

Występowanie i wrażliwość na antybiotyki warunkowo chorobotwórczych bakterii izolowanych z nasienia ogierów

Zakład Chorób Koni Bydgoskiego Oddziału Instytutu Weterynarii w Puławach, Al. Powstańców Wlkp. 10, 85-090 Bydgoszcz

Summary

Prevalence and sensitivity to antibiotics of facultative pathogenic bacteria isolated from the semen of stallions

295 ejaculates of 150 stallions of various breeds (full English, Great Polish, Hannover and Polish pony) used for mating in 17 horse breeding centres in Poland were examined bacteriologically. More than 23% of ejaculates were contaminated with facultative pathogenic bacteria, mostly by *Pseudomonas aeruginosa* (10% of samples) sensitive to streptomycin (100%) and neomycin (8%). *Str. zooepidemicus* was also isolated (9.5%), sensitive mostly to chloramphenicol (73%), penicillin (64%) and oxytetracycline (50% of strains).

Ejakulat ogiera może zawierać obok flory saprofitycznej, także drobnoustroje warunkowo chorobotwórcze, określane jako bakterie oportunistyczne, czy nawet patogenne o różnym stopniu zjadliwości (3, 6, 7, 15, 16, 19, 22, 23). Mogą one być pochodzenia wewnętrznego, w związku z infekcją wewnętrznych narządów płciowych samca (5, 11), ale częściej są pochodzenia zewnętrznego (obecność na prąciu, w fałdach napletka czy w cewce moczopłciowej), co jednak nie umniejsza znaczenia występowania zarazka w spermie i roli, jaką może on odegrać w wywoływaniu stanów zapalnych narządów płciowych klaczy i ich jałowości (1, 8, 9, 17). Powyższe zagrożenia determinują więc określone postępowanie profilaktyczne i terapeutyczne (13, 16, 20, 24).

Celem pracy było określenie odsetka ejakulatów zawierających bakterie warunkowo chorobotwórcze u ogierów używanych do krycia w ośrodkach hodowli koni w Polsce, a także ocena wrażliwości najczęściej izolowanych szczepów bakterii na wybrane antybiotyki.

Materiał i metody

W sezonach rozrodczych 1985-1990 poddano ocenie bakteriologicznej 295 ejakulatów pobranych od 150 klinicznie zdrowych ogierów różnych ras (pełnej krwi angielskiej, wielkopolskiej, hanowerskiej i konika polskiego) z 17 ośrodków hodowli koni w Polsce.

Ejakulaty do badań pobierano przy użyciu wyjałowionego sprzętu, bez wstępnej toalety prącia i napletka ogiera i w takich warunkach, w jakich było prowadzone naturalne stanowienie w ośrodku hodowlanym. Nasienie po pobraniu przy użyciu sztucznej pochwy (model zamknięty) i oddzieleniu frakcji galaretowatej przy pomocy sterylnej gazy, przewożono w termosie w temp. +4°C i w jak najkrótszym czasie poddawano badaniu mikrobiologicznemu. Posiewy wykonywano na agarze z krwią, podłożu McConkeya oraz Levina. Jakościowy skład bakteryjny nasienia określano za pomocą rutynowych kryteriów przynależności rodzajowej i szczepowej drobnoustrojów, a ogólną ich liczbę oznaczano metodą płytkową. Wrażliwość na antybiotyki izolowanych szczepów bakterii chorobotwórczych określano metodą krążkową.

Wyniki i omówienie

Stopień bakteryjnego zanieczyszczenia badanych ejakulatów był znaczny, gdyż średnia liczba bakterii w 1 ml nasienia wynosiła $3,13 \times 10^5$ komórek. Wśród 295 ocenianych ejakulatów aż w 68 przypadkach izolowano warunkowo chorobotwórcze bakterie, co stanowi przeszło 23% prób (tab. 1). Dane te są zbieżne z wynikami badań przeprowadzonych w latach 1970-1980 w Polsce, w których w 22% ejakulatów ogierów wykazano obecność bakterii chorobotwórczych (14). Liczba i rodzaj bakterii w świeżo pobranym nasieniu mogą być bardzo różne i zmienne w okresach przed, w czasie i po sezonie rozrodczym koni. Zależą one w dużej mierze od stopnia zanieczyszczenia dróg moczopłciowych samca, ale przede wszystkim od obecności, zdeterminowanej środowiskowo, różnorodnej flory bakteryjnej zewnętrznego pochodzenia. Na określony udział mikroorganizmów w nasieniu ogierów mają też wpływ zabiegi stosowane w ramach tzw. higieny krycia oraz metoda i technika pobierania ejakulatów (6, 7, 10, 15, 16, 18, 19, 21, 22, 23).

Użycie modelu pochwy zamkniętej do pobierania ejakulatu daje możliwość oceny zanieczyszczenia mikrobiologicznego nasienia, obejmującego zarówno obecność drobnoustrojów pochodzenia zewnętrznego, jak i wewnętrznego, co naszym zdaniem jest odbiciem mniej lub bardziej prawdopodobnych sytuacji występujących przy naturalnym kryciu. Szereg autorów stosując ten właśnie sposób pobierania ejakulatów wykazało obecność w nasieniu ogierów wielu rodzajów saprofitycznych i warunkowo chorobotwórczych bakterii, a wśród nich *Pseudomonas sp.*, *E. coli*, *Klebsiella*, *Aerobacter (Enterobacter)*, *Proteus sp.*, *Staphylococcus sp.*, *Streptococcus sp.* i innych (3, 6, 7, 10, 13, 15, 16, 19, 20). Użycie z kolei pochwy otwartej pozwala na uzyskanie większej liczby ejakulatów wolnych od bakterii, frakcji bogatych w plemniki (21), co jest niezmiernie ważne przy inseminacji koni. Ten sposób pobierania nasienia pozwala również na analizę jego poszczególnych fra-

Tab. 1. Odsetek ejakulatów zawierających bakterie warunkowo chorobotwórcze (n=295)

| Badane cechy | % prób dodatnich |
|---|------------------|
| Ejakulaty zanieczyszczone bakteriami warunkowo chorobotwórczymi | 23,05 |
| w tym: | |
| <i>Streptococcus zooepidemicus</i> | 9,50 |
| <i>Streptococcus equisimilis</i> | 1,00 |
| <i>Streptococcus equi</i> | 0,03 |
| <i>Streptococcus pyogenes</i> | 0,03 |
| <i>Staphylococcus aureus</i> | 1,70 |
| <i>Escherichia coli</i> (hemolit.) | 1,00 |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | 10,00 |
| <i>Pseudomonas fluorescens</i> | 0,07 |
| <i>Corynebacterium equi</i> | 0,03 |

Objaśnienie: n – liczba ejakulatów

kcji i wyrzutów w celu dokładnego umiejscowienia źródła infekcji, szczególnie wówczas, gdy proces chorobowy dotyczy np. dodatkowych gruczołów płciowych ogiera (5). Tischner i Kosiniak (22) wykazali, że odsetek wolnych od bakterii ejakulatów maleje, a liczba drobnoustrojów i ich rodzajów wzrasta wraz ze zwiększeniem się liczby skoków oddawanych przez ogiera do ejakulacji (2 i więcej). Autorzy ci (23) badając również bakteriologicznie pierwsze ejakulatory 200 ogierów w okresie okołosezonowym, wykazali w 41% prób brak, a w 59% obecność różnego typu saprofitycznych i potencjalnie chorobotwórczych bakterii z rodzajów: *Streptococcus sp.*, *Staphylococcus sp.*, *Corynebacterium sp.* i szczepu *E. coli*.

Rezultaty badań własnych są podobne do tych ustaleń i wykazują w decydującym stopniu obecność w nasieniu beta hemolitycznych paciorkowców, w tym: *Str. zooepidemicus* (9,5%), *Str. equisimilis* (1,0%) i *Str. equi* (0,03% prób). Na występowanie paciorkowców w ejakulatach ogierów zwracano już w Polsce uwagę (3, 8, 10, 20). Dotychczasowe ustalenia potwierdzają aktualność omawianego problemu i jest to tym bardziej ważne, że odnotowano w czasie prowadzonych badań ronienia u klaczy krytych ogierami, z których nasienia izolowano *Str. zooepidemicus* oraz wykazano nosicielstwo tego paciorkowca u ogiera w kolejnych sezonach rozrodczych. Na uwagę zasługuje również obecność w nasieniu paciorkowca zołzowego – *Str. equi*, a jego izolacja mogła być związana z określoną sytuacją epizootyczną w stadzie.

Bakterią gramujemną, najczęściej izolowaną z nasienia ogierów, była pałeczka ropy błękitnej – *Pseudomonas aeruginosa* (10,0% prób). Obecność tego drobnoustroju w nasieniu ogierów wykazało wielu autorów (6, 13, 15, 16, 19). Stanowi on często tylko mały odsetek różnych bakteryjnych populacji i izolowany jest przeważnie od samców z normalną płodnością (10). Z kolei problem wyjątkowej zjadliwości określonych serotypów *Ps. aeruginosa* w świetle badań Athertona (2) nie jest do końca jasny. Badania własne wykazały tylko, że bakteria ta najczęściej występowała w nasieniu ogierów pełnej krwi (40% prób dodatnich) i hanowerów (28,5% prób), a najrzadziej u wielkopolskich (6,0% prób) i konika polskiego (5,0% prób).

Bakterie występujące w nasieniu ogierów mogą być przenoszone w czasie krycia i często wykazywane są jako czynniki etiologiczne stanów zapalnych macicy klaczy, ronień i jałowości (1, 4, 8, 9, 12, 15, 17, 25). Mogą być też przyczyną infekcji narządów płciowych ogiera; opisane zostały ostatnio przypadki zapalenia najądrzy wywołanego przez *Str. zooepi-*

demicus (11) oraz bańki nasieniowodu i gruczołów pęcherzykowych przez *Ps. aeruginosa* (5).

Z tych też względów dużego znaczenia nabierają wyniki oceny wrażliwości na antybiotyki bakterii najczęściej izolowanych z nasienia krajowych ogierów, które przedstawiono w tab. 2. Okazało się, że *Streptococcus zooepidemicus* był najbardziej wrażliwy na chloramfenikol (73%), penicylinę (64%) i oksytetracyklinę (59% szczepów), a najmniej na kloksacylinę (4,5% szczepów). Podobne wyniki uzyskał Rostel (15) stwierdzając, że hemolityczne paciorkowce izolowane z nasienia ogierów wrażliwe były w 70,3% na chloramfenikol, a 45,2% na penicylinę oraz Renner (16), który potwierdził wrażliwość hemolitycznych paciorkowców na chloramfenikol, penicylinę, erytromycynę, tetracyklinę, ampicylinę, a oporność między innymi na gentamycynę, kanamycynę i neomycynę.

Pseudomonas aeruginosa był szczególnie wrażliwy na streptomycynę (100%) i na neomycynę (8% szczepów), a oporny na większość pozostałych antybiotyków. Wielu autorów stwierdziło, że zarówno u klaczy, jak i ogierów bakteria ta jest oporna na szereg chemioterapeutyków oraz wywołuje trudno wyleczalne stany zapalne narządów płciowych (2, 5, 13, 16).

Przedstawione wyniki badania bakteriologicznego ejakulatów ogierów obrazują zanieczyszczenie nasienia różnymi rodzajami bakterii warunkowo chorobotwórczych. Należy mieć jednak świadomość, że są to drobnoustroje, które współżyją ze zwierzęciem lub znajdują się w bezpośrednim środowisku jego bytowania i w zwykłych warunkach nie wywołują choroby. Jest jednak szereg czynników, które powodują, że nieszkodliwe dotąd szczepy nabierają właściwości chorobotwórczych, a problem wtedy może mieć nie tylko charakter indywidualny, ale również środowiskowy, często związany z określonym stadem i sezonem rozrodczym.

Piśmiennictwo

- Allen W.E., Newcombe J.R.: Vet. Rec. 104, 228, 1979.
- Atherton J.G.: Equine vet. J. 14, 329, 1982.
- Biełański W., Chodkowski A., Szaflarski J.: Medycyna Wet. 5, 442, 1949.
- Bader H., Merkt H.: Tierärztl. Umsch. 47, 67, 1992.
- Blanchard T.L., Verner D.D., Hurtgen J.P., Love C.C., Cummings M.R., Strzemiński P.J., Benson C., Kenney R.M.: J. Am. vet. med. Ass. 192, 525, 1988.
- Bowen J.M., Tobin N., Simpson R.B., Ley W.B., Anasani M.M.: J. Reprod. Fert. Suppl. 32, 41, 1982.
- Burns S.J., Simpson R.B., Snell J.R.: J. Reprod. Fert., Suppl. 23, 139, 1975.
- Chodkowski A., Szaflarski J.: Anns. Univ. Mariae Curie-Skłodowska sect. DD, 6, 39, 1951.
- Crouch J.R.F., Atherton J.G., Platt H.: Vet. Rec. 90, 21, 1972.
- Danek J., Wiśniewski E., Klimczak J.: Bull. vet. Inst. Puławy 38, 94, 1993.
- Held J.P., Adair S., McGavin M.D., Adams W.H., Toal R., Henton J.: J. Am. vet. med. Ass. 197, 602, 1990.
- Hughes K.L.: Aust. vet. J. 51, 282, 1975.
- Hughes J.P., Asbury A.C., Loy R.G., Burd H.E.: Cornell Vet. 57, 53, 1967.
- Kosiniak K.: Koń Pol. 3, 4, 1983.
- Röstel W.: Tierärztl. Umsch. 30, 66, 1975.
- Renner C.: Tiefgefrierkonservierung von Hengstperma in Kunststoffröhrchen mit unterschiedlichen Volumina. Praca dokt., Justus Liebig-Universität, Giessen 1991.
- Ricketts S.W.: Vet. Rec. 17, 46, 1981.
- Scherbarth R., Krüger A., Flüge A.: Dt. tierärztl. Wschr. 83, 35, 1976.
- Sigler D.H., Kiracofe G.H.: Equine Vet. Sci. 8, 160, 1988.
- Strumillo Z.: Medycyna Wet. 13, 257, 1957.
- Tischner M., Kosiniak K., Biełański W.: J. Reprod. Fert., Suppl. 41, 329, 1974.

Tab. 2. Wrażliwość (w %) *Str. zooepidemicus* oraz *Ps. aeruginosa* izolowanych z nasienia ogierów na wybrane antybiotyki

| Antybiotyk | <i>Str. zooepidemicus</i> | | | <i>Ps. aeruginosa</i> | | |
|------------------|---------------------------|------|------|-----------------------|------|-------|
| | w | św | o | w | św | o |
| Ampicylina | 32,0 | 9,0 | 59,0 | 0 | 0 | 100,0 |
| Chloramfenikol | 73,0 | 4,5 | 22,5 | 0 | 8,0 | 92,0 |
| Erytromycyna | 36,5 | 4,5 | 59,0 | 0 | 0 | 100,0 |
| Gentamycyna | 4,5 | 9,0 | 86,5 | 4,0 | 4,0 | 96,0 |
| Kloksacylina | 4,5 | 4,5 | 91,0 | 0 | 0 | 100,0 |
| Linkomycyna | 9,0 | 4,5 | 86,5 | 0 | 0 | 100,0 |
| Neomycyna | 23,0 | 41,0 | 36,0 | 8,0 | 71,0 | 21,0 |
| Oksytetracyklina | 59,0 | 32,0 | 9,0 | 0 | 4,0 | 96,0 |
| Penicylina | 64,0 | 14,0 | 22,0 | 0 | 0 | 100,0 |
| Streptomycyna | 36,0 | 41,0 | 23,0 | 100 | 0 | 0 |

Objaśnienia: w – wrażliwe, św – średniowrażliwe, o – opome

22. Tischner M., Kosiniak K.: Vlaams Dierg. Tijdschr. 55, 90, 1986.
 23. Tischner M., Kosiniak K.: Acta vet. scand. Suppl. 88, 83, 1992.
 24. Varner D.D., Schumacher J., Blanchard T.L., Johnson L.: Diseases and Management of Breeding Stallions. American Vet. Publ., Inc. Goleta, CA, 1991.

25. Wiśniewski E., Danek J.: Życie wet. 62, 329, 1987.

Adres autora: dr Janusz Danek, ul. Witeckiego 2/46, 85-791 Bydgoszcz

ALICJA KUREK, STEFAN KOSSAKOWSKI, ANDRZEJ LEDWOŻYŃ

Aktywność esterazy neurotoksycznej u kur wielokrotnie zatrutowanych DFP

Zakład Ochrony Radiologicznej i Badań Izotopowych, Instytut Weterynarii, Al. Partyzantów 57, 24-100 Puławy

Summary

Activity of neurotoxic esterase in hens poisoned over a period of time with DFP

The studies were carried out on 30 hens of the Leghorn breed, which were being poisoned with DFP for 20 days at a rate of 0.05 mg per 1 kg. The activity of AChE was determined in the plasma, brain and spinal cord and the activity of NTE in the brain and spinal cord after 1, 5, 15 and 20 days. In poisoned hens the activity of AChE decreased after the 1st injection to 55 per cent and did not change for up to 20 days; it fell to 82 per cent in the brain after 5 days and was on the same level for up to 20 days. In contrast, the activity of AChE in the spinal cord decreased successively up to 71 per cent after 20 days. The NTE activity in the brain dropped to 46 per cent and in the spinal cord to 40 per cent after 20 days.

Związki fosforoorganiczne (FO) mogą wywoływać u ludzi i zwierząt opóźniony efekt neurotoksyczny, który jest całkiem odmienny od ostrej odpowiedzi toksycznej, związanej z działaniem antycholinesterazowym. Nie występuje on nigdy wcześniej niż w 8 dni po zatruciu, a w łagodniejszych przypadkach występuje w okresie do 3-4 tygodni. Efekty te dotyczą głównie długich aksonów rdzenia kręgowego i nerwów obwodowych; zwykle są bardziej rozwinięte w kończynach tylnych – nogach aniżeli przednich – rękach (4).

Opóźniona neuropatia została po raz pierwszy rozpoznana przez Larota w 1899 r. u gruźlika leczonego fosfokreozotem, a opisana po raz pierwszy przez Smitha i wsp. w 1933 r. Przypadki tej choroby stwierdzano w Holandii, Niemczech, Francji u kobiet stosujących wyciąg z pietruszki z dodatkiem TOCP do wywołania aborcji, a także u żołnierzy niemieckich i francuskich w czasie II wojny światowej w wyniku używania oleju jadalnego zafaszowanego TOCP (22). Najpoważniejsze zatrucia z przypadkami neuropatii, obejmujące około 10 000 osób, wywołane zafaszowanym TOCP olejem jadalnym, miały miejsce w 1959 r. w Maroku (16).

Opóźnione neuropatie mogą występować również u osób zawodowo stosujących rozpuszczalniki, farby, lakiery, skóry naturalne i sztuczne i materiały plastikowe zawierające TOCP, środek zwiększający ich plastyczność (23).

Jeśli chodzi o pestycydy, to po raz pierwszy stwierdzono w USA neurotoksyczne działanie Leptofosu (2) i w związku z tym odwołano jakąkolwiek tolerancję dla tego związku w żywności oraz wprowadzono bieżącą kontrolę związków FO

przed ich dopuszczeniem do stosowania. Kontrole takie wprowadzono następnie w Wielkiej Brytanii, Niemczech, Kanadzie i innych krajach. Badania testowe tego typu polegają na oznaczaniu neurotoksycznej esterazy (NTE) u kur w wieku powyżej 180 dni otrzymujących testowany związek FO.

W związku z tym podjęto badania porównawcze aktywności acetylocholinoesterazy (AChE) i NTE w mózgu i rdzeniu kręgowym kur po wielokrotnym podawaniu DFP, który jest typowym związkiem FO o działaniu neurotoksycznym.

Materiał i metody

Badania przeprowadzono na 30 kurach rasy Leghorn w wieku 12 miesięcy o masie ciała 1,8-2,4 kg. Zwierzęta przez cały okres doświadczenia były żywione standardową dietą z nieograniczonym dostępem do wody.

DFP (fluorofosforan dwuizopropylowy) rozpuszczony w mieszaninie glikolu propylenowego z alkoholem etylowym (1:1) w stężeniu 1 mg DFP/1 ml podawano kurom domięsniowo codziennie przez 20 dni w dawkach 0,05 mg/kg.

Oznaczanie aktywności AChE w osoczu, mózgu i rdzeniu kręgowym wykonano po 1, 5, 10, 15 i 20 dniach metodą Hestrina opisaną przez Juszkiewicza i wsp. (14). Oznaczanie NTE w mózgu i rdzeniu kręgowym wykonano w tych samych okresach metodą Johnsona (11). Zawartość białka w badanych tkankach oznaczano metodą Lowry i wsp. (21).

Krew do oznaczeń aktywności AChE w osoczu pobierano z żyły skrzydłowej. Do oznaczeń aktywności AChE i NTE w mózgu i rdzeniu kręgowym kury zabijano przez dekapitację bez narkozy. Aktywność enzymów oznaczano bezpośrednio po pobraniu prób.

Wyniki badań

Aktywność AChE w osoczu przed podaniem DFP wynosiła (w nM/min/ml/ 650±43 (100%). Po pierwszej iniekcji DFP aktywność AChE zmniejszyła się w ciągu 24 godz. do 354±30 (55%). Następne, codzienne iniekcje DFP nie zmieniały istotnie aktywności AChE, która po 20 dniach wynosiła 344,5±25 (53%).

Aktywność AChE w homogenatach mózgu (ryc. 1) przed podaniem DFP wynosiła (w μM/min/g tkanki) 23,3±1,8 (100%). Po pierwszej iniekcji DFP zmniejszyła się do 21,9±2,0 (94%). W ciągu 5 dni następował dalszy spadek aktywności AChE do 19,1±1,5 (82%) i w ciągu kolejnych iniekcji DFP aktywność AChE utrzymywała się na podobnym poziomie, wynoszącym po 20 dniach 19,6±2,0 (84%).

Aktywność AChE w homogenatach rdzenia kręgowego (ryc. 1) przed podaniem DFP wynosiła (w μM/min/g tkan-