

KRYSTYNA ROMANIUKOWA, ZDZISŁAW SYNOWIEDZKI,  
HALINA ROGOZIEWICZ, LECH JAŚKOWSKI

## Pojawienie się tylozyny w nasieniu i tkankach oraz jej wpływ na florę bakteryjną nasienia buhajów po domięśniowych iniekcjach preparatów T<sub>200</sub> i T<sub>50B</sub>

Z Zakładu Fizjopatologii Rozrodu i Inseminacji Instytutu Weterynarii Oddział w Bydgoszczy  
Z Zakładu Technologii i Kontroli Leków Weterynaryjnych Instytutu Weterynarii Oddział w Warszawie

Tylozyna jest antybiotykiem zaliczanym do grupy makrolidów, a działanie jej polega głównie na hamowaniu syntezy białka. Wykazuje ona silne właściwości bakteriostatyczne zarówno w stosunku do drobnoustrojów z grupy Gram-dodatnich, jak i niektórych Gram-ujemnych. Zaobserwowano, że antybiotyk ten bardzo szybko przenika do wszystkich tkanek. Weisel i wsp. (8) donoszą, że tylozyna podana domięśniowo psom w ilości 10 mg/kg wagi ciała osiągała stężenie maksymalne we krwi już po 30 min., które utrzymywało się przez ok. 60 min., a następnie powoli opadało przez 540 min. Wymienione właściwości spowodowały, że antybiotyk ten znalazł szerokie zastosowanie w leczeniu różnych infekcji u zwierząt. Tylozyna stosowana jest głównie w weterynarii i to zarówno jako cenny lek, jak również jako dodatek do pasz w charakterze stymulatora wzrostu (1).

Zdolność szybkiego przenikania tylozyny do różnych tkanek skłoniła autorów do przesłedzenia jak szybko, opracowane preparaty T<sub>200</sub> i T<sub>50B</sub> w formie zastrzyków, zawierające w swoim składzie tylozynę, dwutylo-aminoetylo-dekstran jako adiuwant oraz dodatkowe substancje (7), podane domięśniowo buhajom przenikają do nasienia, w jakim stężeniu, oraz jaki wywierają wpływ na florę bakteryjną nasienia.

### Materiał i metody

Do badania użyto 14 buhajków, rasy ncb, w wieku od 14 do 16 miesięcy, wagi ok. 400 kg, pochodzących z jednej obory. Buhaje podzielono na trzy grupy; — dwie doświadczalne (każda po 5 buhajów) i jedną kontrolną (4 buhaje).

W pierwszej grupie doświadczalnej buhaje otrzymały preparat T<sub>200</sub>, zawierający w 1 ml buforowego roztworu do wstrzykiwań 200 mg tylozyny (zasada); 50 mg dwutylo-aminoetylo-dekstranu (DEAE-D); 2-amino (2 hydroksymetylo) 1—3 propandiolu (Tris); 300 mg glikolu propylenowego; stabilizator; konserwujący oraz ok. 550 ml wody do wstrzykiwań, pH preparatu 6,8—7,5. Dzienna dawka tylozyny zawartej w tym preparacie wynosiła 10 mg na 1 kg wagi ciała, co w przeliczeniu wynosiło 4 g tylozyny na jednego buhaja. Preparat ten podawano domięśniowo dwa razy dziennie po 2 gramy.

Buhaje w drugiej grupie doświadczalnej otrzymały preparat T<sub>50B</sub> zawierający w 1 ml buforowego roztworu do wstrzykiwań 50 mg tylozyny (zasada); 50 mg dwutylo-aminoetylo-dekstranu (DEAE-D); 2-amino/2 hydroksymetylo/1—3 propandiolu (Tris); 300 mg glikolu propylenowego; stabilizator; środek konserwujący oraz ok. 550 ml wody do wstrzykiwań, pH preparatu 6,8—7,5. Dzienna dawka tylozyny zawartej w tym preparacie wynosiła 2,5 mg na 1 kg wagi ciała

tj. 1 g tylozyny na jednego buhaja. Preparat ten podawano domięśniowo (w kilka miejsc) raz dziennie. Podawanie preparatów w obu doświadczalnych grupach kontynuowano przez 4 kolejne dni, następnie robiono 5-dniową przerwę i zabieg powtarzano przez następne 4 dni.

Nasienie do badania pobierano przy pomocy sztucznej pochwy, pierwszy raz przed podaniem preparatu, a następnie po iniekcji preparatów tylozyny, po 2, 5, i 12 godzinach po podaniu preparatu T<sub>200</sub> oraz 24 godz. po podaniu preparatu T<sub>50B</sub>. W trakcie podawania preparatów nasienie do oznaczania tylozyny pobierano także 2-go i 4-go dnia, oraz 24, 48 i 72 godz. po ostatniej iniekcji antybiotyku. Dwa buhaje poddano ubojowi (po jednym z każdej grupy) po 24 godz. od ostatniej iniekcji preparatów i pobierano od nich jądra, nerki oraz wycinki mięśni w celu oznaczenia stężenia tylozyny.

Do wykrywania tylozyny w nasieniu stosowano mikrobiologiczną metodę dołków agarowych wg techniki polecanej przez Grove i Randall (2). Szczep testowy (*Sarcina lutea*), otrzymany z PZH w Warszawie przechowywany był na agarze skośnym. Zawiesinę roboczą otrzymano przez postanie szczepu na bulion z glukozą i inkubację przez 24 godz. Do 100 ml podłoża agarowego dodawano 2 ml tej hodowli bulionowej. Jako podłoża używano 1,5% agaru Difco z dodatkiem 1% glukozy i 0,9% NaCl, pH 8. Do przygotowania standardu używano buforu fosforanowego o pH 7.

Płytki najpierw poziomowano przy pomocy 21 ml podłoża agarowego. Następnie dawano 4 ml tego samego podłoża ze szczepem testowym. Po zastęgnięciu agaru wycinano dołki o średnicy 12 mm, do których, wlewano po 0,2 ml nasienia lub wyciągu z tkanek. Robiono trzykrotne powtórzenia każdej próby. Płytki umieszczano w chłodni (+4°C) na trzy godziny celem kompensacji różnicy dyfuzji nasienia do podłoża, a następnie inkubowano w cieplarni przez 18 godzin. Wyniki odczytywano przez pomiar strefy zahamowania wzrostu bakterii. Równocześnie nastawiono standard tylozyny w rozcieńczeniach od 0,5 do 10,0 mcg/ml.

Wyciąg z tkanek przygotowywano wg metody opracowanej przez Mc Cracen i wsp. (3). Pobrane próby narządów i mięśni najpierw zamrażano w temp. —18°C, następnie 10 g tkanki homogenizowano z 20 ml alkoholu metylowego po czym wirowano przez 15 min. przy 2000 obrotów na minutę. Po odwirowaniu zbierano płyn nad osadu, z którego odparowano alkohol, a w pozostałym ekstrakcie oznaczano tylozynę. W badaniu bakteriologicznym nasienia określano ilość i jakość drobnoustrojów. Do identyfikacji drobnoustrojów używano podłoży wybiórczych (Edwards, Mc Concey i cukrów)

### Wyniki i omówienie

W nasieniu pobranym 2 godziny po pierwszej iniekcji u buhajów, którym podawano preparat T<sub>50B</sub>, wykryto tylozynę w ilości 0,5—1,0 mcg/ml, a w nasieniu buhajów, którym podawano pre-

parat  $T_{200}$  po 1,0 mcg/ml. W próbach pobranych 5 godzin później ilości wykrywanej tylozyny wzrosły i wyniosły średnio 1,0 mcg w nasieniu buhajów otrzymujących preparat  $T_{50B}$  i 1,4 mcg/ml w nasieniu buhajów, którym podawano preparat  $T_{200}$ . Dodać należy, że buhaje, którym podawano preparat  $T_{200}$  otrzymywały w pierwszej iniekcji pół dawki, co w przeliczeniu na ilość tylozyny wynosiło 2 g.

Dalsze oznaczenia tylozyny w nasieniu buhajów w pierwszej serii podawania preparatów wykonano po 12 godzinach u buhajów otrzymujących preparat  $T_{200}$ , i po 24 godzinach u buhajów, którym podawano preparat  $T_{50B}$ . Ilości wykrywanej tylozyny wynosiły odpowiednio od 1,0 do 4,0 mcg/ml i 0,5—1,0 mcg/ml u poszczególnych buhajów.

Tab. 1. Pojawienie się tylozyny w nasieniu buhajów po domięśniowych iniekcjach preparatów  $T_{200}$  i  $T_{50B}$  podawanych przez 13 dni z 5-dniową przerwą

Poziom tylozyny w nasieniu (mcg)				
Po podaniu $T_{50B}$			Po podaniu $T_{200}$	
Czas po ostatniej iniekcji (godz)	$\bar{x}$	s	Czas po ostatniej iniekcji (godz)	$\bar{x}$ s
2	0,7±0,1		2	1,0±0
5	1,0±0,1		5	1,4±0,24
24	0,8±0,12		12	2,6±0,24
24	0,7±0,12		12	2,4±0,51
48	0,4±0,19		36	0,9±0,12
72	0		60	0
Przerwa 5 dni				
2	1,0±0,16		2	0,9±0,3
5	1,0±0,24		5	1,6±0,4
24	1,2±0,2		12	3,8±0,2
24	1,5±0,29		24	2,2±0,9
48	0,7±0,14		48	0,9±0,12
72	0,6±0,13		72	0,4±0,22

Po kolejnych 4 dniach podawania preparatów tylozyny, w nasieniu buhajów, które otrzymywały preparat  $T_{200}$ , antybiotyk wykryto 36 godzin po ostatniej iniekcji, średnio 1,0 mcg/ml, a w nasieniu buhajów premedykowanych preparatem  $T_{50B}$ , ostatni raz tylozynę wykryto po 48 godz. w ilości od 0,5—1,0 mcg/ml (tylko u trzech buhajów).

Tab. 2. Zachowanie się flory bakteryjnej w nasieniu po parenteralnym długotrwałym podawaniu preparatów  $T_{50B}$  i  $T_{200}$

Rodzaje drobnoustrojów	Procent prób nasienia, z którego wyhodowano drobnoustroje								
	$T_{50B}$			$T_{200}$			Buhaje kontrolne		
	I	II	III	I	II	III	I	II	III
<i>Micrococcus sp.</i>	0	13,3	70,0	25,0	6,6	80,0	0	43,7	70,0
<i>Streptococcus sp.</i>	100,0	60,0	86,6	100,0	86,6	73,3	100,0	75,0	66,6
<i>Pseudomonas sp.</i>	0	6,6	0	0	6,6	0	33,3	18,0	0
<i>E. coli</i>	0	66,6	36,6	25,0	40,0	50,0	33,3	22,2	36,6
<i>Proteus sp.</i>	50,0	73,3	16,6	0	73,3	20,0	33,3	50,0	26,6
Laseczki	75,0	53,3	96,6	0	73,3	20,0	33,3	50,0	26,6
Inne	100,0	80,0	90,0	100,0	60,0	76,6	100,0	81,2	80,0
Średnia $n \cdot 10^3$ bakt/ml	129,6	155,0	155,0	122,6	137,5	124,1	140,0	192,0	243,0
Ilość badanych prób	4	15	30	4	15	30	3	16	30

Objaśnienia: I — okres przed iniekcją preparatu; II — okres podania preparatu (13 dni); III — okres po premedykacji (77 dni).

Po 5-dniowej przerwie cały zabieg powtórzone. Tylozyna w nasieniu obu grup buhajów pojawiła się również po dwu godzinach w ilości od 0,5 do 2,0 mcg/ml. W następnych badaniach wykrywano wyższe ilości tylozyny w nasieniu buhajów, które otrzymywały preparat  $T_{200}$  (nawet do 4,0 mcg/ml), niż w nasieniu buhajów, którym podawano preparat  $T_{50B}$ , u których najwyższa średnia wartość tylozyny wynosiła 1,5 mcg/ml. W tej serii badań, 72 godziny po ostatniej iniekcji, wykrywano jeszcze tylozynę w nasieniu wszystkich buhajów, które otrzymywały preparat  $T_{50B}$ , i tylko u dwóch buhajów otrzymujących preparat  $T_{200}$  (tab. 1).

Dwa buhaje (po jednym z każdej grupy) podano ubojowi 24 godz. po ostatniej iniekcji i oznaczano tylozynę w wyciągu z tkanek. U buhaja traktowanego preparatem  $T_{50B}$ , tylozynę wykrywano w wyciągu z nerek (7,5 mcg/ml) i z jąder (1,0 mcg/ml). Natomiast u buhaja premedykowanego preparatem  $T_{200}$ , w wyciągu z nerek wykryto 10 mcg/ml a z jąder 6,0 mcg/ml tylozyny, ponadto tylozynę wykryto w wyciągu z mięśni w ilości 0,5 mcg/ml.

Flora bakteryjna nie zmieniła się w zasadniczy sposób pod wpływem działania stosowanych preparatów. Drobnoustroje, które występowały przed terapią antybiotykową jak np. paciorkowce, w tym głównie *Str. faecalis*, czy laseczki, wykrywano także w czasie trwania kuracji jak również w okresie późniejszym, trwającym do 90 dni po podawaniu buhajom wymienionych preparatów. W okresie podawania preparatów zawierających tylozynę, w nasieniu niektórych buhajów obu grup pojawiły się drobnoustroje z rodz. *Pseudomonas sp.*, które już później nie występowały (tab. 2).

Otrzymane wyniki potwierdzają spostrzeżenia innych autorów (8) o szybkim przenikaniu tylozyny do tkanek i płynów ustrojowych. W dostępnym piśmiennictwie nie natrafiliśmy na pracę dotyczącą stężenia tylozyny w tkance jądrowej i nasieniu po domięśniowym podaniu tego antybiotyku. Zaobserwowane ilości w tkance jądrowej 24 godz. po ostatniej iniekcji preparatu  $T_{200}$  wynosiły 6 mcg/ml. Natomiast po wpro-

wadzeniu preparatu T<sub>50B</sub> wykryto w tym samym okresie tylko 1,0 mcg/ml tylozyny w wyściagu z tkanki jądrowej.

W nasieniu tylozynę wykryto 2 godziny po pierwszej iniekcji w zbliżonych ilościach u obu grup buhajów. Z dalszych jednak obserwacji wynikało, że ilości tylozyny wykrywane w nasieniu były wyższe u buhajów traktowanych preparatem T<sub>200</sub>. Zaobserwowano też, w drugiej serii podawania preparatów, wyższe stężenie tylozyny w nasieniu niż w pierwszej serii. Można zatem sądzić, że tylozyna zawarta w stosowanych preparatach, wprowadzona powtórnie do ustroju po pewnej przerwie łatwiej już pokonuje bariery tkankowe.

Jeżeli przyjąć za innymi autorami (4), że terapeutyczne stężenie tylozyny wynosi 0,7 mcg/ml, to takie stężenie w nasieniu buhajów traktowanych preparatem T<sub>50B</sub> wystąpiło 5 godz. po pierwszej iniekcji i utrzymywało się 24 godziny po ostatniej iniekcji. W przypadku podawania preparatu T<sub>200</sub>, stężenie tylozyny uważane za terapeutyczne wystąpiło w nasieniu już 2 godz. po pierwszej iniekcji i utrzymywało się do 48 godzin po ostatniej iniekcji.

Istnieją jednak podzielone poglądy co do wysokości stosowanych dawek tylozyny i skuteczności osiągniętego stężenia tego antybiotyku w płynach ustrojowych. Weisel i wsp. (8) uważają, że stężenie tylozyny 1,5 mcg/ml nie jest wystarczające do zahamowania wzrostu *Pasteurella sp.*, *Staphylococcus sp.* W naszych badaniach pojawiające się ilości tylozyny w nasieniu (do 4,0 mcg na ml), nie miały większego wpływu na ilość drobnoustrojów, które dostawały się z napletka do nasienia w czasie pobierania prób. Również nie uległa zmianie flora bakteryjna napletka w wyniku obecności tylozyny jak to obserwowaliśmy u buhajów traktowanych chloramfenikolem (5).

Z piśmiennictwa wiadomo, że nie wszystkie antybiotyki docierają do nasienia i tkanki jądrowej w dostatecznej ilości (6), toteż łatwość z jaką tylozyna z preparatów T<sub>50B</sub> i T<sub>200</sub> pokonuje bariery tkankowe, docierając zarówno do tkanki jądrowej jak i nasienia w dużych ilościach, przysposobuje te preparaty do terapeutycznego stosowania przy schorzeniach narządu płciowego samców, wywołanych drobnoustrojami wrażliwymi na tylozynę.

#### Piśmiennictwo

1. Furowiec A.: Prz. hod. 46, 8, 1978.
2. Grove D. C., Randall W. A.: Assay methods of antibiotics a laboratory manual. Medical Encyclopedia. New York, 1955.
3. Mc Cracren A., O'Brien J. J., Campbell N.: Appl. Bact. 41, 129, 1976.
4. Mc Donald M., Biberstein E. L.: Am. J. vet. Res., 35, 1563, 1974.
5. Romaniukowa K., Rogoziewicz H., Hoffman-Woźniak K., Jaśkowski L.: Medycyna Wet. 34, 429, 1978.
6. Samborski Z., Senze A., Dubiel A., Fronczek T.: Pol. Arch. wet. 14, 335, 1971.
7. Synowiedzki Z.: Opracowanie technologii preparatów T<sub>200</sub> i T<sub>50B</sub> do wstrzykiwań domięśniowych zawierających tylozynę i dwuctyloamino-dektran jako adiuwanty. W opracowaniu do druku.
8. Weisel M. K., Powers J. D., Powers T. E., Baugot J. D.: Am. J. vet. Res. 38, 273, 1977.

Adres autora: dr Krystyna Romaniukowa, ul. Świerczewskiego 35/48, 85-224 Bydgoszcz.

Романюк К., Сыноведский З., Рогозевич Г., Яськовский Л. — Появление тилозина в семени и тканях и его влияние на бактериальную флору семени бычков после внутримышечных инъекций препаратов T<sub>200</sub> и T<sub>50B</sub>.

Опыт провели на 14 быках черно-пестрой породы, возрастом 14—16 мес. и весом ок. 400 кг, разделенных на три группы. Первая группа получала по 4 г препарата T<sub>200</sub> ежедневно на одно животное; вторая группа получала по 1 г препарата T<sub>50B</sub> ежедневно на одного бычка. По истечении 4 дней внутримышечных инъекций введение лекарства прервали на 5 дней и повторили в течение последующих 4 дней. Третья группа состояла из 4 контрольных бычков. Тилозин в семени обеих групп бычков открыли через 2 часа после первой инъекции. В следующие дни концентрация тилозина в семени росла до 4 mcg/ml у бычков, премедицированных препаратом T<sub>200</sub> и до 1,5 mcg/ml в семени второй группы бычков.

Во время второго введения бычкам препаратов (10—13 день) концентрация тилозина в семени обеих групп бычков была выше чем после первого (1—4 день), что внушает, что после первого введения этот антибиотик легче преодолевает тканевые барьеры. Бактериальная флора семени не подверглась ни количественному, ни качественному изменению в период премедикации, как и в более поздний период наблюдений, продолжающийся до 90 дней.

Romaniukowa K., Synowiedzki Z., Rogoziewicz H., Jaśkowski L. — The appearance of tylosin in tissues and semen of bulls and its influence on seminal bacterial flora following intramuscular injections of the preparates T<sub>200</sub> and T<sub>50B</sub>.

The experiment was carried out on 14 bulls of black and white lowland breed at the age of 14—16 months and weighing by 400 kg divided into 3 groups. Group 1 received 4.0 g of preparate T<sub>200</sub> daily per animal. Group 2 was injected 1.0 g of T<sub>50B</sub> daily. After 4 days of intramuscular injections the treatment was discontinued for 5 days and repeated for 4 days. Group 3 consisted of 4 untreated controls.

Tylosine was detected in the semen of both groups of bulls after 2 hr following the first injection. On the next days tylosine concentration in the semen rose up to 4.0 mcg/ml in the animals treated with T<sub>200</sub> and up to 1.5 mcg/ml in the semen of the second group of animals.

During the second treatment (day 10—13) the concentration of the antibiotic in the semen of both groups of animals was higher than that in the first one (1—4 day), which suggested an easier passage of the antibiotic through the tissue barrier. The concentration of tylosine in tissue extracts of testes 24 hr after the last injection was 6.0 mcg/ml. The seminal flora did not change during the treatment and 90 days after the application of the preparates.

MITTAL K. R., TIZARD J. R.: Badania doświadczalne nad pekrewieństwem serologicznym *Yersinia enterocolitica* i *Brucella abortus*. (Experimental studies on the serological relationships between *Yersinia enterocolitica* and *Brucella abortus*). Res. vet. Sci. 27, 354—360, 1979 (3).

Podobieństwo seroantygennowe między lipopolisacharydami *Yersinia enterocolitica* i *Brucella abortus* powodują błędne interpretacje wyników badań serologicznych w kierunku brucellozy. Badania przeprowadzone z surowicami cieląt zaszczepionych *Brucella abortus* S19 oraz *Yersinia enterocolitica* O9 wykazały, że odczynny aglutynacji z użyciem antygenów O, OH i H umożliwia odróżnienie zakażeń wywołanych przez *Brucella abortus* i *Yersinia enterocolitica*.

G.