

**UNIwersYTET PRZYRODnicZY W LUBLINIE**  
**WYDZIAŁ MEDYCYNY WETERYNARYJNEJ**  
**DYSCYPLINA WETERYNARIA**

lek. wet. mgr MBA Krzysztof Bourdo

Rozprawa doktorska

Doctoral thesis

*Profil farmakokinetyczny oraz zanikanie pozostałości  
wybranych leków przeciwbakteryjnych u gęsi domowej.*

*Pharmacokinetic profile and residue depletion of selected  
antibacterial drugs in domestic geese.*

Praca wykonana pod kierunkiem  
dr hab. Beaty Łebkowskiej-Wieruszewskiej, prof. uczelni

Katedra Farmakologii, Toksykologii i Ochrony Środowiska  
Wydział Medycyny Weterynaryjnej  
Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie

Lublin 2026



## Podziękowania

*Dziękuję mojemu promotorowi,  
Pani dr hab. Beacie Łebkowskiej-Wieruszewskiej  
za inspirację, cierpliwość i nieocenioną pomoc,  
co pozwoliło mi zrealizować tę pracę.*



### Oświadczenie promotora rozprawy doktorskiej

Oświadczam, że niniejsza rozprawa doktorska została przygotowana pod moim kierunkiem i stwierdzam, że spełnia ona warunki do przedstawienia jej w postępowaniu o nadanie stopnia naukowego.

Data 08.05.2026v

Podpis promotora .....

### Oświadczenie autora rozprawy doktorskiej

Świadom odpowiedzialności prawnej oświadczam, że:

- niniejsza rozprawa doktorska została przygotowana przeze mnie samodzielnie pod kierunkiem Promotora i nie zawiera treści uzyskanych w sposób niezgodny z obowiązującymi przepisami;
- przedstawiona rozprawa doktorska nie była wcześniej przedmiotem procedur związanych z uzyskaniem stopnia naukowego;
- niniejsza wersja rozprawy doktorskiej jest tożsama z załączoną na pendrive wersją elektroniczną.

Data 08.05.2026v

Podpis autora .....



**W skład niniejszej rozprawy doktorskiej wchodzi trzy publikacje z listy czasopism punktowanych MNiSW:**

1. Bourdo K., Fadel C., Giorgi M., Sitovs A., Poapolathep A., Łebkowska-Wieruszewska B. (2024) Disposition kinetics and tissue residues of tilmicosin following intravenous, subcutaneous, single and multiple oral dosing in geese (*Anser anser domesticus*). *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, Sept., Vol. 47, Iss. 5, s. 416-426, DOI: 10.1111/jvp.13461  
(*IF: 1,7; pkt.70*)
2. Bourdo K., Fadel C., Giorgi M., Gajda A., Bilecka M., Poapolathep A., Łebkowska-Wieruszewska B. (2024) Pharmacokinetics and tissue residues of colistin following intravenous, and single and repeated oral dosing in domestic geese (*Anser anser domesticus*). *Veterinary Journal*, Dec., Vol. 308, 106245, DOI: 10.1016/j.tvjl.2024.106245  
(*IF: 3,1; pkt. 140*)
3. Bourdo K., Fadel C., Giorgi M., Gbylik-Sikorska M., Matras A., Poapolathep A., Łebkowska-Wieruszewska B. (2026) Disposition kinetics and tissue residues of Lincomycin following intravenous, intramuscular and single and multiple oral dosing in domestic geese (*Anser anser domesticus*). *British Poultry Science*, Feb., Vol. 67, Iss. 1, s. 9-17, DOI: 10.1080/00071668.2025.2524711  
(*IF: 1,7; pkt. 100*)

Sumaryczna liczba punktów według komunikatu MNiSW obowiązującego w roku wydania pracy: 310 punktów; IF: 6,5



## **Spis treści**

Wykaz skrótów.....	13
<b>I. WSTĘP.....</b>	<b>19</b>
1. GĘSI – CHARAKTERYSTYKA GATUNKU.....	20
2. CHARAKTERYSTYKA WYBRANYCH LEKÓW PRZECIWDROBNOUSTROJOWYCH.....	24
2.1. Tylmikozyzna.....	25
2.2. Kolistyna.....	31
2.3. Linkomycyna.....	38
3. BADANIA FARMAKOKINETYCZNE – CHARAKTERYSTYKA WYBRANYCH PARAMETRÓW.....	44
3.1. Losy leku w ustroju.....	45
3.2. Farmakokinetyka kompartmentowa/niekompartmentowa.....	49
3.3. Podstawowe parametry farmakokinetyczne.....	50
4. BADANIA POZOSTAŁOŚCI I WYZNACZANIE OKRESU KARENCJI.....	58
4.1. Badania pozostałości tylmikozyzny.....	60
4.2. Badania pozostałości kolistyny.....	62
4.3. Badania pozostałości linkomycyny.....	66
4.4. Wyznaczanie okresu karencji.....	68
5. METODY OZNACZANIA LEKÓW W MATERIALE BIOLOGICZNYM.....	69
5.1. Metody oznaczania tylmikozyzny.....	70
5.2. Metody oznaczania kolistyny.....	70
5.3. Metody oznaczania linkomycyny.....	71
5.4. Walidacja metod analitycznych.....	72
<b>II. CEL BADAŃ.....</b>	<b>76</b>
<b>III. PROFIL FARMAKOKINETYCZNY ORAZ ZANIKANIE POZOSTAŁOŚCI TYLMIKOZYNY PO JEDNORAZOWYM PODANIU DOŻYLNYM, PODSKÓRNYM I DOUSTNYM ORAZ WIELOKROTNYM DOUSTNYM U GĘSI DOMOWEJ.....</b>	<b>77</b>

III.1. Materiały i metody .....	77
III.1.1. Zwierzęta .....	77
III.1.2. Oznaczanie tylnikozyny w osoczu oraz tkankach .....	78
III.1.3. Walidacja metody analitycznej .....	79
III.1.4. Analiza statystyczna oraz farmakokinetyczna .....	80
III.1.5. Analiza pozostałości i oszacowanie okresu karencji .....	81
III.2. Wyniki .....	81
III.2.1. Walidacja metody .....	81
III.2.2. Profil farmakokinetyczny .....	82
III.2.3. Oszacowanie okresu karencji .....	86
III.3. Dyskusja .....	89
III.3.1. Analiza profilu farmakokinetycznego .....	89
III.3.2. Okres karencji .....	92

<b>IV. PROFIL FARMAKOKINETYCZNY ORAZ ZANIKANIE POZOSTAŁOŚCI KOLISTYNY PO JEDNORAZOWYM PODANIU DOŻYLNYM I DOUSTNYM ORAZ WIELOKROTNYM DOUSTNYM U GĘSI DOMOWEJ .....</b>	<b>94</b>
IV.1. Materiały i metody .....	94
IV.1.1. Zwierzęta .....	94
IV.1.2. Oznaczanie kolistyny w osoczu oraz tkankach .....	96
IV.1.3. Walidacja metody analitycznej .....	97
IV.1.4. Analiza statystyczna oraz farmakokinetyczna .....	97
IV.1.5. Analiza pozostałości i oszacowanie okresu karencji .....	98
IV.2. Wyniki .....	99
IV.2.1. Walidacja metody .....	99
IV.2.2. Profil farmakokinetyczny .....	101
IV.2.3. Pozostałości w tkankach .....	105
IV.3. Dyskusja .....	106
IV.3.1. Analiza profilu farmakokinetycznego .....	106
IV.3.2. Rozkład pozostałości w tkankach .....	108

<b>V. PROFIL FARMAKOKINETYCZNY ORAZ ZANIKANIE POZOSTAŁOŚCI LINKOMYCYNY PO JEDNORAZOWYM PODANIU DOŻYLNYM, DOMIĘŚNIOWYM I DOUSTNYM ORAZ WIELOKROTNYM DOUSTNYM U GĘSI DOMOWEJ</b> .....	110
V.1. Materiały i metody .....	110
V.1.1. Zwierzęta .....	110
V.1.2. Oznaczanie linkomycyny w osoczu oraz tkankach .....	112
V.1.3. Walidacja metody analitycznej .....	113
V.1.4. Analiza statystyczna oraz farmakokinetyczna .....	114
V.1.5. Analiza pozostałości i oszacowanie okresu karencji .....	115
V.2. Wyniki .....	115
V.2.1. Walidacja metody .....	115
V.2.2. Profil farmakokinetyczny .....	117
V.2.3. Oszacowanie okresu karencji .....	121
V.3. Dyskusja .....	124
V.3.1. Analiza profilu farmakokinetycznego .....	124
V.3.2. Okres karencji .....	127
<b>VI. WNIOSKI</b> .....	128
<b>VII. STRESZCZENIE W JĘZYKU POLSKIM</b> .....	130
<b>VIII. STRESZCZENIE W JĘZYKU ANGIELSKIM (ABSTRACT)</b> .....	133
<b>IX. PIŚMIENNICTWO</b> .....	136
<b>X. SPIS RYCIN I TABEL</b> .....	162
<b>XI. PUBLIKACJE WCHODZĄCE W SKŁAD CYKLU</b> .....	165
<b>XII. OŚWIADCZENIA</b> .....	194



## Wykaz skrótów

ACN	acetonitryl
ADI	z ang. <i>Acceptable Daily Intake</i> - dopuszczalne dzienne spożycie
APCI	z ang. <i>Atmospheric Pressure Chemical Ionization</i> - jonizacja chemiczna pod ciśnieniem atmosferycznym
AUC	z ang. <i>Area Under the Curve</i> - pole powierzchni pod krzywą zależności stężenia leku od czasu
AUC 0-24	pole powierzchni pod krzywą stężenia leku we krwi w czasie 24 godzin od podania
AUC <sub>0-∞/rest/last</sub>	pole powierzchni pod krzywą stężenia leku we krwi mierzone od momentu podania (czas 0) do nieskończoności (całkowitej eliminacji leku z organizmu)
AUMC	z ang. <i>Area Under the Moment Curve</i> - pole powierzchni pod krzywą momentu czasowego
C	z ang. <i>Concentration</i> - stężenie leku w osoczu
CCa	z ang. <i>Decision Limit</i> - decyzyjna wartość graniczna
CCb	z ang. <i>Detection Capability</i> - zdolność wykrywania
CFU	z ang. <i>Colony-forming unit</i> - jednostka tworząca kolonię
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	dichlorometan
Cl	z ang. <i>Clearance</i> - klirens
Cl <sub>nerkowy</sub>	klirens nerkowy
Cl <sub>tot</sub>	klirens całkowity
Cl <sub>wątrobowy</sub>	klirens wątrobowy
Cl <sub>wewn</sub>	klirens wątrobowy wewnętrzny
C <sub>max</sub>	maksymalne (szczytowe) stężenie leku we krwi
CMS	z ang. <i>colistin methanesulphonate</i> - kolistymetat sodu
CV	z ang. <i>Coefficient of Variation</i> - współczynnik zmienności
CVMP	<i>The Committee for Veterinary Medicinal Products</i> - Komitet ds. Weterynaryjnych Produktów Leczniczych
CYP450	cytochrom P450
DNA	kwask deoksyrybonukleinowy
E <sub>body</sub>	współczynnik ekstrakcji

EFSA	<i>European Food Safety Authority</i> - Europejski Urząd ds. Bezpieczeństwa Żywności
ELISA	<i>z ang. enzyme-linked immunosorbent assay</i> - test immunoenzymatyczny
EMA	<i>The European Medicines Agency</i> - Europejska Agencja Leków
EMEA	<i>European Medicines Evaluation Agency</i> - Europejska Agencja ds. Oceny Produktów Leczniczych przekształcona w 2004 roku w EMA
ESI	<i>z ang. Electrospray Ionization</i> - jonizacja elektrorozpyleniowa; chromatografia cieczowa sprzężona z tandemową spektrometrią mas z jonizacją elektrosprajową
EWG	Europejska Wspólnota Gospodarcza
F	biodostępność
FAO	<i>z ang. Food and Agriculture Organization of the United Nations</i> - Organizacja Narodów Zjednoczonych ds. Wyżywienia i Rolnictwa
fu, P	frakcja niezwiązana leku w osoczu
fu, T	powinowactwo do tkanek
GC-MS	<i>z ang. Gas Chromatography-Mass Spectrometry</i> - chromatografia gazowa sprzężona ze spektrometrią mas
GC-MS/MS	<i>z ang. Gas Chromatography-Tandem Mass Spectrometry</i> - chromatografia gazowa z tandemową spektrometrią mas
GFR	<i>z ang. glomerular filtration rate</i> - współczynnik filtracji kłębuszkowej
HCOOH	kwask mrówkowy
HPLC	<i>z ang. High-Performance Liquid Chromatography</i> - wysokosprawna chromatografia cieczowa
HPLC-DAD	<i>z ang. High-Performance Liquid Chromatography with Diode Array Detection</i> - wysokosprawna chromatografia cieczowa z detekcją diodową
IM	<i>z łac. iniectio intramuscularis</i> - podanie domięśniowe
Interday CV	<i>z ang. inter-day coefficient of variation</i> - współczynnik zmienności międzydniowy
IS	<i>z ang. Internal standard</i> - standard wewnętrzny
IV	<i>z łac. Iniectio in venam</i> - podanie dożylnie
Kel	stała szybkości eliminacji leku (lub λz)

$K_m$	stała Michaelis'a-Menten'a
Km	stężenie, przy którym szybkość eliminacji osiąga połowę wartości maksymalnej (masa/objętość)
KOL	kolistyna
LC	z ang. <i>Liquid Chromatography</i> - chromatografia cieczowa
LC-HRMS	z ang. <i>Liquid Chromatography-High-Resolution Mass Spectrometry</i> - chromatografia cieczowa sprzężona ze spektrometrią mas o wysokiej rozdzielczości
LC-MS	z ang. <i>Liquid Chromatography-Mass Spectrometry</i> - chromatografia cieczowa sprzężona ze spektrometrią mas
LC-MS/MS	z ang. <i>Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry</i> - chromatografia cieczowa z tandemową spektrometrią mas
LD <sub>50</sub>	z ang. <i>lethal dose</i> - średnia dawka śmiertelna
LIN	linkomycyna
LLOQ	z ang. <i>Lower Limit of Quantification</i> - dolna granica oznaczalności
LNC	z ang. <i>Lipid nanocapsule</i> - nanokapsułka z lipidowym rdzeniem
LNP	z ang. <i>Lipid nanoparticle</i> - lipidowa nanocząsteczka
LOD	z ang. <i>Limit of Detection</i> - limit detekcji
LOQ	z ang. <i>Limit of Quantification</i> - limit oznaczalności
LPS	lipopolisacharyd
MAT	z ang. <i>Mean Absorption Time</i> - średni czas wchłaniania
MDR	z ang. <i>Multidrug resistance</i> - oporność wielolekowa
MIC	z ang. <i>Minimum Inhibitory Concentration</i> - minimalne stężenie hamujące
MLP	maksymalny limit pozostałości
MRL	z ang. <i>Maximum residue limit</i> - najwyższy dopuszczalny poziom pozostałości leku
MRP2	z ang. <i>Multidrug resistance-associated protein 2</i> - Białko 2 związane z opornością wielolekową, znane również jako ABCC2
MRT	z ang. <i>Mean Residence Time</i> - średni czas przebywania leku w organizmie
NDSP	Najwyższe dopuszczalne stężenie pułapowe (w kontekście pozostałości)
-NH	grupa amonowa

NLC	z ang. <i>Nanostructured Lipid Carries</i> - nanostrukturalny nośnik lipidowy
NOEL	z ang. <i>No-Observed-adverse-Effect Level</i> - maksymalna dawka substancji bez obserwowanych efektów biologicznych
-OH	grupa wodorotlenowa
PCR	z ang. <i>Polymerase Chain Reaction</i> - łańcuchowa reakcja polimerazy
PD	z ang. <i>Pharmacodynamics</i> - farmakodynamika
PDR	z ang. <i>Pan-Drug Resistant</i> - ogólna oporność na leki
PK	z ang. <i>Pharmacokinetics</i> - farmakokinetyka
PO	z łac. <i>Per Os</i> - podanie doustne
POmulti	podanie doustne wielokrotne
QC	z ang. <i>Quality Control</i> - próbka kontrolna
Qh	przepływ krwi przez wątrobę
RP-HPLC	ang. <i>Reverse-Phase High-Performance Liquid Chromatography</i> - wysokosprawna chromatografia cieczowa z odwrotnym układem faz
SC	z łac. <i>iniectio subcutanea</i> - podanie podskórne
SLN	z ang. <i>Solid Lipid Nanoparticle</i> - stała nanocząsteczka lipidowa
T1/2	okres półtrwania, biologiczny okres półtrwania
T1/2ab	biologiczny okres półtrwania w fazie wchłaniania
T1/2el	biologiczny okres półtrwania w fazie eliminacji
TFA	z ang. <i>trifluoroacetic acid</i> - kwas trójfluorooctowy
TLM	tylmikozyna
TLM-PH	z ang. <i>tilmicosin phosphate</i> - fosforan tylnikozyny
T <sub>max</sub>	czas, po którym substancja czynna leku osiąga swoje maksymalne stężenie w osoczu krwi
UHPLC-MS/MS	z ang. <i>Ultra-High Performance Liquid Chromatography coupled with Tandem Mass Spectrometry</i> - ultra wysokosprawna chromatografia cieczowa sprzężona z tandemową spektrometrią mas
ULOQ	z ang. <i>Upper Limit of Quantitation</i> - górna granica oznaczalności

UPLC-MS	<i>z ang. Ultra-High Performance Liquid Chromatography coupled with Mass Spectrometry</i> - ultra-wysokosprawna chromatografia cieczowa sprzężona ze spektrometrią mas
V <sub>darea</sub>	objętość dystrybucji wyliczana metodą pola powierzchni
V <sub>dss</sub>	objętość dystrybucji w stanie stacjonarnym
VL	<i>z ang. validation limit</i> - poziom walidacji
V <sub>m</sub>	maksymalna szybkość eliminacji
V <sub>max</sub>	maksymalna zdolność metaboliczna enzymów wątrobowych
VP	objętość osocza
V <sub>t</sub>	objętość tkanek
WE	Wspólnota Europejska
WHO	<i>z ang. World Health Organization</i> - Światowa Organizacja Zdrowia
XDR	<i>z ang. extensively drug-resistant</i> - rozszerzona oporność na antybiotyki



## I. WSTĘP

Polska to jeden z największych producentów i eksporterów gęsiny, puchu i pierza w Europie. Produkuje blisko 8 mln sztuk gęsi, czyli 45 tys. ton mięsa rocznie, z czego zdecydowana większość trafia na eksport. Produkcja na tak ogromną skalę wymaga oprócz odpowiedniego żywienia, utrzymania wysokiej zdrowotności, co dalej przekłada się na wysokojakościową produktywność. Właściwa bioasekuracja nie obchodzi się natomiast bez trafnego leczenia zarówno pod względem wybranego leku, dawki, interwałów podawania czy długości całego okresu leczenia, co z drugiej strony istotnie wpływa na ekonomiczną stronę chowu i hodowli. Ponadto mając na uwadze ograniczenia stosowania antybiotyków w Europie, istotnym wydaje się przedkliniczna, z punktu widzenia farmakokinetyki (PK), ocena skuteczności potencjalnych (najczęściej stosowanych) leków przeciwbakteryjnych, które mogłyby zostać ekstrapolowane z innych gatunków na gęsi.

Zasady postępowania lekarzy weterynarii, w sytuacji braku możliwości zastosowania odpowiednich weterynaryjnych produktów leczniczych w leczeniu zwierząt określone zostały w art. 112-114 rozporządzenia Parlamentu Europejskiego i Rady (UE) 2019/6 w sprawie weterynaryjnych produktów leczniczych (Rozp. UE, 2019). Daje to możliwość, w pierwszej kolejności sięgnięcia po leki już zarejestrowane dla innych gatunków zwierząt, przy czym musi zostać określony każdorazowo właściwy okres karencji dla tkanek lub produktów przeznaczonych do spożycia przez ludzi.

Choć istnieje szereg danych literaturowych odnośnie dawek terapeutycznych często stosowanych u drobiu grzebiącego leków przeciwbakteryjnych jak: tylmikozyjna, kolistyna czy linkomycyna, u gęsi nie są one znane. Znajomość specyfiki gatunku (w tym sposób utrzymania) nasuwa przypuszczenie, że ekstrapolacja na gęsi wartości dawek ustalonych dla innych gatunków ptaków może być niedostateczna ze względu na różnice w metabolizmie (ale też w procesach wchłaniania czy wydalania). Jednocześnie zwiększone dawki mogą istotnie wpłynąć na poziomy pozostałości w tkankach, ograniczając bezpieczeństwo konsumentów.

Badanie oceniające profil PK oraz zanikanie pozostałości leku umożliwi opracowanie: dawek, interwałów podawania, długości terapii oraz oszacuje okres karencji niezbędny dla bezpiecznego wykorzystania mięsa i produktów pochodzących od ptaków, u których zastosowano lek.

Wybrane do doświadczenia antybiotyki są powszechnie stosowanymi lekami przeciwbakteryjnymi w chowie i hodowli drobiu grzebiącego i przez to stosowanymi na

zasadzie *label off* (poza wskazaniami) również w hodowli gęsi. Na rynku europejskim można spotkać zarejestrowane preparaty w proszku oraz w płynie, zarówno do podawania z wodą do picia, jak i z paszą. Jednakże, żaden z nich nie posiada rejestracji dla gęsi, co najprawdopodobniej podyktowane jest względami ekonomicznymi firm farmaceutycznych i jeszcze nie tak ogromnym zapotrzebowaniem, jak ma to miejsce w chowie i hodowli drobiu grzebiącego.

Jednakże, aby zapewnić bezpieczne i skuteczne leczenie, istotne jest korzystanie z protokołów terapii specyficznych dla gatunku, opracowanych na podstawie badań i doświadczenia klinicznego dla każdego gatunku ptaków. Według wiedzy autora, badania te będą stanowić pierwsze badania PK wybranych antybiotyków u gęsi, biorąc pod uwagę: zróżnicowanie dróg podania, a także analizę zanikania pozostałości w całościowym procesie leczenia.

## 1. GĘSI – CHARAKTERYSTYKA GATUNKU

Obecnie istnieje prawie 60 różnych ras gęsi, z czego wiele występuje we wschodniej Europie (Buckland i Guy, 2002).

Gęsi należą do rodziny kaczkowatych (*Anatidae*) i są podzielone na dwa rodzaje: *Anser* i *Branta*, które różnią się wyglądem.

- Gęsi z rodzaju *Anser* mają jednolite ubarwienie w odcieniach szarości, brązu i bieli, a ich nogi i dzioby są różowe, pomarańczowe lub żółte.
- Gęsi z rodzaju *Branta* mają bardziej kontrastowe, czarno-białe lub ciemnobrązowo-białe upierzenie, a ich nogi i dzioby są czarne.

Charakterystyczną cechą gęsi *Anser* są dobrze widoczne, ząbkowane krawędzie dzioba, które u gęsi *Branta* są bardzo małe lub nieobecne.

Gęsi z rodzaju *Anser* były jednymi z pierwszych udomowionych zwierząt. Wyróżnia się dwa główne typy gęsi domowych:

- Pochodzące z Europy, wywodzące się od dzikiej gęsi gęgawy (*Anser anser*).
- Pochodzące z Azji, wywodzące się od dzikiej gęsi łabędzioszej (*Anser cygnoides*).

Gęś biłgorajska, należy do rodzaju *Anser* i posiada typowe dla niej cechy. Jest to prymitywna rasa pochodząca z północno-wschodniej części Polski i jest aktywnie chroniona ze względu na swoje znaczenie genetyczne (Książkiewicz i wsp., 2006). Ptaki te mają całkowicie białe upierzenie, ściśle przylegające do ciała, a ich dziób i nogi

mają pomarańczowo-czerwony kolor. Gęś biłgorajska charakteryzuje się niską zawartością tłuszczu i dobrze rozwiniętymi mięśniami (Pudyszak, 2006).



**Ryc. 1. Gęś biłgorajska (Gospodstwo agroturystyczne - Majątek „Rutka”, Puchaczów). (Źródło: Autor)**

Według Organizacji Narodów Zjednoczonych do spraw Wyżywienia i Rolnictwa (FAO) gęsi są gatunkiem niedocenianym, mimo, że ich hodowla niesie ze sobą wiele korzyści (FAO, 2019). Z praktycznego punktu widzenia gęsi łatwo przystosowują się do życia w niewoli, dobrze znoszą różne warunki klimatyczne i są łatwe w utrzymaniu. To jeden z najszybciej rosnących gatunków ptaków o dużej zdolności adaptacyjnej. Ponadto gęsi mają stosunkowo duże rozmiary, co czyni je mniej podatnymi na ataki drapieżników, a także wykazują większą odporność na choroby w porównaniu do wielu innych ptaków hodowlanych.

Gęsi dostarczają wartościowego mięsa, jaj i tłuszczu wykorzystywanego w kuchni, a także puchu i pierza, które są cenionymi surowcami do produkcji pościeli i odzieży. Te produkty mogą stanowić dodatkowe źródło dochodu dla hodowców (Kozák, 2021).

Choć spożycie produktów z gęsi nie jest tak popularne jak w przypadku innych gatunków drobiu, w ostatnich dekadach znacznie wzrosło. Mięso gęsie jest cenione za swoją delikatność i wyjątkowy smak (Kozák, 2021). Charakteryzuje się niską zawartością

tłuszczu i jest bogate w jednonienasycone kwasy tłuszczowe, takie jak oleinowy, linolowy i arachidonowy. W szczególności mięso gęsi hodowanych na pastwiskach zawiera dużo wielonienasyconych kwasów tłuszczowych, co czyni je zdrowym wyborem żywieniowym (Okruszek i wsp., 2013).

Na tle globalnej produkcji mięsa, gęś w porównaniu do kurcząt zajmuje stosunkowo dalekie miejsce. Według FAO w 2019 roku produkcja mięsa gęsięgo wyniosła 2,7 miliona ton, z czego 95,9% pochodziło z Azji (głównie Chin – 2,6 miliona ton), a 2,4% z Europy (głównie Polska i Węgry) (FAO, 2019).

Jednym z najbardziej cenionych produktów z gęsi jest wątroba tłuszczowa (*foie gras*), uznawana przez wielu konsumentów za największy przysmak. Obecnie kraje o największej tradycji produkcji *foie gras* w Europie to Francja i Węgry (Kozák, 2021). Wątroba tłuszczowa powstaje w wyniku przymusowego karmienia ptaków, zgodnie z rozporządzeniem Komisji Europejskiej (WE) nr 543/2008, a za *foie gras* uznaje się wyłącznie wątrobę o wadze powyżej 400 g (Rozp. WE, 2008). Jednak w wielu krajach, takich jak USA, Australia, Indie, Izrael, Argentyna, Norwegia, Niemcy oraz Polska produkcja tego przysmaku została zakazana ze względu na kwestie związane z dobrostanem zwierząt.

Jaja gęsie są rzadko spożywane ze względu na nawyki konsumentów, ale w niektórych krajach stanowią element diety. Ich wartość odżywcza jest porównywalna z jajami innych gatunków drobiu – są bogate w składniki odżywcze, niezbędne aminokwasy, kwasy tłuszczowe, witaminy i minerały.

Puch i pierze gęsie nadal odgrywają ważną rolę w przemyśle tekstylnym, będąc surowcem do produkcji wysokiej jakości kołder i odzieży (Kozák, 2021).

Zdrowie i efektywność produkcyjna gęsi hodowlanych są wspierane dzięki nowoczesnym metodom farmakologicznym, praktykom żywieniowym i postępowi genetycznemu. Gęsi, podobnie jak inne ptaki hodowlane (kurczęta, indyki, kaczki, strusie), są narażone na infekcje wywołane przez patogeny, takie jak *Mycoplasma spp.*, *Salmonella ssp.*, *Escherichia coli*, *Pasteurella ssp.* czy *Pseudomonas spp.* Patogeny te mogą zakażać jaja, prowadzić do obumierania zarodków i powodować poważne straty ekonomiczne (De Vos i wsp., 2009; Stipkovits i Szathmary, 2012).

Zakażenia bakteriami *Salmonella*, dawniej określane jako paratyfus, nadal stanowią poważny problem w hodowli gęsi, kaczek oraz innych ptaków. Najczęściej występujące serotypy to *Salmonella enteritidis*, *Salmonella anatum* i *Salmonella thompson*. Do zakażenia może dojść już w zakładzie wylęgowym. Jeśli stado rodzicielskie jest nosicielem

bakterii, infekcja przenosi się pionowo poprzez układ rozrodczy, powodując zakażenie jaj wylęgowych oraz piskląt. Starsze i dorosłe ptaki najczęściej zarażają się drogą pokarmową – poprzez skażoną paszę, wodę lub kontakt z zanieczyszczonym środowiskiem fermy. Bakterie mogą przenosić się także drogą oddechową, szczególnie w sytuacjach stresowych, np. podczas podskubów. Do źródeł infekcji należą również pracownicy ferm, gryzonie, owady, dzikie ptactwo, sprzęt oraz pojazdy wjeżdżające na teren gospodarstwa. Nosicielstwo bezobjawowe i długotrwałe wydalanie bakterii przez zakażone ptaki sprzyjają utrzymywaniu się choroby w stadzie (Kozdruń i wsp., 2019; Nolan i wsp., 2015; De Vos i wsp., 2009).

Pastereloza, dawniej zwana cholerą drobiu, to wysoce zaraźliwa choroba zarówno ptaków wodnych, jak i grzebiących. Zwykle ma ona przebieg ostry, posocznicowy, prowadzący do wysokiej zachorowalności i śmiertelności. W dużych fermach częściej obserwuje się jej przewlekłą formę. Czynnikiem wywołującym jest *Pasteurella multocida*. Pomimo stosowania odpowiednich środków profilaktycznych, pastereloza nadal występuje endemicznie na wielu fermach gęsi w Polsce. Na zakażenie podatne są ptaki w każdym wieku, jednak najczęściej choroba występuje u gęsi i kaczek powyżej 6. tygodnia życia oraz w stadach reprodukcyjnych po okresie intensywnej nieśności. Starsze ptaki wykazują większą wrażliwość na infekcję niż młodsze (Kozdruń i wsp., 2018; Nolan i wsp., 2015).

Kolibakterioza, wywoływana przez *Escherichia coli*, to jedna z najczęstszych chorób bakteryjnych drobiu wodnego, powodująca znaczne straty hodowlane. Pomimo poprawy warunków sanitarnych na fermach, *Escherichia coli* pozostaje najczęściej izolowanym patogenem u ptaków. Bakteria ta stanowi naturalny składnik flory jelitowej, ale jej chorobotwórcze serotypy mogą występować w paszy i wodzie. Wszystkie gatunki ptaków są podatne na zakażenie, które może trwać przez wiele miesięcy. Do czynników sprzyjających infekcji należą m.in.: niewłaściwa wentylacja, nadmierne zagęszczenie, błędy żywieniowe, obecność pasożytów, stres termiczny, osłabienie odporności oraz długotrwałe lub niewłaściwe stosowanie antybiotyków. Kolibakterioza może prowadzić do zakażeń ogólnoustrojowych, obejmujących układ oddechowy, pokarmowy i rozrodczy. Często wikła inne infekcje, np. wirusowe czy bakteryjne, w tym wywołane przez mykoplazmy (Kozdruń i wsp., 2018; Kozdruń i wsp., 2019; Nolan i wsp., 2015; Nolan i wsp., 2020).

Mykoplazmozy również stanowią coraz większe zagrożenie w hodowli drobiu wodnego. Ich przyczyną są bakterie *Mycoplasma anseris*, *Mycoplasma cloacale*, *Mycoplasma anatis*, a także *Mycoplasma gallisepticum* i *Mycoplasma synoviae*. Zakażenia

mykoplazmami występują zarówno w stadach reprodukcyjnych, jak i towarowych. Najczęściej dochodzi do nich drogą oddechową lub płciową podczas krycia przez samce. Możliwe jest również przenoszenie infekcji pionowo – przez zakażone nioski na potomstwo. Źródłem zakażenia często są bezobjawowi nosiciele oraz skażone środowisko i personel fermy. Mykoplazmozy często współwystępują z innymi infekcjami, np. *Escherichia coli*, *Pasteurella multocida*, *Chlamydochila*, wirusem choroby Derzyego, parwowirusami i reowirusami. Powodują zwiększoną śmiertelność, osłabienie wyników produkcyjnych oraz straty ekonomiczne zarówno w tuczu, jak i w rozrodzie (Kozdruń i wsp., 2018; Kozdruń i wsp., 2019; Stipkovits i Szathmary, 2012).

Ze względu na znaczne zagrożenia wynikające z chorób bakteryjnych drobiu wodnego, niezbędne jest opracowanie nowych metod zapobiegania, monitorowania i leczenia tych infekcji. Na dużych fermach leki weterynaryjne są najczęściej podawane poprzez paszę leczniczą lub wodę pitną, jednak w przypadku hodowli przydomowych lub małych stad, gdzie gęsi są traktowane jako zwierzęta towarzyszące i ozdobne, konieczne mogą być indywidualne terapie/protokoły farmakologiczne (Bekoff, 2019).

Jeśli hodowla gęsi jest prowadzona z przeznaczeniem na spożycie przez ludzi, niezbędna jest również ocena poziomu pozostałości leków w tkankach, aby zapewnić bezpieczeństwo konsumentów.

## **2. CHARAKTERYSTYKA WYBRANYCH LEKÓW PRZECIWDROBNOUSTROJOWYCH**

Antybiotyki stanowią jedną z najważniejszych grup farmaceutyków stosowanych zarówno u zwierząt towarzyszących, jak i gospodarskich. Od pierwszego klinicznego zastosowania penicyliny w 1940 roku, odkryto i wprowadzono do lecznictwa znaczącą liczbę nowych grup antybiotyków, ale ich nadmierne stosowanie stało się przyczyną wielu nieoczekiwanych problemów (Saga i Yamaguchi, 2009). W ostatnich latach coraz częściej obserwuje się rozwój oporności na antybiotyki, co stanowi pilne wyzwanie dla mikrobiologów, lekarzy ludzkich oraz lekarzy weterynarii (Nakamura, 1997; EFSA, 2012). Główną przyczyną rozprzestrzeniania się oporności bakteryjnej u zwierząt i ludzi jest nadmierne oraz niewłaściwe stosowanie leków przeciwdrobnoustrojowych.

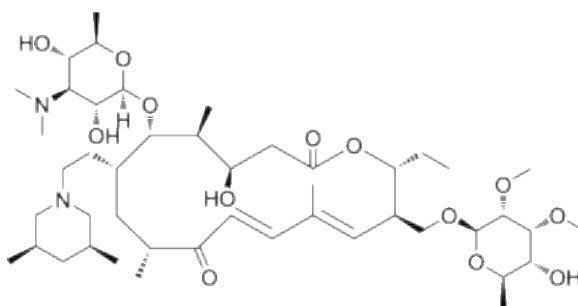
Aby zapobiegać powstawaniu szczepów opornych, konieczna jest dokładna znajomość profilu PK oraz profilu PD danego leku u danego gatunku zwierzęcia. Ekstrapolowanie dawek i efektów leków z innych gatunków może prowadzić do istotnych błędów, ponieważ

różne zwierzęta mogą znacznie różnić się pod względem metabolizmu leków i procesów fizjologicznych (Toutain i wsp., 2010).

### 2.1. Tylmikozyzna

Tylmikozyzna (TLM) to półsyntetyczny antybiotyk makrolidowy opracowany w latach 80. XX wieku (Norcia i wsp., 1999), stosowany wyłącznie w leczeniu infekcji bakteryjnych u zwierząt, w tym u drobiu (Clark i wsp., 2004).

TLM, o nazwie chemicznej 20-deoksy-20-(3,5-dimetylo-piperydyn-1-yl) desmykocyna, jest strukturalnie podobna do tylozyny (Ryc. 2).



**Ryc.2. Wzór strukturalny Tylmikozyzny (TLM).**  
(Źródło: <https://www.medchemexpress.com/Tilmicosin.html>)

Faktycznie jest mieszaniną jednego izomeru cis i dwóch izomerów trans w przybliżonym stosunku 85:15. Rozpuszczalność w wodzie wynosi 0,0484 mg/ml. Masa cząsteczkowa to 869,1 g/mol

#### Farmakodynamika

Uważa się, że TLM hamuje syntezę białka bakteryjnego *in vitro* i *in vivo*, nie mając wpływu na syntezę kwasu nukleinowego. Mechanizm działania TLM na wrażliwe bakterie polega na jednoczesnym odwracalnym połączeniu się z podjednostką 50S rybosomu, blokując transpeptydację (indukcja rozdzielania peptydylo-tRNA od rybosomu w fazie elongacji) i/lub przesunięcie mRNA, co prowadzi do dalszego hamowania syntezy białek bakteryjnych i wywołuje skuteczność antybakteryjną (Zhang i wsp., 2017).

TLM wykazuje szerokie spectrum działania głównie bakteriostatyczne przeciwko drobnoustrojom Gram-dodatnim oraz niektórym bakteriom Gram-ujemnym (Prescott, 2000). Jest szczególnie aktywna przeciwko bakteriom *Pasteurella spp.*, *Actinobacillus spp.* (*Haemophilus*) oraz *Borrelia* i mykoplazmom u bydła, świń, owiec i ptaków (WHO, 1996; Ose, 1988; Clark i wsp., 2004; Modric i wsp., 1998).

Poniżej przedstawiono główne wskazania do stosowania TLM w weterynarii:

Trzoda chlewna (Moore i wsp., 1996):

- Leczenie i zapobieganie zapaleniu płuc wywołanemu przez *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Mycoplasma hyopneumoniae* oraz *Pasteurella multocida*.
- Leczenie i metafilaktyka chorób układu oddechowego wywołanych przez *Mannheimia haemolytica* oraz *Pasteurella multocida*.

Bydło (Hoar i wsp., 1998):

- Leczenie i zapobieganie zapaleniu płuc wywołanemu przez *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Mycoplasma hyopneumoniae* oraz *Pasteurella multocida*.
- Leczenie i metafilaktyka chorób układu oddechowego wywołanych przez *Mannheimia haemolytica* oraz *Pasteurella multocida*.

Owce (Christodoulopoulos i wsp., 2002):

- Leczenie zapalenia płuc związanego z *Mannheimia haemolytica* oraz *Pasteurella multocida*; mastitis związane z *Staphylococcus aureus* oraz *Mycoplasma agalactiae* oraz wspomaganie kontroli poronień enzootycznych u owiec wywołanych przez *Chlamydia psittaci*.

Króliki (McKay i wsp., 1996):

- Terapia infekcji dróg oddechowych wywołanych przez *Pasteurella multocida* oraz *Bordetella bronchiseptica* oraz zapalenie jelit wywołane przez *Clostridium spp.*

Kury i indyki (Jordan i Horrocks, 1996; Kempf i wsp., 1997; Varga i wsp., 2001; Olsen i wsp., 2010):

- Leczenie infekcji dróg oddechowych w stadach drobiu, związanych z: *Mycoplasma gallisepticum*, *Mycoplasma synoviae*, *Ornithobacterium rhinotracheale*, *Pasteurella multocida* oraz innymi organizmami wrażliwymi na TLM.

Zaobserwowano występowanie oporności krzyżowej pomiędzy TLM i innymi antybiotykami z grupy makrolidów. Jak wcześniej wspomniano TLM podobnie jak pozostałe makrolidy powstrzymują syntezę białkową poprzez wiązanie odwracalne z podjednostką rybosomalną 50S. Namnażanie bakterii powstrzymywane jest poprzez

indukcję rozdzielania peptidyl-tRNA od rybosomu w trakcie fazy wzrostu przez wydłużenie. Metylaza rybosomalna, zakodowana genem *erm* może przyspieszyć oporność na makrolidy poprzez zmianę miejsca wiązania rybosomalnego. Oporność jest również wywoływana pompą efluksową, która aktywnie oczyszcza komórki z makrolidów. W takim zjawisku pompy efluksowej chromosomalnie pośredniczą geny określane jako geny *acrAB*. Oporność bakterii z rodzaju *Pseudomonas* oraz innych bakterii Gram-ujemnych, enterokoków i stafylokoków, może zostać przyspieszona kontrolowaną chromosomalnie zmianą przepuszczalności lub pobieraniem leku (Singh i Bhunia, 2019).

Dostępne formułacje TLM obejmują: postać iniekcyjną do stosowania u bydła i owiec, roztwory doustne dla świń, bydła, kur i indyków, granulaty doustne dla świń oraz premiksy dla świń i królików (FAO, 2009).

a) Zalecana dawka formułacji iniekcyjnej zarówno dla bydła, jak i owiec to pojedyncza iniekcja podskórna (SC) wynosząca 10 mg tylmikozyny/kg m.c.

b) Zalecana dawka doustna (PO) roztworu: dla świń wynosi 15-20 mg tylmikozyny/kg m.c. dziennie przez 5 dni, dla kur: 15-20 mg tylmikozyny/kg m.c. przez 3 dni, dla indyków 10-27 mg tylmikozyny/kg m.c. przez 3 dni, dla cieląt 12,5 mg tylmikozyny/kg m.c. dwa razy na dobę przez 3-5 dni.

c) Zalecana dawka doustna (PO) granulatu dla świń wynosi 16 mg tylmikozyny/kg m.c. dziennie przez 15 dni.

d) Zalecana dawka doustna (PO) premiksu: dla świń wynosi 8-16 mg tylmikozyny/kg m.c. dziennie przez 15-21 dni, dla królików wynosi 12 mg tylmikozyny/kg m.c. dziennie przez 7 dni (FAO, 2009).

W przypadku drobiu, Zhang i wsp. (2020) zbadali PK i farmakodynamikę TLM u kurcząt zakażonych *Mycoplasma gallisepticum*. TLM wykazywała działanie zależne od stężenia, co oznacza, że jej skuteczność przeciwko *Mycoplasma gallisepticum* rosła wraz z wyższymi dawkami. Wskaźnik AUC/MIC (pole pod krzywą stężenie-czas do minimalnego stężenia hamującego) był najlepszym predyktorem skuteczności ( $R^2 = 0,92$ ). Aby uzyskać 1 log<sub>10</sub> redukcję kolonii bakteryjnych (CFU/płuca), wymagany był AUC/MIC = 300,02 h, natomiast dla 3 log<sub>10</sub> redukcji (pełnego działania bakteriobójczego), wartość ta wynosiła 6950,15 h. Wyniki sugerują, że optymalne dawkowanie powinno wynosić około 9,12 mg/kg, aby uzyskać pełny efekt terapeutyczny przeciwko *Mycoplasma gallisepticum*.

## Farmakokinetyka

Farmakokinetyka TLM po podaniu pozajelitowym została zbadana u bydła (Ziv i wsp., 1995; Modric i wsp., 1998; Gourlay i wsp., 1989), trzody chlewnej (Chen i wsp., 2023; Xiong i wsp., 2019), kóz (Ramadan, 1997; Elkomy i wsp., 2016), owiec (Modric i wsp., 1998; Naccari i wsp., 2001), koni (Clark i wsp., 2008), osłów (Yang i wsp., 2024) oraz jeleni (Clark i wsp., 2004).

Przykładowo u bydła po podaniu SC w dawce 10 mg/kg masy ciała, maksymalne stężenie TLM w surowicy ( $C_{max}$ ) osiągane jest po około 1 godzinie. U cieląt nowonarodzonych  $C_{max}$  wynosi 1,55  $\mu\text{g/ml}$ , natomiast u bydła opasowego 0,97  $\mu\text{g/ml}$ . U owiec po podaniu SC w dawce 10 mg/kg masy ciała,  $C_{max}$  wynosi 0,44  $\mu\text{g/ml}$  i jest osiągane po 8 godzinach (Ziv i wsp., 1995; Modric i wsp., 1998).

Niewiele jest natomiast danych na temat PK w przypadku TLM po podaniu PO, w tym u drobiu (Keles i wsp., 2001; Shen i wsp., 2005). TLM podana PO kurczętom, indykom i świniom z wodą do picia lub cielętom z preparatem mlekozastępczym, jest absorbowana i szybko dystrybuowana z surowicy do obszarów o niskim pH. Skutkuje to bardzo wysokim poziomem TLM w tkance płucnej, co stwierdzono u świń a u kurcząt i indyków w tkance worków powietrznych, która to jest wykrywana już po 6 godzinach od rozpoczęcia leczenia i utrzymuje się do 10 dni.  $C_{max}$  TLM w homogenizowanej tkance płucnej indyków (6,3 lg/g) było wyższe niż odnotowane dla płuc świń (1,43 lg/g) przy dawce 200 ppm podanej w paszy, ale niższe niż stwierdzane dla płuc kurcząt (7,96 lg/g) przy dawce 50 mg/kg podanej w wodzie i płucach bydła (7,17 lg/g) przy dawce 10 mg/kg podanej SC (Keles i wsp., 2001).

Stwierdzono również, że TLM koncentruje się w makrofagach pęcherzyków płucnych u świń (Scorneaux i Shryock, 1998).

Przemiany metaboliczne TLM różnią się w zależności od gatunku zwierząt, ale w większości przypadków głównym wykrywanym związkami jest niezmieniona TLM. Stwierdzano kilka metabolitów, z których głównym jest T1 (N-demetylo tylmikozyne) (WHO; 1996).

Po podaniu PO, TLM wydalana jest głównie z żółcią w kale, a niewielkie ilości wydalane są także z moczem (WHO; 1996).

W badaniach PK TLM (jednorazowe podanie PO, 15 mg/kg m.c.) u kurcząt zakażonych *Mycoplasma synoviae* nie stwierdzono istotnej różnicy w okresie półtrwania eliminacji ( $t_{1/2_{el}}$ ) i średnim czasie przebywania (MRT) zarówno w przypadku dializatu ze stawów jak i osocza. Natomiast czas pola powierzchni pod krzywą stężenia-czasu (AUC)

i  $C_{\max}$  TLM w osoczu były odpowiednio 2,1 i 1,4 razy wyższe niż w dializacie. Współczynnik dystrybucji TLM w stawach i osoczu ( $AUC_{\text{dializat}}/AUC_{\text{plazma}}$ ) wynosił 0,51. Podsumowując, stężenie TLM w stawach kurcząt zakażonych *Mycoplasma synoviae* było znacznie niższe niż w osoczu, co może skutkować słabym efektem klinicznym i lekoopornością (Yan i wsp., 2023).

W innym badaniu porównano PK i biodostępność (F) fosforanu tylnikozyny (TLM-PH) z trzema formułacjami lipidowych nanocząsteczek (LNP): stałymi nanocząsteczkami lipidowymi (SLNs), nanostrukturalnymi nośnikami lipidowymi (NLCs) oraz nanokapsułkami z lipidowym rdzeniem (LNCs). Po podaniu PO (20 mg/kg) kurczętom brojlerom analiza osocza wykazała, że względna F dla TLM-SLNs, TLM-NLCs i TLM-LNCs była odpowiednio 1,7, 2,7 i 3,6 razy wyższa w porównaniu z TLM-PH. Spośród badanych formułacji TLM-LNCs wykazywały najwyższe  $C_{\max}$  (2,17  $\mu\text{g/mL}$ ) oraz znacząco wyższe pozostałe parametry PK. Wyniki te sugerują, że nanocząsteczki lipidowe, zwłaszcza LNCs, stanowią obiecującą strategię zwiększania wchłaniania PO TLM i jej skuteczności terapeutycznej (Rassouli i wsp., 2016).

W badaniu przeprowadzonym przez Fricke i wsp. (2008) na indykach, podano paszę zawierającą 200 ppm TLM przez 5 dni, a następnie analizowano stężenia leku w osoczu i tkankach po zakończeniu leczenia.  $C_{\max}$  TLM odnotowano w wątrobie (22,6  $\mu\text{g/g}$ ) i nerkach (20,9  $\mu\text{g/g}$ ), co sugerowało intensywną dystrybucję do narządów detoksykacyjnych. W płucach osiągnięto  $C_{\max} = 6,3 \mu\text{g/g}$ , co potwierdza skuteczność TLM w leczeniu infekcji oddechowych. W mięśniach wartość  $C_{\max}$  wyniosła 1,2  $\mu\text{g/g}$ . Czas, po którym wystąpiło  $C_{\max}$  ( $T_{\max}$ ) dla płuc i nerek wynosił 2 dni, co oznacza, że  $C_{\max}$  wystąpiło przed zakończeniem podawania paszy leczniczej. W wątrobie  $T_{\max}$  wynosił 1 dzień, co wskazało na wolniejsze uwalnianie leku. W mięśniach  $T_{\max}$  wynosił 1 dzień, co oznacza, że lek osiągnął szczytowe stężenie jeszcze przed zakończeniem terapii. Najszybsza eliminacja miała miejsce w mięśniach ( $k = 0,276$  1/dzień), co sugerowało stosunkowo krótką retencję leku. Wątroba ( $k = 0,28$  1/dzień) i nerki ( $k = 0,35$  1/dzień) miały wyższe wartości  $k$ , co świadczyło o szybszym oczyszczaniu tych narządów. Płuca wykazywały najwolniejszą eliminację ( $k = 0,132$  1/dzień), co wskazało na długą retencję leku w układzie oddechowym.

W badaniu Zhang i wsp. (2022) jak już wcześniej wspomniano, badano PK i farmakodynamikę TLM u kurcząt zakażonych *Mycoplasma gallisepticum*.  $C_{\max}$  po podaniu dawki 1 mg/kg wynosiło 0,12  $\mu\text{g/g}$ , a po podaniu dawki 30 mg/kg wynosiło 6,19  $\mu\text{g/g}$ .  $C_{\max}$  wzrastało proporcjonalnie do dawki, co sugeruje liniową PK w zakresie

badanych dawek.  $T_{max}$  dla obu dawek wynosił 12 godzin, co wskazuje na stosunkowo wolne wchłanianie leku. AUC wynosiło dla dawki 1 mg/kg: 13,62  $\mu\text{g}\cdot\text{h/g}$ , a dla dawki 30 mg/kg: 464,23  $\mu\text{g}\cdot\text{h/g}$ , co sugeruje dobrą biodostępność leku (silna korelacja z dawką). MRT wskazuje na długą retencję TLM w tkance płucnej.  $T_{1/2el}$  (ok. 50h) sugeruje, że TLM może być skuteczna w schematach dawkowania obejmujących rzadkie interwały podania. Natomiast, wartości Cl (ok. 0,08 l/h/kg) sugerują powolne usuwanie leku z organizmu, co sprzyja jego długotrwałemu działaniu.

Przeprowadzono także badania farmakokinetyki TLM (25 mg/kg m.c.) po pojedynczym i wielokrotnym podaniu PO (raz dziennie przez trzy kolejne dni), a także pozostałości w tkankach u zdrowych i doświadczalnie zakażonych *Mycoplasma gallisepticum* brojlerów. Po pojedynczym podaniu TLM ptakom zdrowym lek osiągnął  $C_{max}$  po  $2,45 \pm 0,01$  h od podania, otrzymując wartość  $0,97 \pm 0,04$   $\mu\text{g/ml}$ . Okres półtrwania wchłaniania ( $t_{1/2ab}$ ) TLM wynosił  $0,89 \pm 0,02$  h, a  $t_{1/2el}$  wynosił  $14,73 \pm 1,24$  h. Powtarzane podawanie TLM PO u zdrowych i zakażonych *Mycoplasma gallisepticum* kurcząt, wykazało niższe istotne stężenie TLM w surowicy u zakażonych kurcząt w porównaniu do stężeń u zdrowych kurcząt (Elkomy i wsp., 2018).

Celem kolejnego badania była ocena PK i pozostałości TLM po pojedynczym i wielokrotnym podaniu PO (25 mg/kg.m.w.) raz dziennie przez 5 kolejnych dni u zdrowych i doświadczalnie zakażonych *Mycoplasma gallisepticum* i *Escherichia coli* brojlerów. Po jednorazowym podaniu PO, TLM została szybko wchłonięta zarówno u zdrowych, jak i eksperymentalnie zakażonych brojlerów, z  $t_{1/2ab}$  0,45 i 0,52 h;  $C_{max}$  wynosiło odpowiednio 1,06 i 0,69  $\mu\text{g/ml}$  przy  $T_{max}$  około 2,56 i 2,81 h;  $t_{1/2el}$  wynosiło odpowiednio 21,86 i 22,91 h, a MRT odpowiednio 32,15 i 33,71 h; co wskazuje na powolną eliminację TLM u kurcząt. Wiązanie z białkami *in vitro* wynosiło  $9,72 \pm 0,83\%$ . Stężenia TLM w surowicy po wielokrotnym podaniu PO raz dziennie przez 5 kolejnych dni osiągały szczyt prawie 2 h po każdej dawce, przy czym odnotowano istotnie niższe wartości u brojlerów eksperymentalnie zakażonych niż u osobników zdrowych (Attia i wsp., 2018).

Inne badanie przeprowadzono na 18 zdrowych kurczętach, gdzie oceniano dwie formułacje TLM: Provital i Pulmotil AC. Analizowano kluczowe parametry PK. Średnie wartości  $AUC_{(0-72)}$  dla Provital i Pulmotil AC były bardzo zbliżone ( $24,24 \pm 3,86$  vs.  $21,82 \pm 3,14$   $\mu\text{g}\times\text{h/ml}$ ), bez istotnych statystycznie różnic. Względna biodostępność produktu Provital względem Pulmotil AC wyniosła 111%. Nie stwierdzono również istotnych różnic dla innych parametrów, w tym  $C_{max}$  ( $2,09 \pm 0,37$  vs.  $2,12 \pm 0,40$   $\mu\text{g/ml}$ ),  $T_{max}$  ( $3,99 \pm 0,84$

vs.  $5,82 \pm 1,04$  h),  $t_{1/2}$  ( $47,4 \pm 9,32$  vs.  $45,0 \pm 5,73$  h), CI ( $19,73 \pm 3,73$  vs.  $21,37 \pm 4,54$  ml/min/kg), MRT ( $71,20 \pm 12,87$  vs.  $67,15 \pm 9,01$  h) oraz Vd ( $1024,8 \pm 87,5$  vs.  $1009,8 \pm 79,5$  ml/kg). Podsumowując, TLM była szybko wchłaniana i wolno eliminowana po podaniu PO pojedynczej dawki zarówno w postaci proszku, jak i roztworu (Abu- Basha i wsp., 2007).

Podsumowując, TLM wykazuje u ptaków szereg cech farmakokinetycznych sprzyjających długotrwałemu działaniu, choć nie zawsze przekładających się na równomierną dystrybucję do miejsc zakażenia.

### Toksyczność i działania niepożądane

TLM wykazuje niską toksyczność po podaniu PO, gdzie stwierdzone są takie działania niepożądane jak: przyspieszony oddech, wymioty czy drgawki, ale niebezpieczna staje się po podaniu dożylnym (IV), podskórnym (SC) lub w przypadku powtarzającego się podawania dużych dawek, co może doprowadzić nawet do śmierci (Clark i wsp., 2008; Christodoulopoulos, 2009; Jordan i wsp., 1993).

Toksyczność narządowa dotyczy głównie serca (Khalil i wsp., 2020; Gheith i wsp., 2015; Oda i Derbalah, 2018). Wielokrotne badania na zwierzętach wykazały, że wysokie dawki TLM wywołują niekorzystne efekty inotropowe oraz dodatnie działanie chronotropowe na układ sercowo-naczyniowy, w tym upośledzenie funkcji komór, nagłą niewydolność serca oraz zmiany w zapisie EKG (Oztekin i wsp., 2004; Jordan i wsp., 1993; Main i wsp., 1996; Yazar i wsp., 2004). Efekty te są głównie zależne od dawki, gatunku zwierzęcia i drogi podania (Yazar i wsp., 2002; Yazar i wsp., 2004).

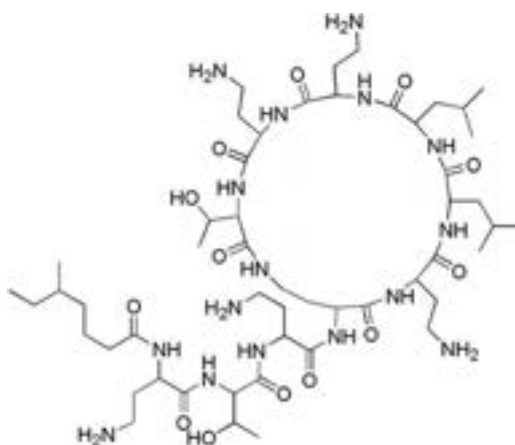
Wiele wcześniejszych badań nie przedstawiło jednoznacznego mechanizmu, w jaki sposób TLM wywołuje efekt kardiotoksyczny. Toksyczność sercowo-naczyniowa wydaje się być wynikiem blokady kanału wapniowego (Youssef i wsp., 2016). Ponadto przypuszcza się, że TLM może powodować kardiotoksyczność poprzez zwiększoną produkcję reaktywnych form tlenu lub wpływ na stan oksydacyjny tkanek serca (Kart i wsp., 2007), co prowadzi do uszkodzenia białek, DNA i lipidów, a w konsekwencji do apoptozy kardiomiocytów (Aboubakr i wsp., 2020).

## **2.2.Kolistyna**

Kolistyna (KOL), znana również jako polimyksyna E, to antybiotyk peptydowy (polimyksynowy) produkowany przez *Bacillus polymyxa* var. *colistinus*. Podobnie jak inne antybiotyki polipeptydowe, KOL jest złożonym związkem składającym się z ponad

13 cyklicznych polipeptydów, różniących się głównie długością segmentów acylowych kwasów tłuszczowych (Decolin i wsp., 1997). Dwa główne składniki, kolistyna A i B (polimyksyna E1 i E2), wydają się stanowić do 95% jej całkowitej masy (Suzuki i wsp., 1963a; Suzuki i wsp., 1963b; Suzuki i wsp., 1963c; Studer i wsp., 1965).

KOL jest rozpuszczalna w wodzie (564000 mg/L), słabo rozpuszczalna w alkoholach, ale nierozpuszczalna w rozpuszczalnikach niepolarnych, takich jak heksan i chloroform. Masa cząsteczkowa KOL to 1155,4 g/mol (Osol i Hoover, 1975).



**Ryc. 3. Wzór strukturalny Kolistyny (KOL).**  
(Źródło: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Colistin>)

KOL jest dostępna w postaci soli siarczanowej oraz jako kolistymetat sodowy. Jest podawana PO (siarczan KOL) i pozajelitowo (siarczan KOL, kolistymetat sodowy-CMS) (Li i wsp., 2003a).

### Farmakodynamika

Mechanizm działania KOL polega na interakcji z błoną zewnętrzną bakterii, zwłaszcza z cząsteczkami lipopolisacharydów, co powoduje wypieranie jonów wapnia i magnezu oraz destabilizację błony zewnętrznej. Ta destabilizacja prowadzi do wycieku zawartości komórkowej i w konsekwencji do starzenia się komórki oraz jej śmierci (Newton i wsp., 1956; Schindler i wsp., 1979; Nakajima, 1967; Pristovšek i Kidrič, 1999; Pristovšek i Kidrič, 2001).

KOL ma stosunkowo wąskie spektrum działania przeciwbakteryjnego. Jest wysoce skuteczna przeciwko bakteriom Gram-ujemnym, takim jak *Escherichia coli*, *Klebsiella spp.* i *Salmonella spp.*, a także *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*,

*Haemophilus spp.*, *Shigella spp.*, *Pasteurella spp.*, *Brucella spp.*, *Aerobacter aerogenes*, oraz *Bordetella bronchiseptica* (Poirel i wsp., 2017; Komura i wsp., 1979; Falagas i wsp., 2005; Storm i wsp., 1977). Bakterie Gram-dodatnie są na ogół mniej wrażliwe, jednakże istnieją wrażliwe szczepy np.: *Staphylococcus spp.*, *Bacillus spp.*, *Streptococcus pyogenes* i *Corynebacterium spp.* (Storm i wsp., 1977).

Głównym wskazaniem do stosowania KOL w medycynie weterynaryjnej są zakażenia przewodu pokarmowego wywołane przez nieinwazyjne szczepy *Escherichia coli* i *Salmonella spp.* (np. biegunka poodsadzeniowa prosiąt, ale także zakażenia u bydła, owiec, kóz i królików) (Catry i wsp., 2015; Rhouma i wsp., 2016).

KOL wykazuje również aktywność przeciwko endotoksynom wytwarzanym przez niektóre szczepy *Escherichia coli* w przewodzie pokarmowym u koni (efekt antytoksyczny, a nietypowo przeciwbakteryjny) związanej z ciężką kolką i innymi chorobami przewodu pokarmowego (Barton i wsp., 2004; Moore i Barton, 2003). KOL jest także stosowana u bydła, owiec i kóz produkujących mleko przeznaczone do spożycia przez ludzi (Catry i wsp., 2016; Rhouma i wsp., 2016; Elbadawy i Aboubakr, 2017).

Pomimo że, w wielu krajach KOL jest zakazana w leczeniu salmonelozy u drobiu (Lohren i wsp., 2008), jest często stosowana w leczeniu łagodnej kolibakteriozy (Kempf i wsp., 2013; Catry i wsp., 2015; Barbieri i wsp., 2017) oraz w skojarzeniu z amoksycyliną w leczeniu martwiczego zapalenia jelit u kurcząt brojlerów (Elbadawy i Aboubakr, 2017).

W przypadku stosowania u zwierząt gospodarskich, w tym drobiu, KOL jest zazwyczaj podawana PO z wodą pitną (Stefaniuk i Tyski, 2019), choć istnieją także postaci iniekcyjne. Zalecana dawka KOL różni się w zależności od produktu i gatunku zwierząt – proponowana dawka wynosi 75 000 IU siarczanu kolistyny/kg dla drobiu (kury, indyki) i 100 000 IU siarczanu kolistyny/kg dla innych zwierząt, takich jak cielęta, króliki i świnię (Friedlander i wsp., 2006).

Do 2015 roku uważano, że oporność na KOL w rodzinie *Enterobacteriaceae* powstaje na skutek mechanizmów chromosomalnych, które modyfikowały warstwę lipopolisacharydową (LPS) poprzez dodanie 2-aminoetanolu, fosfoetanoloaminy (PetN, pochodnej 2-aminoetanolu) lub innych pomp efluksowych, a także poprzez tworzenie otoczek przez te mikroorganizmy (Olaitan i wsp., 2014). Modyfikacja lipidu A w strukturze LPS może być związana z mutacjami prowadzącymi do aktywacji systemów dwuskładnikowych, takich jak PmrA/PmrB i PhoP/PhoQ, lub inaktywacji genu mgrB, co powoduje zniesienie negatywnej regulacji zwrotnej systemu PhoP/PhoQ w bakteriach

Gram-ujemnych. U *Escherichia coli* wykazano, że geny *etk* i *mgrR* mogą nadawać oporność na KOL (Delannoy i wsp., 2017).

W 2015 roku chińscy badacze przeanalizowali szczepy bakterii opornych na KOL i odkryli obecność genu *mcr-1*, który może przenosić się pomiędzy szczepami bakterii (Liu i wsp., 2016). Gen *mcr-1* koduje fosfoetanolaminotransferazę – enzym katalizujący przyłączanie fosfoetanolaminy (kationowej cząsteczki) do lipidu A w LPS, co zmienia ładunek błony komórkowej. W efekcie KOL (również kationowa) nie może związać się z błoną i wywołać jej lizy (Biswas i wsp., 2012).

Badania oparte na technice PCR pozwoliły na identyfikację kolejnych genów oporności na KOL związanych z plazmidami (*mcr-2* do *mcr-8*) i wykazały występowanie genu *mcr-2* w szczepach *Escherichia coli* izolowanych od bydła i trzody chlewnej (Xavier i wsp., 2016; AbuOun i wsp., 2017; Borowiak i wsp., 2017; Yin i wsp., 2017; Teo i wsp., 2018; Wang i wsp., 2018; Yang i wsp., 2018). Ponadto, geny *mcr-2*, do *mcr-8* wykazują 44-77% podobieństwa do *mcr-1*, a produkty białkowe przez nie syntetyzowane mają 32-83% homologię z sekwencją aminokwasową *mcr-1* (Joshi i wsp., 2019; Yassin i wsp., 2017; Pishnian i wsp., 2019; Benameura i wsp., 2014; Chiou i wsp., 2017; Anjum i wsp., 2016). W ciągu kolejnych dwóch lat został on wykryty w ponad 30 krajach i regionach (Liu i wsp., 2016; McGann i wsp., 2016; Schwarz i Johnson, 2016; Skov i Monnet, 2016). Co więcej, retrospektywne analizy wykazały, że pojawienie się *mcr-1* można było prześledzić aż do połowy lat 80. XX wieku, co sugeruje, że stosowanie KOL w paszach dla zwierząt mogło indukować i przyspieszać rozprzestrzenianie się tego mechanizmu oporności zarówno wśród zwierząt, jak i ludzi (Walsh i Wu, 2016).

Należy podkreślić, że KOL jest obecnie często przedstawiana w literaturze jako „terapia ostatniej szansy” w leczeniu infekcji wywołanych bakteriami Gram-ujemnymi o rozszerzonej oporności na antybiotyki (XDR - Extended drug resistance), wielolekoopornymi (MDR - Multidrug resistant) czy też całkowicie opornymi na dostępne antybiotyki (PDR - Pan-drug resistant) (Michalopoulos i Falagas, 2011; Paterson i Harris, 2016).

W czerwcu 2016 roku Europejska Agencja Leków (EMA) dokonała ponownej oceny swoich zaleceń dotyczących stosowania KOL w Europie (Walsh i Wu, 2016). W związku z powagą sytuacji podkreślono konieczność racjonalnego stosowania i nieustannego monitorowania stosowania KOL w hodowli zwierząt, w celu ochrony zdrowia publicznego i bezpieczeństwa żywności.

## Farmakokinetyka

CMS najczęściej stosowany u ludzi w postaci iniekcyjnej, jest nieaktywnym prolekiem KOL, który wykazuje niski poziom wiązania z białkami. Nie jest stabilny *in vitro* i *in vivo* i jest hydrolizowany w osoczu ludzkim, tworząc złożoną mieszaninę częściowo sulfometylowanych pochodnych, które mogą wytwarzać do 32 różnych produktów, w tym KOL (Li i wsp., 2005).

Farmakokinetyka KOL jest złożona ze względu na w/w występującą wewnątrzustrojową konwersję, jak również różnice w dystrybucji i metabolizmie obu form leku. Na podstawie badań przeprowadzonych na zdrowych ochotnikach ustalono, że maksymalne stężenie aktywnej formy leku było osiągane po 1-3 h od podania i było niższe niż maksymalne stężenie kolistymetatu sodowego (Couet i wsp., 2011; Mizuyachi i wsp., 2011; Zhao i wsp., 2018).

Siarczan KOL po podaniu PO u ludzi, zwierząt laboratoryjnych i gatunków docelowych jest słabo wchłaniany (Goetting i wsp., 2011; Blood i Radostits, 1989). Stężenia w osoczu są zwykle niewykrywalne po podaniu PO. Zwiększone wchłanianie po podaniu PO obserwowano u noworodków zwierząt (FAO, 2006). Wchłanianie z powierzchni błon śluzowych i gruczołu sutkowego jest minimalne (Blood i Radostits, 1989). Wyższe stężenia w osoczu stwierdzano po podaniu CMS niż po podaniu siarczanu KOL (Al-Khayyat i Aronson, 1973; Blood i Radostits, 1989).

KOL, stosowana jako siarczan kolistyny lub kolistymetat sodowy cechuje się znaczną międzygatunkową zmiennością farmakokinetyczną, przy dobrej biodostępności po podaniu pozajelitowym i znikomym wchłanianiu z przewodu pokarmowego u większości gatunków (Escoula i wsp., 1981; Terakado i wsp., 1972). Po wchłonięciu dystrybuuje się głównie w przestrzeni pozakomórkowej, choć stopień wiązania z tkankami zależy od gatunku i postaci preparatu (Ziv i Sulman, 1973a i 1973b; Al-Khayyat i Aronson, 1973).

U ludzi domięśniowe podanie kolistymetatu sodowego zapewniało terapeutyczne stężenia utrzymujące się 6-12 h, a po wyższych dawkach do 24 h;  $C_{max}$  rosło wraz z dawką (ok. 3-7,6  $\mu\text{g/ml}$  po 2 h) (FAO, 2006). Po podaniu dożylnym  $T_{1/2el}$  wynosił ok. 2 h dla kolistymetatu i ponad 4 h dla kolistyny zasadowej (Li i wsp., 2003b).

U psów po podaniu IM  $C_{max}$  osiągano po 0,5-1 h (2,8-17,7  $\mu\text{g/ml}$ ), a  $T_{1/2el}$  wynosił ok. 2,7 h i nie zależał od dawki. Objętość dystrybucji przekraczała przestrzeń płynu pozakomórkowego, a lek kumulował się w wątrobie, nerkach i mózgu; wydalanie zachodziło głównie przez nerki lub z kałem (Al Khayyat i Aronson, 1973).

U bydła po podaniu IV uzyskiwano  $C_{max}$  ok. 16  $\mu\text{g/ml}$  i  $T_{1/2el}$  4-6 h, natomiast po podaniu IM  $T_{max}$  wynosił 0,5-3 h, a eliminacja była wolniejsza u krów niż cieląt; stężenia w mleku były niskie (Ziv i wsp., 1982; Archimbault i wsp., 1980). Po podaniu doustnym lek często był niewykrywalny (Escoula i wsp., 1981).

U owiec kolistymetat dawał wyższe stężenia niż siarczan kolistyny, który silnie wiązał się z białkami (Ziv i Sulman, 1973a i 1973b). U świń po podaniu IV obserwowano szybki spadek stężeń, po IM  $T_{max}$  wynosił ok. 30 min, a  $T_{1/2el}$  4-4,5 h; po podaniu doustnym lek był wykrywany w surowicy i żółci (Sato i wsp., 1972; Lin i wsp., 2005; Terakado i wsp., 1972).

Metabolizm i eliminacja KOL wciąż nie są do końca poznane. U ludzi do 80% dawki KOL odzyskiwane jest w postaci niezmienionej z moczem i nie następuje wydalanie z żółcią. Można założyć, że pozostała część leku ulega inaktywacji w tkankach, jednak mechanizm tego zjawiska nie jest znany. Po podaniu kolistymetatu sodowego, KOL pojawia się w osoczu szybko. KOL wiąże się z osoczem ludzkim w około 50%  $C_{max}$  w surowicy po podaniu IV są osiągnięte w ciągu 10 minut i wydawały się wyższe, ale spadały szybciej niż te osiągnięte po podaniu IM (Froman i wsp., 1970).

Podobnie psy metabolizują KOL do związku pozbawionego aktywności przeciwdrobnoustrojowej. Około 67% KOL wydalanej z moczem stanowiła KOL o działaniu przeciwbakteryjnym, podczas gdy 33% stanowił metabolit o działaniu przeciwbakteryjnym nieaktywnym (Al-Khayyat i Aronson, 1973). Autorzy zauważają jednak, że badane dawki były wyższe niż normalne dawki terapeutyczne i mogą nie odzwierciedlać znaczenia metabolizmu w dawkach w zakresie terapeutycznym. Ponadto nie podjęto próby zidentyfikowania metabolitu.

U bydła leczonego dozwaczowo KOL i erytromycyną nie wykryto aktywności KOL w płynie żwaczowym (Escoula i wsp., 1981).

W przypadku drobiu, określano radioaktywność znakowanej KOL w odchodach po pojedynczym podaniu SC kolistymetatu jednodniowym kurczętom. W ciągu 28 dni pobierania próbek odzyskano mniej niż 33% podanej dawki. W próbkach pobranych w ciągu pierwszych 12 godzin aktywność przeciwdrobnoustrojowa stanowiła mniej niż 0,1% całkowitej dawki (US FDA, 1998).

Chociaż KOL jest bardzo słabo wchłaniana w jelicie, należy pamiętać, że uszkodzenie funkcjonowania bariery jelitowej związane z zakażeniami przewodu pokarmowego powoduje zwiększoną przepuszczalność jelitową (Camilleri i wsp., 2012)

i możliwość lepszej absorpcji. Natomiast, Rhouma i wsp., w 2015 roku odkryli, że KOL w kontakcie z sokiem żołądkowym zmniejsza swoją aktywność przeciwdrobnoustrojową.

### Toksyczność i działania niepożądane

Do głównych działań toksycznych KOL zalicza się: nefrotoksyczność (ostra martwica kanalików), neurotoksyczność (uszkodzenia nerwów obwodowych, porażenia i niedowłady kończyn), w tym poprzez blokadę przewodnictwa nerwowo-mięśniowego (splątanie, oczopląs, u ludzi zaburzenia mowy, porażenie mięśni oddechowych, bezdech), oraz zaburzenia hematologiczne (Biswas i wsp., 2012; Wu i wsp., 2024).

Mechanizm nefrotoksyczności KOL jest złożony i nie w pełni poznany. Badania na zwierzętach wykazały, że kolistymetat ulega w nerkach wydzielaniu, podczas gdy powstała w wyniku jego rozpadu KOL podlega nasilonej reabsorpcji. Oba te procesy prowadzą do bardzo wysokiego stężenia KOL w komórkach cewek nerkowych – zarówno tej reabsorbowanej, jak i powstałej wskutek wewnątrzkomórkowego rozpadu wydzielanego kolistymetatu. Nagromadzona KOL zaburza funkcjonowanie komórek, powodując m.in. zatrzymanie cyklu komórkowego, stres oksydacyjny i ostatecznie apoptozę (Li i wsp., 2004; Zavascki i wsp., 2017; Eadon i wsp., 2013; Dai i wsp., 2014).

Neurotoksyczność KOL jest stosunkowo rzadka i zazwyczaj ma łagodny przebieg. Objawy obejmują parestezje (częstsze po podaniu IV (Koch-Weser i wsp., 1970)), niedoczulicę, zawroty głowy, osłabienie mięśni, zaburzenia widzenia, zaburzenia zachowania i świadomości (w tym halucynacje), napady drgawkowe, zaburzenia równowagi, ataksję, zaburzenia słuchu, blokadę przewodnictwa nerwowo-mięśniowego oraz wtórne zahamowanie ośrodka oddechowego z bezdechami, a nawet encefalopatią (Molina i wsp., 2009; Nigam i wsp., 2015).

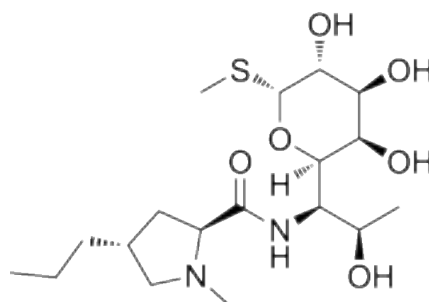
Mechanizmy neurotoksycznego działania KOL nie zostały w pełni wyjaśnione. Wiadomo jednak, że antybiotyk blokuje presynaptyczne uwalnianie acetylocholino, co zaburza przewodnictwo nerwowo-mięśniowe (Nigam i wsp., 2015). Czynnikiem ryzyka neurotoksyczności są także hipalbuminemia i jednoczesne stosowanie leków przeciwzapalnych (Nigam i wsp., 2015).

Wśród innych działań niepożądanych KOL opisywanych w literaturze wymienia się zaburzenia elektrolitowe (hiponatremia, hipokaliemia), podwyższone stężenia enzymów wątrobowych (Karnik i wsp., 2013), obrzęk naczyniowy, wymioty oraz wysypkę (Pintado i wsp., 2008).

Zgodnie z charakterystyką produktu leczniczego, jednoczesne stosowanie KOL z lekami neurotoksycznymi, nefrotoksycznymi (np. furosemidem, innymi diuretykami pętlowymi), antybiotykami z grupy makrolidów i fluorochinolonów, niedepolaryzującymi środkami zwiotczającymi oraz innymi substancjami hamującymi przewodnictwo nerwowo-mięśniowe może prowadzić do potencjalnie niekorzystnych interakcji (Wu i wsp., 2024; Leksykon, 2025).

### 2.3. Linkomycyna

Linkomycyna (LIN) jest naturalnym antybiotykiem należącym do grupy linkozamidów, wytwarzanym przez bakterie glebowe *Streptomyces lincolnensis* z rzędu promieniowców (actinomycetes), w procesie fermentacji (Chang i Weisblum, 1967; Spížek i Rezanka, 2004). Składa się z odmiennego aminokwasu, tj. trans-N-metylo-4-n-l-proliny (kwasu propylohydrynowego) połączonego wiązaniem peptydowym z cukrem 6-amino-6,8-dideoksy-1-tio-d-erytro- $\alpha$ -d-galaktopiranozydem (metylotio-lincosamidem) (Kagan i wsp., 1972; Horton i wsp., 1974).



**Ryc. 4. Wzór strukturalny Linkomycyny (LIN).**

(Źródło: <https://www.medchemexpress.com/lincomycin-standard.html>)

Masa cząsteczkowa LIN = 406,5 g/mol Jest rozpuszczalna w metanolu, niskoprocentowych alkoholach, acetonie, octanie etylu, chloroformie, a słabo rozpuszczalna w wodzie (O'Neil, 2006).

Mechanizm działania LIN polega na hamowaniu biosyntezy białek bakteryjnych przez wiązanie się z podjednostką 50S rybosomów bakteryjnych. Po wnikięciu do komórki bakteryjnej LIN łączy się odwracalnie z rybozymem peptydylotransferazą – 23S-rRNA podjednostki 50S rybosomu bakteryjnego i ją inaktywuje. W ten sposób hamuje tworzenie wiązań peptydowych pomiędzy aminokwasami. Ponadto LIN blokuje translację

rybosomu. Dochodzi do zahamowania elongacji łańcucha polipeptydowego, co skutkuje zablokowaniem syntezy białek bakteryjnych (Mateusen i wsp., 2002; Spížek i Rezanka, 2004). W warunkach *in vitro* LIN wywiera przeważnie działanie bakteriostatyczne. Jej działanie bakteriobójcze lub bakteriostatyczne zależy od stężenia leku w miejscu zakażenia oraz wrażliwości zakażonego organizmu (Czarniak i wsp., 2016). Spektrum przeciwbakteryjne to (Murray i wsp., 2022):

- drobnoustroje wrażliwe – rodzaje: *Actinomyces*, *Propionibacterium*, *Eubacterium*, *Peptococcus*, *Peptostreptococcus*, paciorkowce mikroaerofilne, gronkowce, w tym także szczepy metycylinooporne (występuje możliwość oporności krzyżowej), paciorkowce, w tym *Streptococcus pneumoniae*, pneumokoki;
- drobnoustroje umiarkowanie wrażliwe – rodzaje: *Bacteroides*, *Fusobacterium*, *Clostridium*;
- drobnoustroje słabo wrażliwe lub niewrażliwe: *Streptococcus faecalis*, większość szczepów *Haemophilus influenzae*, *Pseudomonas* i inne bakterie Gram-ujemne.

LIN jest stosowana w podaniu PO w przypadku:

Trzoda chlewna: leczenie i metafilaktyka enzoptycznego zapalenia płuc wywołanego przez *Mycoplasma hyopneumoniae*;

Kurczęta: leczenie i metafilaktyka martwiczego zapalenia jelit wywołanego przez *Clostridium perfringens*), a także stosowana leczniczo w kolibakteriozach.

Natomiast preparaty IM są dostępne do leczenia bakteryjnych zakażeń przewodu pokarmowego oraz układu oddechowego u cieląt i owiec (Fekry i wsp., 2023; Schreier i wsp., 2022; Khan i wsp., 2021; Kalill i wsp., 2022; Elkomy i wsp., 2019).

LIN często łączy się z innymi środkami przeciwdrobnoustrojowymi, takimi jak kitasamycyna (Kalill i wsp., 2022), spektinomycyna (Schreier i wsp., 2022; Kalill i wsp., 2022), diklazuril (Al-Aziz i wsp., 2014) i bacytracyna (Elkomy i wsp., 2019), w celu zwiększenia jej skuteczności.

Preparaty łączone z neomycyną są stosowane jako postaci dowymieniowe w okresie laktacji u bydła mlecznego w terapii ostrego zapalenia wymion (EMA, 1998).

Komisja Europejska do spraw Produktów Leczniczych Weterynaryjnych zaleca dawkowanie:

- a) w przypadku drobiu - PO w paszy lub wodzie pitnej, w dawkach odpowiadających do 5 mg linkomycy/kg m.c./dzień przez okres do 7 dni;
- b) przypadku trzody chlewnej - PO, w dawkach do 10 mg linkomycyny/kg m.c./dzień przez

okres do 21 dni lub IM w dawce 15 mg linkomycyny/kg m.c./dzień przez okres do 7 dni. Dawka IM dla cieląt i owiec wynosi do 15 mg linkomycyny/kg m.c./dzień przez okres do 4 dni (EMA, 1998).

LIN wykazuje oporność krzyżową z klindamycyną (półsyntetyczną chloropochodną LIN) w pełnym zakresie. Oporność gronkowców i paciorkowców jest najczęściej spowodowana metylacją określonych nukleotydów w 23S RNA wchodzącego w skład podjednostek 50S rybosomów. Co więcej, metylacja ta może determinować oporność krzyżową na makrolidy i streptograminy B (fenotyp MLSB) (Li i wsp., 2013; Kim i wsp., 2024).

### Farmakokinetyka

Farmakokinetykę LIN u ludzi badano po podaniu różnymi drogami. Około 72% LIN wiąże się z białkami osocza i jest szeroko dystrybuowana, a  $V_d$  odpowiada całkowitej wodzie ustrojowej. LIN wydalana jest głównie z kałem, a istotną drogą eliminacji jest również wydzielanie z żółcią. Znaczące stężenia osiągane są w wielu tkankach i płynach ustrojowych niezależnie od drogi podania m.in. w żółci, płynie otrzewnowym, opłucnowym, oku, mózgu, kości, szpiku, torebkach stawowych, płynie maziowym i mózgowo-rdzeniowym. LIN zwykle słabo penetruje do płynu mózgowo-rdzeniowego, chyba że występuje stan zapalny, gdzie w zapaleniu opon mózgowych osiąga stężenia terapeutyczne (Fass, 1981).

LIN przenika przez łożysko. Po jednorazowym podaniu IM, 600 mg ciężarnym kobietom, stężenie w płynie owodniowym wynosiło 0,2-3,8 mg/ml i utrzymywało się przez 52 h. Obecność leku wykryto również w sianie i mleku (Fass, 1981).

Tylko niewielka część dawki PO linkozamidów dociera do dolnych partii jelita (Greenlees i wsp., 2000). Przykładowo klindamycyna wchłania się niemal całkowicie, natomiast LIN szybko, ale słabo (Goodman i Gilman, 1975). Biodostępność u ludzi szacowana jest na 25-50% na czczo, lecz tylko 5% po posiłku (Hornish i wsp., 1987).

Farmakokinetyka LIN opisana jest u psów (Brown i wsp., 1975; Greenlees i wsp., 2000), kotów (Albarelllos i wsp., 2003, 2012, 2013), trzody chlewnej (Nielsen i Gyrd-Hansen, 1998; Kuroha i wsp., 2001; JECFA, 2000; Greenlees i wsp., 2000, 1987; JECFA, 2000; Hamdy i wsp., 1981; Chaleva i Nguyen, 1987; HuiMin i wsp., 2012), kóz (Sharma i wsp., 2017; 2019, Sharma i Dumka, 2016; Abo El-Sooud i wsp., 2004), owiec (Ziv i Sulman 1973a i 1973b), bydła (Burrows i wsp., 1983; Burrows i wsp., 1986; Hornish i wsp., 1987; JECFA, 2000; Gouri i wsp., 2014) oraz drobiu (Shamakh i wsp., 2022; Kim i

wsp., 2024; Chaleva i Dzhurov, 1987; Elkomy i wsp., 2019).

U zwierząt wchłanianie linkomycyny po podaniu doustnym jest ograniczone, natomiast wyraźnie lepsze po podaniu domięśniowym;  $C_{max}$  osiągane jest po 2-4 h (PO) i 1-2 h (IM) (Aiello i May, 1998; Hornish i wsp., 1987). U psów po podaniu IM (20 mg/kg m.c.) lek wchłania się szybko ( $C_{max}$  ok. 30 min), a po PO (300 mg/kg m.c.)  $t_{max}$  wynosi 1-2 h; najwyższe stężenia obserwowano w nerkach i żółci, a najniższe w OUN (Greenlees i wsp., 2000).

U świń dawki doustne 4,4-22 mg/kg m.c. zapewniają szybkie osiągnięcie stężeń terapeutycznych ( $C_{max}$  1,8-5,1  $\mu\text{g/ml}$  w ok. 1 h), przy niskim wiązaniu z białkami (<4%) (DeGeeter i Stahl, 1976). Okres półtrwania wynosi ok. 2,0 h (IV) i 3,4 h (PO), natomiast w tkankach (wątroba, nerki) jest znacznie dłuższy (24-29 h) (Hornish i wsp., 1987; JECFA, 2000). U owiec po IM (20 mg/kg m.c.)  $C_{max}$  wynosi 12,3  $\mu\text{g/ml}$  (1 h), a w mleku osiąga bardzo wysokie wartości (Ziv i Sulman, 1973a i 1973b).

U krów mlecznych ok. 32% dawki wydalane jest z moczem, natomiast po podaniu domacicznym większość eliminowana jest z mlekiem (85–95%) (Hornish i wsp., 1987). LIN ulega intensywnemu metabolizmowi (liczne metabolity, głównie forma niezmieniona, N-desmetyl-linkomycyna i sulfotlenek), przy czym u różnych gatunków dominującą postacią wydalaną pozostaje lek niezmieniony (Hornish i wsp., 1987; JECFA, 2000). U świń 11-21% dawki wydalane jest z moczem, a większość z przewodu pokarmowego, głównie w postaci metabolitów (Hornish i wsp., 1987).

W przypadku drobiu danych literaturowych odnośnie PK jest niewiele i są niejednoznaczne, gdyż m.in. sugerują dobre wchłanianie w przypadku broilerów (Elsayed i wsp., 2015; Shamakh i wsp., 2022), a zarazem bardzo słabe w przypadku niosek - jedynie 2,6% przy istotnie niższych stężeniach w surowicy niż po podaniu IV (Kim i wsp., 2024; Chaleva i Dzhurov, 1987).

Shamakh i inn. (2022) badali przebieg kinetyki LIN u kurcząt brojlerów po jednorazowym podaniu PO w dawce 10 mg/kg m.c. Stężenia LIN w surowicy oznaczano za pomocą wysokosprawnej chromatografii cieczowej w odwróconym układzie faz (RP-HPLC). Uznano, że otwarty model dwukompartamentowy najlepiej opisuje kinetykę leku po podaniu PO. Po podaniu PO lek osiągał  $C_{max}$  wynoszące  $5,892 \pm 0,060 \mu\text{g/ml}$  w  $T_{max}$   $1,241 \pm 0,015 \text{ h}$ .  $T_{1/2(ab)}$  wynosił  $0,347 \pm 0,016 \text{ h}$ , a  $AUC_{0-t}$  wynosiło  $48,868 \pm 0,175 \mu\text{g/ml}\cdot\text{h}$ . LIN była eliminowana z szybkością ( $K_{10}$ ) równą  $0,147 \pm 0,006 \text{ h}^{-1}$  i usuwana przez wszystkie procesy klirensu w organizmie ( $Cl/F$ ) z szybkością  $0,312 \pm 0,004 (\text{mg/kg})/(\mu\text{g/ml})/\text{h}$ . Podsumowując, LIN podawana PO w dawce 10 mg/kg m.c. wykazała

korzystny profil PK, z długim  $t_{1/2_{el}}$  wynoszącym  $7,041 \pm 0,402$  h.

Parametry PK w tym biodostępność dla LIN po jednorazowym podaniu IV i PO określono u kurcząt brojlerów. Zbadano również wpływ amprolium na kinetykę dystrybucji i poziomy pozostałości LIN w tkankach po wielokrotnym podaniu PO. Model dwukompartamentowy najlepiej opisywał kinetykę leku po podaniu jednorazowym IV w dawce 20 mg/kg m.c. zdrowym broilerom, z  $t_{1/2_{el}}$  równym  $2,93 \pm 0,014$  h, objętością dystrybucji w stanie stacjonarnym ( $V_{d_{ss}}$ ) wynoszącą  $1,76 \pm 0,014$  L/kg oraz całkowitym klirensiem ( $Cl_{tot}$ ) równym  $0,457 \pm 0,004$  L/kg/h. Po jednorazowym podaniu PO,  $C_{max}$  wynosiło  $7,08 \pm 0,16$   $\mu\text{g/ml}$  i było osiągnięte po czasie  $T_{max} = 1,16 \pm 0,02$  h. Średnia biodostępność ogólnoustrojowa po podaniu PO wynosiła  $71,32 \pm 2,62\%$ . Po wielokrotnym podaniu PO LIN zdrowym brojlerom, najwyższe stężenie w osoczu osiągnięto w ciągu jednej godziny po każdej dawce. Podanie amprolium powodowało istotne zmniejszenie maksymalnego stężenia LIN w osoczu ( $C_{max} = 7,29 \pm 0,204$   $\mu\text{g/ml}$ ) w porównaniu do samej LIN ( $C_{max} = 8,13 \pm 0,244$   $\mu\text{g/ml}$ ). Ponadto, amprolium znacząco zmniejszało poziomy pozostałości LIN w tkankach (Elsayed i wsp., 2015).

Natomiast, po jednorazowym podaniu LIN do wola brojlerów w dawkach 50 i 100 mg/kg, większość podanej dawki stwierdzano w surowicy krwi odpowiednio w 2. godzinie oraz do 6. i 8. godziny po podaniu. Badania wpływu wieku na stężenie w surowicy przy tej drodze podania wykazały, że preparat wchłaniał się szybciej u brojlerów niż u kur niosek, natomiast w zakresie utrzymywania się stężeń nie odnotowano istotnych różnic. Natomiast po jednorazowym podaniu PO LIN brojlerom w dawce 100 mg/kg, antybiotyk kumulował się głównie w nerkach, wątrobie i płucach, a także w treści jelita cienkiego i grubego. Po podaniu do wola nioskom w dawkach 100 mg/kg przez 7 dni, LIN była wydalana w jajach zarówno w trakcie leczenia, jak i przez 4 dni po jego zakończeniu, w stężeniach bakteriostatycznych wynoszących 0,6-5,9  $\mu\text{g/cm}^3$  (Chaleva i Dzhurov, 1987).

Celem kolejnego badania była ocena doustnej biodostępności dla LIN na podstawie danych PK po podaniu IV i PO oraz porównanie pozostałości leku w jajach. W badaniu biodostępności nioski podzielono na dwie grupy: PO i IV ( $n = 8/\text{grupa}$ ), którym jednorazowo podano LIN w dawce 10 mg/kg m.c. Grupa PO wykazywała istotnie niższe średnie stężenie leku w surowicy w porównaniu do grupy IV, a F po podaniu PO wynosiła jedynie 2,6%. Badanie potwierdziło, że LIN cechuje bardzo niska biodostępność po podaniu PO u niosek (Kim i wsp., 2024).

W badaniu Elkomy i Aboubakr, (2020) porównywano biorównoważność preparatów

Lincopharm 800® i Lincoyosr® u zdrowych kurcząt brojlerów po podaniu PO obu produktów w dawce 20 mg linkomycyny/kg m.c. 24 kurczęta brojlery podzielono na dwie grupy. Pierwsza grupa została przeznaczona do badania PK preparatu Lincopharm 800®, natomiast druga do badania PK preparatu Lincoyosr®. Każdemu osobnikowi z obu grup podano PO 20 mg linkomycyny/kg m.c. Kinetyka dystrybucji preparatów Lincopharm 800® i Lincoyosr® po podaniu PO 20 mg linkomycyny/kg m.c. wykazała, że  $C_{max}$  wynosiły odpowiednio 4,81 i 4,62  $\mu\text{g/ml}$ , osiągnęte przy  $T_{max}$  wynoszącym odpowiednio 1,36 i 1,35 godziny. Podsumowując Preparat Lincoyosr® był biorównoważny względem Lincopharm 800®, ponieważ stosunki parametrów  $C_{max}$ ,  $AUC_{0-24}$  oraz  $AUC_{0-\infty}$  wynosiły odpowiednio 0,96, 0,92 oraz 0,91. Wszystkie wartości mieściły się w akceptowalnym zakresie biorównoważności.

Podsumowując, mając na uwadze znikome dane literaturowe odnośnie PK LIN u drobiu są one niejednoznaczne, gdyż m.in. sugerują dobre wchłanianie w przypadku broilerów, a zarazem bardzo słabe w przypadku niosek (jedynie 2,6%) przy istotnie niższych stężeniach w surowicy niż po podaniu IV.

#### Toksyczność i działania niepożądane

LIN ma niską toksyczność ostrą. U szczurów i myszy ostra doustna dawka  $LD_{50}$  chlorowodoru LIN zawsze była większa niż 5000 mg/kg m.c. Objawy toksyczności obserwowane przy dawkach 8000 mg/kg m.c. i wyższych obejmowały osłabienie, depresję, biegunkę i drgawki. Substancja była bardziej toksyczna po podaniu pozajelitowym, przy czym przy podaniu IV wartości  $LD_{50}$  wynosiły 214 i 342 mg/kg m.c. odpowiednio u myszy i szczurów (Greenlees i wsp., 2000).

Badania toksyczności przewlekłej, genotoksyczności, działania kancerogennego oraz teratogennego wykazały, że LIN jest antybiotykiem stosunkowo bezpiecznym (WHO, 2000).

Przedawkowanie, objawia się zwiększonym ryzykiem wystąpienia poważnych działań niepożądanych, takich jak zaburzenia żołądkowo-jelitowe, w tym zapalenie okrężnicy, zakażenia wtórne w tym ryzyko rzekomobłoniastego zapalenia jelita grubego (na tle *Clostridioides difficile*) – szczególnie groźne u ludzi (10%), ale potencjalnie możliwe u innych gatunków (Fass, 1981; Gilbert, 1994; Goodman i Gilman, 1975). Zwłaszcza u ludzi istnieje ryzyko pojawienia się silnych reakcji nadwrażliwości w tym anafilaksji oraz ciężkich reakcji skórnych (rumień wielopostaciowy, zespół Stevensa-Johnsona) (Kucers i Bennett, 1979). Nadwrażliwość na klindamycynę prawdopodobnie rozwija taką samą

reakcję w trakcie leczenia LIN. Ponadto pacjenci nadwrażliwi na penicylinę również rozwijali reakcje nadwrażliwości podczas leczenia LIN.

LIN blokuje płytkę nerwowo-mięśniową i może nasilać działanie leków o podobnych właściwościach (Kapusnik-Uner i wsp., 1996).

### 3. BADANIA FARMAKOKINETYCZNE

#### - CHARAKTERYSTYKA WYBRANYCH PARAMETRÓW

Badania farmakokinetyczne są jednym z pierwszych kroków w przedklinicznej ocenie leku. Poprzez badanie przebiegu zmian stężenia (ilości) leku i jego metabolitów w płynach ustrojowych, tkankach i wydalinach z równoczesnym ustaleniem zależności matematycznych opisujących i tłumaczących znalezione dane analityczne, możemy dokładnie poznać losy danej substancji w ustroju oraz wyznaczyć dla niej parametry PK (Danysz, 1996; Grabowski, 2015; Roliński, 2008).

Ocena profilu farmakokinetycznego:

- umożliwia uzyskanie danych odnośnie zachowania leku *in vitro*, a *in vivo*, np. mniej silne działanie w warunkach *in vitro* cząsteczki leku, w warunkach *in vivo* z powodu ich korzystnej kinetyki (większa absorpcja, lepsza dystrybucja itp.), mogą być bardziej skuteczne;
- umożliwia ocenę wysokości stężenia leku w osoczu po podaniu różnymi drogami w stosunku do zastosowanej dawki w aspekcie ekstrapolacji danych np. z medycyny ludzkiej;
- umożliwia oszacowanie pola powierzchni pod krzywą i stężenia maksymalnego leku stwierdzanych w osoczu, dzięki którym można ocenić ekspozycję organizmu na lek;
- wykazuje różnice w farmakokinetyce między różnymi grupami pacjentów, różnymi gatunkami, różnymi drogami podania czy też długością leczenia i innymi czynnikami (np. podanie przed i po karmieniu);
- umożliwia ocenę zmienności między poszczególnymi osobnikami, a także pomaga zidentyfikować przypadki z odbiegającymi poziomami leku.

Znajomość kinetyki i efektów działania leków (farmakodynamika) są niezbędne do prawidłowego zastosowania leku w terapii (Hermann, 2002) poprzez ustalenie hipotetycznej dawki i interwałów podawania w oparciu o wartość MEC (Minimal Effective Concentration - minimalne skuteczne stężenie), oszacowane nie tylko dla danego gatunku zwierzęcia, ale też ekstrapolowane z innych gatunków.

### 3.1. Losy leku w ustroju

U podstaw farmakokinetyki (*farmakon* - lek, *kinesis* - ruch) leży ilościowa analiza matematyczna procesów zachodzących w ustroju po podaniu leku. Do procesów tych zaliczamy: wchłanianie (absorpcję) oraz dyspozycję. Poprzez dyspozycję rozumie się rozmieszczanie (dystrybucję), metabolizm (biotransformację) i wydalanie (eliminację) (Grabowski, 2015; Danysz, 1996; Rosenbaum, 2012). Proces ten wykazuje indywidualną zmienność, zależną od takich czynników jak: wiek, płeć, predyspozycje genetyczne oraz gatunek lub rasa zwierząt (Riviere i Papich, 2013). W przypadku leków podanych drogą IV mamy do czynienia jedynie z dyspozycją leku, ponieważ lek dostaje się bezpośrednio do krwi. W przypadku większości leków podanych parenteralnie warunkiem ich ogólnoustrojowego działania jest wchłonięcie z miejsca podania do krwi. Dopiero po wchłonięciu do krwi lek może dotrzeć do miejsca swojego docelowego działania i wywrzeć tam odpowiedni, zaplanowany efekt farmakologiczny (Hermann, 2002). Procesy absorpcji, dystrybucji, metabolizmu i eliminacji stanowią więc, fundamentalny model opisujący losy leku w organizmie po jego podaniu. Zrozumienie tych procesów jest kluczowe w farmakologii klinicznej, gdyż determinują one biodostępność substancji leczniczej, jej stężenie w docelowym miejscu działania oraz czas utrzymywania się efektu terapeutycznego.

#### Wchłanianie

Wchłanianie leku odnosi się do jego przechodzenia z miejsca podania do krwiobiegu lub krążenia ogólnoustrojowego, jak opisują Riviere i Papich (2013). Zakres absorpcji leku zależy zarówno od metody podania, jak i od jego formulacji. Leki podawane IV dostają się bezpośrednio do układu krążenia, podczas gdy drogi pozanaczyniowe wymagają dłuższego procesu wchłaniania. Ponadto płynne formy leków wchłaniają się szybciej ze względu na ich naturalną rozpuszczalność, natomiast formy stałe, takie jak tabletki czy kapsułki, muszą najpierw ulec rozpuszczeniu. Proces ten częściowo zależy od stałej dysocjacji leku. Leki podawane PO są głównie wchłaniane przez nabłonek przewodu pokarmowego, jednak intensywny metabolizm wątrobowy może ograniczyć ich stężenie w krążeniu ogólnoustrojowym do poziomu niewystarczającego dla uzyskania efektu terapeutycznego.

W skrócie, absorpcja leku jest determinowana przez różne czynniki, w tym formulację, rozmiar cząstek, właściwości fizykochemiczne (np. pH, lipofilność), drogę podania, rozpuszczalność leku, gatunek zwierzęcia, stan ogólnoustrojowy oraz zarówno

patologiczne, jak i fizjologiczne warunki organizmu (Riviere i Papich, 2013; Brunton i wsp., 2011).

Należy podkreślić, że wchłanianie leku odgrywa kluczową rolę w określaniu jego biodostępności, czyli proporcji substancji czynnej, która skutecznie dostaje się do krążenia ogólnoustrojowego – kwestia ta ma istotne znaczenie kliniczne (Brunton i wsp., 2011). W konsekwencji biodostępność leku podlega tym samym czynnikom, które wpływają na jego absorpcję.

### **Dystrybucja**

Po wchłonięciu lub podaniu do układu krążenia leki ulegają dystrybucji do różnych płynów ustrojowych, takich jak osocze, płyn zewnątrzkomórkowy i płyn wewnątrzkomórkowy, docelowo osiągając tkanki narządowe. Proces ten zależy od wielu czynników fizjologicznych organizmu oraz właściwości fizykochemicznych samego leku.

Czynniki fizjologiczne obejmują m.in. pojemność minutową serca, regionalny przepływ krwi, przepuszczalność naczyń włosowatych oraz objętość tkanek, natomiast do cech fizykochemicznych leku zaliczają się masa cząsteczkowa, pKa i rozpuszczalność w lipidach (Brunton i wsp., 2011; Riviere i Papich, 2013).

W większości przypadków leki początkowo trafiają do dobrze ukrwionych narządów, takich jak serce, wątroba, nerki i mózg, a następnie stopniowo dyfundują do słabiej unaczynionych tkanek, takich jak skóra, tkanka tłuszczowa i narządy wewnętrzne (Riviere, 2009). Warto zauważyć, że leki lipofilne wykazują szerszą dystrybucję (Fahr i wsp., 2005).

### **Metabolizm**

Metabolizm leków, znany również jako biotransformacja, obejmuje szereg reakcji enzymatycznych lub chemicznych, które przekształcają lek w celu wywołania efektu terapeutycznego lub zakończenia jego aktywności biologicznej. Zazwyczaj metabolity powstałe w tych procesach wykazują zwiększoną polarność (hydrofilność) (Brunton i wsp., 2011).

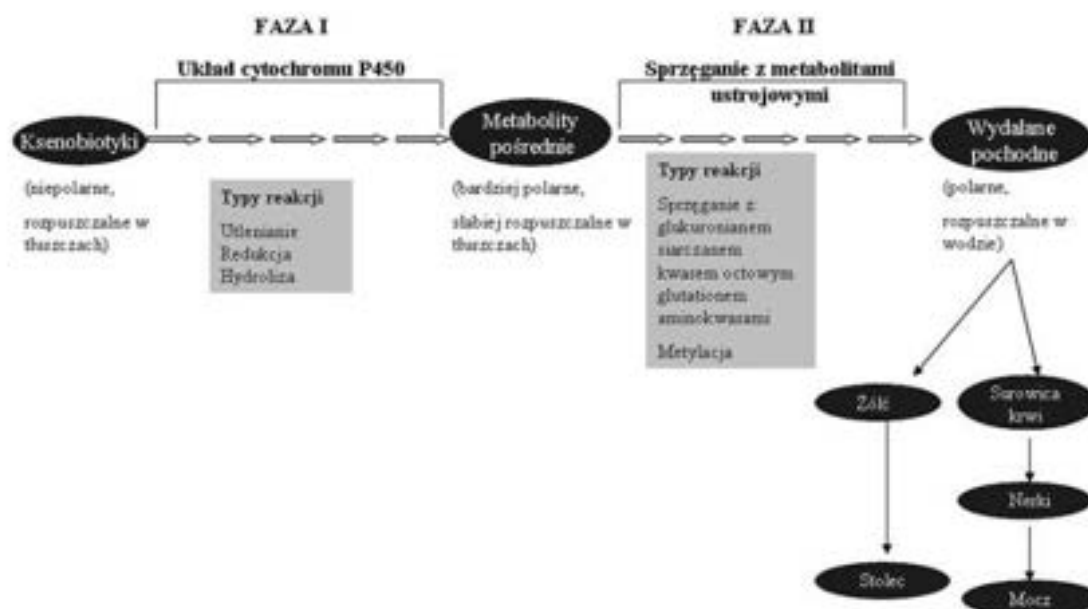
Procesy te dzieli się na reakcje fazy I i fazy II, które zachodzą głównie w hepatocytach.

a) Reakcje fazy I obejmują podstawowe mechanizmy biotransformacji, takie jak hydroliza, utlenianie i redukcja. W ich wyniku lek macierzysty jest przekształcany w bardziej polarny metabolit poprzez dodanie lub odsłonięcie grup funkcyjnych, takich jak -OH lub -NH. Powstały metabolit może być bardziej aktywny od związku wyjściowego lub jeśli jest

wystarczająco polarny, może zostać szybko wydany przez nerki. Reakcje fazy I są katalizowane przez izoformy enzymów z rodziny cytochromu P450 (CYP450).

b) Z kolei reakcje fazy II zazwyczaj obejmują sprzężanie metabolitów fazy I z cząsteczkami takimi jak kwas glukuronowy, aminokwasy, octan, glutation czy siarczany. Prowadzi to do powstania silnie polarnych, nieaktywnych związków, które są szybko wydalone z moczem i kałem (Brunton i wsp., 2011).

Podczas gdy wątroba jest głównym narządem zawierającym enzymy odpowiedzialne za metabolizm leków, warto zauważyć, że także inne narządy, takie jak przewód pokarmowy, nerki i płuca, posiadają znaczące zdolności metaboliczne. Ten rozszerzony udział w metabolizmie może znacząco wpływać na proces przetwarzania leków. Na przykład znaczna część leku podanego PO może ulec metabolicznej inaktywacji jeszcze w przewodzie pokarmowym lub w wątrobie, zanim dostanie się do krążenia ogólnoustrojowego. Zjawisko to jest powszechnie określane jako efekt pierwszego przejścia i znacząco zmniejsza biodostępność doustną leków szczególnie podatnych na zmiany metaboliczne, takich jak morfina (Brunton i wsp., 2011). W konsekwencji metabolizm leków, czyli biotransformacja, odgrywa kluczową rolę w modulowaniu aktywności leku, zarówno w celu osłabienia, jak i wzmocnienia jego działania.



Ryc. 5. Metabolizm leków w wątrobie.

(Źródło: <http://e-biotechnologia.pl/artykuly/metabolizm-ksenobiotykow/>)

## Wydalanie

Proces wydalania leku obejmuje eliminację substancji z organizmu, zarówno w jej niezmienionej postaci, jak i po przekształceniu w metabolity. Wśród narządów odpowiedzialnych za wydalanie leków kluczową rolę odgrywają nerki, które usuwają zarówno same leki, jak i ich metabolity. W procesie wydalania biorą udział trzy podstawowe mechanizmy: filtracja kłębuszkowa, aktywne wydzielanie kanalikowe i bierna reabsorpcja kanalikowa. Jakikolwiek zaburzenia funkcji nerek mogą mieć istotny wpływ na wszystkie te procesy. Wydalanie zależy od wskaźnika filtracji kłębuszkowej (GFR) oraz stopnia wiązania leku z białkami osocza, gdyż tylko niezwiązane cząsteczki leku mogą zostać przefiltrowane przez nerki.

Na wydalanie nerkowe wpływa także kilka innych czynników, w tym stan jonizacji metabolitu, aktywne wydzielanie kanalikowe w bliższym kanalikule nerkowym oraz obecność transporterów, takich jak białko oporności wielolekowej typu 2 (MRP2), które znajduje się w apikalnej błonie szczoteczkowej i ułatwia wydzielanie sprzężonych metabolitów. Istotnym czynnikiem wpływającym na wydalanie leków jest również ciśnienie krwi.

W bliższych i dalszych kanalikach nerkowych zachodzi bierna reabsorpcja niezdisocjowanych słabych kwasów i zasad. Komórki kanalikowe wykazują mniejszą przepuszczalność dla zjonizowanych form słabych elektrolitów, dlatego ich absorpcja jest zależna od pH moczu. Alkaliczność moczu powoduje jonizację słabych kwasów, co przyspiesza ich wydalanie. Przykładem może być zwiększone wydalanie kwasu salicylowego po alkalizacji moczu (Brunton i wsp., 2011).

Oprócz nerek pewne narządy, takie jak płuca, odgrywają istotną rolę w eliminacji niektórych leków, na przykład gazów anestetycznych. Ponadto niektóre związki mogą być wydalane z kałem. Może to wynikać z ich niewchłonięcia po podaniu PO lub z ich wydalania w postaci metabolitów, zwłaszcza glukuronidów, które są usuwane z żółcią lub wydzielane do światła jelita bez ponownej absorpcji (Brunton i wsp., 2011).

Warto zauważyć, że niektóre metabolity mogą podlegać reabsorpcji w świetle jelita, co nazywane jest krążeniem wątrobowo-jelitowym. Zjawisko to wydłuża obecność leku w krążeniu, a tym samym zwiększa jego okres półtrwania ( $t_{1/2}$ ) (Roberts i wsp., 2002). Na proces wydalania wpływają również takie czynniki jak lipofilność, jonizacja, polarność oraz masa cząsteczkowa leku.

Oprócz opisanych wyżej dróg eliminacji, leki mogą być również wydalane innymi szlakami, takimi jak skóra (przez pot), ślina, łzy, włosy, mleko matki, a nawet mięso

(w przypadku zwierząt przeznaczonych na ubój) (Brunton i wsp., 2011; Katzung i wsp., 2004).

### 3.2. Farmakokinetyka kompartmentowa/niekompartmentowa

Matematyczna interpretacja wyników uzyskanych w badaniach PK wymaga przyjęcia odpowiedniego modelu, zakładającego, że organizm stanowi jeden lub więcej tzw. kompartmentów (każdy reprezentuje odrębną przestrzeń fizjologiczną bądź anatomiczną, gdzie stężenia są względnie jednorodne). W zależności od swoich właściwości, leki w organizmie ulegają rozmieszczeniu jedynie we krwi (np. dekstran) lub też przenikają do tkanek i narządów. Umowną przestrzeń dystrybucyjną, w której substancja rozmieszcza się równomiernie w danej jednostce czasu nazwano kompartmentem. Przyjmuje się, że istnieją dwa rodzaje kompartmentu: centralny oraz obwodowy. Kompartment centralny stanowi krew, natomiast kompartment obwodowy (tkankowy) stanowią tkanki i narządy. Zakłada się, że leki przemieszczają się między tymi kompartmentami, a dystrybucja w każdym z nich podlega kinetyce I rzędu. W przypadku niektórych leków o charakterystycznych właściwościach fizykochemicznych możemy mieć do czynienia z sytuacją, w której leki gromadzą się jedynie w wybranych tkankach lub narządach, do których mają szczególne powinowactwo (tkanka tłuszczowa, mięśnie i układ limfatyczny). Obszar taki nazywany jest kompartmentem głębokim lub wolnowymiennym (tzw. model trzech kompartmentów) (Danysz, 1996; Grabowski, 2015; Toutain i Lees, 2004).

Model jednokompartmentowy jest najprostszym sposobem opisu procesów zachodzących w organizmie. Zakłada on natychmiastowe i homogenne rozmieszczenie leku w ustroju. Eliminacja substancji oznacza w tym przypadku eliminację substancji z całego organizmu. Opiera się na matematycznych modelach (równaniach różniczkowych) opisujących zmiany stężenia leku w każdym kompartmentcie w czasie. Modele te opisują parametry takie jak  $Cl$ ,  $Vd$  oraz stałe szybkości eliminacji, które można oszacować metodami dopasowywania krzywych. W sytuacji, w której opis za pomocą modelu jednokompartmentowego jest niewystarczający należy rozważyć przyjęcie modelu dwukompartmentowego. Kompartment pierwszy symbolizuje krew i dobrze ukrwione tkanki, a drugi, tkanki mniej ukrwione. Czasem także model 2-kompartmentowy okazuje się niewystarczający. Alternatywą w takiej sytuacji jest model  $n$ -kompartmentowy. Farmakokinetyka kompartmentowa wymaga wielu punktów pomiarowych w czasie, aby dokładnie oszacować parametry, przez co potrzebne są obszerne zbiory danych (Cobelli i Toffolo, 1984; Hermann, 2002).

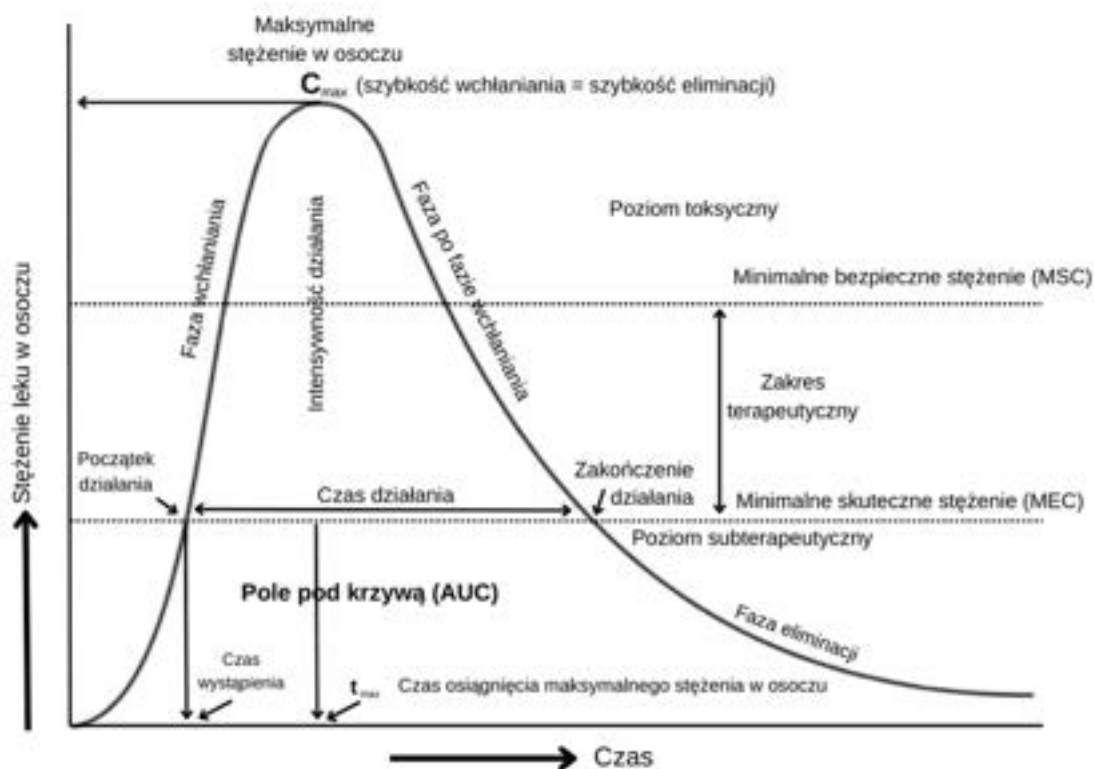
W ostatnich latach coraz częściej obserwuje się tendencje do przeprowadzania badań na tzw. modelu niekompartmentowym (PK niezależna od modelu, bezmodelowa).

Analiza niekompartmentowa nie opiera się na podziale na kompartmenty. Zamiast tego analizuje cały profil stężenia leku w czasie bez odniesienia do konkretnych przedziałów.

Zastosowanie modelu niekompartmentowego pozwala na opisywanie zarówno kinetyki liniowej, jak i nieliniowej. Farmakokinetyka liniowa ( $I^\circ$ ) opisuje procesy PK, których szybkości są liniową funkcją stężenia, a wielkości parametrów PK nie zależą od podanej dawki leku. Farmakokinetyka nieliniowa ( $0^\circ$ ) opisuje procesy PK, których szybkości nie są liniową funkcją stężenia leku. Konsekwencją nieliniowości tych procesów jest zmienność parametrów PK w zależności od podanej dawki leku (Grabowski, 2015; Cutler, 1978). Farmakokinetyka niekompartmentowa nie wymaga modelowania, a jedynie wykorzystuje proste formuły matematyczne do obliczania parametrów PK takich jak: pole powierzchni pod krzywą, maksymalne stężenie leku, czas osiągnięcia maksymalnego stężenia i okres półtrwania. Ponadto może być przeprowadzona na podstawie mniejszej liczby punktów pomiarowych i nie wymaga pełnego profilu stężenia w czasie. Jest szczególnie przydatna w przypadku ograniczonej liczby próbek. Bezmodelowe podejście do farmakokinetyki uważane jest za bardziej obiektywne, niezależne od ustawienia doświadczenia (Hermann, 2002). Podsumowując, parametry PK są obliczane bez modelowania, bezpośrednio na podstawie zaobserwowanych danych (Gabrielsson i Weiner, 2001; Cutler, 1978). Wybór między tymi podejściami zależy od celów badania, dostępnych danych i stopnia skomplikowania PK leku.

### 3.3. Podstawowe parametry farmakokinetyczne

Farmakokinetyka jest nauką praktyczną. W przebiegu badań PK określa się wpływ czasu, dawki i drogi podania na losy leku w ustroju (Hermann, 2002). Znajomość wskaźników PK danej substancji umożliwia racjonalne zastosowanie w lecznictwie. Do kluczowych parametrów PK należą: klirens (Cl), objętość dystrybucji ( $V_d$ ), okres półtrwania ( $t_{1/2}$ ) oraz biodostępność (F). Oprócz tych parametrów istotnym wskaźnikiem zarówno w analizach PK, jak i PD jest pole pod krzywą (AUC).



**Ryc. 6. Typowy profil zależności stężenia leku w osoczu od czasu, przedstawiający parametry PK i PD, uzyskany po doustnym podaniu pojedynczej dawki leku. (Źródło: <https://www.pharmacy180.com/article/plasma-drug-concentration-time-profile-2506/> po modyfikacji Autora)**

### Pole powierzchni pod krzywą (AUC)

Jest to całkowita powierzchnia pod krzywą opisującą zmierzone stężenie leku w krążeniu ogólnoustrojowym w czasie (Brunton i wsp., 2011). Odzwierciedla rzeczywistą ekspozycję organizmu na lek po podaniu dawki i jest wyrażane w  $\text{mg}\cdot\text{h}/\text{L}$ . AUC jest zależne zarówno od szybkości eliminacji leku z organizmu, jak i od podanej dawki.

Aby obliczyć całkowitą ilość leku wyeliminowaną z organizmu, można sumować lub całkować ilości eliminowane w poszczególnych przedziałach czasowych, począwszy od momentu podania leku (czas zero), aż do nieskończoności. Ta całkowita ilość odpowiada frakcji podanej dawki, która ostatecznie dostaje się do krążenia ogólnoustrojowego.

W przypadkach, gdy lek wykazuje kinetykę liniową, AUC jest wprost proporcjonalne do dawki. Natomiast wykazuje odwrotną zależność z Cl. Innymi słowy, wyższy Cl prowadzi do krótszego czasu obecności leku w krążeniu ogólnoustrojowym, co skutkuje

szybszym spadkiem stężenia leku w osoczu. W takich przypadkach ekspozycja organizmu na lek jest zmniejszona, co skutkuje mniejszą wartością pola pod krzywą stężenie-czas.

Znając biodostępność i dawkę, Cl leku można obliczyć dzieląc wchłoniętą dawkę przez AUC. Obliczony Cl jest stosunkowo niezależny od kształtu profilu stężenie-czas. Metoda ta dostarcza cennych informacji na temat zachowania kinetycznego badanego leku. Może być również stosowana do badania zmian Cl leku w określonych warunkach klinicznych, takich jak choroba czy jednoczesne podawanie innych leków.

### **Klirens (Cl)**

Kluczowym parametrem przy projektowaniu schematu dawkowania leku jest Cl leku (Brunton i wsp., 2011). Cl oznacza objętość osocza, z której lek jest całkowicie usuwany w jednostce czasu (Brunton i wsp., 2011; Urso i wsp., 2002). Dokładniejsza definicja określa Cl jako stosunek dwóch składowych: szybkości eliminacji leku oraz odpowiadającego jej stężenia leku w osoczu (Toutain i Bousquet-Melou, 2004a).

a) Z tego względu Cl osoczowy można wyrazić w jednostkach obejmujących objętość, czas i masę ciała, zazwyczaj jako mL/h/kg:

$$Cl = \text{całkowita szybkość eliminacji leku} / \text{stężenie osoczowe}$$

To równanie obowiązuje dla leków wykazujących kinetykę pierwszego rzędu, w której stała frakcja leku w organizmie jest eliminowana w jednostce czasu. Jest to więc reakcja niezależna od dawki, a większość leków podlega tej kinetyce.

b) Z kolei dla leków podlegających kinetyce zerowego rzędu, w której stała ilość leku jest eliminowana w jednostce czasu (proces zależny od dawki), Cl można określić jako:

$$Cl = V_m / (K_m + C)$$

Gdzie:

- $V_m$  – maksymalna szybkość eliminacji,
- $K_m$  – stężenie, przy którym szybkość eliminacji osiąga połowę wartości maksymalnej (masa/objętość),
- $C$  – stężenie leku w osoczu.

c) Klirens można przedstawić jako sumę eliminacji leku przez różne narządy, takie jak nerki, wątroba i inne. Zatem całkowity Cl systemowy wyraża się wzorem:

$$Cl = Cl_{\text{wątrobowy}} + Cl_{\text{nerkowy}} + Cl_{\text{inne}}$$

Gdzie:

- $Cl$  – klirens całkowity,
- $Cl_{\text{wątrobowy}}$  – klirens wątrobowy,
- $Cl_{\text{nerkowy}}$  – klirens nerkowy,
- $Cl_{\text{inny}}$  – klirens przez przewód pokarmowy, skórę, płuca itp.

d) W ogólnym przypadku,  $Cl$  systemowy dla leków o kinetyce pierwszego rzędu można obliczyć na podstawie biodostępności i stężenia osoczowego leku w stanie stacjonarnym, co wyraża się jako:

$$Cl = (F \times \text{Dawka}) / AUC$$

Gdzie:

- $F$  – biodostępność,
- $AUC$  – pole pod krzywą stężenia leku w osoczu.

Interpretację  $Cl$  osoczowego i porównania międzygatunkowe ułatwia wyliczenie  $E_{\text{body}}$  tj. współczynnika ekstrakcji całego organizmu (w zakresie od 0 do 1), który stanowi stosunek  $Cl$  całkowitego do pojemności minutowej serca.

$Cl$  osoczowy jest kluczowym parametrem PK, ponieważ kontroluje całkowitą ekspozycję na lek (dla danej biodostępności) i pozwala na obliczenie dawki podtrzymującej. Jest to kluczowy parametr w klinicznej farmakoterapii, ponieważ umożliwia dostosowanie dawkowania leków w celu osiągnięcia optymalnych efektów terapeutycznych. Monitorowanie  $Cl$  jest szczególnie istotne dla oceny funkcji nerek i wątroby, zapobiegania kumulacji leku i toksyczności oraz zarządzania interakcjami lekowymi. Zrozumienie dynamiki  $Cl$  umożliwia lekarzom dostosowanie schematów dawkowania do indywidualnych cech pacjentów, zapewniając bezpieczeństwo i skuteczność terapii (Toutain i Bousquet-Melou, 2004c).

### **Objętość dystrybucji ( $V_d$ )**

$V_d$  to teoretyczna lub pozorna objętość, która byłaby potrzebna do rozmieszczenia całkowitej ilości leku w organizmie przy identycznym stężeniu, jakie występuje w osoczu. Matematycznie definiuje się ją jako stosunek ilości leku w organizmie w danym czasie „t”, do jego stężenia w osoczu w tym samym momencie (Toutain i Bousquet-Melou, 2004d; Benet i Galeazzi, 1979).

$V_d$  jest kluczowym parametrem określającym rozmieszczenie leku w organizmie oraz przy obliczaniu dawki nasycającej niezbędnej do osiągnięcia pożądanego terapeutycznego stężenia leku w osoczu. Zazwyczaj wyraża się ją w jednostkach objętości na masę ciała, takich jak mL/kg lub L/kg.

$$V_d = \text{Dawka} / C_0$$

Gdzie:

- $V_d$  – objętość dystrybucji,
- $C_0$  – stężenie leku w osoczu w momencie podania (czas zero).

$V_d$  jest stałą proporcjonalności między całkowitą ilością leku w organizmie, a jego stężeniem w osoczu. Ponieważ stężenia osoczowe leku mogą być mierzone w różnych warunkach (w stanie równowagi, w warunkach pseudo-równowagi itd.), zdefiniowano kilka rodzajów  $V_d$ . Najważniejsze to:

- $V_d$  w stanie równowagi ( $V_{ss}$ ) – reprezentuje hipotetyczną objętość, w której całkowita ilość leku musiałaby być równomiernie rozmieszczona, aby osiągnąć obserwowane stężenie osoczowe w stanie równowagi;
- $V_d$  w warunkach pseudo-równowagi ( $V_{area}$ ) – odzwierciedla objętość potrzebną do uwzględnienia całkowitej ilości leku w organizmie w warunkach pseudo-równowagi, uwzględniając pole pod krzywą stężenia leku (AUC).

Parametry  $V_d$  odgrywają kluczową rolę w określaniu odpowiedniej dawki nasycającej oraz w ocenie ilości resztkowej leku w organizmie na podstawie zmierzonych stężeń osoczowych, co pozwala na optymalne dostosowanie schematów dawkowania.

$V_d$  można interpretować w kontekście modeli fizjologicznych, uwzględniających wiązanie leku z białkami osocza oraz tkankami. Powinna być określona na wczesnym etapie rozwoju leku, ponieważ substancje o dużej  $V_d$  mogą być wybierane do uzyskania długiego  $t_{1/2}$ , nawet jeśli ich  $Cl$  jest stosunkowo wysoki (Toutain i Bousquet-Melou, 2004d).

### **Okres półtrwania ( $t_{1/2}$ )**

$T_{1/2}$  to czas potrzebny do zmniejszenia stężenia leku w osoczu o połowę po osiągnięciu pseudo-równowagi, a nie czas wymagany do eliminacji połowy podanej dawki.

Gdy proces wchłaniania nie jest czynnikiem ograniczającym,  $t_{1/2}$  jest parametrem hybrydowym kontrolowanym przez CI osoczowy oraz zakres dystrybucji leku.

Natomiast gdy proces wchłaniania jest czynnikiem ograniczającym,  $t_{1/2}$  odzwierciedla szybkość i zakres wchłaniania, a nie proces eliminacji. Zjawisko to określane jest jako kinetyka *flip-flop*. W farmakokinetyce *flip-flop*  $t_{1/2}$  jest determinowany przez zależność między procesami wchłaniania i eliminacji. Zjawisko to jest szczególnie widoczne w przypadku leków o wolnej lub nieregularnej kinetyce wchłaniania.

Czynniki wpływające na kinetykę *flip-flop* obejmują:

- właściwości fizykochemiczne leku,
- charakterystykę postaci farmaceutycznej,
- fizjologię miejsca wchłaniania.

Na przykład leki o słabej rozpuszczalności lub niskiej przenikalności mogą wykazywać opóźnione lub niepełne wchłanianie, co sprzyja kinetyce *flip-flop*. Nieuwzględnienie tego zjawiska może prowadzić do błędnej interpretacji danych PK, skutkując nieoptymalnym dawkowaniem, co może zmniejszać skuteczność terapeutyczną lub zwiększać ryzyko działań niepożądanych. Dlatego świadomość kliniczna kinetyki *flip-flop* jest kluczowa dla dokładniejszego i bardziej spersonalizowanego podejścia do terapii lekowej, co ostatecznie zwiększa bezpieczeństwo i skuteczność leczenia farmakologicznego.

Po podaniu pozanaczyniowym (np. PO, IM, SC)  $t_{1/2}$  może być dłuższy niż po podaniu IV. Jest to często obserwowane w weterynarii, gdzie stosuje się preparaty o przedłużonym uwalnianiu, takie jak implanty SC i gąbki dopochwowe, które mają na celu utrzymanie stężenia osoczowego powyżej minimalnego stężenia terapeutycznego przez dłuższy czas.

$T_{1/2}$  ma szczególne znaczenie w schematach wielokrotnego dawkowania, ponieważ kontroluje:

- stopień kumulacji leku,
- wahania stężenia między dawkami,
- czas potrzebny do osiągnięcia stanu stacjonarnego.

Jest to kluczowy parametr przy wyborze odpowiedniego odstępu między dawkami, ponieważ jego relacja do interwału dawkowania określa amplitudę wahań stężeń leku w osoczu podczas cyklu dawkowania (Toutain i Bousquet-Melou, 2004b).

$T_{1/2}$  wyraża się w jednostkach czasu (godziny, minuty) i oblicza według wzoru:

$$t_{1/2} = 0,693 \times V_d / Cl$$

$$t_{1/2} = Cl / 0,693 \times V_d$$

lub

$$t_{1/2} = 0,693 K_{el}$$

$$t_{1/2} = K_{el} / 0,693$$

Gdzie:

0,693 – logarytm naturalny z 2,

$K_{el}$  – stała szybkości eliminacji leku (lub  $\lambda_z$ ).

Należy podkreślić, że  $t_{1/2}$  jest ściśle powiązany z  $Cl$  i  $V_d$ . Klirens osoczowy jak już wcześniej wspomniano, jest składową różnych klirensów narządowych, takich jak  $Cl$  wątrobowy i nerkowy.

Czynniki wpływające na klirens wątrobowy ( $Cl_{\text{wątrobowy}}$ ):

- przepływ krwi przez wątrobę ( $Q_h$ ),
- klirens wątrobowy wewnętrzny ( $Cl_{\text{wewn}}$ ),
- frakcja niezwiązana leku w osoczu ( $f_u, P$ ),
- maksymalna zdolność metaboliczna enzymów wątrobowych ( $V_{\text{max}}$ ),
- stała Michaelisa-Mentena ( $K_m$ ), określająca powinowactwo leku do układu enzymatycznego.

Czynniki wpływające na klirens nerkowy ( $Cl_{\text{nerkowy}}$ ):

- współczynnik filtracji kłębuszkowej (GFR),
- aktywne wydzielanie kanalikowe,
- procesy reabsorpcji,
- jonizacja zależna od pH,
- interakcje z transporterami nerkowymi.

Ponadto  $t_{1/2}$  jest silnie związany z dystrybucją leku w organizmie, na którą wpływa:

- powinowactwo leku do białek krążących ( $f_u, P$ ),
- powinowactwo do tkanek ( $f_u, T$ ),
- objętość osocza ( $V_P$ ) i tkanek ( $V_t$ ).

Zrozumienie zależności między  $t_{1/2}$ ,  $Cl$  i  $V_d$  pozwala na bardziej precyzyjne dostosowanie schematów dawkowania, zapewniając optymalne stężenia leku w organizmie i minimalizując ryzyko działań niepożądanych.

## **Biodostępność (F)**

F oznacza zasadniczo odsetek leku, który dociera do krążenia ogólnego, aby wywołać swój efekt terapeutyczny (Toutain i Bousquet-Melou, 2004a). Parametr ten jest zazwyczaj wyrażany w procentach (%). W przypadku podania IV, F osiąga maksymalną wartość, wynosząc 100% (F=1), ponieważ cała dawka leku trafia bezpośrednio do krążenia ogólnego. Natomiast w przypadku dróg podania pozanaczyniowego, takich jak podanie PO, SC czy IM biodostępność zależy od szybkości wchłaniania leku w stosunku do jego eliminacji.

W tych pozanaczyniowych drogach podania część leku może ulegać metabolizmowi w przewodzie pokarmowym lub napotykać bariery wchłaniania, zwłaszcza w przypadku podania PO. Dlatego przy ocenie biodostępności w tych przypadkach bardziej przydatne jest obliczenie jej w odniesieniu do dawki podanej IV, co umożliwi bezwzględne określenie F.

$$F\% = 100 \times \frac{AUC \text{ (dawka pozanaczyniowa)} \times \text{Dawka (I.V.)}}{AUC \text{ (I.V.)} \times \text{Dawka (dawka pozanaczyniowa)}}$$

Biodostępność może mieć wartość od 0 do 1. Dlatego w przypadku leków o niskiej biodostępności konieczne jest stosowanie większych dawek, aby osiągnąć pożądany efekt terapeutyczny (Brunton i wsp., 2011).

Zrozumienie biodostępności jest kluczowe dla dostosowywania dawek leków, optymalizacji efektów terapeutycznych i zapewnienia możliwości zamiany różnych formuляcji lekowych. Równoważność leków generycznych opiera się na wykazaniu porównywalnej biodostępności w stosunku do ich oryginalnych odpowiedników. Ponadto parametr ten jest kluczowy dla medycyny personalizowanej, uwzględnia indywidualne różnice między pacjentami i odgrywa istotną rolę w określaniu początku i czasu działania leku. Optymalna biodostępność pozwala także, na minimalizację działań niepożądanych poprzez możliwość stosowania niższych dawek przy zachowaniu skuteczności terapeutycznej.

## **Średni czas przebywania leku (MRT)**

MRT, ang. mean residence time, oznacza przeciętny czas, przez jaki lek pozostaje w organizmie. MRT opisuje średni czas, jaki cząsteczki leku w stanie nienaruszonym spędzają w organizmie, obejmując wszystkie procesy PK, takie jak uwalnianie leku

z postaci dawkowania, jego wchłanianie oraz kolejne etapy rozmieszczenia i eliminacji (Riegelman i Collier, 1980).

MRT jest obliczany na podstawie dwóch kluczowych parametrów: pola pod krzywą stężenia leku w czasie (AUC) oraz pola pod krzywą momentu czasowego (AUMC). Wzór obliczeniowy MRT przedstawia się następująco:

$$\text{MRT} = \text{AUMC}/\text{AUC}$$

Klinicznie MRT pomaga w optymalizacji schematów dawkowania leków poprzez określanie odpowiednich odstępów między dawkami. Umożliwia monitorowanie czasu działania leku oraz wybór najbardziej odpowiedniego leku w ramach danej klasy terapeutycznej. MRT można wykorzystać do indywidualizacji terapii, szczególnie w przypadku leków o znacznie różniących się wartościach MRT u pacjentów. Odgrywa ono istotną rolę w monitorowaniu terapii lekowej, zapewniając utrzymanie stężenia leku w pożądanym zakresie terapeutycznym. W badaniach przedklinicznych MRT jest kluczowe dla oceny PK i bezpieczeństwa nowych leków. Ogólnie rzecz biorąc, MRT wspomaga decyzje dotyczące dawkowania leków, poprawia skuteczność leczenia i minimalizuje potencjalne działania niepożądane.

Podsumowując, zrozumienie parametrów PK jest kluczowe dla skutecznej i bezpiecznej farmakoterapii. Klirens odgrywa główną rolę w określaniu dawkowania podtrzymującego, podczas gdy  $V_d$  pozwala oszacować dawkę nasycającą. Okres półtrwania pomaga w ustaleniu odstępów między kolejnymi dawkami, a AUC obrazuje ogólną ekspozycję organizmu na lek.

#### **4. BADANIA POZOSTAŁOŚCI I WYZNACZANIE OKRESU KARENCJI**

Obecność pozostałości antybiotyków lub innych substancji o podobnym działaniu (chemioterapeutyków) w żywności zwierzęcego pochodzenia musi być ściśle limitowana przez tzw. Najwyższe Dopuszczalne Stężenie Pozostałości (NDSP, ang. MRL – *Maximum Residue Limits*). Wartością pomocną przy ustalaniu MRL jest ADI, tj. *Acceptable Daily Intake*. Według definicji WHO (Światowej Organizacji Zdrowia), ADI to ilość danej substancji wyrażona w kg m.c. na dzień, która może być pobierana w ciągu całego życia nie powodując ryzyka zagrożenia zdrowia. ADI jest wyznaczane, po zastosowaniu odpowiednich współczynników bezpieczeństwa, na podstawie poziomu NOEL

(*non-observed-effect level*), czyli takiej dawki substancji ustalonej na podstawie badań toksykologicznych, która nie wywołuje żadnego obserwowanego skutku. Przy ustalaniu ADI przyjmuje się dane szacunkowe dotyczące spożycia dziennego określonych produktów. ADI dla TLM, po serii testów toksykologicznych, zostało ustalone na poziomie 0-40  $\mu\text{g}/\text{kg}$  m.c., w oparciu o NOEL wynoszący 4  $\text{mg}/\text{kg}$  m.c./dzień (WHO, 2008). Dla KOL na 0-7  $\mu\text{g}/\text{kg}$  m.c./dzień na podstawie MIC50 dla *Escherichia coli* (WHO, 2006), a dla LIN na 0-0,03  $\text{mg}/\text{kg}$  m.c. na podstawie NOEL wynoszącego 30  $\text{mg}/\text{kg}$  m.c./dzień (WHO, 2004).

Najwyższe dopuszczalne stężenie pozostałości poszczególnych wybranych do niniejszego badania antybiotyków w tkankach oraz produktach pochodzących od drobiu zgodnie z zaleceniami UE (EMA, 2002; Rozp. WE, 2010; WHO, 2004; CAC, 2015) przedstawiono w Tabeli 1.

Antybiotyk	Gatunek	Tkanka	MRL
TLM	Drób (kurczęta, indyki)	mięśnie, skóra z tłuszczem	75 $\mu\text{g}/\text{kg}$
		wątroba	1000 $\mu\text{g}/\text{kg}$
		nerki	250 $\mu\text{g}/\text{kg}$
KOL	Drób (kurczęta, indyki)	mięśnie, wątroba	150 $\mu\text{g}/\text{kg}$
		nerki	200 $\mu\text{g}/\text{kg}$
LIN	Drób (kurczęta)	mięśnie	200 $\mu\text{g}/\text{kg}$
		wątroba	500 $\mu\text{g}/\text{kg}$
		nerki	500 $\mu\text{g}/\text{kg}$

**Tab. 1. Najwyższe dopuszczalne stężenie pozostałości wybranych antybiotyków w tkankach oraz produktach pochodzenia zwierzęcego. (Źródło: Autor)**

W Polsce, która jest członkiem Unii Europejskiej, wszystkie przepisy uzależnione są od uregulowań prawnych, jakie narzuca Europejska Agencja Oceny Leków (European Agency for the Evaluation of Medicinal Products, EMA), Komitet do spraw Leków Weterynaryjnych (Committee for Veterinary Medicinal Products, CVMP) oraz Europejska Agencja do Spraw Bezpieczeństwa Żywności (European Food Safety Authority - EFSA). Kwestie regulacji pozostałości substancji farmakologicznie czynnych w środkach

spożywczych pochodzenia zwierzęcego można znaleźć w Rozporządzeniu (WE) nr 470/2009 Parlamentu Europejskiego i Rady z dnia 6 maja 2009 r. ustanawiającego wspólnotowe procedury dla określania maksymalnych limitów pozostałości substancji farmakologicznie czynnych w środkach spożywczych pochodzenia zwierzęcego oraz uchylające rozporządzenie Rady (EWG) nr 2377/90 oraz zmieniające dyrektywę 2001/82/WE Parlamentu Europejskiego i Rady, a także rozporządzenie (WE) nr 726/2004 Parlamentu Europejskiego i Rady. W Polsce implementacja prawa Unii Europejskiej opiera się na Ustawie z dnia 16 grudnia 2005 r. o produktach pochodzenia zwierzęcego (Dz. U. z 2006 r. Nr 17, poz. 127) oraz Rozporządzeniu Ministra Rolnictwa i Rozwoju Wsi z dnia 21 czerwca 2017 r. (poz. 1246) w sprawie monitorowania substancji niedozwolonych, pozostałości chemicznych, biologicznych, produktów leczniczych i skażeń promieniotwórczych.

#### 4.1. Badania pozostałości tilmikozyny

Badania u bydła wykazały, że lek ten bardzo długo utrzymuje się w organizmie i przenika do mleka w wysokim stężeniu, szczególnie do siary. Z tego powodu TLM nie powinna być stosowana u krów mlecznych. Okres usuwania TLM z mleka określono na ponad 36 dni. Podobnie u owiec lek utrzymywał się w mleku przez 6 dni, a okres karencji został zasugerowany na, co najmniej 15 dni. Jednocześnie TLM nie powinna być stosowana u owiec mlecznych (FAO; 2009).

W przypadku badań pozostałości u królików, wyniki wskazują na stosunkowo szybki spadek stężeń TLM w większości tkanek, a nerki okazały się miejscem, gdzie ten antybiotyk utrzymuje się najdłużej (FAO; 2009).

Badania TLM po podaniu PO 75 mg/ml (Zhang i wsp., 2004) i 50 mg/ml (Keles i wsp., 2001) u broilerów wykazały, że wątroba i nerki są głównymi miejscami akumulacji pozostałości TLM u tego gatunku, a bezpieczny okres karencji wynosi co najmniej 7 dni (FAO; 2009).

Zbadano także pozostałości w tkankach u kurcząt brojlerów po podaniu TLM (podawane codziennie przez 5 kolejnych dni) w dawce 25 mg/kg m.c. TLM nie wykryto we wszystkich badanych tkankach (z wyjątkiem płuc) do 6 dni po ostatnim podaniu leku (Elbadawy i wsp., 2017).

Przeprowadzono także badania pozostałości po wielokrotnym podaniu PO (raz dziennie przez 3 kolejne dni) TLM w dawce 25 mg/kg m.c. w tkankach u zdrowych i doświadczalnie zakażonych *Mycoplasma gallisepticum* brojlerów. Pozostałości TLM

badano w płucach, nerkach, wątrobie, sercu, mięśniach piersiowych, mięśniach udowych, tłuszczu i skórze po 24, 48, 72, 96, 120 i 144 godzinach od ostatniej dawki leku. Wyniki wykazały, że najwyższe wartości pozostałości odnotowano w płucach, a następnie w wątrobie i nerkach, podczas gdy najniższe wartości odnotowano w sercu. Okres karencji oszacowano, na co najmniej 5 dni (Elkomy i wsp., 2018).

Celem kolejnego badania było zbadanie PK i pozostałości TLM po pojedynczym i wielokrotnym podaniu PO (25 mg/kg.m.c.) raz dziennie przez 5 kolejnych dni u zdrowych i doświadczalnie zakażonych *Mycoplasma gallisepticum* i *Escherichia coli* brojlerów. TLM była szybko usuwana z tkanek. Najwyższe wartości pozostałości odnotowano w płucach, a następnie w wątrobie i nerkach, podczas gdy najniższe wartości odnotowano w śledzionie, tłuszczu i mięśniach. Zalecano okres karencji na 5 dni (Attia i wsp., 2018).

W badaniu (Dimitrova i wsp., 2012) badano pozostałości fosforanu TLM, u zdrowych brojlerów rasy KOB-500. Po 2 godzinach od podania leku zawartość TLM w płucach i wątrobie wynosiła odpowiednio:  $17,02 \pm 0,24$  oraz  $12,78 \pm 0,22$   $\mu\text{g/g}$ . Po 26 godzinach w nerkach osiągnęła poziom:  $8,25 \pm 0,19$   $\mu\text{g/g}$ . Po 52 godzinach w mięśniu piersiowym i mięśniu sercowym wykryto odpowiednio:  $6,19 \pm 0,28$  i  $5,23 \pm 0,39$   $\mu\text{g/g}$ . Najwyższe stężenie TLM stwierdzono po 96 godzinach w płucach, co podkreśla jej znaczenie w leczeniu infekcji układu oddechowego. 24 godziny po zaprzestaniu podawania (tj. po 120 godzinach od początku badania) zawartość TLM w narządach zmniejszyła się: w płucach 1,9 razy, wątrobie 1,6 razy, nerkach 1,4 razy, mięśniu piersiowym 1,7 razy, a w mięśniu sercowym 1,3 razy. Po 5 dniach (216 godzinach) od zakończenia podawania wykryto resztkowe ilości TLM: w płucach –  $1,20 \pm 0,03$   $\mu\text{g/g}$ , w wątrobie –  $1,01 \pm 0,02$   $\mu\text{g/g}$ , w nerkach –  $0,91 \pm 0,03$   $\mu\text{g/g}$ . W mięśniu piersiowym lek ten nie był wykrywalny, a w mięśniu sercowym stwierdzono jedynie śladową ilość  $0,02$   $\mu\text{g/g}$ . Wyniki wykazały szybkie wchłanianie substancji z przewodu pokarmowego oraz penetrację do narządów wewnętrznych. Najwyższe stężenia fosforanu TLM wykryto w płucach i wątrobie. Autorzy zasugerowali okres karencji wynoszący 5 dni.

W badaniach indyków tempo zanikania było szybsze niż u kurcząt w większości tkanek, z wyjątkiem wątroby, gdzie zanikanie zachodziło wolniej i to wątroba okazała się miejscem depozytowym TLM (stwierdzana do 14 dnia). Porównując, w mięśniach stwierdzano pozostałości do 7 dnia od zakończenia leczenia (FAO; 2009).

W badaniu na indykach, przeprowadzonym przez Fricke i wsp. (2008), podawano paszę zawierającą 200 ppm TLM przez 5 dni, a następnie analizowano stężenia leku w osoczu i tkankach po zakończeniu leczenia. Najwyższe stężenia TLM odnotowano

w wątrobie (22,6 µg/g) i nerkach (20,9 µg/g), co sugeruje intensywną dystrybucję do narządów detoksykacyjnych. TLM była wykrywalna w tkankach, przez co najmniej 20 dni po zakończeniu terapii. Stężenia w wątrobie, nerkach i mięśniach spadały poniżej granicy detekcji (LOD) między 25, a 30 dniem.

Pozostałości TLM w jajach utrzymują się przez kilka dni, osiągając szczytowe poziomy około 3-4 dnia. Ze względu na dużą zmienność osobniczą nie ustalono okresu karencji. Jednocześnie zalecono, aby TLM nie była stosowana u kur niosek (FAO; 2009).

Podsumowując, TLM wykazuje wyraźną tendencję do kumulacji w płucach, wątrobie i nerkach, a dynamika pozostałości jest silnie gatunkozależna. Najdłuższe utrzymywanie się leku obserwowane jest u bydła i indyków, co przekłada się na bardzo długie okresy wymywania, szczególnie z mleka. U brojlerów lek jest usuwany stosunkowo szybciej, a większość badań wskazuje na konieczność zachowania karencji wynoszącej 5-7 dni.

#### 4.2. Badania pozostałości kolistyny

W badaniu pozostałości KOL przeprowadzonym na cielętach, zwierzęta były leczone doustnie przez 3 dni siarczanem KOL w dawce 5 mg /kg m.c. lub 10 mg /kg m.c. Były to odpowiednio najwyższa standardowa dawka oraz dawka dwukrotnie wyższa od normalnie stosowanej. Lek podawano za pomocą zgłębnika żołądkowego w 150 ml wody. Próbkę krwi pobierano przed podaniem oraz 1, 2, 4, 6, 24 i 72 godziny po ostatniej dawce. Tkanki pobrano 72 godziny po zakończeniu leczenia. Analiza próbek została przeprowadzona przy użyciu testu mikrobiologicznego (organizm testowy: *Bordetella bronchiseptica*, ATCC 4617), z granicą wykrywalności wynoszącą 0,05 µg/g (dla żółci: 0,1 µg/g). W teście odzysku wykazano dobrą odzyskiwalność KOL z wszystkich analizowanych próbek oraz akceptowalne współczynniki zmienności. Żadna z przebadanych próbek nie zawierała KOL w stężeniu przekraczającym granicę wykrywalności testu (FAO, 2006).

W innym badaniu cztery cielęta były leczone preparatem mlekozastępczym zawierającym KOL w dawce 100 000 IU/kg m.c. Zwierzęta otrzymywały lek dwa razy dziennie przez 7 dni. KOL mieszano z 1/3 całkowitej objętości mleka i podawano rano oraz wieczorem. Cielęta poddano ubojowi 6 godzin po ostatniej dawce. Stężenia KOL w tkankach oznaczono przy użyciu zwalidowanej metody HPLC. Pozostałości KOL wykryto w trzech z czterech próbek nerek. W jednej z nich stężenie wynosiło 139 µg/kg. Podsumowując, stwierdzono, że krótka ekspozycja na KOL w dawkach terapeutycznych nie prowadzi do wykrywalnych pozostałości w tkankach. Dłuższe podawanie (7 dni)

skutkuje akumulacją w nerkach, ale nie w innych tkankach. Natomiast brak pozostałości w mięśniach i wątrobie sugeruje ograniczoną F dla KOL po podaniu PO (FAO, 2006).

W badaniu krótkoterminowym u trzody chlewnej, zwierzęta były leczone PO siarczanem KOL przez 3 dni w dawce 10 mg/kg m.c. lub 20 mg/kg m.c. Próbkę krwi pobierano przed podaniem oraz 1, 2, 4, 6, 24 i 72 godziny po ostatniej dawce, a tkanki 72 godziny po zakończeniu leczenia. Stwierdzono bardzo niską koncentrację leku w osoczu wyłącznie 1 godzinę po podaniu ostatniej dawki. W żadnej próbce tkankowej nie wykryto KOL powyżej LOQ. Natomiast w badaniu długoterminowym świnię były leczone PO siarczanem KOL przez 4 miesiące w dawce 40 mg/kg m.c. lub 200 mg/kg m.c. Lek podawano w paszy. Próbkę tkanek (mięśnie, tłuszcz, wątroba, nerki) pobrano: w dniu zakończenia leczenia, 1 dzień oraz 3 dni po ostatniej dawce. Wykorzystano analizę mikrobiologiczną (granica wykrywalności: 0,03 µg/g). W żadnej tkance nie wykryto KOL powyżej LOQ w żadnym punkcie czasowym. W kolejnym badaniu 4 świnię otrzymywały z paszą kolistynę w dawce 100 000 IU/kg m.c. dwa razy dziennie przez 5 dni. Zwierzęta poddano ubojowi 6 godzin po ostatnim podaniu leku. Próbkę tkanek (mięśnie, wątroba, nerki, skóra + tłuszcz) analizowano metodą HPLC. KOL wykryto we wszystkich próbkach wątroby, skóry i tłuszczu oraz w jednej próbce nerki, jednak nie stwierdzono ilości możliwych do oznaczenia ilościowego (FAO, 2006).

W kolejnym badaniu dwanaście królików leczono KOL w dawce 100 000 IU/kg m.c. Zwierzęta otrzymywały lek z wodą do picia dwa razy dziennie przez 5 dni. Króliki zostały podzielone na trzy grupy po 4 osobniki i poddane ubojowi odpowiednio 6, 24 i 48 godzin po ostatnim podaniu leku. Pobrano próbki mięśni, wątroby, nerek oraz tłuszczu. Stężenia KOL w tkankach określono za pomocą zwalidowanej metody HPLC. Pozostałości KOL wykryto we wszystkich próbkach tłuszczu, w czterech próbkach nerek oraz w dwóch próbkach mięśni. Wszystkie pozostałości w mięśniach i wątrobie znajdowały się poniżej LOQ metody. Dwie próbki nerek pobrane 6 godzin po ostatnim podaniu leku zawierały wykrywalne ilości pozostałości. W późniejszych terminach pobierania próbek pozostałości w nerkach były poniżej LOQ. Niskie, ale wykrywalne stężenia KOL stwierdzono we wszystkich próbkach tłuszczu pobranych 6 godzin po podaniu leku. Obie próbki tłuszczu pobrane od samców królików 24 godziny po podaniu zawierały wykrywalne ilości pozostałości, podczas gdy w próbkach pobranych od samic były one poniżej LOQ. Tłuszcz jednego samca królika, który został poddany ubojowi 48 godzin po ostatnim podaniu leku, zawierał wykrywalne ilości pozostałości (FAO, 2006).

Badania odnośnie jednodniowych kurcząt po podaniu SC 14C-kolistymetatu sodowego w dawce 0,2 mg KOL /kg m.c. wykazały stężenia pozostałości porównywalne u samców i samic. W 14 dniu po podaniu najwyższe stężenia pozostałości odnotowano w wątrobie i mięśniach (ok. 0,51–0,55 mg/kg), natomiast najniższe w skórze/tłuszczu (0,29–0,32 mg/kg). W 21 dniu nastąpił istotny spadek stężeń we wszystkich tkankach tj. wątroba: 0,17–0,18 mg/kg, mięśnie: 0,23–0,24 mg/kg, skóra/tłuszcz: 0,12 mg/kg. W 28 dniu wartości pozostałości były jeszcze niższe, ale nadal wykrywalne, ale najniższe w skórze/tłuszczu (0,07 mg/kg) i najwyższe w mięśniach (0,12–0,14 mg/kg). Warto zauważyć, że w miejscu iniekcji pozostałości były najwyższe w 14 dniu (0,51–0,65 mg/kg), ale stopniowo malały do 0,12 mg/kg w 28 dniu. Dane te wskazują na stosunkowo wolną eliminację pozostałości KOL z organizmu, zwłaszcza w wątrobie i mięśniach, co może mieć znaczenie dla ustalania okresu karencji. Ekstrakcja w środowisku kwaśnym pozwoliła na odzyskanie jedynie 1,4% substancji, natomiast w środowisku zasadowym – ponad 65%. Mimo to, w uzyskanych ekstraktach nie potwierdzono aktywności przeciwbakteryjnej (US FDA, 1998).

W innym badaniu sześć kurcząt leczono KOL w dawce 100 000 IU/kg m.c. Zwierzęta otrzymywały lek z paszą dwa razy dziennie przez 5 dni. Kurczęta zostały poddane ubojowi 6 godzin po ostatnim podaniu leku. Pobrano próbki mięśnia piersiowego, wątroby, nerek oraz skóry z tłuszczem. Stężenia KOL w tkankach określono za pomocą zwalidowanej metody HPLC. KOL powyżej wartości LOQ wykryto tylko w jednej próbce skóry z tłuszczem oraz w trzech próbkach nerki, gdzie wartość pozostałości KOL stwierdzonej w nerce samicy wynosiła 184 µg/kg (FAO, 2006).

W kolejnym badaniu sześć indyków leczono KOL w dawce 100 000 IU/kg m.c. Zwierzęta otrzymywały lek z wodą do picia dwa razy dziennie przez 5 dni. Indyki zostały poddane ubojowi 6 godzin po ostatnim podaniu leku. Pobrano próbki mięśnia piersiowego, wątroby, nerek oraz skóry z tłuszczem. Stężenia KOL w tkankach określono za pomocą zwalidowanej metody HPLC. KOL powyżej LOQ wykryto we wszystkich próbkach mięśni, w pięciu próbkach skóry z tłuszczem oraz w jednej próbce nerki. W przypadku nerki, tylko u jednej samicy stwierdzono 194,5 µg/kg pozostałości KOL, a w skórze i tłuszczu tego samego zwierzęcia: 98 µg/kg (FAO, 2006).

W badaniu pozostałości w mleku, 10 krów otrzymywało IM 10 mg amoksycyliny/kg m.c. i 25 000 IU KOL/kg m.c. przez 5 dni. Pozostałości wykrywano w czasie leczenia i 1 dzień po jego zakończeniu. Po 3 dniach po zakończeniu leczenia

3 z 10 próbek zawierały minimalne ilości KOL powyżej LOQ. Po 4 dniach tylko 1 z 10 próbek miała wykrywalne pozostałości (FAO, 2006).

Oceniano także kolistynę w mleku owiec po pojedynczym podaniu IM siarczanu KOL oraz KOL metanosulfonianowej (3,5 mg/kg i 7,5 mg/kg). Wyższe stężenia obserwowano po podaniu KOL metanosulfonianowej (maks. 3-10  $\mu\text{g/ml}$ ), niż siarczanu KOL (maks. 1-1,5  $\mu\text{g/ml}$ ). Stężenia maksymalne wystąpiły 2-3 godziny po podaniu. Pozostałości KOL metanosulfonianowej zanikały wolniej niż siarczanu KOL (Ziv i Sulman, 1973a i 1973b).

Natomiast kury nioski otrzymywały siarczan KOL PO przez 5 dni (1 000 000 IU/L w wodzie, 90 000 IU/kg m.c.) lub jednokrotnie IM (50 000 IU/kg m.c.). Jaja zbierano codziennie w trakcie leczenia i po jego zakończeniu. Jednakże w jajach nie wykryto KOL (Roudaut, 1989).

Przeprowadzono badania pozostałości KOL u 72 kaczek rasy Cherry Valley, którym podano jednorazowo domięśniowo siarczan kolistyny w dawce 3 mg (90 000 IU)/kg m.c. Kaczki uśmiercono w 0,5, 1, 2, 4, 6, 12, 24, 36, 48, 72, 96 i 120 godzin od podania leku. Druga grupa 42 ptaków otrzymała kolistynę wielokrotnie przez 10 dni z paszą w dawce 20 mg (600 000 IU)/kg m.c. Kaczki uśmiercono w 0, 0,5, 2, 6, 12, 24, i 48 godzin od podania leku. Do analizy HPLC pobrano osocze, mięśnie, wątrobę lub nerki, a także w przypadku grupy PO jelita. Okres karencji 5 dni obliczono na podstawie wartości MRL ustalonych dla kolistyny odpowiednio: 150  $\mu\text{g/kg}$  dla wątroby i mięśni oraz 200  $\mu\text{g/kg}$  dla nerek po podaniu IM i odpowiednio 0 dni po podaniu kolistyny PO (Zeng, 2010).

Badano także obecność pozostałości LIN wraz z KOL w aspekcie wyznaczenia okresu karencji u broilerów. Kurom podawano preparat zawierający LIN i KOL w formie połączonej. Pozostałości antybiotyków w tkankach jadalnych oznaczano ilościowo w różnych odstępach czasu, wykorzystując metody ELISA oraz techniki chromatograficzne, a następnie wyznaczano okres karencji. Najwyższe stężenia pozostałości obu antybiotyków stwierdzono w wątrobie i nerkach, jednak już pierwszego dnia były one poniżej wartości MRL i od trzeciego dnia wykazywały szybki spadek. Okres karencji obliczono na 3 dni (Park i wsp., 2019).

Podsumowując, KOL jest antybiotykiem o bardzo słabej biodostępności po podaniu doustnym, co ma zasadniczy wpływ na charakter jej pozostałości w tkankach zwierząt rzeźnych. Dane literaturowe z badań na przeżuwaczach, trzodzie chlewnej, królikach, drobiu oraz zwierzętach mlecznych wykazują, że pozostałości KOL są zazwyczaj niskie, wykrywalne głównie w nerkach, rzadziej w wątrobie, a wyjątkowo w mięśniach lub tłuszczu.

### 4.3. Badania pozostałości linkomycyny

W przypadku trzody chlewnej iniekcja (11 mg/kg m.c. przez 3 dni) osiągała bardzo wysokie stężenia w nerkach i wątrobie bezpośrednio po leczeniu (do 20 900 µg/kg w nerkach), a spadek do wartości poniżej 60 µg/kg zanotowano po 6 dniach (Hornish i wsp., 1987). Natomiast podanie PO osiągało wartości stężeń maksymalnych do 280 µg/kg w nerkach w momencie odstawienia, gdzie reszta tkanek zawierała pozostałości LIN o wartościach mniejszych niż LOQ (<100 µg/kg) metody (JECFA, 2000).

U owiec iniekcja LIN w dawce 5 mg/kg m.c. przez 3 dni skutkowałą pozostałościami w wątrobie równymi 4340 µg/kg (8h), oraz poniżej 17 µg/kg w 14-tym dniu; podczas gdy w nerkach stwierdzono: 9150 µg/kg w 8h i <17 µg/kg w 7 dniu (Brown i wsp., 1996). Warto podkreślić, że badania potwierdziły również silne przenikanie do mleka ( $C_{max}$  w mleku = 25 200 µg/l po 2h) (Ziv i Sulman, 1973a i 1973b).

W przypadku bydła iniekcje LIN (15 mg/kg m.c., 6 dawek), powodowały pojawienie się pozostałości LIN odpowiednio w przypadku wątroby w ilości: 295 µg/kg (8h), <47 µg/kg (7 dni); w nerkach: do 3 340 µg/kg (8h), spadek do <47 µg/kg (14 dni); w mięśniach: 720 µg/kg (8h), <47 µg/kg (7 dni) oraz tłuszczu i miejscu iniekcji: do 2 420 µg/kg (Friedlander, 2025).

Ponadto podawanie LIN domaciczne u krów mlecznych w okresie laktacji dało wykrywalne pozostałości w mleku przez okres do 24 godzin (Kaneene i wsp., 1986). Natomiast po podaniu LIN, dożylnie krowom w dawce 4-7 mg/kg m.c., stężenie w mleku było 1,9–4,3 razy wyższe niż w osoczu, a po uwzględnieniu związania z białkami, nawet 2,3–5,6 razy wyższe niż stwierdzane w osoczu (Rasmussen, 1966).

W pierwszych badaniach u drobiu brojlerom podawano LIN w wodzie do picia (264 mg/l) przez 7 dni, a pozostałości w tkankach analizowano metodą mikrobiologiczną. Po zakończeniu podawania, we wszystkich próbkach (z wyjątkiem jednej wątroby i jednej nerki) stężenia były poniżej LOQ. Stężenia jakie stwierdzono to w przypadku wątroby: 980 µg/kg (w 0h) oraz nerki: 850 µg/kg (w 6h) (Friedlander, 2025). Natomiast nieskom podawano bolusy PO (0,55 mg co 12h przez 12 dni) oraz badano pozostałości w tkankach oraz jajach. Stwierdzono następujące poziomy stężenie pozostałości LIN: jaja (całe) 1,2–12 µg ekwiwalentów/kg w czasie leczenia i 1–4 µg/kg 3 dni po zakończeniu. W żółtku stwierdzono stężenia około 3× wyższe niż w białku jaj. Stężenia w tkankach wynosiły w przypadku wątroby, nerki, mięśni i skóry, odpowiednio w 4h: 141/152/20/19 µg/kg; w 28h: 24/21/13/14 µg/kg i w 76h: 6/6/10/3 µg/kg (Friedlander, 2025).

W jednym z ostatnich badań, celem było oznaczenie poziomu LIN w tkankach kurcząt oraz jego porównanie z MIC i MRL względem wybranych patogenów. W badaniu uczestniczyły trzy grupy kurcząt brojlerów ( $n = 20$  w każdej grupie): grupa kontrolna bez leczenia LIN oraz dwie grupy (każda dodatkowo podzielona na dwie podgrupy), którym podawano PO LIN w dawce  $1\text{g}/10\text{ kg m.c.}$  dziennie przez odpowiednio 7 i 14 kolejnych dni. Próbkę tkanek pobierano od każdej grupy w 1 dniu i po 1 tygodniu od zakończenia podawania LIN. Podawanie LIN przez 7 i 14 dni skutkowało osiągnięciem stężeń o wartości terapeutycznej; jednakże po tygodniu od zakończenia terapii większość tkanek wykazywała wysokie stężenia leku przekraczające dopuszczalne normy pozostałości. Poziom LIN w wątrobie i nerkach przekroczył dopuszczalny limit pozostałości (MRL), natomiast w mięśniach piersiowych utrzymywał się poniżej dopuszczalnego limitu po tygodniu leczenia (Wijayanti i wsp. 2024).

W badaniu Kim i wsp. (2024) profil pozostałości LIN w jajach potwierdził ograniczoną ekspozycję układową po podaniu PO. W ramach eksperymentu nioski podzielono na dwie grupy: otrzymującą niską i wysoką dawkę (po 12 osobników w każdej). Próbkę jaj zbierano i analizowano przez 14 dni po zakończeniu terapii. Pomimo różnic w zawartości substancji czynnej i składzie testowanych preparatów handlowych, we wszystkich przypadkach średnie stężenia pozostałości w jajach spadły poniżej MRL w ciągu około 3 dni od ostatniego podania.

Jak już wcześniej wspomniano, podawano kurom preparat zawierający zarówno LIN i KOL w formie połączonej. Najwyższe stężenia pozostałości obu antybiotyków stwierdzono w wątrobie i nerkach, jednak już pierwszego dnia były one poniżej wartości MRL i od trzeciego dnia wykazywały szybki spadek. Okres karencji obliczono na 3 dni (Park i wsp., 2019).

Podsumowując, dostępne badania dotyczące pozostałości LIN u zwierząt gospodarskich są znikome, a jednocześnie konsekwentnie wskazują, że niezależnie od gatunku, schematu podania czy długości terapii, linkomycyna wykazuje wyraźną preferencję do kumulacji w wątrobie i nerkach. Mleko, zwłaszcza u owiec i krów, stanowi dodatkową, istotną drogę wydalania. Dostępne dane jednoznacznie wskazują, że droga podania ma kluczowe znaczenie dla poziomu i czasu utrzymywania się pozostałości, a podanie pozajelitowe wiąże się z wielokrotnie wyższymi stężeniami i wolniejszą eliminacją.

#### 4.4. Wyznaczanie okresu karencji

Na podstawie badań pozostałości oraz w oparciu o wyznaczone MRL ustala się okresy karencji (Concordet, 1997a i b; Cybulski, 2002; Anonymous, 2019).

Okres karencji, jest to czas, po którym w tkankach (mięśnie, nerki, wątroba oraz tłuszcz ze skórą) oraz produktach (jaja, mleko, miód) pochodzących od zwierzęcia, u którego zastosowano lek, nie stwierdza się pozostałości tego leku w ilości przekraczającej NDSP (MRL) - najwyższe dopuszczalne stężenie pozostałości. Okres karencji ustalany jest w celu zagwarantowania konsumentowi braku zanieczyszczenia pozostałościami zastosowanych leków w produktach zwierzęcych. Okresy karencji są specyficzne dla każdego produktu leczniczego, stosowanego u danego gatunku zwierzęcia, poszczególnych tkanek i narządów, jak również produktów pochodzenia zwierzęcego, jakimi są mleko, miód czy też jaja.

Można wyróżnić 3 główne metody wyznaczania okresu karencji dla leków weterynaryjnych stosowanych u zwierząt produkcyjnych (Fish, 2000; Lewicki, 2006; Vranic, 2003):

##### **Reguła decyzyjna**

Zakłada, że okres karencji to czas, w którym pozostałości we wszystkich tkankach jadalnych, wszystkich badanych zwierząt znajdują się poniżej spodziewanego MRL, plus pewien określony zakres bezpieczeństwa. Reguła ta jest nieakceptowana w przypadku statystycznej interferencji z powodu niemożności potwierdzenia niepodważalności wyników.

Powinno się rozważyć problem wyznaczenia zakresu bezpieczeństwa, aby wykluczyć przekłamanie wyników ze względu na różnorodność biologiczną osobników. Wielkość zakresu bezpieczeństwa zależy od różnych czynników m.in. od projektu badań, jakości danych czy też właściwości PK leku. W rezultacie, w tej metodzie nie można wprowadzić uogólnionych zaleceń co do zakresu bezpieczeństwa. Ruchomą wartością najczęściej przyjmowaną za zakres bezpieczeństwa jest 10-30% oznaczonego wstępnie okresu karencji, kiedy wszystkie obserwowane punkty znajdują się poniżej MRL. Alternatywnie, zakres bezpieczeństwa może być obliczony równie dobrze z tkankowego okresu półtrwania jako wartość 1 do 3 okresów  $t_{1/2}$  (Concordet, 1997a).

##### **Metoda nieparametryczna**

Zakłada, że okres karencji to czas, w którym określony procent zwierząt (co najmniej 95%) posiada pozostałości poniżej MRL (z ryzykiem 5%). Metoda ta jest oparta na dystrybucji dwuzmiennej (tworząc prawdziwą odpowiedź dychotomiczną). Zmniejsza to

teoretyzowanie przypuszczeń, co do długości okresu karencji, ale jednocześnie narzuca wzrost zapotrzebowania na wielkość próby (w tym wypadku liczbę osobników). Jedynym wyjściem w tej sytuacji jest uwzględnienie procentu ryzyka, jakie może zakłócić prawidłowe wyznaczenie okresu karencji (Concordet, 1997b).

### **Regresja liniowa (rekomendowana przez EMA)**

Metoda ta wykorzystuje analizę regresji liniowej dla modelu jednokompartamentowego. Okres karencji określany jest tu jako ostatni dzień (punkt czasowy), gdzie stwierdzono najwyższe tolerowane stężenie pozostałości badanego leku będące poniżej wartości MRL. W przypadkach, gdzie ten punkt czasowy, nie osiąga pełnego dnia, okres karencji zostaje zaokrąglony do dnia (punktu czasowego) następnego. Analizę przeprowadza się przy uwzględnieniu 95% górnego limitu tolerancji stosując 95% przedziały ufności. Jeśli nie można pokonać odchylenia od głównego liniowego zakresu modelu po logarytmicznej transformacji danych, można rozpatrywać inne metody transformacji (np. metoda potęgowania, gdzie każda wartość podnoszona jest do określonej potęgi) (Anonymous, 2019).

## **5. METODY OZNACZANIA LEKÓW W MATERIALE BIOLOGICZNYM**

Czułe i efektywne pod względem kosztów metody monitorowania pozostałości leków w tkankach, narządach oraz produktach pochodzenia zwierzęcego mają zasadnicze znaczenie dla zapewnienia utrzymania ich poziomu w określonych limitach.

Obecnie do monitorowania poziomów pozostałości antybiotyków w żywności używane są różne metody np.: testy mikrobiologiczne, test immunoenzymatyczny (ELISA), wysokosprawną chromatografię cieczową (HPLC), chromatografię cieczową połączoną ze spektrometrią mas (LC-MS), tandemowa chromatografia cieczowa połączona ze spektrometrią mas (LC-MS/MS) i ultrasprawną chromatografię cieczową połączoną ze spektrometrią mas (UPLC-MS) (El Tahir i in. 2021, Tasci i in. 2021).

Testy mikrobiologiczne są czasochłonne i niewystarczająco specyficzne do celów analitycznych (Le i wsp., 2015). Testy immunologiczne określają analizowane substancje głównie poprzez specyficzne reakcje antygenów i przeciwciał. Jednak ze względu na dużą reaktywność krzyżową między związkami o podobnej budowie (np. TLM i tylozyna), ich rozróżnienie za pomocą testu immunologicznego jest trudne (Burkin i Galvidis, 2012).

Technika HPLC charakteryzuje się istotnymi właściwościami, takimi jak powtarzalność, selektywność, rozdzielczość, wysoki odzysk i łatwość zastosowania, w związku z czym jest najczęściej stosowana (Ghanjaoui i wsp., 2020, Treiber i Beranek-Knauer, 2021).

W celu opracowania właściwej metody analitycznej przeszukano dostępną literaturę odnośnie wszystkich trzech badanych antybiotyków. Podsumowanie przedstawiono poniżej:

### **5.1. Metody oznaczania tilmikozyny**

Przedstawione w dostępnej literaturze metody określania pozostałości TLM obejmują testy mikrobiologiczne (Coleman i wsp., 1995), testy immunologiczne (Beier i wsp., 2005; Burkin i Galvidis, 2012; Peng i wsp., 2012; Le i wsp., 2013, 2015; Wang i wsp., 2016; Huang i wsp., 2019a; Li i wsp., 2019; Liu i wsp., 2021; Wang i wsp., 2021; Cayci i in. 2019; Tao i in. 2012), chromatografię cieczową (LC) (Chan i wsp., 1994; Parker i Patel, 1994; Ngoh, 1996; Moran i wsp., 1997; Juhel-Gaugain i wsp., 1999; Stobba-Wiley i Readnour, 2000; Stobba-Wiley i wsp., 2000; Clark i wsp., 2009; Zheng i wsp., 2011; Zhang, 2016), LC–MS/MS (Readnour i wsp., 1997; Draisci i wsp., 2001; Herrera i wsp., 2007; Yibar i wsp., 2014; Li i wsp., 2017; Qin i wsp., 2017; Ji i wsp., 2019; Yipel i in. 2018; Yamaguchi i in. 2015; El Tahir i wsp., 2021) oraz chromatografię gazową z tandemową spektrometrią mas (GC–MS/MS) (Tang i wsp., 2022).

Z punktu widzenia precyzyjnej i ilościowej analizy, metody chromatograficzne i spektrometrii mas są niezawodne do określania pozostałości TLM w niskich stężeniach. Najczęściej stosowane są metody LC oraz LC sprzężona z MS/MS, natomiast metody GC–MS/MS są rzadziej wykorzystywane ze względu na derywatyzację TLM (przeprowadzona w odpowiednie pochodne o właściwościach umożliwiających ich oznaczenie).

### **5.2. Metody oznaczania kolistyny**

W literaturze opisano kilka metod mających na celu wykrywanie KOL. Metody mikrobiologiczne (Sato i wsp., 1972; Thomas i wsp., 1980; Elverdam i wsp., 1981), bądź immunologiczne (Kitagawa i wsp., 1985). Komisja Europejska (FAO, 2006) do oznaczania KOL w tkankach i mleku zaleca techniki separacyjne jak np.:

- chromatografia cienkowarstwowa (Thomas i Holloway, 1978),
- izotachoforeza (Holska i Gwozdz. 1989),
- elektroforeza kapilarna (Kristensen i Hansen, 1993),
- wysokosprawna chromatografia cieczowa z detekcją fluorymetryczną (Chepyala i wsp., 2015),

- wysokosprawna/ultra wysokosprawna chromatografia cieczowa sprzężona z tandemową spektrometrią mas (HPLC-MS/MS) (Wang i wsp., 2023; Boison 2015, Kumar i wsp., 2020, 2021; Wijayanti i wsp., 2024; Cangemi i wsp., 2016; Sin i wsp., 2006; Kaufmann i Widmer 2013; Fu i wsp., 2017; Choosakoonkriang i wsp., 2013; Dotsikas i wsp., 2011; Xu i wsp., 2012, Wan i wsp., 2006; Mercier i wsp., 2014; Lee i wsp., 2011),
- chromatografia cieczowa sprzężona z tandemową spektrometrią mas z jonizacją elektrosprayową (ESI) (Liu i wsp., 2019),
- chromatografia cieczowa ze spektrometrią mas o wysokiej rozdzielczości (LC-HRMS) (Wu i wsp., 2020).

Istnieje także kilka wielopozostałościowych metod oznaczania antybiotyków polipeptydowych, w tym KOL, w matrycach zwierzęcych (Kaufmann i Widmer, 2013; Boison i wsp., 2015). Ograniczeniem tych metod wielopozostałościowych są słabe odzyski KOL (Kaufmann i Widmer, 2013; Boison i wsp., 2015).

### 5.3. Metody oznaczania linkomycyny

Do oznaczenia stężeń LIN w żywności pochodzenia zwierzęcego stosowano różne metody, m.in.: analizę mikrobiologiczną (Barbiers i Neff, 1976), spektrofotometrię UV (Zi-ming 2009), kolorymetrię (Egutkin, 1984), spektroskopię absorpcji atomowej (El Ries, 1994), jednakże techniki chromatograficzne okazały się najbardziej czułe np.:

- wysokosprawna chromatografia cieczowa z detekcją UV (Wijayanti i inn., 2024; Abualhasan i wsp., 2012),
- wysokosprawna chromatografia cieczowa sprzężona z detekcją aerozolu naładowanego koronowo (HPLC-CAD) (Vučićević-Prčetić i wsp., 2011; Stypułkowska i wsp., 2015),
- wysokosprawna chromatografia cieczowa sprzężona z tandemową spektrometrią mas (HPLC-MS/MS) (Sin i wsp., 2004a; Thompson i wsp., 2003),
- chromatografia gazowa połączona ze spektrometrią mas (GC-MS) (Guo i wsp., 2021),
- chromatografia gazowa z derywatyzacją (Farrington i wsp., 1988; Luo i wsp., 1996b; Hou i wsp., 2024),
- chromatografia cieczowa w odwróconych fazach z parami jonowymi i detekcją elektrochemiczną (Luo i wsp., 1996a; Moats, 1991),

- chromatografia cieczowa z detekcją elektrochemiczną impulsową (Szúnyog i wsp., 2002.; Luo i wsp., 1996b; LaCourse i Dasenbrock, 1999),
- chromatografia cieczowa sprzężona z tandemową spektrometrią mas z jonizacją elektrosprayową (ESI) (Sin i wsp., 2004b; Crellin i wsp., 2003),
- LC-MS/MS z jonizacją chemiczną pod ciśnieniem atmosferycznym (APCI) (Thompson i wsp., 2003).

#### 5.4. Walidacja metod analitycznych

Walidacja metod analitycznych stosowanych do oznaczania stężeń leków w materiale biologicznym stanowi fundamentalny element zapewnienia jakości badań farmakokinetycznych. W ujęciu naukowym i regulacyjnym jest to proces systematycznej oceny zdolności metody do dostarczania wiarygodnych, powtarzalnych i obiektywnych wyników, które mogą stanowić podstawę do dalszych analiz ilościowych oraz wnioskowania biologicznego. Bez spełnienia tych kryteriów dane analityczne tracą wartość interpretacyjną, co bezpośrednio wpływa na jakość wyznaczanych parametrów farmakokinetycznych.

Szczególne znaczenie w badaniach farmakokinetycznych ma charakter matrycy biologicznej. Surowica lub osocze, choć stosunkowo jednorodne, zawierają liczne składniki mogące wpływać na sygnał analityczny, natomiast tkanki, mleko czy jaja stanowią matryce złożone, wymagające bardziej zaawansowanych procedur przygotowania próbki, gdyż zanieczyszczenie próbki może prowadzić do supresji lub wzmocnienia sygnału, co w konsekwencji skutkuje błędem oznaczeń. Z kolei w analizie pozostałości kluczowe znaczenie ma osiągnięcie granic oznaczalności poniżej obowiązujących limitów MRL, co wymaga wysokiej czułości i specyficzności metody.

Walidacja pełni również istotną funkcję w kontekście porównywalności wyników między badaniami oraz ich powtarzalności w czasie. W badaniach farmakokinetycznych, które często stanowią podstawę do ustalania schematów dawkowania oraz okresów karencji, nawet niewielkie odchylenia w oznaczeniach mogą prowadzić do istotnych różnic w interpretacji danych. Brak rygorystycznej walidacji zwiększa ryzyko błędów systematycznych i losowych, co może skutkować nieprawidłowym oszacowaniem ekspozycji organizmu na lek, a w konsekwencji błędnymi decyzjami terapeutycznymi.

W ujęciu metodologicznym walidacja nie jest jednorazowym etapem, lecz procesem ciągłym, obejmującym również walidację częściową oraz weryfikację metody w trakcie rutynowego stosowania. Zmiany w aparaturze, matrycy czy zakresie stężeń wymagają

ponownej oceny wybranych parametrów, aby utrzymać spójność i wiarygodność danych. Tym samym walidacja stanowi integralny element systemu zarządzania jakością w badaniach analitycznych.

Z perspektywy zapewnienia jakości badań (quality assurance), walidacja metod takich jak HPLC czy LC-MS/MS wpisuje się w ramy Dobrej Praktyki Laboratoryjnej (GLP) oraz wytycznych Komisji Europejskiej (Rozp. UE, 2021/808) czy dostępnych przewodników analitycznych (Anonymous, 2012; Wenzl, 2016), gdzie metody analityczne służące do określania stężeń leków weterynaryjnych muszą być zwalidowane tzn. spełniać szereg wymogów potwierdzających ich przydatność.

Walidacja obejmuje zwykle określenie takich cech metody jak: liniowość, precyzja (powtarzalność, odtwarzalność wewnątrzlaboratoryjna), odzysk (poprawność), granicę wykrywalności (LOD) oraz granicę oznaczalności (LOQ).

- **Liniowość (Linearity)** metody określa zakres stężeń, w którym uzyskiwane wartości sygnału pomiarowego substancji badanej są wprost proporcjonalne do analizowanych stężeń. Krzywe kalibracyjne są kluczowe w walidacji metody i muszą być generowane w tej samej matrycy, co docelowe próbki badawcze. Osiąga się to poprzez dodanie znanych stężeń analitu do czystej matrycy. Każdy analizowany analit wymaga osobnej krzywej kalibracyjnej dla każdej serii analitycznej. Przed walidacją należy określić oczekiwany zakres stężeń, który powinien mieścić się w zakresie krzywej kalibracyjnej, tj. między LLOQ, a ULOQ (górnym standardem kalibracyjnym). Zakres ten musi być odpowiedni do opisu PK analitu. Krzywa kalibracyjna powinna obejmować minimum sześć poziomów stężeń oraz próbkę zerową (z IS, ale bez analitu). Stężenia wyliczone wstecz dla standardów kalibracyjnych powinny mieścić się w zakresie  $\pm 15\%$  wartości nominalnej, z wyjątkiem LLOQ, gdzie dopuszcza się  $\pm 20\%$ . Zastosowanie IS w metodach analitycznych z wykorzystaniem techniki chromatografii cieczowej ze spektrometrią mas (LC-MS/MS) jest niezwykle istotne z kilku powodów, głównie w celu zwiększenia dokładności i precyzji pomiarów. W niniejszych badaniach jako IS zastosowano odpowiednio w przypadku tilmikozyny - ftalimid; kolistyny - Polimiksynę B oraz linkomycyny - linkomycynę-d3.
- **Dokładność (Accuracy)** określa stopień zgodności wyników badań uzyskanych daną metodą z wartością przyjętą jako prawdziwa, np. wartością nominalną lub z wynikami uzyskanymi ustaloną metodą odniesienia. Aby ocenić dokładność, należy używać próbek kontroli jakości (QC), do których dodano znane ilości analitu. Próbki QC muszą być wzbogacane niezależnie od standardów kalibracyjnych, przy użyciu oddzielnych

roztworów podstawowych (stock solutions), chyba że są one ustalone. Próbkę QC są analizowane względem krzywej kalibracyjnej, a uzyskane stężenia porównuje się z wartościami oczekiwanymi. Dokładność określa się jako procent wartości nominalnej. Ocena dokładności obejmuje dwie analizy: dokładność wewnątrz serii (within-run) czyli powtarzalność oraz dokładność między seriami (between-run) czyli odtwarzalność/precyzja. Powtarzalność oznacza analizę co najmniej 5 próbek na czterech poziomach stężeń w ramach jednej serii analitycznej (LLOQ, niski QC, średni QC, wysoki QC). Średnie stężenie powinno mieścić się w zakresie  $\pm 15\%$  wartości nominalnej, z wyjątkiem LLOQ, gdzie dopuszcza się  $\pm 20\%$  Odtwarzalność, czyli precyzja ocenia próbki LLOQ, niskie, średnie i wysokie QC z co najmniej trzech serii analitycznych przeprowadzonych w różnych dniach. Średnie stężenia powinny mieścić się w granicach  $\pm 15\%$  wartości nominalnej, z wyjątkiem LLOQ, gdzie dopuszcza się  $\pm 20\%$

- **Odzysk (Recovery)** określa wydajność ekstrakcji. Parametr oblicza się porównując wartości sygnału pomiarowego uzyskane po ekstrakcji z materiału biologicznego zawierającego znaną ilość związku badanego, do bezpośrednio nastrzykniętego roztworu wzorcowego. Badanie odzysku prowadzone jest w celu stwierdzenia ewentualnych strat analitu w toku analizy oraz wpływu matrycy na wynik badania i jest również sposobem wyrażania dokładności metody. Odzysk ocenia się poprzez porównanie odpowiedzi detektora dla ekstrahowanych próbek QC (poddanych pełnemu procesowi analitycznemu) oraz czystych rozcieńczeń standardów (niewymagających ekstrakcji). Wyniki odzysku wyraża się w procentach jako średnią ( $\pm$  SD).

- **Granica wykrywalności (LOD – Limit of Detection)** to najniższe stężenie badanego związku w próbkach po ekstrakcji, które może być w sposób wiarygodny odróżnione od szumów linii podstawowej tzn., gdy stosunek wartości sygnału pochodzącego od substancji badanej do szumów (S/N) wynosi od 2 do 3. Parametr LOD może być również wyznaczony na podstawie standardowego błędu oceny „y” względem „x” ( $S_{yx}$ ) oraz wartości współczynnika nachylenia krzywej kalibracyjnej.

- **Granica oznaczalności (LOQ) i Dolna granica oznaczalności (LLOQ – Lower Limit of Quantification)**. LLOQ to termin używany w bioanalizie i jest odpowiednikiem LOQ. LLOQ jest zdefiniowana jako najniższy standard na krzywej kalibracyjnej. LLOQ jest akceptowany jako LOQ, jeśli spełnione są następujące warunki:

- odpowiedź analitu na LLOQ jest co najmniej 5-krotnie większa niż odpowiedź próbki ślepej;
- pik analitu (odpowiedź) jest identyfikowalny, dyskretny i powtarzalny

z precyzją 20% i dokładnością 80–120%. Jest to również najniższy standard kalibracyjny (Dokładność i precyzja).

Dodatkowo, można także w procesie walidacji metod analitycznych wyznaczać inne parametry m.in.: Selektowność/specyficzność, Przeniesienie próbki, Efekt matrycy, Integralność rozcieńczenia, Stabilność, Odporność, Limit decyzyjny ( $CC\alpha$ ) oraz zdolność wykrywania do badań przesiewowych ( $CC\beta S$ ) (Rozp. UE, 2021/808, Anonymous, 2012).

Przestrzeganie ram regulacyjnych to nie tylko formalność, ale zobowiązanie do zapewnienia bezpieczeństwa, skuteczności i precyzji w badaniach naukowych i rozwoju farmaceutycznym. Wszystkie metody oznaczania wybranych antybiotyków, będących podstawą do przygotowania niniejszej dysertacji, poddano walidacji zgodnie z zobowiązującymi wytycznymi UE (Anonymous, 2012; Rozp. UE, 2021/808, Wenzl 2016). Postawowym zatem celem było zagwarantowanie, że opracowane metody analityczne spójnie generowały dokładne i powtarzalne wyniki.

## II. CEL BADAŃ

Choć istnieje szereg danych literaturowych odnośnie dawek terapeutycznych często stosowanych u drobiu grzebiącego leków przeciwbakteryjnych jak: tylmikozyjna, kolistyna czy linkomycyna, u gęsi nie są one znane. Znajomość specyfiki gatunku (w tym sposób utrzymania) nasuwa przypuszczenie, że ekstrapolacja na gęsi wartości dawek ustalonych dla innych gatunków ptaków może być niedostateczna ze względu na różnice w metabolizmie (ale też różnice w procesach wchłaniania czy wydalania). Jednocześnie zwiększone dawki mogą istotnie wpłynąć na poziomy pozostałości w tkankach, ograniczając bezpieczeństwo konsumentów. Badanie profilu farmakokinetycznego oraz zanikania pozostałości leku umożliwi ocenę zastosowanego schematu terapii, a także określi okres karencji niezbędny dla bezpiecznego wykorzystania mięsa i produktów pochodzących od ptaków, u których zastosowano lek. Mając na uwadze powyższe, celem niniejszej dysertacji było:

1. Opracowanie i walidacja metod oznaczania wybranych antybiotyków, takich jak tylmikozyjna, kolistyna oraz linkomycyna pod kątem materiału biologicznego pozyskanego od gęsi domowej;
2. Wyznaczenie oraz ocena podstawowych parametrów farmakokinetycznych wybranych antybiotyków, takich jak tylmikozyjna, kolistyna oraz linkomycyna u gęsi domowej:
  - po jednorazowym podaniu dożylnym (IV),
  - po jednorazowym podaniu podskórnym (SC) lub domięśniowym (IM),
  - po jednorazowym podaniu doustnym (PO),
  - po wielokrotnym podaniu doustnym (PO multi);
3. Ocena zanikania pozostałości w/w leków w tkankach jadalnych u gęsi domowej po wielokrotnym podaniu doustnym w aspekcie wyznaczenia okresu karencji.

### III. PROFIL FARMAKOKINETYCZNY ORAZ ZANIKANIE POZOSTAŁOŚCI TYLMIKOZYNY PO JEDNORAZOWYM PODANIU DOŻYLNYM, PODSKÓRNYM I DOUSTNYM ORAZ WIELOKROTNYM DOUSTNYM U GĘSI DOMOWEJ

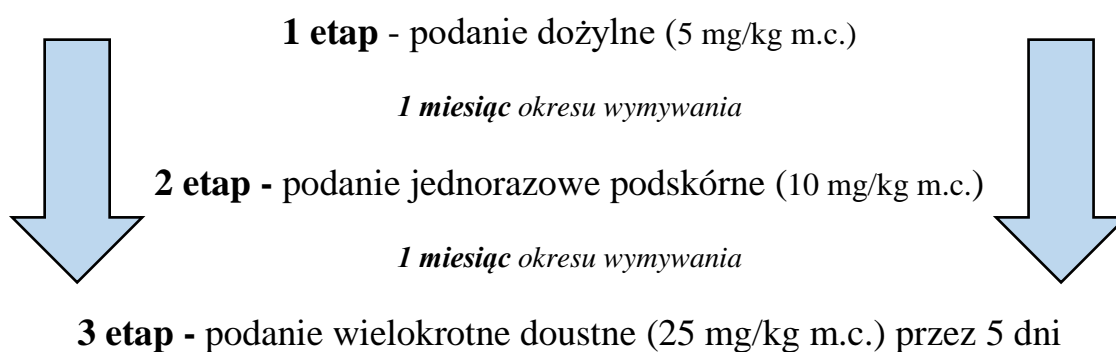
#### III.1. Materiały i metody

##### III.1.1. Zwierzęta

Badanie przeprowadzono na 15 sztukach zdrowych, dorosłych (w wieku 2 lat), o masie ciała od 4,1 do 5,6 kg samcach gęsi rasy Biłgorajskiej. Przed rozpoczęciem badania stan zdrowia gęsi został dokładnie oceniony przez lekarzy weterynarii nadzorujących badanie na podstawie badania klinicznego, analiz biochemicznych osocza oraz badań hematologicznych. Wybrane od doświadczenia zwierzęta nie otrzymywały wcześniej żadnych antybiotyków ani innych leków. Następnie ptaki poddano tygodniowemu okresowi aklimatyzacji, w czasie którego codziennie monitorowano ich zachowanie, apetyt i przyzwyczajano do obecności, zapachu oraz dotyku osób, które będą przeprowadzać doświadczenie. Następnie ptaki zważono i oznakowano indywidualnie pierścieniem na lewej nodze.

Gęsi były utrzymywane zgodnie z wymaganiami Ministra Rolnictwa i Rozwoju Wsi z dnia 19 września 2019 r. (Dz.U. 2019 poz. 1966), a eksperyment przeprowadzono zgodnie z prawem europejskim (2010/63/UE) i w oparciu o zgodę (nr 105/2022) wydaną przez Lokalną Komisję Etyczną do Spraw Doświadczeń na Zwierzętach z siedzibą w Lublinie.

Projekt badania obejmował szereg 3 badań naprzemiennych (*cross-over study/trial*). Poszczególne fazy były oddzielone jednomiesięcznym okresem wymywania leku.



Ryc. 7. Schemat podawania TLM. (Źródło: Autor)

W pierwszym etapie badania gęsiom podano jednorazowo IV dawkę TLM w ilości 5 mg/kg masy ciała (Micorion®, Orion Pharma, 300 mg/ml), wstrzykiwaną do żyły skrzydłowej lewej. W etapie drugim zastosowano jednorazowo dawkę SC TLM (10 mg/kg; Micorion®, Orion Pharma), podawaną w okolicę międzyłopatkową. Etap trzeci obejmował wielokrotne PO podawanie roztworu TLM (25 mg/kg; Tylmiscan®, ScanVet, 300 mg/ml) za pomocą wlewu do wola. Po każdej aplikacji kaniulę przepłukiwano 5 ml wody w celu zapewnienia pełnego podania dawki. Gęsi otrzymywały lek PO raz dziennie przez pięć kolejnych dni o godzinie 8:00

Dawka PO została ustalona na podstawie dostępnej literatury oraz zaleceń dla drobiu (Elsayed i in., 2014), natomiast dawkę SC określono zgodnie z rekomendacjami dla owiec i bydła (Modric i in., 1998). Dawka IV została celowo obniżona, a była niezbędna wyłącznie do oszacowania podstawowych parametrów PK, w tym całkowitej F.

Próbki krwi (ok. 1 ml) pobierano z żyły skrzydłowej prawej w określonych przedziałach czasowych we wszystkich trzech etapach: 0, 0.085 (wyłącznie dla podania IV), 0.25, 0.5, 0.75, 1, 1.5, 2, 4, 6, 8, 10, 24 oraz 48 godzin po podaniu. W przypadku wielokrotnego podania PO próbki pobierano w pierwszym oraz piątym dniu eksperymentu, zgodnie z tym samym harmonogramem. Krew pobierano do probówek zawierających heparynę, następnie odwirowywano, po czym osocze oddzielano i przechowywano w temperaturze  $-20^{\circ}\text{C}$

Po zakończeniu etapu z wielokrotnym podaniem PO TLM (dzień 5), gęsi (po trzy osobniki w grupie) poddano ubojowi w następujących punktach czasowych: 24, 48, 76, 92 oraz 120 godzin po ostatnim podaniu leku. Do dalszych analiz pozyskano próbki tkanek (ok. 20 g każda) – mięśni, wątroby oraz nerek – które następnie zamrożono i przechowywano w temperaturze  $-20^{\circ}\text{C}$ . Analizy chromatograficzne przeprowadzono w ciągu 40 dni od momentu pobrania próbek, po zakończeniu każdej fazy badania.

### **III.1.2. Oznaczanie tylmikozyiny w osoczu oraz tkankach**

Do oznaczenia TLM w pobranym materiale biologicznym zaadaptowano i nieznacznie zmodyfikowano wcześniej opracowaną i zwalidowaną pod kątem osocza świń metodę autorstwa Zhang i wsp. (2017).

W celu ekstrakcji TLM z osocza, po rozmrożeniu, 0,2 ml próbki zmieszano z 40  $\mu\text{L}$  roztworu standardu wewnętrznego (IS; 25  $\mu\text{g/ml}$ ), po czym krótko wytrząsano (vortex). Następnie dodano 1,2 ml dichlorometanu ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ) i mieszaninę wytrząsano przez 50 sekund. Po 10 minutach odwirowywania przy  $4000\times g$  zebrano dolną warstwę (1,4 ml).

Pozostałą warstwę osocza poddano podwójnej ekstrakcji, dodając kolejne 1,2 ml  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , po czym przeprowadzono 40-sekundowe wytrząsanie i 4-minutowe odwirowanie przy  $4000\times g$ . Dolną warstwę ponownie zebrano i połączono z wcześniej uzyskaną frakcją, a następnie łagodnie odparowano pod azotem w temperaturze  $45^\circ\text{C}$ . Po rekonstytucji w 100  $\mu\text{L}$  fazy ruchomej i 40-sekundowym wytrząsaniu, próbki przeniesiono do fiolek i zaaplikowano do HPLC, przy objętości wstrzykiwanej próbki wynoszącej 50  $\mu\text{L}$ .

W przypadku próbek tkanek (mięśni, wątroby i nerek) najpierw je rozmrożono i natychmiast rozdrobniono na drobne kawałki (Garcia i wsp., 2000; Sartini i wsp., 2021). Porcję 1 g każdej tkanki umieszczano w plastikowej próbówce zawierającej 3 ml roztworu homogenizującego (bufor fosforanowy diwodorowy 0,1M, pH 7,1). Zawiesinę homogenizowano przez około 1 minutę, po czym 0,3 ml poddano dalszemu przetwarzaniu zgodnie z wcześniej opisanym protokołem dla osocza.

Metodę stosowaną do analizy osocza zaadaptowano i zwalidowano dla wszystkich badanych rodzajów tkanek, z niewielkimi zmianami objętości. Na początku, do 0,3 ml próbki dodawano 200  $\mu\text{L}$  IS o stężeniu 25 ppm. Następnie przeprowadzano podwójną ekstrakcję przy użyciu 2,4 ml  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  każdorazowo.

Analizy wykonywano na systemie LC Jasco (gradient PU-980, AS2055) z detektorem UV ustawionym na długość fali 285 nm. Rozdział prowadzono na kolumnie Luna C18 ( $250 \times 4,6$  mm, 5  $\mu\text{m}$ ) w  $30^\circ\text{C}$ . Fazę ruchomą stanowiła mieszanina: (A): 0,1% kwas mrówkowy ( $\text{HCOOH}$ ) z 5 mM mrówczanem amonu w wodzie oraz (B): acetonitryl (ACN). Kolumnę eluowano izokratycznie przy użyciu mieszaniny 24% fazy A i 76% fazy B z przepływem 0,8 ml/min.

### III.1.3. Walidacja metody analitycznej

Roztwór macierzysty TLM (1 mg/ml) rozpuszczono w acetonitrylu (ACN), natomiast kolejne rozcieńczenia przygotowano w fazie ruchomej. Standard wewnętrzny (IS) rozpuszczono w metanolu (MeOH). Wszystkie roztwory przechowywano w temperaturze  $-20^\circ\text{C}$ . Do opracowania krzywej kalibracyjnej TLM w osoczu wykorzystano rozcieńczenia o stężeniach: 5, 2,5, 1, 0,5, 0,1 i 0,01  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . Liniowość oceniano w zakresie 0,01–5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  na podstawie wykresu reszt, testu dopasowania oraz przeliczenia wstecznego. Sześć próbek osocza z dodatkiem IS, zawierających wysokie (5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ), średnie (2,5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) i niskie (0,01  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) stężenia, analizowano przy użyciu tego samego aparatu i operatora: jednego dnia (dla precyzji wewnątrzdniowej) oraz w trzech różnych dniach (dla precyzji międzyseryjnej). Skuteczność odzysku leku oceniano na podstawie

odpowiedzi detektora dla próbek kontrolnych i czystych standardów. LOD (granice wykrywalności) określono jako stężenie leku w osoczu dające stosunek sygnału do szumu - 3, a LLOQ jako najniższe stężenie osoczowe dające stosunek sygnału do szumu - 5 (Anonymous, 2012).

### III.1.4. Analiza statystyczna oraz farmakokinetyczna

Analizę PK przeprowadzono za pomocą oprogramowania PKanalix™ (R1, 2023), przy zastosowaniu podejścia niekompartmentowego. Krzywe zależności stężenie–czas posłużyły do bezpośredniego wyznaczenia  $C_{max}$  w osoczu oraz jego  $T_{max}$ .  $T_{1/2_{elim}}$  obliczono na podstawie regresji najmniejszych kwadratów dla końcowej fazy eliminacji. AUC wyliczono metodą trapezów logarytmicznych liniowych dla podania IV oraz metodą *linear-up log-down* dla podań PO i SC. Wartość resztkowego pola powierzchni pod krzywą ( $AUC_{rest}$ ) u każdego osobnika była mniejsza niż 20% pole powierzchni pod krzywą obliczone między zero, a nieskończonością ( $AUC_{0-\infty}$ ), a współczynnik determinacji ( $R^2$ ) linii regresji fazy końcowej przekraczał 95%. Wartości poniżej LLOQ zostały wykluczone z analizy PK. Wskaźnik kumulacji obliczono jako stosunek  $AUC_{0-\infty}$  po ostatnim podaniu w schemacie wielokrotnego dawkowania do  $AUC_{0-\infty}$  po pojedynczej dawce (Toutain i Bousquet-Mélou, 2004a), gdzie wartość bliska 1 wskazuje na brak kumulacji.

Biodostępność po podaniu PO i SC obliczono według następującego wzoru:

$$F\% = 100 \times \frac{AUC(PO \text{ lub } SC) \times Dawka(IV)}{AUC(IV) \times Dawka(PO \text{ lub } SC)}$$

Średni czas wchłaniania (MAT) wyliczono ze wzoru:

$$MAT(PO \text{ lub } SC) = MRT(PO \text{ lub } SC) - MRT(IV)$$

Wskaźnik ekstrakcji ogólnoustrojowej ( $E_{body}$ ) dla TLM po podaniu IV obliczono jako  $Cl/CO$ , zgodnie z metodologią Toutain i Bousquet-Mélou (2004b), gdzie  $CO$  (ml/kg/min) to pojemność minutowa serca wyliczana według równania allometrycznego dla ptaków:  $CO = 290,7 \times (\text{masa ciała w kg})^{0,69}$  (Grubb, 1983).

Aby ocenić statystycznie istotne różnice w parametrach PK pomiędzy grupami, zastosowano jednoczynnikową analizę wariancji (ANOVA), po której przeprowadzono test wielokrotnych porównań Bonferroniego jako analizę *post hoc*. Za istotne statystycznie

uznawano wartości  $p < 0,05$ . Do analizy użyto oprogramowania GraphPad InStat (wersja 5.3).

### III.1.5. Analiza pozostałości i oszacowanie okresu karencji

Parametry PK dla TLM w wybranych tkankach obliczono przy użyciu podejścia *naïve pooled-data* z zastosowaniem analizy niekompartmentowej (Pouplin i wsp., 2016). Przenikanie leku do tkanek oceniano poprzez porównanie średniego  $AUC_{\text{tkanek}}$  z odpowiednimi wartościami AUC po wielokrotnym podaniu PO ( $AUC(0-\infty)$  tkanka / osocze).

Okresy karencji dla TLM w tkankach gęsi obliczono z wykorzystaniem oprogramowania WT 1.4., opracowanego przez EMA (Anonymous, 2019). Okres karencji określono jako moment, w którym górna jednostronna granica tolerancji (99%) z 95% przedziałem ufności spada poniżej MRL. W niniejszym badaniu zastosowano wartości MRL dla TLM w tkankach kurcząt, określone przez EMA: 1000  $\mu\text{g}/\text{kg}$  dla wątroby, 250  $\mu\text{g}/\text{kg}$  dla nerek oraz 75  $\mu\text{g}/\text{kg}$  dla mięśni (EMA, 2002).

## III.2. Wyniki

### III.2.1. Walidacja metody

Pełną walidację metod przeprowadzono osobno dla osocza oraz dla każdej badanej tkanki gęsi, oceniając: liniowość, precyzję wewnątrz- i międzydniową, odzysk, LOD i LLOQ – zgodnie z wytycznymi EMA (Anonymous, 2012).

Tabela 2. przedstawia wyniki walidacji metody analitycznej, uwzględniając kluczowe parametry oceniane w osoczu i w analizowanych tkankach.

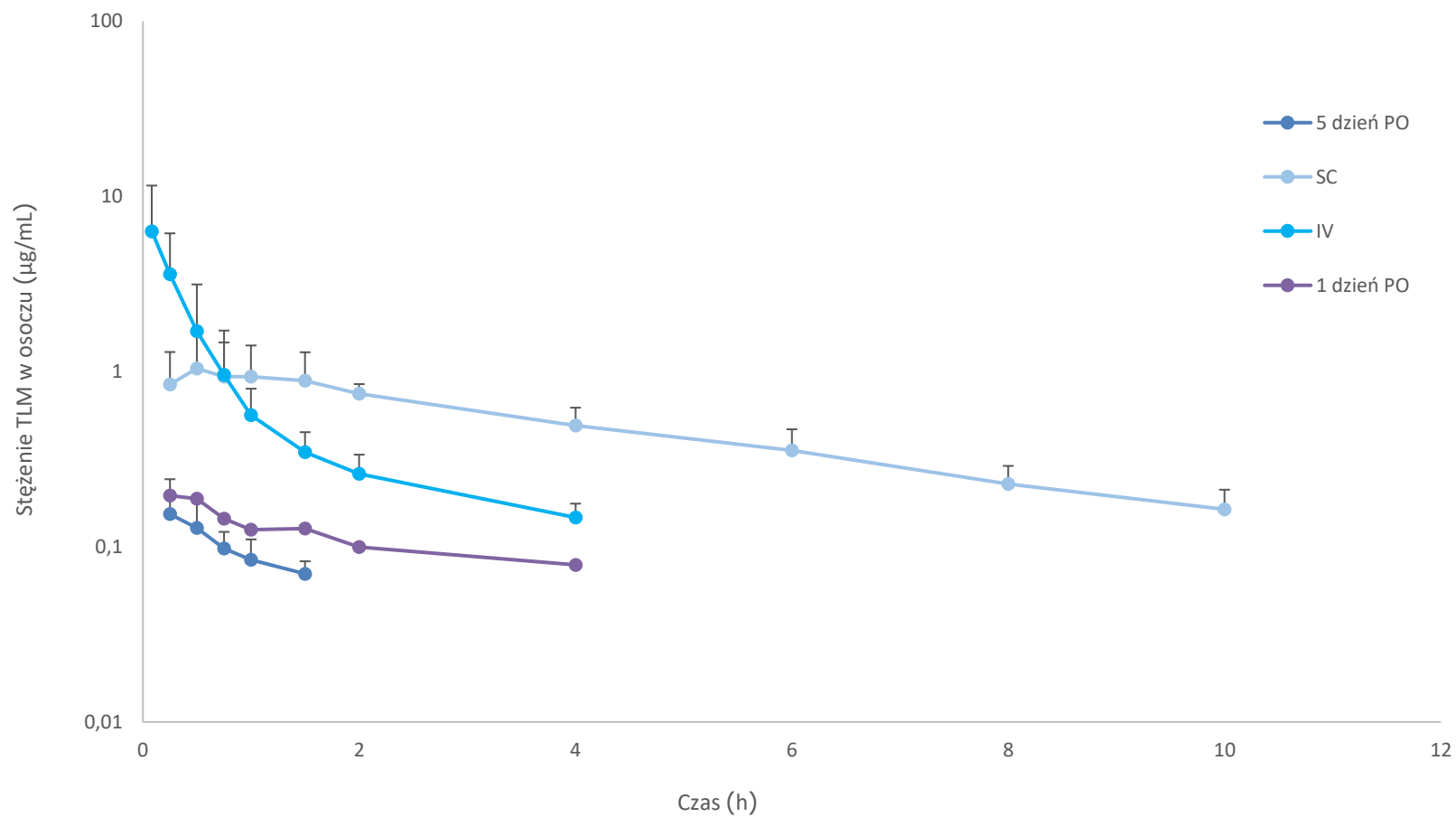
Parametr	Jednostka	Matryca			
		Osocze	Mięśnie	Nerki	Wątroba
Równanie		$y = 0,3566x - 0,0176$	$y = 0,289x + 0,03$	$y = 0,373x - 0,163$	$y = 0,267x + 0,246$
R <sup>2</sup>		0,997	0,991	0,999	0,999
Precyzja Inter-day, CV	%	12,3	4,7	11,9	15,4
Precyzja Intra-day, CV	%	2,9	2,1	3,8	4,1
Odzysk	%	86	94	91	89
LLOQ	µg/mL µg/g	0,01	0,01	0,01	0,01
LOD	µg/mL µg/g	0,005	0,007	0,007	0,007

**Tab. 2. Wyniki walidacji metody HPLC do ilościowego oznaczania TLM w osoczu i wybranych tkankach u gęsi. (Źródło: Autor)**

Metoda wykazała doskonały odzysk, niskie wartości LLOQ oraz liniowość w zakresie 0,01–5 µg/ml dla każdej badanej matrycy.

### III.2.2. Profil farmakokinetyczny

Stężenia TLM w osoczu były oznaczalne do 4 godzin po podaniu PO i IV oraz do 10 godzin po podaniu SC (Ryc. 8).



**Ryc. 8. Półlogarytmiczny wykres średnich ( $\pm$ SD) stężeń TLM w osoczu w czasie, po podaniu IV, S.C.; jednorazowym PO oraz wielokrotnym PO. (Źródło: Autor)**

W tabeli 3. przedstawiono średnie parametry PK na podstawie analizy niekompartmentowej. Z wyjątkiem  $T_{max}$ , który przedstawiono jako zmienną kategorię (mediana i zakres) oraz okresu półtrwania (wyrażonego jako średnia harmoniczna). Pozostałe parametry PK przedstawiono jako średnie geometryczne z odpowiednimi zakresami (Julious i Debarnot, 2000).

Parametr	Jednostka	IV			SC			Podanie jednorazowe PO			Podanie wielokrotne PO		
		Średnia geo	max	min	Średnia geo	max	min	Średnia geo	max	min	Średnia geo	max	min
AUC <sub>(0-∞)</sub> D	h*ug/mL	0,61	1,54	0,24	0,52	0,89	0,37	0,02 <sup>a,b</sup>	0,03	0,01	0,02 <sup>a,b</sup>	0,03	0,01
λz	1/h	0,37	0,72	0,3	0,19 <sup>a,b</sup>	0,29	0,15	0,58	0,95	0,17	0,28	1,25	0,14
t <sub>1/2</sub> <sup>h</sup>	h	1,86	2,33	0,96	3,62 <sup>a,b</sup>	4,57	2,35	1,18	4,06	0,73	2,45	4,96	0,56
Cl	L/h/kg	1,63	4,02	0,65	-	-	-	-	-	-	-	-	-
V <sub>d</sub>	L/kg	4,87	7,77	1,57	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MRT <sub>(0-∞)</sub>	h	1,41	2,27	0,71	5,42 <sup>a,c</sup>	6,97	3,79	1,8	5,39	1,19	3,68 <sup>a</sup>	7,53	0,93
C <sub>max</sub> D	μg/mL	-	-	-	0,106 <sup>c,d</sup>	0,195	0,056	0,021	0,036	0,009	0,013	0,033	0,008
T <sub>max</sub> <sup>§</sup>	h	-	-	-	0,50	2	0,50	0,50	1,50	0,25	0,25	0,50	0,25
F	%	-	-	-	86,32 <sup>c,d</sup>	179,03	29,86	3,98	6,80	1,28	3	6,95	0,75
MAT	h	-	-	-	4,02	6,26	2,33	1,31	3,61	0,48	3,11	5,33	1,80

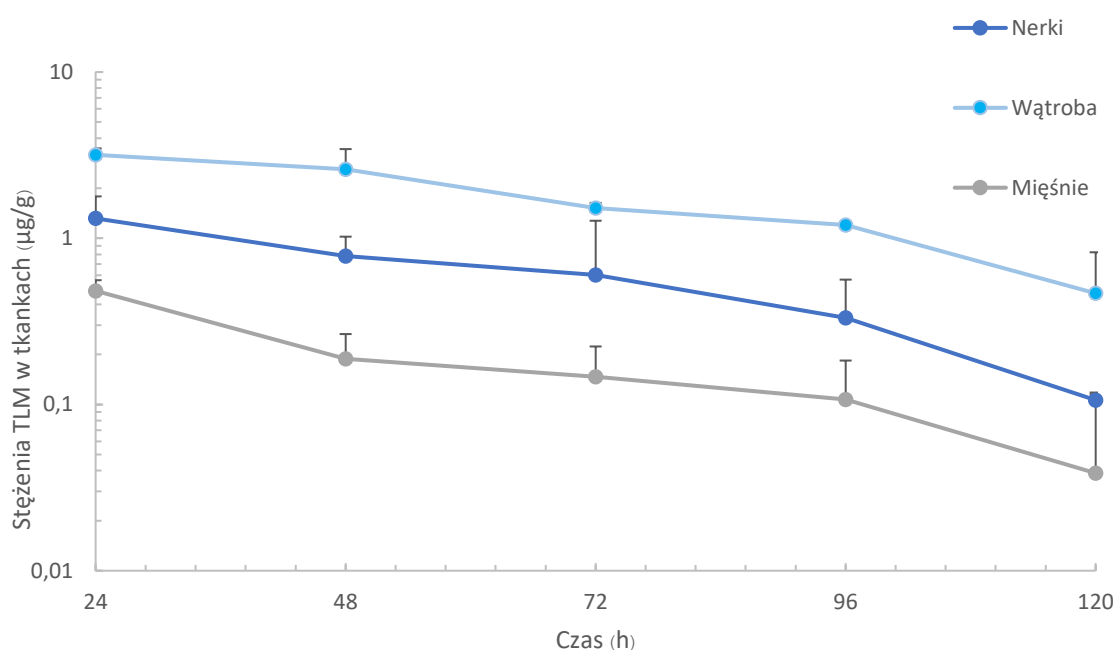
Gdzie: AUC<sub>(0-∞)</sub> D, pole pod krzywą od 0 h do nieskończoności znormalizowane dla 1 mg/kg; λz, stała szybkości w fazie końcowej; t<sub>1/2</sub>, okres półtrwania w fazie eliminacji; Cl, klirens osocza; V<sub>d</sub>, objętość dystrybucji; MRT<sub>(0-∞)</sub>, średni czas przebywania od 0 h do nieskończoności; C<sub>max</sub> D, szczytowe stężenie w osoczu znormalizowane dla 1 mg/kg; T<sub>max</sub>, czas osiągnięcia szczytowego stężenia; F, biodostępność; MAT, średni czas wchłaniania. <sup>a</sup>, statystycznie różni się od IV; <sup>b</sup>, statystycznie różni się od SC; <sup>c</sup>, statystycznie różni się od pojedynczego PO; <sup>d</sup>, statystycznie różni się od wielokrotnego PO; <sup>§</sup>, wartość mediany; <sup>h</sup>, średnia harmoniczna.

**Tab. 3. Średnie wartości parametrów farmakokinetycznych dla TLM (i zakres wartości) po dożylnym (5 mg/kg), podskórnym (10 mg/kg), jednorazowym (25 mg/kg) i wielokrotnym (25 mg/kg przez 5 dni) podaniu doustnym. (Źródło: Autor)**

Po podaniu IV zaobserwowano krótki końcowy okres półtrwania, stosunkowo szybki CI oraz umiarkowaną  $V_d$ .  $E_{body}$  był niski i wynosił 0,03. Bezwzględna F po podaniu PO była niska (4%), natomiast po podaniu SC dość wysoka (87%). Wskaźnik kumulacji wynoszący 1,06 wskazywał na brak kumulacji leku w osoczu po wielokrotnym podaniu PO.

### III.2.3. Oszacowanie okresu karencji

Rycina 9. przedstawia półlogarytmiczny wykres średnich ( $\pm$ SD) stężeń TLM w tkankach w czasie, po piątym dniu wielokrotnego podawania PO.



**Ryc. 9. Średnie stężenia TLM w wątrobie, nerkach i mięśniach po 5. dniu wielokrotnego podawania doustnego (25 mg/kg) u gęsi. (Źródło: Autor)**

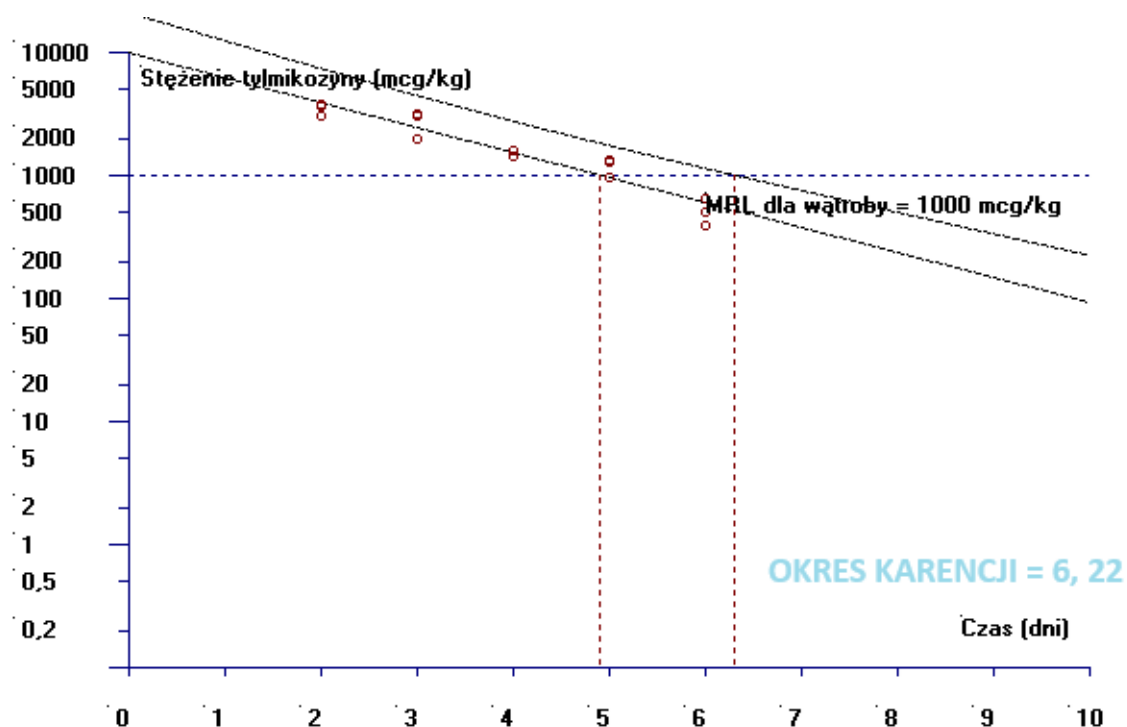
TLM wykrywano we wszystkich tkankach we wszystkich punktach czasowych, z wyjątkiem mięśni w 120. godzinie (gdzie stwierdzono ją jedynie u dwóch gęsi). Najwyższe stężenia obserwowano 24 godziny po piątym dniu podawania PO we wszystkich badanych tkankach. Tabela 4. zawiera parametry PK obliczone dla wszystkich badanych tkanek.

Parametr	Jednostka	Tkanka		
		Wątroba	Nerki	Mięśnie
AUC <sub>(0-∞)</sub>	μg*h/mg	227,32	75,50	23,33
t <sub>1/2</sub>	h	30,89	19,18	24,93
λ <sub>z</sub>	1/h	0,022	0,036	0,028
MRT <sub>(0-∞)</sub>	h	63,04	53,79	54,57
AUC <sub>(0-∞)</sub> tkanka/osocze		320,16 ± 194	144,72 ± 76	44,20 ± 23

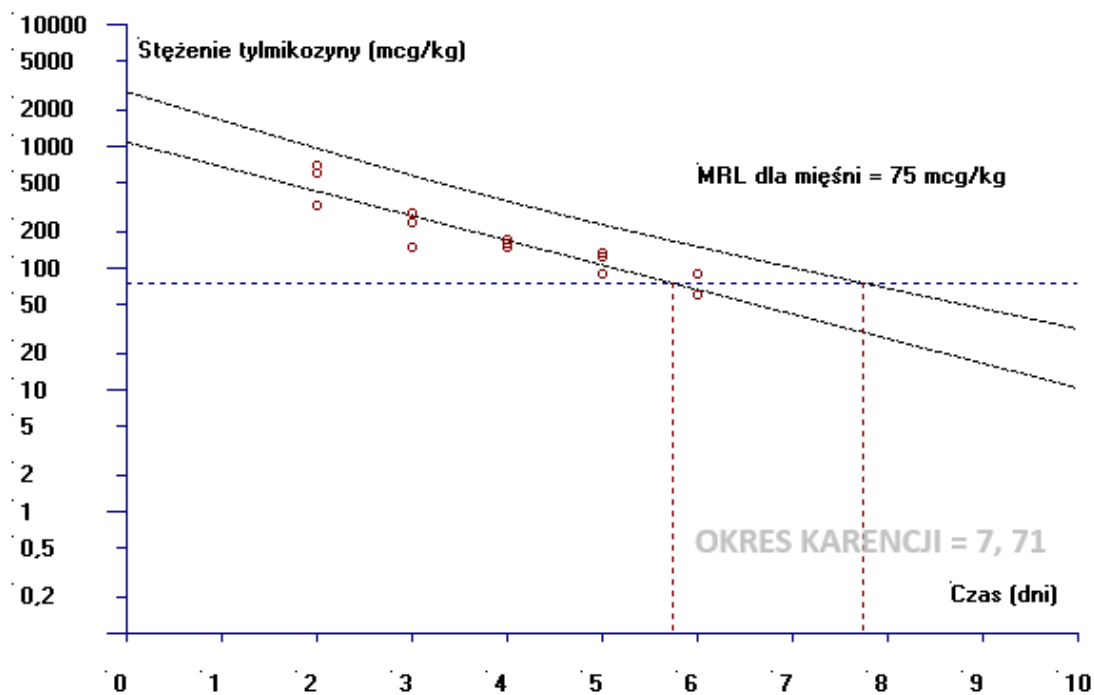
Gdzie: AUC(0-∞), pole pod krzywą od zera do nieskończoności; t<sub>1/2</sub>, końcowy okres półtrwania; λ<sub>z</sub>, stała szybkości w fazie końcowej; MRT(0-∞), średni czas przebywania od zera do nieskończoności; AUC(0-∞) tkanka/osocze = stosunek pola pod krzywą od czasu zerowego do nieskończoności stosunek tkanki/osocza.

**Tab. 4. Parametry PK wraz z SD (±) w badanych tkankach w 5. dniu po wielokrotnym doustnym podaniu (w dawce 25 mg/kg) u gęsi. (Źródło: Autor)**

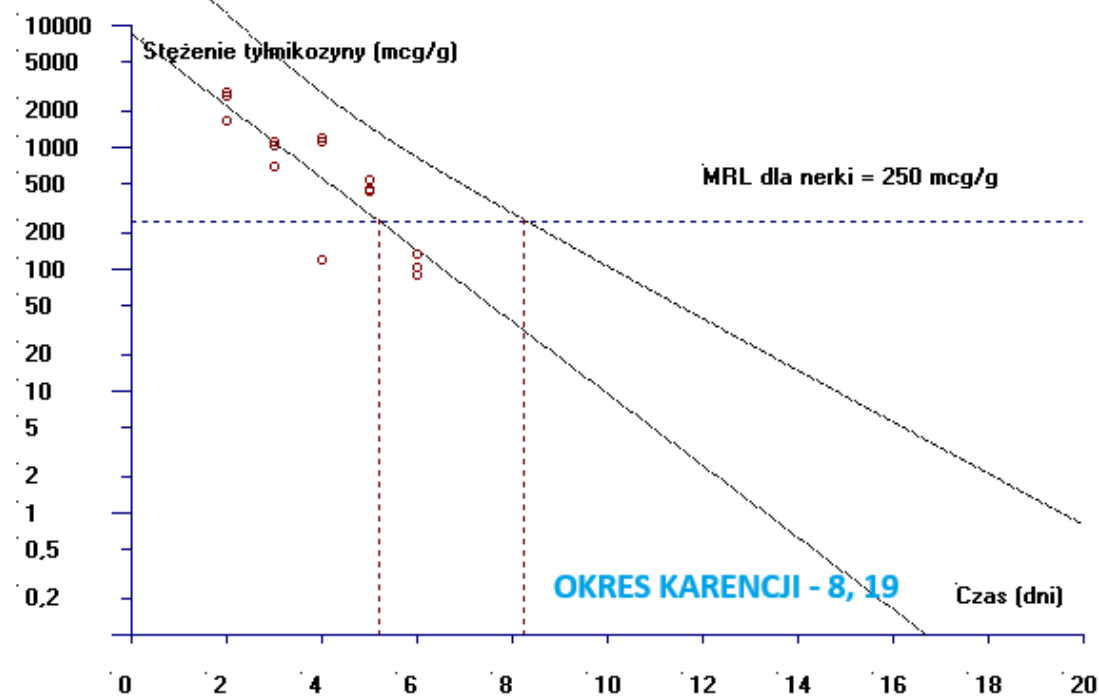
Wątroba wykazywała najwyższy poziom pozostałości leku, znacznie przekraczający LLOQ w 120. godzinie (0,35 μg/g), z wartością AUC(0-t) osocze/tkanka wynoszącą 320,16, w porównaniu do 144,72 w nerkach i 44,20 w mięśniach. Obliczone okresy karencji wyniosły odpowiednio: 6 dni dla wątroby (Ryc. 10), 7,5 dnia dla mięśni (Ryc.11) i 8 dni dla nerek (Ryc.12).



**Ryc.10. Obliczony okres karencji dla TLM w wątrobie gęsi po wielokrotnym doustnym podaniu (w dawce 25 mg/kg) przez pięć kolejnych dni. (Źródło: Autor)**



Ryc. 11. Obliczony okres karencji dla TLM w mięśniach gęsi po wielokrotnym doustnym podaniu (w dawce 25 mg/kg) przez pięć kolejnych dni. (Źródło: Autor)



Ryc. 12. Obliczony okres karencji dla TLM w nerkach gęsi po wielokrotnym doustnym podaniu (w dawce 25 mg/kg) przez pięć kolejnych dni. (Źródło: Autor)

### **III.3. Dyskusja**

#### **III.3.1. Analiza profilu farmakokinetycznego**

Zgodnie z aktualnym stanem wiedzy, jest to pierwsze badanie dotyczące farmakokinetyki i pozostałości TLM przeprowadzone na gęsiach.

Biodostępność leku różniła się znacząco w zależności od pozanaczyniowej drogi podania: wartość F po podaniu SC wyniosła 87%, natomiast po podaniu PO jedynie 4%. Zjawisku temu towarzyszyła wysoka zmienność międzyosobnicza, sugerująca ryzyko niewystarczającego stężenia ogólnoustrojowego u znacznej części populacji (Toutain i Bousquet-Mélou, 2004c). Ograniczone wchłanianie doustne może wynikać zarówno z cech fizjologicznych przewodu pokarmowego gęsi, jak i ich specyficznego metabolizmu lipidów, zdolności do akumulacji tłuszczu, tempa opróżniania żołądka oraz składu i aktywności mikrobioty jelitowej, co może wpływać na rozpuszczalność, stabilność i transport TLM w obrębie przewodu pokarmowego (Fadel i wsp., 2022; Tikhomirov i wsp., 2020). Wcześniej uważano, że makrolidy cechują się wysoką biodostępnością PO (Clark i wsp., 2008; Papich i Riviere, 2001), jednak nowsze badania wykazały niską lub umiarkowaną F np.: 26% dla winianu tylosyny (Ji i wsp., 2014) oraz 54% dla winianu tylwalozyny (Elbadawy i wsp., 2019) u drobiu. Wyniki niniejszego badania są z nimi sprzeczne. Jest to szczególnie warte uwagi, ponieważ do tej pory nie oceniano biodostępności PO TLM u żadnego gatunku zwierząt. Ze względu na różnice fizjologiczne pomiędzy gęśmi, a innymi ptakami, nie można też jednoznacznie przewidzieć zachowania TLM u innych gatunków. Gęsi charakteryzują się unikalnym metabolizmem lipidów i zdolnością do akumulacji tłuszczu (ważną przed migracją), co może wpływać na PK leków lipofilnych, takich jak TLM (Eichhorn i wsp., 2019; Lu i wsp., 2015; Ouyang i wsp., 2022). Dodatkowo, ich lepsze wykorzystanie włókna pokarmowego oraz wpływ wodnej diety na mikrobiom jelitowy mogą wpływać na genom gospodarza i zmieniać F leku (Gao i wsp., 2016; Ouyang i wsp., 2022).

Wcześniejsze doniesienia wskazywały na umiarkowane do szybkiego wchłanianie TLM po podaniu PO lub SC (Avci i Elmas, 2014; Dimitrova i wsp., 2012; Elkomy i wsp., 2016, 2018). U brojlerów  $T_{max}$  po podaniu PO wynosił 3–4 godziny (Abu-Basha i wsp., 2007; Dimitrova i wsp., 2012). Chociaż w niniejszym badaniu po podaniu SC  $T_{max}$  wynosił 0,5 godziny, to wartości MAT przekraczały  $t_{1/2}$ , co wskazuje na występowanie zjawiska *flip-flop*. Zjawisko to obserwowano również u koni (Clark i wsp., 2008). Było to szczególnie widoczne po podaniu SC, gdzie  $t_{1/2}$  (3,62 godz.) znacząco różnił się od

podania IV (1,86 godz.). Na takie opóźnione wchłanianie po podaniu SC mogą mieć wpływ gatunkowo specyficzne różnice w perfuzji tkanki, przepływie krwi lub cechy samego miejsca iniekcji (Yáñez i wsp., 2011). Warto zauważyć, że w literaturze wskazywano na możliwość długotrwałego utrzymywania się pozostałości TLM w miejscu iniekcji z powodu wysokiego stężenia oraz towarzyszących zmian zapalnych (Clark i wsp., 2008; Van Donkersgoed i wsp., 2000). Biorąc pod uwagę pKa TLM (ok. 8), lek występuje zarówno w postaci zjonizowanej, jak i niezjonizowanej (Stuart i wsp., 2007). Jeśli pH tkanki będzie niższe, może to sprzyjać jonizacji i spowolnieniu wchłaniania po podaniu SC.

Wartość  $E_{\text{body}}$  była stosunkowo niska (0,03), co wskazuje na ograniczoną zdolność wątroby i nerek do eliminacji leku (Toutain i Bousquet-Mélou, 2004b). Wyniki te są zgodne z wcześniejszymi doniesieniami, w których wykazywano minimalny metabolizm TLM u różnych gatunków (u bydła, kurcząt, świń i królików (Montesissa i wsp., 2004) i dominację wydalania leku w postaci niezmienionej przez filtrację kłębuszkową (Short, 1994). U gęsi ze względu na niskie  $E_{\text{body}}$  może być podobnie, choć wymaga to dokładniejszego potwierdzenia.

Okres półtrwania TLM po podaniu PO był znacznie krótszy niż w innych badaniach u ptaków, 30 h (Keleş i wsp., 2001), gdzie u kurcząt wynosił: 25,98 h (Zhang i wsp., 2020), 45 h (Abu-Basha i wsp., 2007), 21,86 h (Attia i wsp., 2018) i 32 h (Dimitrova i wsp., 2012), a także u świń: 12,93 h (Xiong i wsp., 2019). Również  $t_{1/2}$  po podaniu SC u gęsi był krótszy niż u owiec: 12 h (Naccari i wsp., 2001), 34,6 h (Modric i wsp., 1998) czy bydła 29,4 h (Modric i wsp., 1998). Może to wynikać z różnic w biotransformacji, skuteczności wydalania, sekwestracji w tkankach, wiązania z białkami osocza, stanu stresowego, unikalnego mechanizmu transportu leku itp. Brak danych po podaniu IV w poprzednich badaniach ogranicza możliwość porównania Cl i Vd. Jednocześnie, wyniki te podkreślają wagę uwzględnienia zmienności międzygatunkowej u ptaków i ostrożności przed ekstrapolacją danych na pozostałe gatunki ptaków ze względu na znaczną zmienność parametrów farmakokinetycznych. Ponadto, jak wyjaśniono w dalszej części, ocena i porównanie kinetyki w tkankach, zamiast koncentrowania się na parametrach osocza i  $t_{1/2}$ , zapewniłoby solidniejszą podstawę do zalecenia optymalnego schematu dawkowania i interwałów podawania.

TLM znana ze swojej wysokiej lipofilności, charakteryzuje się dużą Vd, co skutkuje znaczną akumulacją w tkankach (Giguère, 2013). Vd wynosząca 4,87 L/kg po podaniu IV jest zgodna z wcześniejszymi wynikami uzyskanymi u różnych gatunków, w tym krów,

owiec, kóz i świń (Modric i wsp., 1998; Ramadan, 1997; Shen i wsp., 2005; Ziv i wsp., 1995). Tak szeroka dystrybucja wiąże się z niskim stopniem wiązania TLM z białkami osocza (Ziv i wsp., 1995). Niedawne badania przeprowadzone u kurcząt (Zhang i wsp., 2023) wykazały, że przy stężeniu TLM w osoczu wynoszącym 2 µg/ml, jedynie 9,51% leku było związane z białkami osocza. Potwierdza to tendencję, zgodnie z którą niskie stężenia osoczowe korelują z wysokimi poziomami w tkankach (Abu-Basha i wsp., 2007; Clark i wsp., 2008; Giguère, 2013). W efekcie tak rozległa dystrybucja TLM w tkankach prowadzi do słabej korelacji między stężeniami w osoczu, a efektem klinicznym, co podkreśla konieczność oceny pozostałości w tkankach podczas terapii (Carbon, 1998; Elkomy i wsp., 2018; Gourlay i wsp., 1989; Xiong i wsp., 2019; Ziv i wsp., 1995).

Uzyskane w niniejszym doświadczeniu wyniki są zgodne z wcześniejszymi obserwacjami (Attia i wsp., 2018; Clark i wsp., 2008; Fricke i wsp., 2008; Keleş i wsp., 2001; Zhang i wsp., 2004, 2020), wykazując najwyższe stężenia TLM w wątrobie, następnie w nerkach i mięśniach. Taki wzorzec dystrybucji może wynikać z przepływu krwi przez poszczególne narządy oraz powinowactwa tkankowego (Yan i wsp., 2023).

Jak już wspomniano, stężenie TLM w osoczu nie jest wystarczającym wskaźnikiem ogólnego poziomu leku w organizmie ani jego aktywności terapeutycznej, co jeszcze raz podkreśla znaczenie oceny stężeń w tkankach (Gourlay i wsp., 1989; Zhang i wsp., 2017). W badaniu Ziv i wsp. (1995) stężenia terapeutyczne TMC utrzymywały się w mleku krów przez 8–9 dni, pomimo  $t_{1/2}$  w osoczu wynoszącego 4,18 godziny, po podaniu SC w dawce 10 mg/kg. Dostępna literatura konsekwentnie podkreśla znaczenie wskaźników PK/PD, takich jak AUC/MIC i  $C_{max}/MIC$ , jako kluczowych parametrów do przewidywania skuteczności przeciwdrobnoustrojowej TLM (Chen i wsp., 2023; Huang i wsp., 2019b). W niedawnym badaniu Huang i wsp. (2020) oszacowano, że wartości  $AUC_{(0-96\text{ h})}/MIC$  i  $C_{max}/MIC$ , wymagane do uzyskania redukcji o 3 log<sub>10</sub> (CFU/mL) wobec szczepów *Mycoplasma*, wynosiły odpowiednio 96,72 godziny i 1,91

Chociaż większość badań PK/PD tradycyjnie skupia się na stężeniach leku w osoczu, surowicy i innych płynach ustrojowych, rośnie świadomość znaczenia uwzględniania stężeń w tkankach, szczególnie w kontekście antybiotyków i zakażeń bakteryjnych (Barbour i wsp., 2010; Rodríguez-Gascón i wsp., 2021). Kluczowe znaczenie ma ocena stężenia wolnej frakcji leku w miejscu działania, co pozwala lepiej przewidywać efekty kliniczne i optymalizować schematy dawkowania (Zhang i wsp., 2022). Biorąc pod uwagę zakres MIC dla *Mycoplasma gallisepticum* wynoszące od 0,0156 do 0,038 µg/ml (Zhang i wsp., 2017, 2023), dane farmakokinetyczne z tkanek znacznie przekraczały progi

wyznaczone przez wspomniane wskaźniki PK/PD ( $AUC_{(0-96\text{ h})}/MIC > 774\text{ godz.}$ ;  $C_{\max}/MIC > 12$ ). Wstępna zatem analiza wskazuje na osiągnięcie skutecznych stężeń terapeutycznych w tkankach przy zastosowanych w niniejszym badaniu schematach dawkowania (PO i SC), nawet przy konserwatywnych założeniach minimalnych stężeń w tkance płucnej (Zhang i wsp., 2023). Jednocześnie, dalsze badania farmakokinetyki i farmakodynamiki *in vivo* oraz wiązania z białkami tkankowymi są kluczowe dla zrozumienia złożonej zależności między ekspozycją na lek, a aktywnością przeciwdrobnoustrojową.

Należy także podkreślić, że przy zastosowanych dawkach, opartych na wcześniejszych obserwacjach u innych gatunków zwierząt (Modric i wsp., 1998; Naccari i wsp., 2001; Ziv i wsp., 1995), przez cały okres doświadczenia gęsi nie wykazywały żadnych zauważalnych działań niepożądanych, ani natychmiastowych, ani opóźnionych (do 7 dni), zarówno miejscowych, jak i ogólnoustrojowych, co potwierdza to korzystny profil bezpieczeństwa TLM (z wyłączeniem drogi IV) u gęsi i przemawia za jej praktyczną przydatnością i niezawodnością w medycynie weterynaryjnej.

### III.3.2. Okres karencji

Ryc. 9. ilustruje długotrwałe utrzymywanie się TLM w tkankach, gdzie pozostaje ona wykrywalna aż do 120 godzin po podaniu przez 5 kolejnych dni. Jak wcześniej wspomniano, pozorny paradoks między krótkim  $t_{1/2}$  TLM, a jej długim czasem rezydencji w tkankach można tłumaczyć wiązaniem z tkankami, sekwestracją i powolnym uwalnianiem leku. Warto zwrócić uwagę, że stosunek  $AUC_{(0-\infty)}$  tkanka/osocze był znacznie podwyższony i wynosił odpowiednio 320,16 dla wątroby, 144,72 dla nerek i 44,20 dla mięśni. Potwierdza to głęboką penetrację tkankową, zgodną z wcześniejszymi doniesieniami (Elkomy i wsp., 2018; Fricke i wsp., 2008; Keleş i wsp., 2001). W badaniu Modric i in. (1998) TLM osiągała stosunek stężenia płuca/surowica na poziomie od 86 do 178, w zależności od obecności infekcji. Ponadto, znacząca penetracja wewnątrzkomórkowa TLM (cecha wspólna dla antybiotyków makrolidowych, kluczowa dla ich skuteczności wobec patogenów wewnątrzkomórkowych) przyczynia się do przedłużonego czasu utrzymywania się leku w tkankach, pomimo szybkiej eliminacji z osocza (Meyer i wsp., 1993). Badania z użyciem TLM znakowanej radioizotopem, gdzie oznaczano lek 4 godziny po podaniu w heterofilach, makrofagach i monocytach kurzych, wykazały stosunki stężenia wewnątrzkomórkowego do zewnątrzkomórkowego odpowiednio 138,32 i 66 (Scorneaux i Shryock, 1998). Dodatkowo, współczynnik

akumulacji osoczowej wynoszący 1,06 wskazuje, że TLM nie kumuluje się w osoczu po wielokrotnym podaniu, lecz preferencyjnie dystrybuuje się do określonych narządów docelowych.

Obliczone okresy karencji wyniosły odpowiednio: 6 dni dla wątroby, 7,5 dnia dla mięśni i 8 dni dla nerek. Po pięciodniowym podawaniu TLM w wodzie do picia, wcześniejsze badania sugerowały okres karencji wynoszący 10 dni zarówno dla kurecząt otrzymujących 75 mg/L (Zhang i wsp., 2004), jak i dla drobiu przy dawce 50 mg/L (Keleş i wsp., 2001). Zaobserwowane różnice w okresach karencji wynikają m.in. z międzygatunkowych różnic w PK oraz z odmiennych metodologii badań, w tym różnych schematów dawkowania i dróg podania. Warto również zaznaczyć, że okresy karencji TLM u gęsi mogą się znacznie różnić w zależności od drogi podania (PO vs SC), nawet przy tej samej dawce, ze względu na różnice w F.

#### IV. PROFIL FARMAKOKINETYCZNY ORAZ ZANIKANIE POZOSTAŁOŚCI KOLISTYNY PO JEDNORAZOWYM PODANIU DOŻYLNYM I DOUSTNYM ORAZ WIELOKROTNYM DOUSTNYM U GĘSI DOMOWEJ

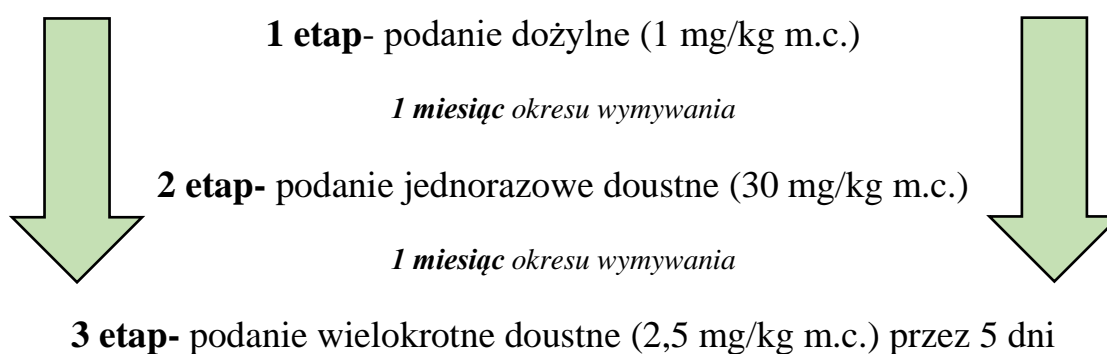
##### IV. 1. Materiały i metody

###### IV.1. 1. Zwierzęta

Badanie przeprowadzono na 16 zdrowych, dorosłych (w wieku 2 lat), o masie ciała od 4,1 do 5,6 kg samcach gęsi rasy Biłgorajskiej. Przed rozpoczęciem badania stan zdrowia gęsi został dokładnie oceniony przez lekarzy weterynarii nadzorujących badanie na podstawie badania klinicznego, analiz biochemicznych osocza oraz badań hematologicznych. Wybrane od doświadczenia zwierzęta nie otrzymywały wcześniej żadnych antybiotyków ani innych leków. Następnie ptaki poddano tygodniowemu okresowi aklimatyzacji, w czasie którego codziennie monitorowano ich zachowanie, apetyt i przyzwyczajano do obecności, zapachu oraz dotyku osób, które będą przeprowadzać doświadczenie. Następnie ptaki zważono i oznakowano indywidualnie pierścieniem na lewej nodze.

Gęsi były utrzymywane zgodnie z wymaganiami Ministra Rolnictwa i Rozwoju Wsi z dnia 19 września 2019 r (Dz.U. 2019 poz. 1966) a eksperyment przeprowadzono zgodnie z prawem europejskim (2010/63/UE) i w oparciu o zgody (nr 59/2022; 76/2023) wydane przez Lokalną Komisję Etyczną do Spraw Doświadczeń na Zwierzętach z siedzibą w Lublinie.

Projekt badania obejmował szereg 3 badań naprzemiennych (*cross-over study/trial*). Poszczególne fazy były oddzielone jednomiesięcznym okresem wymywania leku (Ryc. 13).



Ryc. 13. Schemat podawania KOL. (Źródło: Autor)

W pierwszym etapie badania gęsiom podano jednorazowo IV dawkę 1 mg/kg KOL (Colistin TZF 1000 000 IU, Tarchomińskie Zakłady Farmaceutyczne „Polfa” SA), wstrzykiwaną do żyły skrzydłowej lewej. W etapie drugim zastosowano jednorazowo dawkę PO KOL (30 mg/kg; Colimed, Biofaktor, Polska, 1200 000 IU/g), podawaną za pomocą wlewu do wola. Po każdej aplikacji kaniulę przepłukiwano 5 ml wody w celu zapewnienia pełnego podania dawki. Etap trzeci obejmował wielokrotne podawanie PO roztworu KOL (2,5 mg/kg; Colimed, Biofaktor, Polska, 1200 000 IU/g) za pomocą wlewu do wola. Tu również po każdej aplikacji kaniulę przepłukiwano 5 ml wody w celu zapewnienia pełnego podania dawki. W tym etapie gęsi otrzymywały lek PO raz dziennie przez pięć kolejnych dni o godzinie 8:00

Wielokrotna dawka PO została oparta na zaleceniach dotyczących stosowania KOL u drobiu (FAO, 2006; Mead i wsp., 2021). W przypadku podania IV celowo zastosowano niższą dawkę, aby ograniczyć ryzyko wystąpienia działań niepożądanych. Z kolei do jednorazowego podania PO wybrano dawkę wyższą, przewidując możliwość uzyskania bardzo niskich stężeń ogólnoustrojowych, zjawiska wcześniej obserwowanego przy niższych dawkach u ptaków (FAO, 2006).

Próbki krwi (ok. 1 ml) pobierano z żyły skrzydłowej prawej w określonych przedziałach czasowych we wszystkich trzech etapach: 0, 0.085 (wyłącznie dla podania IV), 0.25, 0.5, 0.75, 1, 1.5, 2, 4, 6, 8, 10, 24 oraz 48 godzin po podaniu leku. W przypadku wielokrotnego podania PO próbki pobierano także co 24h, tuż przed podaniem kolejnej dawki dziennej oraz w piątym dniu eksperymentu, zgodnie z tym samym harmonogramem oraz dodatkową próbką po 36h. Krew pobierano do probówek zawierających heparynę, następnie odwirowywano (1500×g), po czym osocze oddzielano i przechowywano w temperaturze  $-20^{\circ}\text{C}$

Po zakończeniu etapu z wielokrotnym podaniem PO KOL (dzień 5), gęsi (po cztery osobniki w grupie) poddano ubojowi w następujących punktach czasowych: 6, 10, 24 oraz 36 godzin po ostatnim podaniu leku. Do dalszych analiz pozyskano próbki tkanek (ok. 20 g każda): mięśnie, wątrobę, nerki, serce oraz płuca, które następnie zamrożono i przechowywano w temperaturze  $-20^{\circ}\text{C}$

Analizy chromatograficzne przeprowadzono w ciągu 40 dni od momentu pobrania próbek, po zakończeniu każdej fazy badania.

#### IV.1.2. Oznaczanie kolistyny w osoczu oraz tkankach

Metoda oznaczania KOL w osoczu gęsi została w pełni opracowana i zwalidowana przez autora. Do ekstrakcji KOL z próbek osocza, objętość 200  $\mu$ l osocza umieszczono w polipropylenowych probówkach Eppendorfa, dodano 50  $\mu$ l roboczego roztworu IS (Polimyksyna B; 2  $\mu$ g/mL) i krótko wymieszano (vortex). Ekstrakcję przeprowadzono przy użyciu 800  $\mu$ l acetonitrylu (ACN) zawierającego 0,1% kwas mrówkowy (HCOOH) i 0,2% kwas trifluorooctowy (TFA). Próbki mieszano przez 10 min i odwirowano przy 15 000  $\times$ g przez 10 min. Następnie 1 ml supernatantu przeniesiono do szklanej próbki i odparowano do sucha przy użyciu strumienia azotu w temperaturze 45 °C. Suchą pozostałość zrekonstruowano w 0,2 ml 1% HCOOH w wodzie - 1% HCOOH w ACN (95/5; v/v) i przeniesiono do probówek Eppendorfa z filtrem oraz odwirowano przy 15 000 $\times$ g przez 5 min. Następnie supernatant przeniesiono do fiołki HPLC ze szklanym wkładem i analizowano przy użyciu ultrasprawniej chromatografii cieczowej połączonej z tandemową spektrometrią mas (UHPLC-MS/MS).

W przypadku próbek tkanek metoda oznaczania została oparta na wcześniejszych badaniach (Boison i wsp., 2015; Kumar i wsp., 2021) ale poddana walidacji pod kątem tkanek pozyskanych od gęsi zgodnie z obowiązującymi wytycznymi. Zhomogenizowaną porcję 1 g na każdą badaną tkankę umieszczono w polipropylenowej próbce wirówkowej, dodano 100  $\mu$ l roztworu roboczego IS (2  $\mu$ g/ml) i krótko wirowano. Ekstrakcję przeprowadzono przy użyciu 7 ml ACN zawierającego 0,1% HCOOH i 0,2% TFA. Próbki mieszano przez 10 min i wirowano przy 4500 obr./min przez 10 min. Następnie 6 ml supernatantu przeniesiono do szklanej próbki i odparowano do sucha za pomocą strumienia azotu w temperaturze 45 °C. Suchą pozostałość rozpuszczono w 0,5 ml roztworu 1% HCOOH w wodzie - 1% HCOOH w ACN (95/5; v/v), przefiltrowano przez filtry PVDF o średnicy porów 0,22  $\mu$ m, przeniesiono do próbki HPLC ze szklaną wkładką i analizowano za pomocą UHPLC-MS/MS.

Rozdział LC przeprowadzono na systemie Shimadzu Nexera X2 UHPLC (Shimadzu, Japonia), wykorzystując kolumnę Luna Omega Polar C18 (100 $\times$ 2,1 mm  $\times$  1,6 $\mu$ m) połączoną z uchwytem Security Guard ULTRA i wkładem do kolumn UHPLC C 18 (Phenomenex, USA). Faza ruchoma składała się z: (A): 1% kwasu mrówkowego w wodzie i (B): 1% kwasu mrówkowego w ACN. Program elucji gradientowej ustawiono następująco: zaczynając od 5% rozpuszczalnika B przy 0,00 min, zwiększając do 30% rozpuszczalnika B od 0,01 do 3,0 min, dalej zwiększając do 95% rozpuszczalnika B od 3,01 do 4,50 min, a następnie zmniejszając z powrotem do 5% rozpuszczalnika B od 4,51

do 6,0 min. Temperaturę pieca kolumny utrzymywano na 45°C przy szybkości przepływu 0,4 ml/min, gdzie objętość iniekcji wynosiła 10 $\mu$ l

#### IV.1.3. Walidacja metody analitycznej

Metoda UHPLC-MS/MS jak wcześniej wspomniano została walidowana zarówno dla osocza jak i dla każdego rodzaju badanej tkanki gęsi pod kątem liniowości, precyzji (powtarzalność i odtwarzalność wewnątrzlaboratoryjna), odzysku, LOD i LOQ (Wenzl i wsp., 2016).

Liniowość oceniano przy użyciu czystych próbek osocza lub tkanek, aby przygotować dwie krzywe kalibracji obejmujące stężenia od 5 do 10 000 ng/ml dla osocza i od 5 do 200 ng/g dla tkanek. Powtarzalność oceniano, analizując próbki (n = 6) wzbogacone o trzy poziomy (50, 5000, i 10 000 ng/ml dla osocza; 5, 50 i 200 ng/g dla tkanek) tego samego dnia, przy użyciu tego samego urządzenia i operatora. Powtarzalność wewnątrzlaboratoryjna została określona poprzez analizę dwóch dodatkowych zestawów wzbogaconych próbek, podobnych do tych używanych do powtarzalności, przez trzy różne dni z różnymi operatorami. Precyzję wyrażono jako współczynnik zmienności (CV, %) obliczony na podstawie tych pomiarów. Stężenia obliczono w odniesieniu do wewnętrznych standardów przy użyciu krzywych kalibracji dopasowanych do matrycy. Odzysk (%) oceniono poprzez porównanie średniego zmierzonego stężenia ze stężeniem wzbogaconym próbek w tym samym eksperymencie. LOD zdefiniowano jako stężenie leku dające stosunek sygnału do szumu wynoszący 3, a LOQ określono jako najniższy punkt stężenia na krzywej kalibracji matrycy, zgodnie z dokumentem wytycznych dotyczącym szacowania LOQ i LOD dla pomiarów w dziedzinie zanieczyszczeń w paszy i żywności (Wenzl i wsp., 2016).

#### IV.1.4. Analiza statystyczna oraz farmakokinetyczna

Analizę PK przeprowadzono za pomocą oprogramowania PKanalix™ (R1, 2023), wykorzystując podejście niekompartmentowe. Krzywe stężeń w czasie posłużyły do bezpośredniego określenia  $C_{max}$  w osoczu oraz odpowiadającego mu  $T_{max}$ .  $T_{1/2}$  obliczono na podstawie analizy krzywej stężeń w czasie przy użyciu regresji najmniejszych kwadratów. AUC obliczono metodą trapezów logarytmiczno-liniowych w przypadku podania IV oraz metodą *linear-up log-down* w przypadku podania doustnego (PO). Z wyjątkiem  $T_{max}$  (prezentowanego jako zmienna kategoryczna w formie mediany i zakresu) oraz  $t_{1/2_{el}}$  (wyrażonego jako średnia harmoniczna), pozostałe parametry PK dla

KOL przedstawiono jako średnie geometryczne wraz z odpowiednimi zakresami (Julious i Debarnot, 2000).

Wskaźnik kumulacji obliczono jako stosunek  $AUC(0-\infty)_D$  po ostatniej dawce w schemacie wielokrotnego dawkowania, do  $AUC(0-\infty)_D$  po pojedynczej dawce (Toutain i Bousquet-Mélou, 2004a), gdzie wartość zbliżona do 1 wskazuje na minimalną kumulację.

Biodostępność PO została obliczona zgodnie z następującym równaniem:

$$F\% = 100 \times \frac{AUC(PO) \times Dawka(IV)}{AUC(IV) \times Dawka(PO)}$$

Średni czas wchłaniania (MAT) obliczono jako różnicę:

$$MAT(PO) = MRT(PO) - MRT(IV)$$

Wskaźnik ekstrakcji ogólnoustrojowej ( $E_{body}$ ) dla KOL po podaniu IV obliczono na podstawie stosunku klirensu (Cl) do rzutu serca (CO), zgodnie z wcześniej wspomnianym równaniem allometrycznym dla ptaków (Waxman i wsp., 2019).

Analizę statystyczną zmiennych PK pomiędzy grupami wykonano za pomocą analizy wariancji z powtarzonymi pomiarami (ANOVA), po której zastosowano test wielokrotnych porównań Bonferroniego jako analizę post-hoc dla oceny istotnych różnic. Normalność rozkładu danych oceniano przy użyciu testu Shapiro-Wilka. Ponieważ dane nie miały rozkładu normalnego, zamiast odchylenia standardowego przedstawiono wartości minimalne i maksymalne. Za istotne statystycznie uznawano wartości  $p < 0,05$ . Analizy wykonano w programie GraphPad InStat (wersja 5.3, GraphPad Software).

#### IV.1.5. Analiza pozostałości i oszacowanie okresu karencji

Ze względu na ograniczoną liczbę punktów czasowych dostępnych na krzywej eliminacji, nie było wykonalne użycie podejścia *naïve pooled-data* z zastosowaniem analizy niekompartmentowej do obliczenia parametrów PK dla KOL w badanych tkankach. Ponadto niemożliwe było określenie okresu karencji przy użyciu oprogramowania EMA (program WT.1.4). Dlatego też, niniejsza analiza skupiła się na porównaniu stężeń w tkankach wyłącznie z MRL ustalonymi przez Komisję Europejską dla zwierząt służących do produkcji żywności tj.: 150 ng/g dla mięśni i wątroby oraz 200 ng/g dla nerek (Rozp. WE, 2010).

## ***IV.2. Wyniki***

### **IV.2.1. Walidacja metody**

Jak wcześniej wspomniano metodę UHPLC-MS/MS zwalidowano dla osocza i każdej badanej tkanki pozyskanej od gęsi pod względem liniowości, precyzji i odzysku. Tabela 5. przedstawia wyniki walidacji metody analitycznej, szczegółowo opisując parametry oceniane w osoczu i wszystkich analizowanych tkankach.

Parametr	Jednostka	Matryca					
		Osocze	Mięśnie	Nerki	Wątroba	Pluca	Serce
Równanie		$y = 1,049x - 74,24$	$y = 0,0942x + 3,106$	$y = 0,995x + 0,2723$	$y = 1,039x - 1,243$	$y = 1,049x - 1,590$	$y = 1,156x - 2,434$
R <sup>2</sup>		0,992	0,994	0,995	0,993	0,992	0,993
Powtarzalność (repeatability) CV	%	8,5	9,4	6,9	6,7	9,0	6,8
Odtwarzalność wewnątrzlaboratoryjna (within-lab reproducibility) CV	%	8,3	7,4	6,2	6,3	6,9	6,3
Odzysk	%	93,9	105	96,1	101	96,9	94,8
LOD	ng/mL; ng/g	2	2	2	2	2	2
LOQ	ng/mL; ng/g	5	5	5	5	5	5

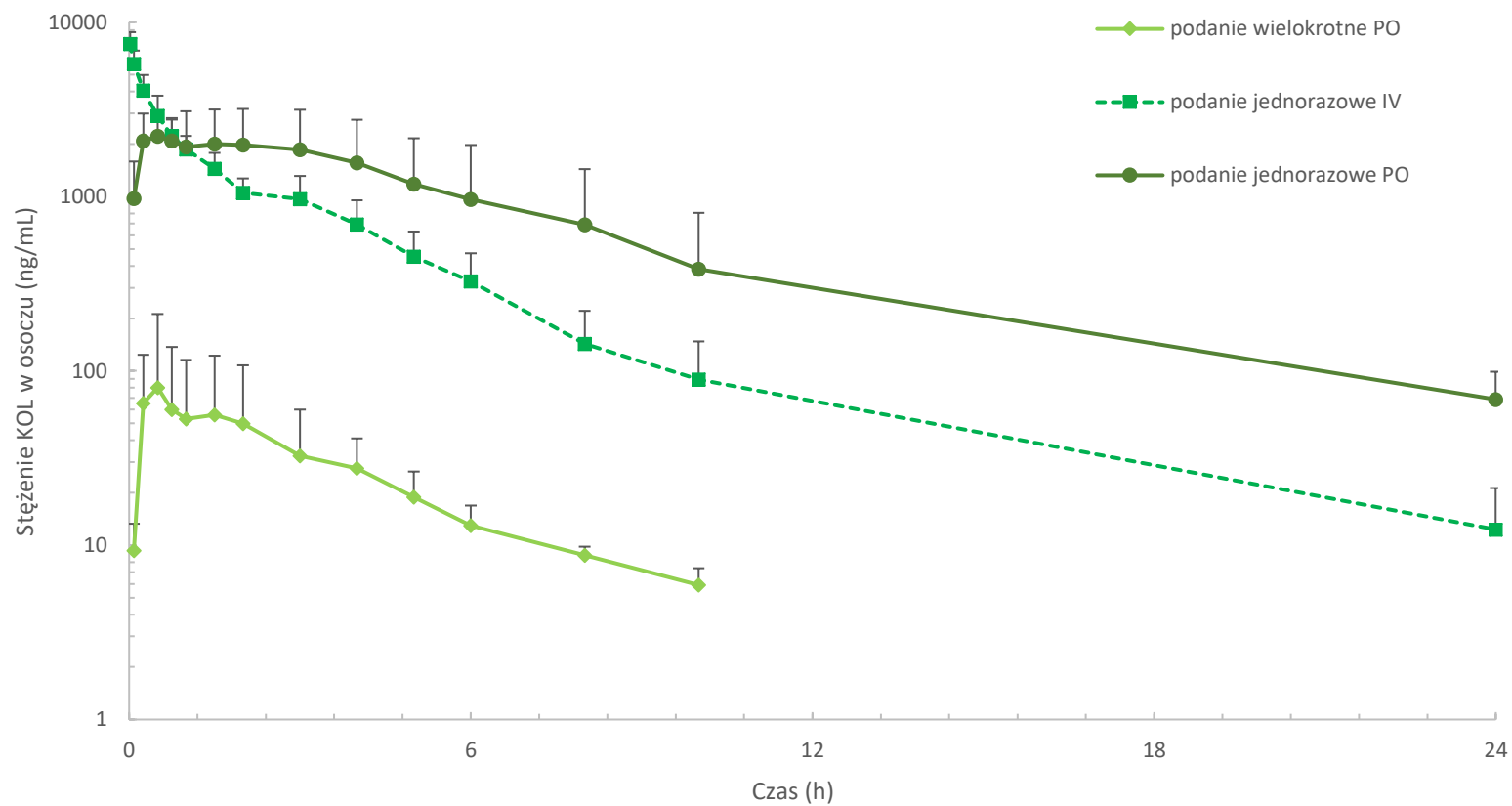
Tab. 5. Wyniki walidacji metody UHPLC-MS/MS do ilościowego oznaczania KOL w osoczu i tkankach u gęsi. (Źródło: Autor)

Metoda wykazała zadowalające wskaźniki odzysku i dobrą liniowość we wszystkich badanych matrycach, wraz z niskimi wartościami LOD i LOQ.

#### **IV.2.2. Profil farmakokinetyczny**

Stężenia leku w osoczu były oznaczalne ilościowo do 24 godzin dla jednorazowej drogi podania PO (n=2) i IV (n=4) oraz do 10 godzin (n=6) od ostatniej dawki podanej w przypadku drogi wielokrotnej PO.

Na Ryc. 14. przedstawiono półlogarytmiczny wykres średnich ( $\pm$ SD) stężeń KOL w osoczu do czasu po podaniu jednorazowym IV i PO oraz wielokrotnym PO.



**Ryc. 14. Póllogarytmiczne krzywe średniego stężenia KOL w osoczu w funkcji czasu po jednorazowym podaniu dożylnym (1 mg/kg) i doustnym (30 mg/kg) oraz wielokrotnym (2,5 mg/kg) doustnym u gęsi (n = 16). (Źródło: Autor)**

W Tabeli 6. przedstawiono średnie wartości wybranych parametrów PK dla KOL na podstawie analizy niekompartmentowej.

Parametr	Jednostka	Podanie IV			Podanie jednorazowe PO			Podanie wielokrotne PO		
		Średnia geo	max	min	Średnia geo	max	min	Średnia geo	max	min
$AUC_{(0-\infty) D}$	$h \cdot ng \cdot mL^{-1}$	8774,05	11414,91	6496,81	274,70 <sup>a</sup>	839,23	132,4	132,94 <sup>a</sup>	380,50	65,915
$\lambda z$	$h^{-1}$	0,30	0,49	0,15	0,26	0,35	0,20	0,26	0,54	0,12
$t_{1/2}^{\circ}$	h	2,18	4,70	1,49	2,59	3,49	1,96	2,88	5,40	1,47
Cl	$mL \cdot h^{-1} \cdot g^{-1}$	0,11	0,12	0,09	–	–	–	–	–	–
Vd	$mL \cdot g^{-1}$	0,41	0,84	0,20	–	–	–	–	–	–
$MRT_{(0-\infty)}$	h	2,66	4,89	1,72	4,18	6,49	3,26	4,56	8,14	2,73
$C_{max D}$	$ng \cdot mL^{-1}$	–	–	–	84,63	188,33	39,00	30,73 <sup>b</sup>	209,5	6,65
$T_{max}^{\S}$	h	–	–	–	0,50	3,00	0,50	0,50	3,00	0,25
F	%	–	–	–	5,00	12,00	1,00	1,50	5,00	0,50
MAT	h	–	–	–	1,52	4,80	1,10	1,88	6,19	0,51

Gdzie:  $AUC_{(0-\infty) D}$ , pole pod krzywą od 0 godz. do nieskończoności znormalizowane do 1 mg/kg podanej dawki;  $\lambda z$ , stała szybkości w fazie końcowej;  $t_{1/2}$ , okres półtrwania w fazie końcowej; Cl, klirens osoczowy; Vd, objętość dystrybucji;  $MRT_{(0-\infty)}$ , średni czas przebywania od 0 godz. do nieskończoności;  $C_{max D}$ , szczytowe stężenie w osoczu znormalizowane do 1 mg/kg;  $T_{max}$ , czas osiągnięcia szczytowego stężenia; F, biodostępność; MAT, średni czas wchłaniania; a, statystycznie różni się od IV; b, statystycznie różni się od podania ednorazowego PO; §, wartość mediany; °, średnia harmoniczna.

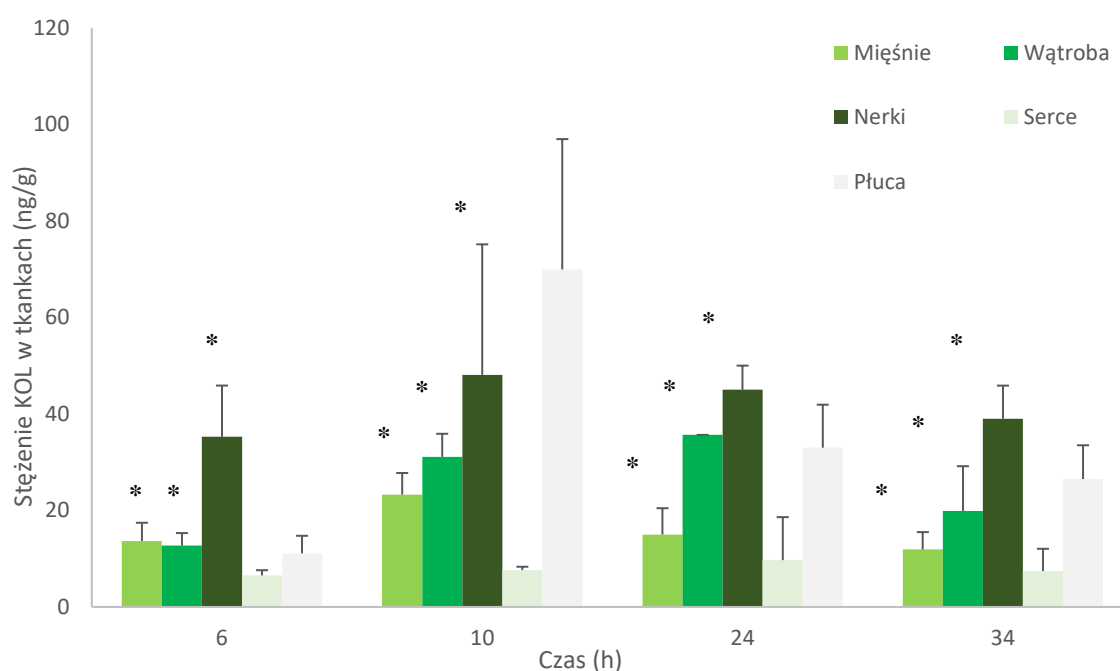
**Tab. 6. Parametry PK dla KOL u gęsi po jednorazowym podaniu dożylnym (1 mg/kg) i doustnym (30 mg/kg) oraz podaniu wielokrotnym doustnym (2,5 mg/kg przez 5 dni). (Źródło: Autor)**

Wartości  $AUC_{rest}$  dla każdego osobnika były mniejsze niż 20%  $AUC(0-\infty)$ , a współczynnik determinacji ( $R^2$ ) dla linii regresji fazy końcowej przekroczył 95%. Próbkę poniżej LOQ zostały wyłączone z analizy PK.

Po podaniu IV obserwowano stosunkowo krótki  $t_{1/2}$  w fazie eliminacji, powolny Cl oraz małą  $V_d$ .  $E_{body}$  wynosił 0,2%. Całkowita F po podaniu PO była bardzo niska i mieściła się w zakresie od 0,5% do 12%. Po wielokrotnym podawaniu PO nie stwierdzono kumulacji KOL w osoczu do piątego dnia leczenia (współczynnik kumulacji  $<1$ ). Początkowo, w ciągu pierwszych 24 godzin po rozpoczęciu podawania wielokrotnego PO stężenia KOL w osoczu były niewykrywalne u większości gęsi. Jednak od piątego dnia po zakończeniu leczenia stężenia były wykrywalne u większości osobników ( $n=12$ ), ze średnim poziomem 12 ng/ml

#### IV.2.3. Pozostałości w tkankach

Ryc. 15. przedstawia histogram średnich ( $\pm$ SD) stężeń KOL w czasie w wybranych tkankach, po piątym dniu podawania wielokrotnego PO, w odniesieniu do MRL ustalonego dla tkanek drobiu (z wyłączeniem płuc i serca).



\* Oznacza, że wszystkie stężenia są niższe od MRL ustalonego dla odpowiednich tkanek u zwierząt produkujących żywność.

**Ryc. 15. Histogram średnich ( $\pm$ SD) stężeń KOL w wybranych tkankach w czasie po pięciu dniach wielokrotnego podawania doustnego (2,5 mg/kg) u gęsi. (Źródło: Autor)**

KOL wykryto we wszystkich tkankach w każdym punkcie czasowym badania. W przypadku wątroby, mięśni i nerek stężenia KOL nie przekroczyły wartości MRL ustalonych dla tkanek drobiu (150 ng/g dla mięśni i wątroby, oraz 200 ng/g dla nerek), w żadnym z badanych punktów czasowych.

### ***IV.3. Dyskusja***

#### **IV.3.1. Analiza profilu farmakokinetycznego**

Stwierdzono, że biodostępność dla KOL u gęsi jest bardzo niska, wynosząc średnio od 1,5% do 5% i jest zgodna z 4% biodostępnością obserwowaną u kurcząt brojlerów (Soliman i wsp., 2016). Podobnie u ssaków, takich jak świnie, cielęta, krowy mleczne i ludzie, wchłanianie KOL z przewodu pokarmowego jest minimalne lub w ogóle nie występuje (Guyonnet i wsp., 2010; Grégoire i wsp., 2017; Kumar i wsp., 2020). U świń stwierdzono, że KOL ulega szybkiej degradacji w badaniu z symulowanym płynem żołądkowym z powodu rozszczepienia wiązań peptydowych w ognie tripeptydowym przez pepsynę, zachowując jednak aktywność przeciwdrobnoustrojową w przewodzie pokarmowym (Grégoire i wsp., 2017).

Pomimo niskiej  $F$  u drobiu, KOL jest celowo podawana w celu leczenia zakażeń jelitowych, ponieważ osiąga wysokie stężenia w miejscu zakażenia w przewodzie pokarmowym przy minimalnym ryzyku pozostałości w tkankach, co pozwala na krótki okres karencji lub nawet jego brak (Mead i wsp., 2021). Ta argumentacja może mieć zastosowanie również do gęsi, gdzie głównym zastosowaniem KOL jest miejscowe leczenie zakażeń przewodu pokarmowego, bez konieczności wchłaniania ogólnoustrojowego. Chociaż istnieją doniesienia o stosowaniu KOL również w przypadku wskazań ogólnoustrojowych, ogólnie nie jest ona zalecana w tym celu u drobiu (Lin i wsp., 2005; Apostolakos i Piccirillo, 2018). Osiągane poziomy we krwi i tkankach wydają się być niewystarczające do leczenia większości powszechnych zakażeń (Apostolakos i Piccirillo, 2018; Kumar i wsp., 2020). Ponadto, jak widać w Tabeli 6, biodostępność i ogólnoustrojowa ekspozycja  $AUC(0-\infty)$  KOL różniły się znacznie i mogą być minimalne u niektórych gęsi, co może osłabiać skuteczność leczenia na poziomie populacji/stada. Takiej zmienności należy się spodziewać przy podawaniu PO, a jej wpływ na wyniki leczenia jest szczególnie znaczący, gdy  $F\%$  jest niska (Toutain i Bousquet-Melou, 2004b). Inne leki, takie jak sulfonamidy, tetracykliny i penicyliny, są z pewnością bardziej odpowiednim wyborem (Löhren i wsp., 2008).

Cl KOL po podaniu IV był stosunkowo niski i wynosił  $0,11 \text{ ml}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ , co było porównywalne z wcześniej stwierdzonym u drobiu ( $0,13 \text{ ml}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ ; Lashev i Haritova, 2003). Takie podobne wskaźniki Cl sugerują, że mechanizmy metaboliczne i wydalnicze zaangażowane w eliminację KOL są prawdopodobnie podobne u tych gatunków ptaków (Fadel i wsp., 2023; Bourdo i wsp., 2024). E<sub>body</sub> u gęsi, stwierdzony jako niski (0,2%), wskazuje na minimalną zdolność oczyszczania narządów do eliminacji KOL. Pomimo tego, połączenie krótkiego t<sub>1/2</sub> i niskich stężeń w osoczu i tkankach zapewnia skuteczną eliminację leku, co potwierdza bezpieczeństwo stosowania KOL u gęsi bez obaw o akumulację leku, co zostanie wyjaśnione w dalszej części.

V<sub>d</sub> u gęsi była niska - do umiarkowanej i wynosiła  $0,41 \text{ ml}\cdot\text{g}^{-1}$ , co odpowiadało wartościom stwierdzonym wcześniej u kurcząt brojlerów ( $0,41 \text{ ml}\cdot\text{g}^{-1}$ ; Lashev i Haritova, 2003). U bydła wartości te były nieznacznie wyższe i wynosiły  $1,3 \text{ ml}\cdot\text{g}^{-1}$  (FAO, 2006), ale nadal wskazywały na pozakomórkową dystrybucję leku. Wiązanie z białkami osocza nie było oceniane w niniejszym badaniu, ale u innych gatunków różni się ono znacznie: 40% u bydła (FAO, 2006), 55% u szczurów (Li i wsp., 2003a), 70% u owiec (FAO, 2006) i 91% u myszy (Cheah i wsp., 2015). Co ciekawe, uważa się, że KOL wiąże się głównie z glikoproteiną alfa-1-kwasową, której poziom może znacznie wzrosnąć podczas zakażeń bakteryjnych, co może potencjalnie zmieniać kinetykę KOL w stanach chorobowych (Grégoire i wsp., 2017).

Jeśli chodzi o t<sub>1/2</sub> w fazie końcowej, wartości uzyskane u gęsi (2,5 h) były relatywnie niskie i zgodne z wartościami stwierdzonymi u kurcząt brojlerów (2,19 h; Lashev i Haritova, 2003) i kaczek (2,33 h; Zeng i wsp., 2010). Sugeruje to podobne zachowanie farmakokinetyczne u tych gatunków ptaków, pomimo ich różnic fizjologicznych. Podobieństwo to może być związane z porównywalnymi wskaźnikami metabolizmu, V<sub>d</sub>, rozmiarem i składem ciała, wiązaniem z białkami osocza i wydajnością Cl (Fadel i wsp., 2023).

Bardzo niski E<sub>body</sub> (0,2%) potwierdza ograniczoną zdolność narządową do eliminacji, a połączenie krótkiego t<sub>1/2</sub> i niskich stężeń ogólnoustrojowych wyklucza ryzyko kumulacji.

Ze względu na ograniczenia techniczne, zawartość KOL w jelitach nie została oceniona w niniejszym badaniu, co stanowi istotne ograniczenie. Ocena stężeń KOL w jelitach, wraz z jej PK, ma kluczowe znaczenie dla optymalizacji zastosowania

terapeutycznego oraz ograniczenia ryzyka rozwoju oporności na środki przeciwdrobnoustrojowe.

U drobiu  $t_{1/2}$  zanikania KOL z treści jelitowej wynosił 2,5 godziny po zaprzestaniu jej podawania w wodzie pitnej (75 000 IU/kg/dzień; Mead i wsp., 2021). Inne badania na kurczętach wykazały, że czas pasażu jelitowego KOL wahał się od 3,82 do 5,65 godziny (Rougière i Carré, 2010; Ravindran, 2013). Dalsze badania tych parametrów u gęsi są szczególnie istotne ze względu na potencjalne różnice w czasie pasażu jelitowego między gatunkami drobiu. Różnice w fizjologii przewodu pokarmowego mogą wpływać na eliminację KOL oraz na jej skuteczność terapeutyczną. Biorąc pod uwagę główną aktywność KOL w świetle jelita, opracowanie schematu dawkowania w oparciu o czas pasażu jelitowego i lokalną aktywność przeciwdrobnoustrojową, a nie wyłącznie o parametry PK w osoczu, może być podejściem bardziej praktycznym i skutecznym (Davis i wsp., 1986). Choć podobne wartości  $Cl$ ,  $V_d$  i  $t_{1/2}$  u gęsi i kurcząt sugerują możliwość stosowania podobnych schematów dawkowania, ich optymalizacja powinna być oparta na ocenie zawartości jelitowej i czasu pasażu. Co więcej, w niniejszym badaniu stosowano doustne podawanie leku przez sondę, a leczenie w gospodarstwie zwykle obejmuje podawanie kolistyny w wodzie pitnej, co będzie prawdopodobnie skutkować jeszcze niższymi stężeniami ogólnoustrojowym (Mead i wsp., 2021). Dlatego też, przyszłe badania powinny obejmować ocenę zawartości KOL w jelitach po wielokrotnym podaniu w wodzie pitnej w celu dalszego udoskonalenia strategii terapeutycznych u gęsi.

Warto podkreślić, że po podaniu KOL wszystkimi drogami, przez cały okres badania, gęsi nie wykazywały żadnych zauważalnych natychmiastowych, ani opóźnionych (do 7 dni) działań niepożądanych, ani miejscowych, ani ogólnoustrojowych, co potwierdza korzystny profil bezpieczeństwa u gęsi i przemawia za jej potencjalną praktyczną przydatnością w terapii zakażeń przewodu pokarmowego.

#### **IV.3.2. Rozkład pozostałości w tkankach**

W przypadku pozostałości w tkankach tj. w wątrobie, mięśniach i nerkach, KOL nie przekroczyła MRL ustalonego dla zwierząt produkujących żywność w żadnym z punktów czasowych. Jest to pozytywny wskaźnik sugerujący, że zalecany protokół leczenia miejscowych zakażeń jelitowych u gęsi nie wpływa na okres karencji, a co za tym idzie, nie stwarza zagrożenia dla zdrowia konsumenta. Jest to zgodne z danymi uzyskanymi u innych gatunków (Archimbault i wsp., 1980; Roudaut, 1989; Zeng i wsp., 2010). KOL była niewykrywalna ani w surowicy, ani w mleku po podaniu PO u krów (Archimbault

i wsp., 1980). U kaczek, którym podawano 20 mg KOL na kg paszy przez 10 kolejnych dni, KOL była niewykrywalna w osoczu i tkankach, z wyjątkiem jelit (Zeng i wsp., 2010). U kur niosek, u których zastosowano ten sam schemat dawkowania PO, co w niniejszym badaniu, nie wykryto żadnych pozostałości KOL w jajach (Roudaut, 1989). Oczywiście należałoby sprawdzić rozkład pozostałości w przypadku gęsi niosek i pozostałości KOL w jajach, aby potwierdzić to założenie. Ważne jest, aby pamiętać, że należy zachować ostrożność przy porównywaniu obecnych wyników ze starszymi badaniami, ponieważ nowoczesne metody analityczne oferują znacznie lepszą czułość, umożliwiając oznaczanie pozostałości przy niższych limitach. Niemniej jednak ogólne wyniki podkreślają minimalne narażenie ogólnoustrojowe i penetrację tkanek przez KOL po podaniu PO, co istotnie ogranicza ryzyko wystąpienia pozostałości w produktach spożywczych. Ta cecha może sprawić, że KOL będzie praktycznym wyborem dla hodowców, umożliwiając skuteczne leczenie infekcji przewodu pokarmowego bez konieczności długich okresów karencji. Należy jednak KOL stosować dopiero po przeprowadzeniu testu antybiotykowrażliwości, ponieważ oporność może wymagać alternatywnych metod leczenia pomimo korzystnego profilu PK.

W odniesieniu do spożycia tkanek serca i płuc jakie ma miejsce w niektórych krajach (Seong i wsp., 2015), stwierdzone w niniejszym badaniu niskie poziomy pozostałości KOL sugerują minimalne ryzyko dla konsumenta. Podobne profile pozostałości do powszechnie spożywanych tkanek mogą wspierać wykorzystanie istniejących MRL dla wątroby, nerek i mięśni jako wstępnych limitów dla serca i płuc. Ponadto, mając na uwadze codzienne spożycie i dane dotyczące narażenia dietetycznego, wskazują na bardzo niskie spożycie tych organów, co jeszcze bardziej minimalizuje ryzyko narażenia konsumenta i potwierdza bezpieczeństwo tych wstępnych MRL.

## **V. PROFIL FARMAKOKINETYCZNY ORAZ ZANIKANIE POZOSTAŁOŚCI LINKOMYCYNY PO JEDNORAZOWYM PODANIU DOŻYLNYM, DOMIĘŚNIOWYM I DOUSTNYM ORAZ WIELOKROTNYM DOUSTNYM U GĘSI DOMOWEJ**

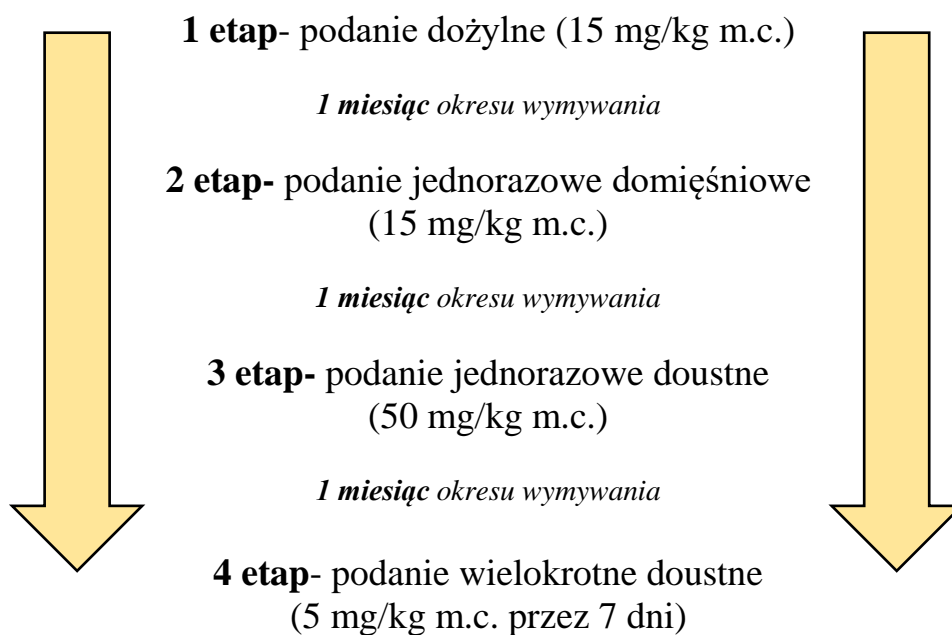
### ***V.1. Materiały i metody***

#### **V.1.1. Zwierzęta**

Badanie przeprowadzono na 16 zdrowych, dorosłych (w wieku 2 lat), o masie ciała od 2,65 do 4,2 kg samcach gęsi rasy Biłgorajskiej. Przed rozpoczęciem badania stan zdrowia gęsi został dokładnie oceniony przez lekarzy weterynarii nadzorujących badanie na podstawie badania klinicznego, analiz biochemicznych osocza oraz badań hematologicznych. Wybrane do doświadczenia zwierzęta nie otrzymywały wcześniej żadnych antybiotyków ani innych leków. Następnie ptaki poddano tygodniowemu okresowi aklimatyzacji, w czasie którego codziennie monitorowano ich zachowanie, apetyt i przyzwyczajano do obecności, zapachu oraz dotyku osób, które będą przeprowadzać doświadczenie. Następnie ptaki zważono i oznakowano indywidualnie pierścieniem na lewej nodze.

Gęsi były utrzymywane zgodnie z wymaganiami Ministra Rolnictwa i Rozwoju Wsi z dnia 19 września 2019 r. (Dz.U. 2019 poz. 1966), a eksperyment przeprowadzono zgodnie z prawem europejskim (2010/63/UE) i w oparciu o zgodę (nr 18/2023) wydaną przez Lokalną Komisję Etyczną do Spraw Doświadczeń na Zwierzętach z siedzibą w Lublinie.

Projekt badania obejmował szereg 4 badań naprzemiennych (*cross-over* study/trial). Poszczególne fazy były oddzielone jednomiesięcznym okresem wymywania leku (Ryc. 16).



**Ryc. 16. Schemat podawania LIN. (Źródło: Autor)**

W pierwszym etapie badania gęsiom podano jednorazowo IV dawkę LIN w ilości 15 mg/kg masy ciała (Lincocin®, roztwór do wstrzykiwań i infuzji; 300 mg/ml, Pfizer), wstrzykiwaną do żyły skrzydłowej lewej. W etapie drugim zastosowano jednorazowo dawkę 15 mg/kg masy ciała IM, LIN (Lincocin®, roztwór do wstrzykiwań i infuzji; 300 mg/ml, Pfizer), podawaną w mięsień piersiowy. Etap trzeci obejmował jednorazowe podanie PO roztworu LIN (Lincofort 400®, 400 mg/g, proszek do sporządzania roztworu doustnego dla świń i drobiu, Biofaktor) w dawce 50 mg/kg masy ciała przez zgłębnik do wola, przepłukując kaniulę 3 ml wody w celu zapewnienia pełnej podaży leku. Ostatni etap obejmował wielokrotne podawanie roztworu PO LIN w dawce 5 mg/kg masy ciała raz dziennie przez 7 kolejnych dni (Lincofort 400®, 400 mg/g, proszek do sporządzania roztworu doustnego dla świń i drobiu, Biofaktor) za pomocą wlewu do wola. Po każdej aplikacji kaniulę przepłukiwano 5 ml wody w celu zapewnienia pełnego podania dawki leku.

Dawka PO została ustalona na podstawie ulotek informacyjnych PLW zarejestrowanych dla drobiu oraz świń (Zoestis, 2026; Biofaktor, 2026), natomiast dawkę IV i IM określono zgodnie z rekomendacjami oraz ulotkami informacyjnymi PLW zarejestrowanych dla świń, psów i kotów (MDSvetmanual, 2026; VMD, 2026).

Próbki krwi (ok. 1 ml) pobierano z żyły skrzydłowej prawej w określonych przedziałach czasowych we wszystkich czterech etapach: 0, 0.085 (wyłącznie dla podania

IV), 0,25, 0,5, 0,75, 1, 1,5, 2, 4, 6, 8, 10, 24 oraz 48 godzin po podaniu (z wyjątkiem wielokrotnego podania PO – do 72 h). W przypadku wielokrotnego podania PO, próbki pobierano w pierwszym oraz w siódmym dniu eksperymentu, zgodnie z tym samym harmonogramem. Krew pobierano do próbek zawierających heparynę, następnie odwirowywano ( $1500 \times g$ ), po czym osocze oddzielano i przechowywano w temperaturze  $-20^{\circ}\text{C}$

Po zakończeniu etapu z wielokrotnym podaniem PO LIN (dzień 7), gęsi (po cztery osobniki w grupie) poddano ubojowi w następujących punktach czasowych: 10, 24, 48 oraz 72 godziny po ostatnim podaniu leku. Do dalszych analiz pozyskano próbki tkanek (ok. 20 g każda): mięśni, wątroby, nerek, płuc i serca, które następnie zamrożono i przechowywano w temperaturze  $-20^{\circ}\text{C}$

Analizy chromatograficzne przeprowadzono w ciągu 10 dni od momentu pobrania próbek, po zakończeniu każdej fazy badania.

#### **V.1.2. Oznaczanie LIN w osoczu oraz tkankach**

Metoda oznaczania LIN w materiale biologicznym pozyskanym od gęsi została w pełni opracowana i zwalidowana przez autora.

Do 200  $\mu\text{l}$  rozmrożonego osocza dodawano 10  $\mu\text{l}$  IS (10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) i pozostawiano mieszaninę w temperaturze pokojowej na 5 min. Dodawano 1 ml mieszaniny ekstrakcyjnej (ACN: 0,1% kwas mrówkowy, 1:1, v/v), po czym 100  $\mu\text{l}$  ultraczystej wody. Całość wytrząsano przez 1 min i wirowano przy  $9500 \times g$  przez 5 min w temperaturze  $4^{\circ}\text{C}$ . Następnie 200  $\mu\text{l}$  supernatantu przenoszono do fiolek chromatograficznych z wkładką szklaną i analizowano przy użyciu ultrasprawniej chromatografii cieczowej połączonej z tandemową spektrometrią mas (UHPLC-MS/MS).

W przypadku tkanek, odważono 0,5 g rozmrożonej i zhomogenizowanej próbki do 15-ml próbki wirówkowej. Dodawano 10  $\mu\text{l}$  IS (10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ), wytrząsano i pozostawiano w temperaturze pokojowej na 5 min. Następnie dodawano 7 ml mieszaniny ekstrakcyjnej (ACN: 0,1% HCOOH, 65:35, v/v) oraz 50  $\mu\text{l}$  ultraczystej wody. Mieszaninę wytrząsano przez 1 min i mieszano na wyrzäsarce obrotowej przez 5 min w temperaturze pokojowej. Próbki wirowano przy  $3060 \times g$  przez 5 min w temperaturze  $4^{\circ}\text{C}$ . Około 500  $\mu\text{l}$  supernatantu filtrowano przez filtr strzykawkowy PVDF 0,22  $\mu\text{m}$ , a 200  $\mu\text{l}$  przesącza przenoszono do fiolek chromatograficznych z wkładką szklaną i analizowano przy użyciu UHPLC-MS/MS.

Analizę UHPLC-MS/MS wykonano wykorzystując system Sciex ExionLC AC PUMP 2.11, sprzężony ze spektrometrem mas QTRAP® 5500 (Sciex, Framingham, MA, USA). Rozdział prowadzono na kolumnie Poroshell 120 EC-C18 (1,9  $\mu$ m, 50  $\times$  2,1 mm, Agilent, Santa Clara, CA, USA) zintegrowanej z kolumną zabezpieczającą tego samego typu. Kolumnę utrzymywano w temperaturze 35°C, przy przepływie 0,5 ml/min. Fazę ruchomą stanowiły: 0,1% kwas mrówkowy (A) oraz ACN (B). Gradient rozpoczął się od 99% fazy A i 1% fazy B, utrzymywanej przez 0,5 min, następnie udział fazy A zmniejszono do 90% w ciągu 2,30 min, a następnie do 10% w ciągu kolejnej 1 min. Następnie zwiększano ponownie do 98% A i utrzymywano przez 1,30 min. Całkowity czas rozdziału wynosił 5,30 min, a objętość wstrzykiwanej próbki wynosiła 2  $\mu$ l.

### V.1.3. Walidacja metody analitycznej

Opracowaną metodę, jak wcześniej wspomniano zvalidowano zgodnie z Rozporządzeniem Wykonawczym Komisji (UE) 2021/808 z dnia 22 marca 2021 r. (Rozp. UE, 2021) oceniając liniowość, precyzję (powtarzalność i odtwarzalność wewnątrzlaboratoryjną), selektywność, odzysk oraz ME. LLOQ i LOD określono na podstawie dokumentu Guidance Document on the Estimation of LOD and LOQ for Measurements in the Field of Contaminants in Feed and Food EUR 28099 EN (Wenzl i wsp., 2016).

Liniowość oceniano, wykonując dwie krzywe kalibracyjne dopasowane do matrycy, przygotowane przez wzbogacanie próbek osocza wolnych od LIN. Użyto różnych stężeń dla każdej krzywej: (1, 50, 100, 250, 500, 750 i 1000  $\mu$ g/l) oraz (1000, 2500, 5000, 10000, 20000, 30000, 40000 i 50000  $\mu$ g/l). Dla tkanek przygotowano jedną krzywą kalibracyjną dopasowaną do matrycy, wzbogacając próbki nerek, mięśni, serca, płuc i wątroby w 10 stężeń: 5, 10, 50, 100, 250, 500, 1000, 5000, 7500 i 10000  $\mu$ g/kg.

Powtarzalność oceniano poprzez wzbogacanie sześciu próbek osocza i tkanek na trzech poziomach (MRL/MLP lub VL (poziom walidacji) — w zależności od matrycy): 0,1 MLP/VL, 1 MLP/VL i 1,5 MLP/VL, przez tego samego operatora, tego samego dnia i na tym samym instrumencie. Odtwarzalność wewnątrzlaboratoryjną określono na podstawie dwóch dodatkowych serii próbek wzbogaconych na tych samych poziomach, analizowanych przez różnych operatorów w odstępie dwóch dni; obliczono współczynniki zmienności (CV, %).

Odzysk oceniano w ramach tego samego eksperymentu, dzieląc średnie zmierzone stężenie przez poziom wzbogacenia.

Ponadto określono Selektywność poprzez analizę sześciu różnych próbek osocza i tkanek wolnych od LIN, oceniając potencjalne interferencje endogenne.

Dodatkowo oceniano ME (Efekt matrycy) (%) porównując sześć próbek wzbogaconych z odpowiednimi standardami przygotowanymi w wodzie przy stężeniach 100 µg/l oraz 100, 500 i 1500 µg/kg w każdej z badanych matryc. Przyjmowano, że ME (%) = 100 ± 15% oznacza brak efektu matrycowego.

LLOQ ustalono jako najniższy punkt krzywej kalibracyjnej o akceptowalnym CV. LOD obliczono jako stosunek sygnału do szumu (S/N) - 3

#### V.1.4. Analiza statystyczna oraz farmakokinetyczna

Analizę PK wykonano z użyciem oprogramowania PKanalix™ (R1, 2023), stosując podejście niekompartmentowe. Z krzywych stężenie–czas wyznaczano bezpośrednio  $C_{max}$  oraz  $T_{max}$ .  $T_{1/2el}$  obliczano na podstawie regresji liniowej w logarytmicznie przekształconej fazie eliminacji. AUC obliczano metodą trapezów liniowo-logarytmicznych dla podania IV oraz metodą *linear-up log-down* dla podań pozanaczyniowych.

Współczynnik akumulacji wyznaczano jako stosunek  $AUC(0-\infty)$  po ostatniej dawce wielokrotnej do  $AUC(0-\infty)$  po dawce pojedynczej (Toutain i Bousquet-Mélou 2004a), gdzie wartość bliska 1 wskazuje na minimalną akumulację.

Biodostępność obliczano według niniejszego równania:

$$F\% = 100 \times \frac{AUC(PO \text{ lub } IM) \times Dawka (IV)}{AUC(IV) \times Dawka (PO \text{ lub } IM)}$$

MAT wyznaczano zgodnie z równaniem:

$$MAT_{(PO)} = MRT_{(PO)} - MRT_{(IV)}$$

$E_{body}$  po podaniu IV obliczano jako  $Cl/CO$  (Toutain i Bousquet-Mélou 2004b), gdzie CO oznacza pojemność minutową serca obliczaną według wcześniej wspomnianego równania allometrycznego dla ptaków (Waxman i in. 2019).

Analizę statystyczną parametrów PK pomiędzy grupami wykonano za pomocą analizy wariancji z powtarzaniem pomiarów (ANOVA). Ze względu na nieparametryczny charakter danych zastosowano test Friedmana, a następnie test wielokrotnych porównań

Dunna. Normalność rozkładu oceniano testem Shapiro–Wilka. Dane nie miały rozkładu normalnego, dlatego zaprezentowano je jako zakresy min–max zamiast odchylenia standardowego. Różnice uznawano za istotne statystycznie przy  $p < 0,05$ . Wszystkie analizy wykonano w programie GraphPad InStat (wersja 5.3).

#### **V.1.5. Analiza pozostałości i oszacowanie okresu karencji**

Okresy karencji dla LIN w tkankach gęsi obliczono przy użyciu oprogramowania WT 1.4. opracowanego przez EMA (Anonymous, 2019). Czas karencji definiowano jako punkt, w którym górna jednostronna granica tolerancji (99%) z 95% przedziałem ufności spada poniżej wartości MRL. W badaniu zastosowano wartości MRL określone dla tkanek kurcząt: 500 µg/kg dla wątroby, 500 µg/kg dla nerek i 200 µg/kg dla mięśni, zgodnie z wytycznymi Codex Alimentarius Commission (CAC, 2015).

### **V.2. Wyniki**

#### **V.2.1. Walidacja metody**

Walidację metody przeprowadzono zgodnie z Rozporządzeniem Wykonawczym Komisji (UE) 2021/808 z dnia 22 marca 2021 r. (Rozp. UE, 2021).

Wszystkie wartości walidacyjne przedstawiono w Tabeli 7.

Parametr	Jednostka	Matryca					
		Wątroba	Pluca	Nerka	Serce	Mięśnie	Osocze
MLP/VL	µg/kg; µg/L	500	100	1500	100	100	1000
Powtarzalność (repeatability), CV	%	12,7±1,9	10,4±3,2	12,7±1,7	11,8±2,6	8,6±2,4	9,8±2,1
Odtwarzalność wewnątrzlaboratoryjna (within-lab reproducibility), CV	%	16,3±2,1	14,4±1,2	14,7±1,8	15,1±1,6	11,6±2,1	8,6±2,4
LLOQ	µg/kg; µg /L	5	5	5	5	5	1
LOD	µg/kg; µg /L	0,5	0,7	0,5	0,5	0,1	0,05
Odzysk*	%	97 ± 5,5	109± 3,6	112 ± 4,5	106 ± 3,8	89,4 ± 5,1	97,1 ± 3,2
Efekt matrycy, ME	%	114,5 ± 3,4	105,1 ± 3,2	84,9 ± 3,2	114,7 ± 2,1	96,6 ± 2,8	96,4 ± 1,7

\* - średnia z 3 MLP/VL

Tab. 7. Wyniki walidacji metody oznaczania stężeń LIN w osoczu i różnych tkankach gęsi. (Zródło: Autor)

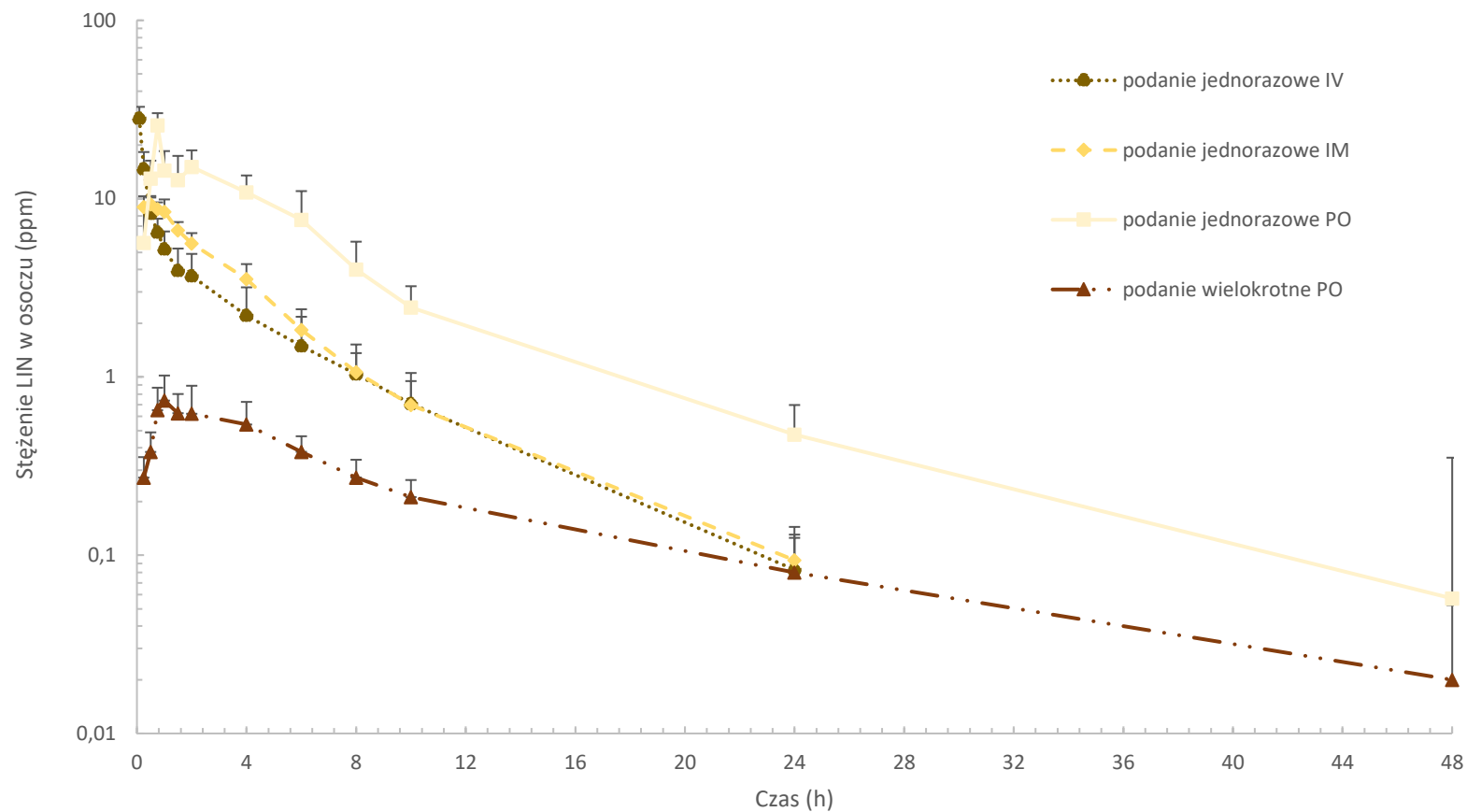
Krzywa kalibracyjna w matrycach wykazała dobrą liniowość, a współczynnik determinacji wyniósł  $R^2 \geq 0,995$  dla wszystkich matryc. Precyzja (powtarzalność i odtwarzalność wewnątrzlaboratoryjna) była zadowalająca; współczynniki zmienności CV dla powtarzalności i odtwarzalności wewnątrzlaboratoryjnej były mniejsze niż 15%

Nie stwierdzono znaczących pików interferencyjnych w próbkach osocza i tkanek w czasie retencji odpowiadającym analitom oraz IS. Selektywność metody była odpowiednia do oznaczania ilościowego LIN w osoczu, nerkach, mięśniach, sercu, płucach i wątrobie. Średnie odzyski mieściły się w zakresie 89–112%, w zależności od matrycy. Efekty matrycy (ME) wynosiły 85–115%. Do minimalizacji i uniknięcia wpływu matrycy zastosowano matrycowe krzywe kalibracyjne oraz IS.

Granice wykrywalności (LOD) mieściły się w zakresie 0,05–0,7  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , zależnie od matrycy; LLOQ wynosiły: 1  $\mu\text{g}/\text{L}$  w osoczu i 5,0  $\mu\text{g}/\text{kg}$  w tkankach.

### **V.2.2. Profil farmakokinetyczny**

Rycina 17. przedstawia półlogarytmiczny wykres średnich ( $\pm$  SD) stężeń LIN w osoczu po podaniu IV, IM oraz jednorazowym i wielokrotnym podaniu PO.



**Ryc.17. Półlogarytmiczne krzywe średniego stężenia LIN w osoczu w funkcji czasu ( $\pm$  SD) po jednorazowym dożylnym (15 mg/kg), domięśniowym (15 mg/kg) oraz jednorazowym (50 mg/kg) i wielokrotnym (5 mg/kg) podaniu doustnym u gęsi. (Źródło: Autor)**

Tabela 8. prezentuje średnie parametry PK na podstawie analizy niekompartmentowej. Z wyjątkiem  $T_{max}$ , przedstawionego jako zmienna kategoryczna z medianą i zakresem oraz końcowego  $t_{1/2}$  (jako średnia harmoniczna), parametry PK podano jako średnie geometryczne i zakresy (Julious i Debarnot 2000).

Parametr	Jednostka	IV			IM			Podanie jednorazowe PO			Podanie wielokrotne PO		
		Średnia geo	max	min	Średnia geo	max	min	Średnia geo	max	min	Średnia geo	max	min
$AUC_{(0-\infty)}^D$	$h \cdot \mu g \cdot mL^{-1}$	2,31	3,31	1,79	2,39	2,89	1,98	2,12	2,81	1,59	1,75 <sup>b</sup>	2,72	1,41
$\lambda z$	$h^{-1}$	0,17	0,28	0,13	0,16	0,19	0,12	0,14	0,21	0,08	0,07 <sup>a,b</sup>	0,12	0,05
$t_{1/2}$	h	4,19	5,50	2,50	4,37	5,90	3,70	5,07	8,66	3,35	9,89 <sup>a,b</sup>	14,76	5,63
Cl	$mL \cdot h^{-1} \cdot kg^{-1}$	451,26	666,19	302,81									
$V_d$	$mL \cdot kg^{-1}$	2727,16	4683,58	1806,26									
$MRT_{(0-\infty)}$	h	4,24	5,48	3,21	4,66	6,53	3,79	6,75 <sup>a</sup>	9,08	5,23	14,15 <sup>a,b</sup>	19,64	8,55
$C_{max}^D$	$\mu g \cdot mL^{-1}$				0,64	0,74	0,58	0,50	1,27	0,39	0,15 <sup>b,c</sup>	1,00	0,09
$T_{max}^{\S}$	H				0,50	1,00	0,50	0,75	0,75	0,75	1,00	2,00	1,00
F	%				109,00	135,00	65,00	95,00	129,00	60,00	80 <sup>b</sup>	106,00	50,00
MAT	h				0,42	1,74	0,00	2,00	3,46	0,15	8,65 <sup>b,c</sup>	16,61	2,09

Gdzie:  $AUC_{(0-\infty)}^D$  – pole pod krzywą od 0 h do nieskończoności znormalizowane do dawki 1 mg/kg;  $\lambda z$  – stała szybkości fazy końcowej;  $t_{1/2}$  – końcowy okres półtrwania; Cl – klirens osoczowy;  $V_d$  – objętość dystrybucji;  $MRT_{(0-\infty)}$  – średni czas przebywania od 0 h do nieskończoności;  $C_{max}^D$  – maksymalne stężenie w osoczu znormalizowane do dawki 1 mg/kg;  $T_{max}^{\S}$  – czas osiągnięcia maksymalnego stężenia; F – biodostępność; MAT – średni czas wchłaniania.

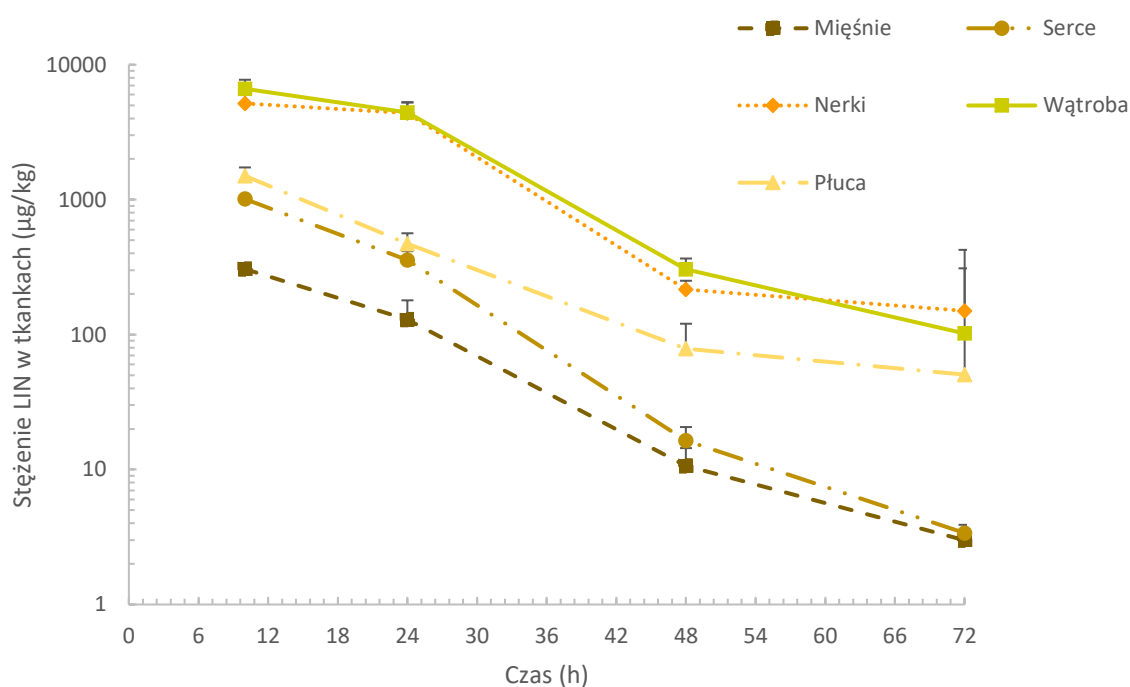
a – statystycznie różne od IV; b – statystycznie różne od IM; c – statystycznie różne od jednorazowego PO; h – średnia harmoniczna; § – wartość mediany.

**Tab. 8. Średnie wartości parametrów PK dla LIN (i zakres wartości) po dożylnym (15 mg/kg), domięśniowym (15 mg/kg), jednorazowym (50 mg/kg) i wielokrotnym (5 mg/kg przez 7 dni) podaniu doustnym. (Źródło: Autor)**

Wartości  $AUC_{ekstrapolowane}$  stanowiły u każdego osobnika mniej niż 10%  $AUC(0-\infty)$ , a  $R^2$  dla fazy terminalnej przekraczało 95%. Próbkę poniżej LLOQ wykluczono z analizy PK. Po podaniu IV obserwowano krótki do umiarkowanego końcowy  $t_{1/2}$ , szybki Cl i dużą pozorną  $V_d$ . Bezwzględny  $E_{body}$  wyniósł 1% ( $\pm 0,3$ ). Bezwzględna F była niemal całkowita zarówno po jednorazowym podaniu PO, jak i po IM. Przy wielokrotnym podaniu PO nie zaobserwowano kumulacji ( $<1$ ) LIN w osoczu do siódmego dnia.

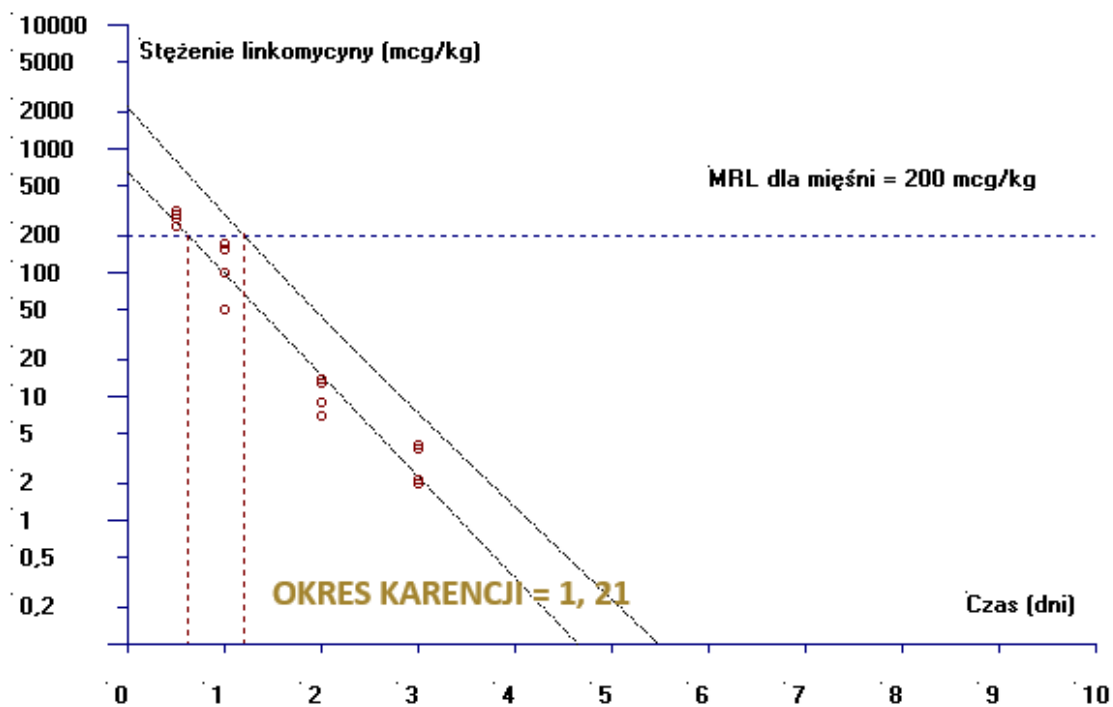
### V.2.3. Oszacowanie okresu karencji

Rycina 18. przedstawia półlogarytmiczny wykres średnich ( $\pm$  SD) stężeń LIN w tkankach po 7 dniach wielokrotnego podawania PO.

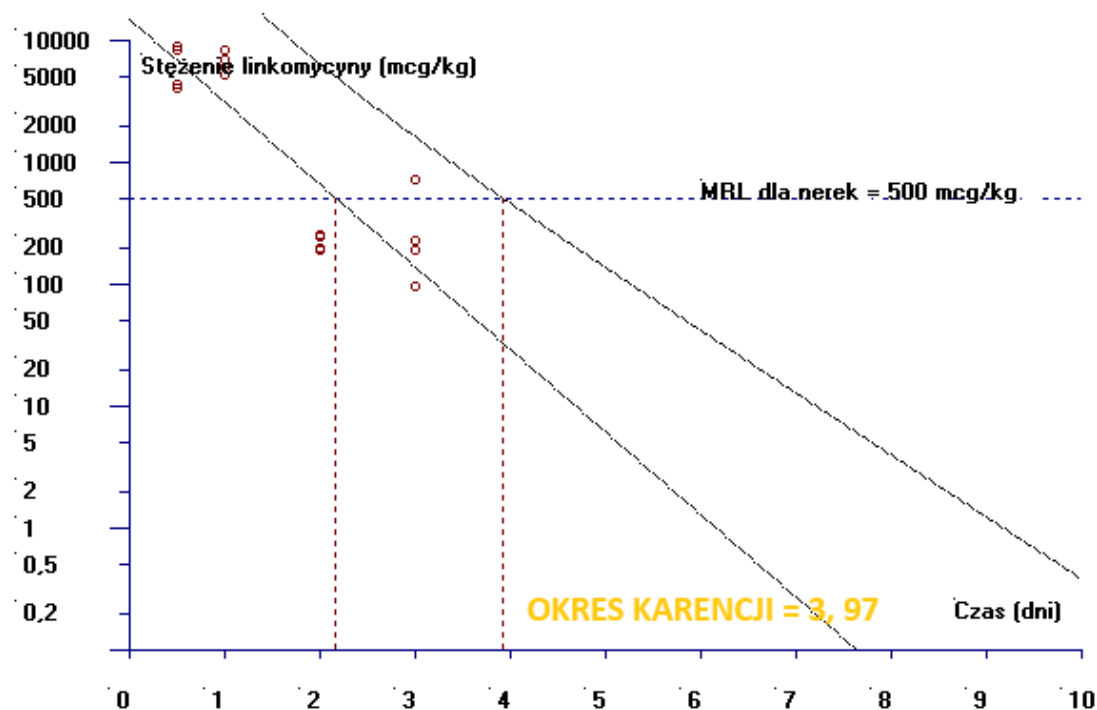


**Ryc. 18. Półlogarytmiczny wykres stężeń LIN w mięśniach, wątrobie, nerkach, płucach oraz sercu gęsi w kolejnych punktach pobierania próbek po wielokrotnym podaniu doustnym. (Źródło: Autor)**

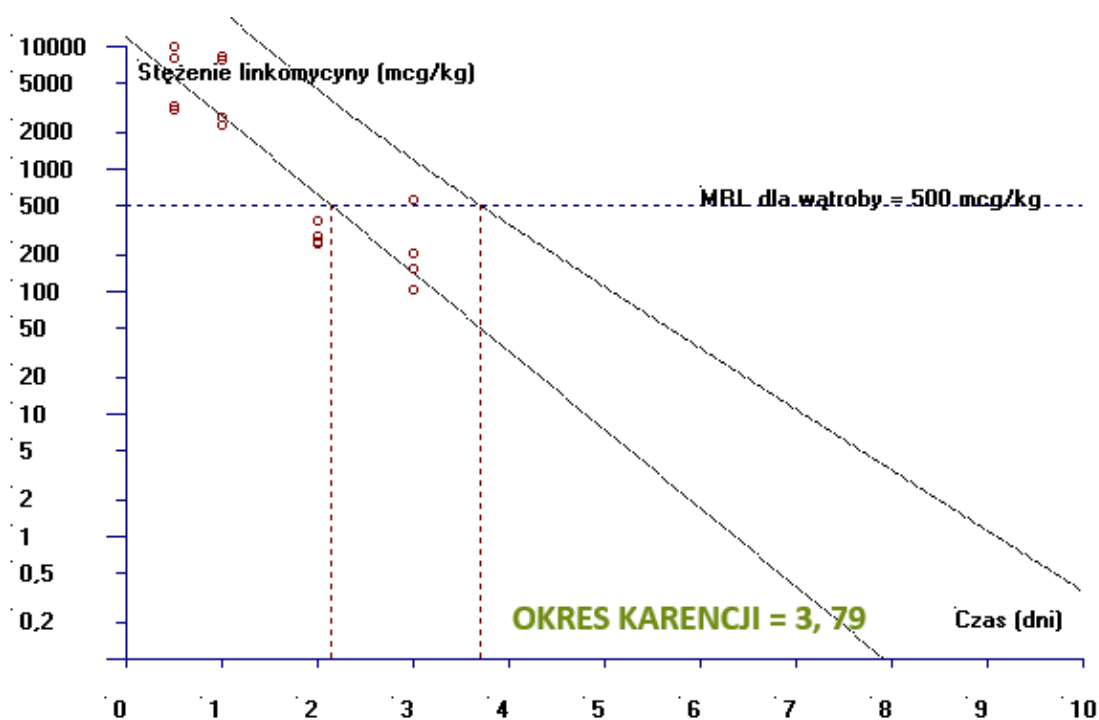
LIN wykrywano we wszystkich badanych tkankach w każdym punkcie czasowym. Wątroba i nerki wykazywały najwyższe stężenia pozostałości, znacznie powyżej LLOQ po 72 h. Dla zastosowanego schematu podawania LIN wstępny okres karencji wynosił 1 dzień dla mięśni (Ryc. 19) oraz 4 dni zarówno dla nerek (Ryc. 20) jak i wątroby (Ryc. 21).



Ryc. 19. Obliczony okres karencji dla LIN w mięśniach gęsi po wielokrotnym doustnym podaniu w dawce 5 mg/kg przez siedem kolejnych dni. (Źródło: Autor)

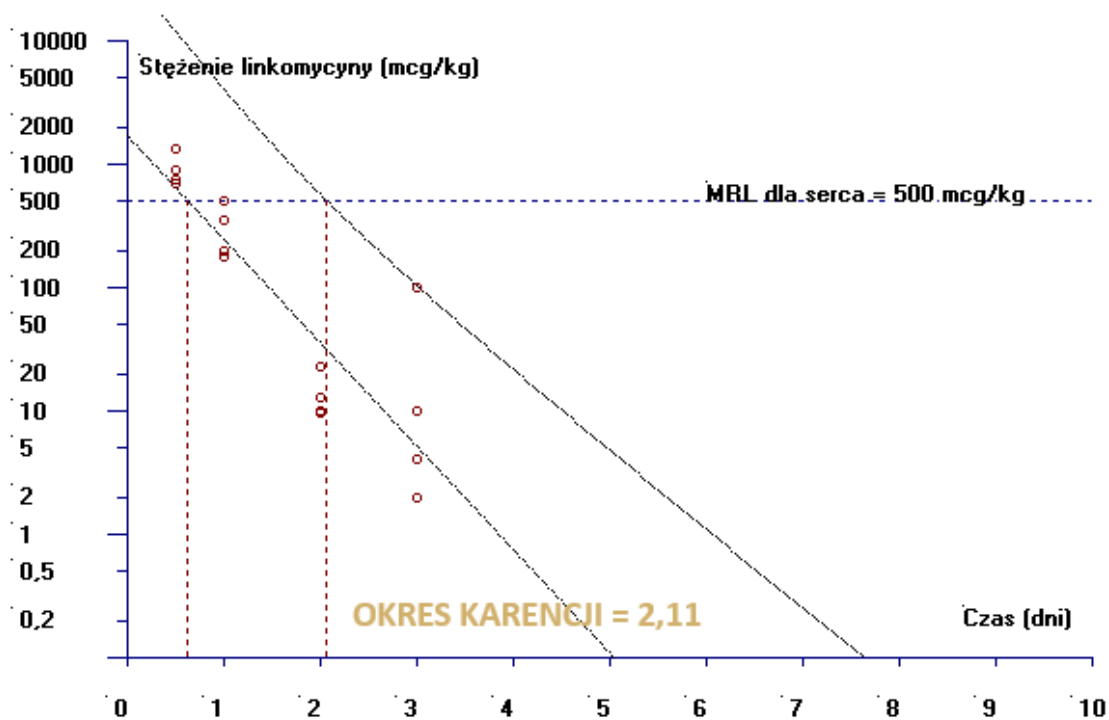


Ryc. 20. Obliczony okres karencji dla LIN w nerkach gęsi po wielokrotnym doustnym podaniu w dawce 5 mg/kg przez siedem kolejnych dni. (Źródło: Autor)

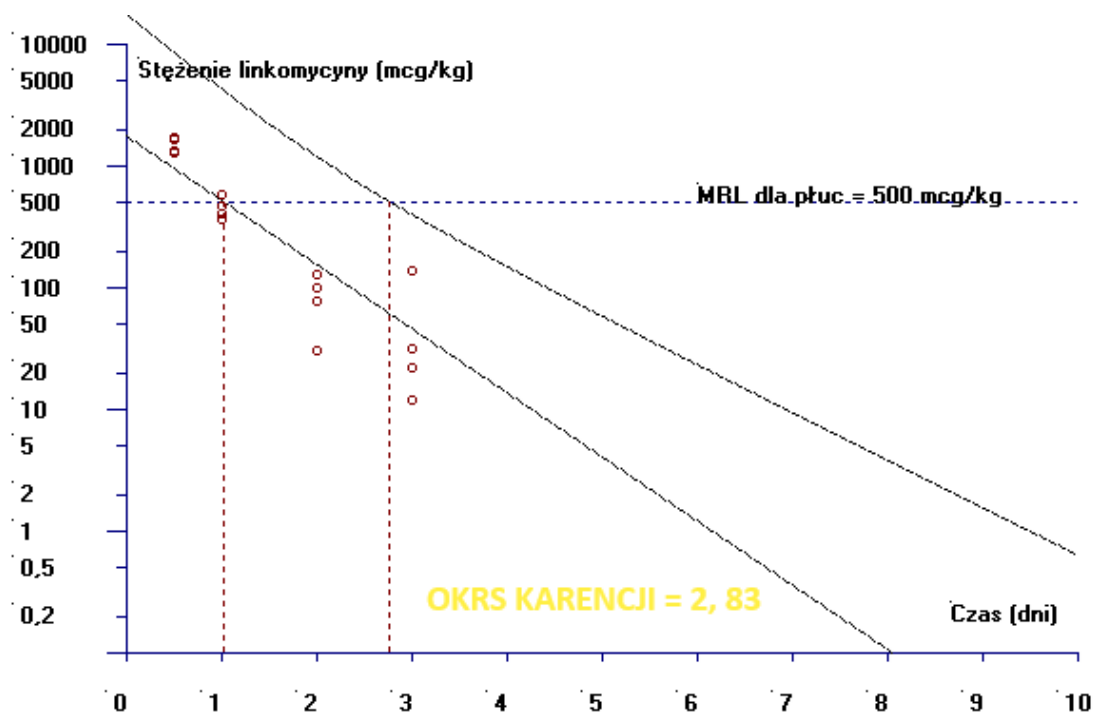


Ryc. 21. Obliczony okres karencji dla LIN w wątrobie gęsi po wielokrotnym doustnym podaniu w dawce 5 mg/kg przez siedem kolejnych dni. (Źródło: Autor)

Zakładając również dla serca i płuc podobny MRL, jak dla wątroby i nerek, sugerowane okresy karencji wyniosły odpowiednio 2 dni (Ryc. 21) i 3 dni (Ryc. 22).



Ryc. 21. Obliczony prowizoryczny okres karencji dla LIN w sercu gęsi po wielokrotnym doustnym podaniu w dawce 5 mg/kg przez siedem kolejnych dni. (Źródło: Autor)



Ryc. 22. Obliczony prowizoryczny okres karencji dla LIN w płucach gęsi po wielokrotnym doustnym podaniu w dawce 5 mg/kg przez siedem kolejnych dni. (Źródło: Autor)

### V.3. Dyskusja

#### V.3.1. Analiza profilu farmakokinetycznego

Biodostępność LIN po podaniu doustnym jest gatunkowo zmienna (Papich i Riviere, 2001), gdzie u świń wynosi 40–75% (Nielsen i Gyrd-Hansen, 1998), a u szczurów 40–60% (Hornish i wsp., 1987), natomiast u kur zaledwie 3% po podaniu dożołądkowym (Kim i wsp., 2024). W niniejszym badaniu u gęsi zaobserwowano niemal całkowitą F, średnio 95% po jednorazowym podaniu PO, 80% po wielokrotnych dawkach PO a nawet >100% w przypadku podania IM. Ta wyraźna rozbieżność sugeruje, że biodostępność LIN może zależeć od kilku czynników, w tym różnic w metabolizmie pierwszego przejścia, fizjologii przewodu pokarmowego i czasie pasażu jelitowego, wpływu mikrobiomu, stanu odżywienia (w badaniu na kurach ptaki były głodzone), a także gatunkowych różnic w aktywnych transporterach leku (Gao i in., 2016; Kim i in., 2024; Ouyang i in., 2022; Sartini i in., 2023). Przyczyny znacząco wyższej F dla LIN u gęsi w porównaniu z kurami są interesujące, choć pozostają niejasne.

Właściwości fizykochemiczne LIN, obejmujące jej lipofilność oraz cechy formulacji, przyczyniają się do jej całkowitej F po podaniu IM. Wysoka rozpuszczalność w lipidach przy pH fizjologicznym (USPC, 2008) zapewnia szybkie wchłanianie, co potwierdzają:

krótki średni czas wchłaniania wynoszący 0,42 h oraz czas osiągnięcia maksymalnego stężenia równy 0,50 h. Choć szczegółowe dane dotyczące podania IM LIN są ograniczone, wyniki uzyskane w niniejszym badaniu są zgodne z tymi raportowanymi u kóz ( $T_{\max} = 0,53$  h, MAT = 0,24 h, F = 91,72%; Abo El-Sooud i wsp., 2004) oraz kotów ( $T_{\max} = 0,12$  h, MAT = 0,66 h, F = 82,55%; Albarellos i wsp., 2012). Droga IM, oferująca szybki początek działania i pełną dostępność ogólnoustrojową, wydaje się być korzystną opcją w stanach ostrych.

Jeśli chodzi o  $V_d$  LIN, u gęsi wykazywała ona stosunkowo wysoką średnią wartość (2727,16 ml/kg). Jest to zgodne z relatywnie wysoką  $V_d$  u drobiu (2363 ml/kg; Kim i wsp., 2024), choć wyższą niż wartości obserwowane u świń (1100 ml/kg; Nielsen i Gyrd-Hansen, 1998), cieląt bawołów (1150 ml/kg; Gouri i wsp., 2014), bydła (1300 ml/kg; Burrows i wsp., 1986), kotów (1400 ml/kg; Albarellos i wsp., 2012) czy kóz (1780 ml/kg; Sharma i wsp., 2019). Zwiększona  $V_d$  u gęsi w porównaniu ze ssakami może wynikać z kilku czynników związanych z ich unikalną fizjologią, takich jak wyższa zawartość tkanki tłuszczowej, odmienna dynamika metaboliczna i sercowo-naczyniowa oraz potencjalnie różne wiązanie z białkami osocza (Yu i wsp., 2020). Choć wiązanie z białkami nie zostało ocenione w niniejszym badaniu, literatura wskazuje, że jest ono niskie do umiarkowanego: u kotów 11,24–17,68%, u owiec 30–40%, u kur 23%, a u kóz 43,7–55,6% (Abo El-Sooud i wsp., 2004; Soback i wsp., 1987; Ziv i Sulman, 1973a i 1973b). Ponadto LIN wiąże się głównie z kwaśną  $\alpha_1$ -glikoproteiną (Son i wsp., 1998), której stężenie może znacząco wzrastać podczas infekcji bakteryjnych, potencjalnie zmieniając PK leku w stanach chorobowych (Grégoire i wsp., 2017).

Średnia wartość  $Cl$  LIN u gęsi była stosunkowo wysoka (451 ml/h/kg), co jest większą wartością niż spotykana u innych gatunków np.: 278 ml/h/kg u kur niosek (Kim i wsp., 2024), 245 ml/h/kg u cieląt bawołów (Gouri i wsp., 2014), 310 ml/h/kg u kóz (Sharma i wsp., 2019), 400 ml/h/kg u świń (Nielsen i Gyrd-Hansen, 1998) oraz 280 ml/h/kg u kotów (Albarellos i wsp., 2011). Należy jednak interpretować te dane ostrożnie ze względu na złożoność wynikającą z uwzględnienia pojemności minutowej serca. W niniejszym badaniu wartość  $E_{\text{body}}$  była niska i wynosiła 1% ( $\pm 0,3$ ), co wskazuje na minimalną zdolność narządów eliminujących do aktywnego usuwania LIN (Toutain i Bousquet-Mélou 2004b). U ludzi LIN jest głównie wydalana z żółcią, przy słabo poznanych szlakach metabolicznych. Dominującą formą wydalaną jest postać niezmieniona (EMA, 1998). U drobiu około 80% wydalanej LIN pozostaje niezmienione, 10% stanowi sulfotlenek LIN, a 5% - N-dimetyllinkomycyna (Hornish i wsp., 1987; Papich i Riviere, 2001). Wyniki te

potwierdzają minimalną wartość  $E_{body}$  stwierdzoną w niniejszym badaniu ( $<1$ ) (Toutain i Bousquet-Mélou, 2004b).

W odniesieniu do końcowego  $t_{1/2}$  nie stwierdzono istotnych różnic pomiędzy różnymi drogami podania, z wyjątkiem wielokrotnego podania PO, gdzie okres ten był istotnie dłuższy. Można to przypisać m.in. inhibicji enzymów w czasie, wysyceniu nerkowej eliminacji, zmianom wiązania z białkami, nieliniowej PK przy różnych dawkach i/lub wielokrotnym dawkowaniu, wartościom odstającym oraz potencjalnym błędom analitycznym (Bourdo i wsp., 2024; Sharma i in. 2016). Jednak wyjątkowo wysoka wartość MAT obserwowana przy wielokrotnym podaniu PO wskazuje na problemy ze strony przewodu pokarmowego, a nie układowe. A pozornie długi  $t_{1/2}$  wynika z zjawiska *flip-flop*, a nie wolniejszej eliminacji. Zjawisko to nie wystąpiło po jednorazowym podaniu PO. Wielokrotne dawki mogą wysycać miejsca wchłaniania, spowalniać motorykę jelit oraz zmieniać środowisko żołądkowe, a zwiększona ilość śluzu w przewodzie pokarmowym i zmiany w ekspresji białek transportowych wskutek adaptacji mogą dodatkowo opóźnić wchłanianie (Vinarov i wsp., 2021). Ponadto stres przewodu pokarmowego wynikający z wielokrotnych pobrań próbek mógł przyczynić się do wydłużonego MAT (Konturek i wsp., 2011).

Wartości  $t_{1/2}$  obserwowane u gęsi są zgodne z danymi dla innych gatunków, w tym kotów (3,56 h IV; 3,67 h IM), cieląt bawołów (3,30 h IV), kóz (3,99 h IV), kur (2,48 h IV; 3,04 h PO) oraz ludzi (4 h IV) (Bellamy i wsp., 1966; Albarellos i wsp., 2011; Gouri i wsp., 2014; Kim i wsp., 2024). Wartości  $V_d$  i  $Cl$  były porównywalne między gatunkami, a średnie wartości u gęsi były zbliżone do tych stwierdzanych u drobiu, gdzie  $Cl$  wynosił około 278 ml/h/kg, a  $V_d$  około 2363 ml/kg (Kim i wsp., 2024).

LIN jest antybiotykiem o działaniu zależnym od czasu ekspozycji. Kluczowym parametrem PK/PD dla tego typu leków jest czas, przez który stężenie leku utrzymuje się powyżej wartości  $MIC_{90}$  (Gouri i wsp., 2014). Ogólnie zaleca się, aby  $T > MIC$  wynosił co najmniej 50% odstępu między dawkami, aby zapewnić optymalne działanie bakteriobójcze (Toutain i Lees, 2004).  $MIC_{90}$  dla niektórych szczepów *Mycoplasma* wyizolowanych od gęsi, leczonych LIN, wynosi zazwyczaj około 8  $\mu\text{g/ml}$  (Gróznier i wsp., 2016).

Uzyskane dane wskazały, że wszystkie dawki LIN zastosowane w niniejszym badaniu, niezależnie od drogi podania, były niewystarczające, by utrzymać  $T > MIC$  powyżej 50% w przypadku bakterii o  $MIC_{90} > 8 \mu\text{g/ml}$ . Z perspektywy PK/PD podane dawki mogły nie zapewnić pełnej skuteczności. Ograniczenie to zaobserwowano również w odniesieniu do innych szczepów patogenów docelowych, takich jak *Clostridium perfringens*, *Mycoplasma*

*gallisepticum* i *Mycoplasma synoviae*, które wykazują rosnącą oporność na LIN (Bottinelli i in., 2022; Gróznier i in., 2016; Slavić i in., 2011).

Podobne obserwacje skłoniły do potrzeby optymalizacji strategii terapeutycznych także u drobiu, co doprowadziło do zastosowania połączenia LIN ze spektynomycyną (Gróznier i in., 2016). Ta kombinacja, szczególnie w proporcji 1:2, dawała istotnie niższe wartości MIC<sub>90</sub> u gęsi (Gróznier i in., 2016).

Wymaga to jednak dalszych badań PK/PD, jednakże nie zamyka drogi zastosowania LIN w terapii przeciwbakteryjnej gęsi, tym bardziej, że po podaniu LIN wszystkimi drogami, przez cały okres badania, gęsi nie wykazywały żadnych zauważalnych natychmiastowych ani opóźnionych (do 7 dni) działań niepożądanych, ani miejscowych, ani ogólnoustrojowych, co potwierdza jej korzystny profil bezpieczeństwa.

### V.3.2. Okres karencji

Mierzalne stężenia LIN we wszystkich tkankach utrzymywały się do 72 godzin.

Wstępnie ustalone okresy karencji wyniosły 1 dzień dla mięśni oraz 4 dni dla wątroby i nerek.

U świń schemat dawkowania 10 mg/kg masy ciała LIN przez 21 kolejnych dni skutkuje okresem karencji wynoszącym jedynie 1 dzień, ze względu na minimalną akumulację i stężenia pozostające poniżej MRL (FAO, 2004). U kur, dla tego samego wielokrotnego PO schematu dawkowania zastosowanego w niniejszym badaniu, okres karencji ustalono na 5 dni (FAO, 2004). Relatywnie podobne wartości okresów karencji między gatunkami sugerują porównywalne zachowanie tkankowe LIN u kur i gęsi w określonych warunkach dawkowania. Konieczne są dalsze badania, aby ustalić okres karencji po podaniu domięśniowym LIN.

Biorąc pod uwagę spożycie tkanek serca i płuc w niektórych regionach świata (Seong i wsp., 2015), profile pozostałości w tych rzadziej spożywanych narządach, uzyskane w niniejszym doświadczeniu, były podobne do tych w tkankach powszechnie spożywanych, choć występowały w niższych stężeniach. Sugeruje to, że istniejące MRL mogą być wykorzystane jako wartości wstępne również dla serca i płuc. Ponadto dane dotyczące dziennego spożycia i narażenia dietetycznego wskazują na niewielką konsumpcję tych narządów, co dodatkowo zmniejsza ryzyko narażenia i wspiera bezpieczeństwo tych wstępnie przyjętych MRL.

## VI. WNIOSKI

1. Opracowane i zwalidowane metody HPLC umożliwiają czułe, selektywne i zgodne z wymaganiami prawnymi oznaczanie tylnikozyny, kolistyny i linkomycyny w osoczu oraz tkankach gęsi, dzięki czemu mogą być wykorzystywane zarówno w badaniach farmakokinetycznych, jak i w rutynowym monitoringu bezpieczeństwa żywności.
2. Tylnikozyna u gęsi wykazuje silną zależność biodostępności od drogi podania tj. wysoką po podaniu podskórnym (87%) i bardzo niską po podaniu doustnym (4%) z dużą zmiennością osobniczą, co wskazuje, że droga SC jest znacznie bardziej odpowiednia w terapii stadnej, podczas gdy podanie PO może prowadzić do subterapeutycznej ekspozycji u części ptaków.
3. Farmakokinetyka tylnikozyny wskazuje na występowanie zjawiska *flip-flop* (szczególnie po podaniu SC), wynikającego z wolniejszego wchłaniania niż eliminacji, przy jednocześnie niskiej wartości  $E_{body}$  sugerującej ograniczoną zdolność eliminacji i dominację wydalania leku w postaci niezmienionej.
4. Wysoka lipofilność, duża objętość dystrybucji i niewielkie wiązanie z białkami osocza powodują intensywną penetrację i sekwestrację tkankową tylnikozyny, co prowadzi do wysokiej ekspozycji tkankowej przekraczającej wartości PK/PD wymagane dla skuteczności wobec *Mycoplasma spp.*, długotrwałej obecności leku w tkankach mimo krótkiego  $t_{1/2}$  w osoczu oraz konieczności stosowania stosunkowo długich okresów karencji (ok. 6–8 dni).
5. Bardzo niska biodostępność kolistyny u gęsi (1,5–5%) powoduje, że po podaniu doustnym lek wydaje się działać niemal wyłącznie miejscowo w przewodzie pokarmowym. W konsekwencji kolistyna nie nadaje się do leczenia zakażeń ogólnoustrojowych, a jej zastosowanie powinno być ograniczone do zakażeń jelitowych.
6. Parametry farmakokinetyczne kolistyny (niski klirens, bardzo niski współczynnik ekstrakcji narządowej, krótki  $t_{1/2}$  oraz mała objętość dystrybucji) wskazują na ograniczoną eliminację i dystrybucję głównie do przestrzeni pozakomórkowej bez ryzyka kumulacji, co wraz z brakiem pozostałości powyżej MRL potwierdza bezpieczeństwo jej stosowania, przy czym optymalizacja dawkowania powinna opierać się raczej na dynamice pasażu jelitowego i stężeniach w treści jelitowej niż na parametrach osoczowych.

7. Linkomycyna u gęsi charakteryzuje się bardzo wysoką biodostępnością zarówno po podaniu doustnym (80–95%), jak i domięśniowym (ok. 100%), co wskazuje na niemal całkowite wchłanianie leku i podkreśla istotne różnice międzygatunkowe w porównaniu z innymi gatunkami drobiu.
8. Wysoka objętość dystrybucji (ok. 2,7 L/kg) oraz stosunkowo niski współczynnik ekstrakcji narządowej wskazują na rozległą penetrację tkankową linkomycyny przy jednoczesnej eliminacji głównie w postaci niezmienionej, a obserwowany po wielokrotnym podaniu doustnym wydłużony pozorny okres półtrwania wynika prawdopodobnie ze zjawiska *flip-flop*, związanego z wolniejszym wchłanianiem z przewodu pokarmowego.
9. Analiza PK/PD sugeruje, że zastosowane dawki linkomycyny mogą nie zawsze zapewniać utrzymanie ekspozycji powyżej MIC dla niektórych patogenów (np. *Mycoplasma spp.*), co wskazuje na potrzebę optymalizacji schematów dawkowania, przy jednocześnie niskim ryzyku pozostałości w tkankach i relatywnie krótkim okresie karencji (ok. 1 dzień dla mięśni oraz 4 dni dla wątroby i nerek).
10. Farmakokinetyka badanych antybiotyków u gęsi wykazuje wyraźne różnice wynikające zarówno z właściwości fizykochemicznych leków, jak i specyficznych cech fizjologii tego gatunku, co podkreśla konieczność prowadzenia badań bezpośrednio u gatunków docelowych, a w tym wypadku gęsi oraz uwzględniania nie tylko klasycznych parametrów farmakokinetycznych, ale także wskaźników PK/PD i stężeń tkankowych przy opracowywaniu skutecznych i bezpiecznych schematów terapeutycznych, co wpisuje się w politykę One Health.

## VII. STRESZCZENIE W JĘZYKU POLSKIM

Produkcja gęsiny stanowi istotny element sektora drobiarskiego w Polsce, która należy do największych producentów i eksporterów mięsa gęsięgo w Europie. Intensyfikacja produkcji drobiarskiej zwiększa jednak ryzyko występowania chorób bakteryjnych, które mogą prowadzić do znacznych strat ekonomicznych. W leczeniu zakażeń bakteryjnych u drobiu powszechnie stosuje się antybiotyki, jednak liczba produktów leczniczych zarejestrowanych bezpośrednio dla gęsi jest ograniczona. W praktyce weterynaryjnej często stosuje się zatem leki dopuszczone dla innych gatunków drobiu zgodnie z zasadą kaskady terapeutycznej. Takie postępowanie wymaga jednak dokładnej znajomości farmakokinetyki i farmakodynamiki stosowanych substancji czynnych, ponieważ różnice fizjologiczne pomiędzy gatunkami mogą wpływać na wchłanianie, dystrybucję, metabolizm i eliminację leków.

Zrozumienie farmakokinetyki antybiotyków jest kluczowe dla opracowania skutecznych schematów dawkowania, które pozwolą osiągnąć odpowiednie stężenia terapeutyczne w miejscu zakażenia, przy jednoczesnym ograniczeniu ryzyka działań niepożądanych oraz rozwoju oporności drobnoustrojów. Dodatkowo w przypadku zwierząt rzeźnych, istotne znaczenie ma ocena pozostałości leków w tkankach jadalnych, ponieważ ich obecność może stanowić zagrożenie dla zdrowia konsumentów.

Celem pracy była kompleksowa analiza farmakokinetyki wybranych antybiotyków (tylmikozyny, kolistyny oraz linkomycyny) u gęsi domowej. Badania umożliwiły określenie podstawowych parametrów farmakokinetycznych tych leków, ocenę ich biodostępności, dystrybucji i eliminacji w organizmie, a także analizę zrozkładu pozostałości w aspekcie wyznaczenia okresu karencji.

Badania przeprowadzono na zdrowych dorosłych gęsiach rasy biłgorajskiej w trzech grupach doświadczalnych (tylmikozyna, n=15, kolistyna, n=16, linkomycyna, n=16). W grupie tylnikozyny zastosowano trzyetapowy schemat: jednorazowe podanie dożylnie (5 mg/kg m.c.), następnie podskórne (w dawce 10 mg/kg m.c.), a w ostatnim etapie lek podawano doustnie (w dawce 25 mg/kg m.c. przez 5 dni), po czym oprócz krwi pobierano również tkanki (mięśnie, nerki, wątrobę, tłuszcz ze skórą) w czasie od 24 do 120 godzin. W grupie kolistyny podobnie zastosowano 3 etapowy schemat: jednorazowe podanie dożylnie (1 mg/kg m.c.), następnie doustne (30 mg/kg m.c.), a na końcu podanie wielokrotne doustne (2,5 mg/kg m.c. przez 5 dni). Po ostatnim etapie, oprócz próbek krwi

analizowano także tkanki w odstępach czasowych 6–36 godzin. W grupie linkomycyny zastosowano cztery etapy obejmujące: jednorazowe podanie dożylnie (15 mg/kg m.c.), domięśniowe (15 mg/kg m.c.) oraz doustne (50 mg/kg m.c.), a następnie wielokrotne podanie doustne przez 7 dni (5 mg/kg m.c.). Po zakończeniu ostatniego etapu pobierano zarówno krew, jak i tkanki (10–72 godziny). Pomiędzy poszczególnymi etapami stosowano jednomiesięczny okres wmywania.

Do analizy wykorzystano zwalidowane metody chromatograficzne, w tym HPLC oraz UHPLC-MS/MS, które umożliwiły ilościowe oznaczanie badanych antybiotyków w osoczu i tkankach. Walidacja metod obejmowała ocenę liniowości, precyzji, dokładności, odzysku oraz granic oznaczalności. Wszystkie opracowane metody wykazały zgodność z obowiązującymi standardami analitycznymi EMA.

Na podstawie uzyskanych danych wyznaczono podstawowe parametry farmakokinetyczne, takie jak maksymalne stężenie w osoczu ( $C_{max}$ ), czas jego osiągnięcia ( $T_{max}$ ), pole pod krzywą stężenie–czas (AUC), okres półtrwania eliminacji ( $t_{1/2}$ ), objętość dystrybucji ( $V_d$ ) oraz klirens (Cl). Analizy farmakokinetyczne przeprowadzono z wykorzystaniem metody niekompartmentowej.

W przypadku tilmikozyny stwierdzono stosunkowo szybkie wchłanianie po podaniu doustnym oraz wyraźną dystrybucję do tkanek w tym układu oddechowego, co może tłumaczyć jej skuteczność w leczeniu zakażeń układu oddechowego u drobiu. Jednakże biodostępność doustna była niska (4%), w porównaniu do podania podskórnego (87%). Najwyższe stężenia obserwowano w narządach silnie ukrwionych, takich jak wątroba, nerki oraz płuca. Okres półtrwania eliminacji sugerował stosunkowo długie utrzymywanie się leku w organizmie, co może mieć znaczenie dla skuteczności terapii oraz ustalania odpowiednich odstępów między dawkami, a także stosowania stosunkowo długich okresów karencji (6-8 dni). Niezbędne jest jednak dokładne dostosowanie schematów dawkowania w celu utrzymania stężeń terapeutycznych przez odpowiedni czas.

W przypadku kolistyny, po podaniu doustnym jej wchłanianie z przewodu pokarmowego było bardzo ograniczone, co skutkowało niskimi stężeniami w osoczu oraz minimalną dystrybucją do tkanek. Zjawisko to potwierdza, że działanie terapeutyczne kolistyny u drobiu ma przede wszystkim charakter miejscowy i jest związane z jej obecnością w świetle przewodu pokarmowego. Parametry farmakokinetyczne wskazywały również na niewielką objętość dystrybucji oraz brak tendencji do kumulacji w organizmie.

Linkomycyna charakteryzowała się natomiast bardzo wysoką biodostępnością po podaniu zarówno doustnym, jak i domięśniowym (ok.100%). Uzyskane wartości  $C_{max}$  oraz

AUC wskazywały na znaczną ekspozycję organizmu na lek. Obliczona objętość dystrybucji sugerowała intensywną penetrację do tkanek, co może sprzyjać skuteczności leczenia zakażeń o charakterze ogólnoustrojowym. Jednakże analiza PK/PD sugeruje, że zastosowane dawki linkomycyny mogą nie zawsze zapewniać utrzymanie odpowiedniej ekspozycji powyżej minimalnego stężenia hamującego (MIC) dla niektórych istotnych drobnoustrojów chorobotwórczych, co wskazuje na potrzebę optymalizacji schematów dawkowania, przy jednoczesnym niskim ryzyku kumulacji pozostałości w tkankach oraz relatywnie krótkim okresie karencji (1-4 dni).

Uzyskane wyniki wskazują, że farmakokinetyka antybiotyków u gęsi może znacząco różnić się od obserwowanej u innych gatunków drobiu, takich jak kury czy indyki. Różnice te mogą wynikać z odmiennych cech fizjologicznych, w tym tempa metabolizmu, budowy przewodu pokarmowego oraz różnic w dystrybucji tkanki tłuszczowej i przepływie krwi przez narządy. Otrzymane wyniki podkreślają również znaczenie analizy parametrów PK/PD przy projektowaniu schematów terapeutycznych. Odpowiednie dopasowanie dawkowania do właściwości farmakokinetycznych leku oraz wrażliwości drobnoustrojów pozwala zwiększyć skuteczność leczenia i ograniczyć ryzyko rozwoju oporności bakteryjnej, co wpisuje się w politykę One Health.

**Słowa kluczowe:** tylmikozyzna, kolistyna, linkomycyna, gęsi, farmakokinetyka, pozostałości w tkankach.

## VIII. STRESZCZENIE W JĘZYKU ANGIELSKIM

### (ABSTRACT)

Goose meat production is an important component of the poultry sector in Poland, which is among the largest producers and exporters of goose meat in Europe. However, the intensification of poultry production increases the risk of bacterial diseases, which may lead to significant economic losses. Antibiotics are commonly used in the treatment of bacterial infections in poultry, yet the number of medicinal products specifically registered for geese is limited. Consequently, veterinary practice often relies on drugs authorized for other poultry species in accordance with the cascade principle. Such an approach requires a thorough understanding of the pharmacokinetics and pharmacodynamics of the active substances used, as interspecies physiological differences may affect drug absorption, distribution, metabolism, and elimination.

Understanding the pharmacokinetics of antibiotics is essential for developing effective dosing regimens that ensure adequate therapeutic concentrations at the site of infection while minimizing the risk of adverse effects and antimicrobial resistance. Additionally, in food-producing animals, the evaluation of drug residues in edible tissues is of particular importance, as their presence may pose a risk to consumer health.

The aim of this study was a comprehensive analysis of the pharmacokinetics of selected antibiotics (tilmicosin, colistin, and lincomycin) in domestic geese. The study enabled the determination of key pharmacokinetic parameters, evaluation of bioavailability, distribution, and elimination, as well as analysis of residue depletion in the context of establishing withdrawal periods.

The study was conducted on healthy adult Biłgoraj geese divided into three experimental groups (tilmicosin,  $n = 15$ ; colistin,  $n = 16$ ; lincomycin,  $n = 16$ ). In the tilmicosin group, a three-stage design was applied: a single intravenous administration (5 mg/kg b.w.), followed by subcutaneous administration at a dose of 10 mg/kg b.w., and in the final stage, multiple oral (25 mg/kg b.w.) administration for 5 days, after which, in addition to blood, tissue samples (muscle, kidney, liver, and fat with skin) were collected between 24 and 120 hours. In the colistin group, a similar three-stage design was used: a single intravenous administration (1 mg/kg b.w.), followed by oral administration (30 mg/kg b.w.), and finally repeated oral dosing for 5 days (2.5 mg/kg b.w.). After the last stage, in addition to blood samples, tissues were also analyzed at time intervals of 6–36

hours. In the lincomycin group, four stages were implemented, including a single intravenous administration (15 mg/kg b.w.), intramuscular administration at the same dose, oral administration (50 mg/kg b.w.), and subsequent repeated oral dosing for 7 days (5 mg/kg b.w.). After completion of the final stage, both blood and tissue samples were collected (10–72 hours). A one-month washout period was applied between successive stages.

Validated chromatographic methods, including HPLC and UHPLC-MS/MS, were used for analysis, enabling quantitative determination of the investigated antibiotics in plasma and tissues. Method validation included the assessment of linearity, precision, accuracy, recovery, and limits of quantification. All developed methods complied with current EMA analytical standards.

Based on the obtained data, key pharmacokinetic parameters were determined, including maximum plasma concentration ( $C_{max}$ ), time to reach  $C_{max}$  ( $T_{max}$ ), area under the concentration–time curve (AUC), elimination half-life ( $t_{1/2}$ ), volume of distribution ( $V_d$ ), and clearance (Cl). Pharmacokinetic analyses were performed using non-compartmental methods.

In the case of tilmicosin, relatively rapid absorption after oral administration and pronounced distribution into tissues, including the respiratory system, were observed, which may explain its effectiveness in treating respiratory infections in poultry. However, oral bioavailability was low (4%) compared to subcutaneous administration (nearly 90%). The highest concentrations were observed in highly perfused organs such as the liver, kidneys, and lungs. The elimination half-life suggested relatively prolonged persistence of the drug in the body, which may be relevant for therapeutic efficacy, dosing intervals, and the application of relatively long withdrawal periods (6–8 days). However, precise optimization of dosing regimens is necessary to maintain therapeutic concentrations for an adequate duration.

In the case of colistin, following oral administration, its absorption from the gastrointestinal tract was very limited, resulting in low plasma concentrations and minimal distribution into tissues. This confirms that the therapeutic effect of colistin in poultry is primarily local and associated with its presence in the intestinal lumen. Pharmacokinetic parameters also indicated a small volume of distribution and no tendency for accumulation, suggesting a low likelihood of consumer exposure.

Lincomycin, in contrast, was characterized by very high bioavailability following both oral and intramuscular administration (approximately 100%). The obtained  $C_{max}$  and

AUC values indicated substantial systemic exposure. The calculated volume of distribution suggested extensive tissue penetration, which may enhance efficacy in the treatment of systemic infections. However, PK/PD analysis suggests that the applied lincomycin doses may not always ensure adequate exposure above the minimum inhibitory concentration (MIC) for certain clinically relevant pathogens, indicating the need for dose optimization, while maintaining a low risk of residue accumulation in tissues and a relatively short withdrawal period (1–4 days).

The results indicate that the pharmacokinetics of antibiotics in geese may differ significantly from those observed in other poultry species, such as chickens or turkeys. These differences may arise from distinct physiological characteristics, including metabolic rate, gastrointestinal structure, and differences in fat distribution and organ blood flow. The findings also highlight the importance of PK/PD analysis in designing therapeutic regimens. Appropriate adjustment of dosing to the pharmacokinetic properties of the drug and the susceptibility of microorganisms can improve treatment efficacy and reduce the risk of antimicrobial resistance, in line with the One Health approach.

**Keywords:** tilmicosin, colistin, lincomycin, geese, pharmacokinetics, tissue residues.

## IX. PIŚMIENICTWO

1. Abo El-Sooud K., Goudah A., Abd El-Aty A.M. (2004) Lack of pharmacokinetic interaction between lincomycin and aspirin in healthy goats. *J Vet Pharmacol Ther.*, 27, 5, 389-92. DOI: 10.1111/j.1365-2885.2004.00611.x.
2. Aboubakr M., Elsayd F. Soliman A., Fadl S.E., El-Shafey A., Abdelhiee E.Y. (2020) L-Carnitine and vitamin E ameliorate cardiotoxicity induced by tilmicosin in rats. *Environ Sci Pollut Res.*, 27, 23026–23034. DOI: 10.1007/s11356-020-08919-6
3. Abualhasan M.N., Batrawi N., Sutcliffe O.B., Zaid A.N. (2012) A validated stability-indicating HPLC method for routine analysis of an injectable lincomycin and spectinomycin formulation. *Sci Pharm.*, 80, 4, 977. DOI: 10.3797/scipharm.1207-13
4. Abu-Basha E. A., Idkaidek N. M., Al-Shunnaq A. F. (2007) Pharmacokinetics of tilmicosin (Provital powder and pulmotil liquid AC) oral formulations in chickens. *Vet Res Com.*, 31, 477–485. DOI: 10.1007/s11259-006-3543-6
5. AbuOun M., Stubberfield E.J., Duggett N.A., Kirchner M., Dormer L., Nunez-Garcia J., Randall L.P., Lemma F., Crook D.W., Teale C., Smith R.P., Anjum M.F. (2017) mcr-1 and mcr-2 variant genes identified in *Moraxella* species isolated from pigs in Great Britain from 2014 to 2015. *J Antimicrob Chemother.*, 72, 2745–2749. DOI: 10.1093/jac/dkx286
6. Aiello S.E.(ed) (1998) *The Merck Veterinary Manual*. 8th. Whitehouse Station: Merck & Co.
7. Al-Aziz, M.I.A., Al-Shadhili, K.A. and Al-Adawi, M.A. (2014) Drug interaction of using lincomycin HCl and diclazuril alone or together in controlling cecal coccidiosis in chickens. *Kafrelsheikh Vet Med J.*, 12, 1, 233–246.
8. Albarellos G.A, Montoya L., Denamiel G.A., Velo M.C., Landoni M.F. (2012) Pharmacokinetics and bone tissue concentrations of lincomycin following intravenous and intramuscular administrations to cats. *J Vet Pharmacol Ther.*, 35, 6, 534-40. doi: 10.1111/j.1365-2885.2011.01355.x.
9. Albarellos G.A., Bonafine R.R., Kreil V.E., Ambros L.A., Montoya L., Hallu R.E. (2003) A non-surgical jugular catheterization technique for multiple blood sampling in cats, *Lab Anim.*, 37, 188–192. DOI: 10.1111/j.1365-2885.2011.01355.x
10. Albarellos G.A., Montoya L., Denamiel G.A.A., Passini S.M., Landoni M.F. (2013) Pharmacokinetics and skin concentrations of lincomycin after intravenous and oral administration to cats. *JSAVA*, 84, 1. DOI: 10.4102/jsava.v84i1.968
11. Al-Khayyat A.A., Aronson A.L. (1973) Pharmacologic and toxicologic studies with the polymyxins. II. Comparative pharmacologic studies of the sulfate and methanesulfonate salts of polymyxin B and colistin in dogs. *Chemotherapy*, 19, 2, 82-97. DOI: 10.1159/000221443.
12. Anjum M.F., Duggett N.A., AbuOun M., Randall L., Nunez-Garcia J., Ellis R.J., Rogers J., Horton R., Brena C., Williamson S., Martelli F., Davies R., Teale C. (2016) Colistin resistance in *Salmonella* and *Escherichia coli* isolates from a pig farm in Great Britain. *J Antimicrob Chemother.*, 71, 2306–2313. DOI: 10.1093/jac/dkw149
13. Anonymous. (2012) Guideline on Bioanalytical Method Validation. EMEA/CHMP/EWP/192217/2009. EMA Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP) Rev. <https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-guidance-bioanalytical-method-validation-en.pdf> - źródło dostępne 30.03.2026r.

14. Anonymous. (2019) Guideline on determination of withdrawal periods for edible tissues. European Medicines Agency. <https://www.ema.europa.eu/en/determination-withdrawal-periods-edible-tissue-scientific-guideline>- źródło dostępne 30.03.2026r.
15. Apostolakos I., Piccirillo A. (2018) A review on the current situation and challenges of colistin resistance in poultry production. *Avian Pathology: Journal of the WVPA.*, 47, 6, 546–558. DOI: 10.1080/03079457.2018.1524573
16. Archimbault P., Boutier C., Fellous R., Muscat G. (1980) Pharmacokinetic study of colistin in cattle. *Rec Med Vet.*, 156, 9, 621–626.
17. Attia T., Latif A., El-Hanbally S., El-Gendy H., El Gendy H. (2018) Disposition kinetics, in vitro plasma protein binding and tissue residues of tilmicosin in healthy and experimentally (CRD) infected broiler chickens. *Int J Basic Clin Pharmacol.*, 7, 11, 2201–2208. DOI: 10.18203/2319-2003.ijbcp20184328
18. Avci T., Elmas M. (2014) Milk and blood pharmacokinetics of tylosin and tilmicosin following parenteral administrations to cows. *Sci World J.*, 2014, 1–6. DOI: 10.1155/2014/869096
19. Barbieri N., Nielsen D.W., Wannemuehler Y., Cavender T., Hussein A., Yan S.G., Nolan L.K., Logue C.M. (2017) Mcr-1 identified in avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC). *PLoS ONE*, 12, e0172997. DOI: 10.1371/journal.pone.0172997
20. Barbiere A.R., Neff A.W. (1976) Screening and confirmatory methods for determining lincomycin residues in animal tissues. *J Assoc Off Anal Chem.*, 59, 4, 849-854.
21. Barbour A., Scaglione F., Derendorf H. (2010) Class-dependent relevance of tissue distribution in the interpretation of anti-infective pharmacokinetic/pharmacodynamic indices. *Int J Antimicrob Agents.*, 35, 5, 431–438. DOI: 10.1016/j.ijantimicag.2010.01.023
22. Barton M.H., Parviainen A., Norton N. (2004) Polymyxin B protects horses against induced endotoxaemia in vivo. *Equine Vet J.*, 36, 5, 397-401. DOI: 10.2746/0425164044868350
23. Beier R.C., Creemer L.C., Ziprin R.L., Nisbet D.J. (2005) Production and characterization of monoclonal antibodies against the antibiotic tilmicosin. *J Agric Food Chem.* 53, 25, 9679-9688. DOI: 10.1021/jf051987x
24. Bekoff M. (2019) The healing power of geese and other animals, *PsychologyToday*, <https://www.psychologytoday.com/us/blog/animal-emotions/201907/the-healing-power-of-geese-and-other-animals> - źródło dostępne 30.03.2026r.
25. Bellamy H. M., Jr Bates B. B., Reinartz J. A. (1966) Lincomycin metabolism in patients with hepatic insufficiency: effect of liver disease on lincomycin serum concentrations. *Antimicrob Agents Chemother.*, 6, 36–41.
26. Benameura Q., Guemourb D., Hammoudic A., Aoudiad H., Aggad H., Humblet M.F., Saegerman C. (2014) Antimicrobial resistance of *Escherichia coli* isolated from chickens in West of Algeria. *Int J Sci Basic Appl Res.*, 13, 366–370.
27. Benet L. Z., Galeazzi R. L. (1979) Noncompartmental determination of the steady-state volume of distribution. *J Pharm Sci.*, 68, 1071-1074. DOI: 10.1002/jps.2600680845.
28. Biofactor, Lincofort 400, 400 mg/g proszek do podania w wodzie do picia dla świń i kur: [https://plw.urpl.gov.pl/files/Lincofort\\_ulotka\\_inf.pdf](https://plw.urpl.gov.pl/files/Lincofort_ulotka_inf.pdf) - źródło dostępne 30.03.2026r.
29. Biswas S., Brunel J.M., Dubus J.C., Reynaud-Gaubert M., Rolain J.M. (2012) Colistin: an update on the antibiotic of the 21st century. *Expert Rev Anti Infect Ther.*, 10, 8, 917-34. DOI: 10.1586/eri.12.78.

30. Blood D.C., Radostits O.M. (1989) Practical antimicrobial therapeutics: polymyxin B and colistin. W *Veterinary Medicine*, 7th Edition. Baillière Tindall (ed.), London. str. 151.
31. Boison J.O., Lee S., Matus J, (2015) A multi-residue method for the determination of seven polypeptide drug residues in chicken muscle tissues by LC-MS/MS. *Anal Bioanal Chem.*, 407, 14, 4065–4078. DOI: 10.1007/s00216-015-8644-z
32. Borowiak M., Fischer J., Hammerl J.A., Hendriksen R.S., Szabo I., Malorny B. (2017) Identification of a novel transposon-associated phosphoethanolamine transferase gene, *mcr-5*, conferring colistin resistance in d-tartrate fermenting *Salmonella enterica subsp. Enterica serovar Paratyphi B*. *J Antimicrob Chemother.*, 72, 3317–3324. DOI: 10.1093/jac/dkx327
33. Bottinelli M., Gastaldelli M., Picchi M., Dall'Ora A., Cristovao Borges L., Ramirez A. S., Matucci A., & Catania S. (2022) The monitoring of *Mycoplasma gallisepticum* minimum inhibitory concentrations during the last decade (2010-2020) seems to reveal a comeback of susceptibility to macrolides, tiamulin, and lincomycin. *Antibiotics (Basel)*, 11, 8, 1021. DOI: 10.3390/antibiotics11081021
34. Bourdo K., Fadel C., Giorgi M., Sitovs A., Poapolathep A., Łebkowska-Wieruszewska B. (2024) Disposition kinetics and tissue residues of tilmicosin following intravenous, subcutaneous, single and multiple oral dosing in geese (*Anser anser domesticus*). *J Vet Pharmacol Ther.*, 47, 5, 416-426. DOI: 10.1111/jvp.13461.
35. Brown R.B., Barza M., Bruschi J.L., Hashimoto Y., Weinstein L. (1975) Pharmacokinetics of lincomycin and clindamycin phosphate in a canine model. *J Infect Dis.*, 131, 3, 252–260. DOI: 10.1093/infdis/131.3.252
36. Brown S.A., Johnson R. A., Cragmill A.L., Wetzlich S. (1996) Linco-Spectin sterile solution in sheep. Part IV and V. Method validation and residue decline of lincomycin in sheep liver after multiple intramuscular administration at a dose of 15mg/kg. Upjohn Technical report 803-7926-95-003 i 803-7926-95-001 W Rostel B., Zmudzki J., MacNeil J. 41-13 Lincomycin – First draft. [https://www.google.com/url?sa=t&source=web&rct=j&opi=89978449&url=https://www.fao.org/fileadmin/user\\_upload/vetdrug/docs/41-13-lincomycin.pdf&ved=2ahUKEwjD1\\_WK7bWTAxVaKhAIHX3pDiEQFnoECBoQAQ&usq=AOvVaw0C5z0oDqfoeThwSzN5zTe-](https://www.google.com/url?sa=t&source=web&rct=j&opi=89978449&url=https://www.fao.org/fileadmin/user_upload/vetdrug/docs/41-13-lincomycin.pdf&ved=2ahUKEwjD1_WK7bWTAxVaKhAIHX3pDiEQFnoECBoQAQ&usq=AOvVaw0C5z0oDqfoeThwSzN5zTe-) źródło dostępne 30.03.2026r.
37. Brunton L., Lazo J., Parker K. (2011) Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, New York, NY, McGraw-Hill.
38. Buckland R., Guy G. (2002) FAO Animal Production and Health Paper 154: Goose, <https://www.fao.org/4/y4359e/y4359e00.htm> - źródło dostępne 30.03.2026r.
39. Burkin M., Galvidis I. (2012) Simultaneous separate and group determination of tylosin and tilmicosin in foodstuffs using single antibody-based immunoassay. *Food Chem.*, 132, 2, 1080-1086. DOI: 10.1080/09540105.2015.1089843
40. Burrows G.E., Barto P.B., Martin B., Tripp M.L. (1983) Comparative pharmacokinetics of antibiotics in newborn calves, lincomycin, and tylosin. *Am J Vet Res.*, 44, 1053–1057.
41. Burrows G.E., Barto P.B., Weeks B.R. (1986) Chloramphenicol, lincomycin and oxytetracycline disposition in calves with experimental pneumonic pasteurellosis. *J Vet Pharmacol Ther.* 9, 2, 213-22. DOI: 10.1111/j.1365-2885.1986.tb00032.x.
42. CAC, Codex Alimentarius Commission (2015) Maximum Residue Limits (MRLs) and Risk Management Recommendations (RMRs) for Residues of Veterinary Drugs in Foods (CAC/MRL 2-2015). Updated as at the 38th Session of the Codex Alimentarius Commission (July 2015), Food and Agriculture Organization of the

- United Nations. [https://www.fao.org/fileadmin/user\\_upload/vetdrug/docs/41-13-Lincomycin.pdf](https://www.fao.org/fileadmin/user_upload/vetdrug/docs/41-13-Lincomycin.pdf) - źródło dostępne 30.03.2026r.
43. Camilleri M., Madsen K., Spiller R., Greenwood-Van Meerveld B., Verne G.N. (2012) Intestinal barrier function in health and gastrointestinal disease. *Neurogastroenterol Motil.*, 24, 6, 503-12. DOI: 10.1111/j.1365-2982.2012.01921.x.
  44. Cangemi G., Barco S., Castagnola E., Tripodi G., Favata F., D'Avolio A. (2016) Development and validation of UHPLC–MS/MS methods for the quantification of colistin in plasma and dried plasma spots. *J Pharm Biomed Anal.*, 10, 129, 551-557. DOI: 10.1016/j.jpba.2016.08.002.
  45. Carbon C. (1998) Pharmacodynamics of macrolides, azalides, and streptogramins: Effect on extracellular pathogens. *Clin Infect Dis.*, 27, 1, 28–32. DOI: 10.1086/514619
  46. Catry B., Cavaleri M., Baptiste K., Grave K., Grein K., Holm A., Jukes H., Liebana E., Lopez Navas A., Mackay D., Magiorakos A.P, Moreno Romo M.A., Moulin G., Muñoz Madero C., Matias Ferreira Pomba M.C., Powell M., Pyörälä S., Rantala M., Ružauskas M., Sanders P., Teale C., Threlfall E.J., Törneke K., van Duijkeren E., Torren Edo J. (2015) Use of colistin-containing products within the European Union and European Economic Area (EU/EEA): development of resistance in animals and possible impact on human and animal health. *Int J Antimicrob Agents.*, 46, 3, 297-306. DOI: 10.1016/j.ijantimicag.2015.06.005.
  47. Catry B., Dewulf J., Maes D., Pardon B., Callens B., Vanrobaeys M., Opsomer G., de Kruif A., Haesebrouck F. (2016) Effect of antimicrobial consumption and production type on antibacterial resistance in the bovine respiratory and digestive tract. *PloS One*, 11, 1, e0146488. DOI: 10.1371/journal.pone.0146488
  48. Cayci M., Kilic A.S., Oruc H.H., Sariyev R. (2019) Screening of veterinary growth-promoting agent and antibacterial residues in beef cattle and broiler meats consumed in Bursa, Turkey. *J Res Vet Sci.*, 38, 1, 52-58. DOI:10.30782/uluvfd.439782
  49. Chaleva E., Dzhurov A. (1987) Toxicological and pharmacokinetic research on lincomycin hydrochloride in broiler chickens and layer hens. *Vet Med Nauki.*, 24, 8, 55-63.
  50. Chaleva E., Nguyen D.L. (1987) Pharmacokinetic research on Pharmachem's lincomycin hydrochloride in pigs. *Vet Med Nauki.*, 24, 47– 51.
  51. Chan W., Gerhardt G.C., Salisbury C.D. (1994) Determination of tylosin and tilmicosin residues in animal tissues by reversed-phase liquid chromatography. *J AOAC Int.*, 77, 2, 331-333.
  52. Chang F.N., Weisblum B. (1967) The specificity of lincomycin binding to ribosomes. *Biochemistry.* 6, 3, 836-43. DOI: 10.1021/bi00855a025.
  53. Cheah S.E., Wang J., Nguyen V.T., Turnidge J.D., Li J., Nation R.L. (2015) New pharmacokinetic/pharmacodynamic studies of systemically administered colistin against *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* in mouse thigh and lung infection models: smaller response in lung infection. *J Antimicrob Chemother.*, 70, 12, 3291–3297. DOI: 10.1093/jac/dkv267
  54. Chen Y., Ji X., Zhang S., Wang W., Zhang H., Ding H. (2023) Pharmacokinetic/pharmacodynamic integration of tilmicosin against *Pasteurella multocida* in a piglet tissue cage model. *Front Vet Sci.*, 10, 1260990. DOI: 10.3389/fvets.2023.1260990
  55. Chepyala D., Tsai I.L., Sun H.Y., Lin S.W., Kuo C.H. (2015) Development and validation of a high-performance liquid chromatography-fluorescence detection method for the accurate quantification of colistin in human plasma. *J Chromatogr B*

- Analyt Technol Biomed Life Sci., 1, 980, 48-54. DOI: 10.1016/j.jchromb.2014.12.015.
56. Chiou C.S., Chen Y.T., Wang Y.W., Liu Y.Y., Kuo H.C., Tu Y.H., Lin A.C., Liao Y.S., Hong Y.P. (2017) Dissemination of mcr-1-carrying plasmids among colistin-resistant *Salmonella* strains from humans and food-producing animals in Taiwan. *Antimicrob Agents Chemother.*, 61. DOI: 10.1128/AAC.00338-17
  57. Choosakoonkriang S., Supaluknari S., Puangkaew P. (2013) High performance liquid chromatographic method for determination of colistin sulfate and its application in medicated premix and animal feed. W: *Proceedings of World Academy of Science, Engineering and Technology. World Academy of Science, Engineering and Technology (WASET)*, 733.
  58. Christodoulouopoulos G. (2009) Adverse outcome of using tilmicosin in a lamb with multiple ventricular septal defects. *Can Vet J.*, 50, 1, 61-3. DOI: 10.4141/cjas70-008.
  59. Clark C., Dowling P. M., Ross S., Woodbury M., Boison J. O. (2008) Pharmacokinetics of tilmicosin in equine tissues and plasma. *J Vet Pharmacol Ther.*, 31, 1, 66–70. DOI: 10.1111/j.1365-2885.2007.00909.x
  60. Clark C., Dowling, P., Boison J. (2009) Development and validation of a method for determination of tilmicosin residues in equine plasma and tissues using HPLC. *J Liq Chromatogr Relat Technol.*, 32, 19, 2839-2856. DOI: 10.1080/10826070903288862
  61. Clark C., Woodbury M., Dowling P., Ross S., Boison J.O. (2004) A preliminary investigation of the disposition of tilmicosin residues in elk tissues and serum. *J Vet Pharmacol Ther.*, 27, 5, 385-7. DOI: 10.1111/j.1365-2885.2004.00609.x.
  62. Cobelli C., Toffolo G. (1984) Compartmental vs. noncompartmental modeling for two accessible pools. *Am J Physiol.*, 247, 488-496. DOI: 10.1152/ajpregu.1984.247.3.R488
  63. Coleman M.R., Peloso J. S., Moran J.W. (1995) Microbiological plate assay for determination of tilmicosin in bovine serum. *J of AOAC Intern.*, 78, 3, 659-662.
  64. Concordet D., Toutain P.L. (1997a) The withdrawal period estimation of veterinary drugs: a non-parametric approach. *J Vet Pharmacol Therap.*, 20, 374-379. DOI: 10.1046/j.1365-2885.1997.00077.x
  65. Concordet D., Toutain P.L. (1997b) The withdrawal period estimation of veterinary drugs revisited. *J Vet Pharmacol Therap.*, 20, 380-386. DOI: 10.1046/j.1365-2885.1997.00076.x
  66. Couet W., Grégoire N., Marchand S., Mimoz O. (2012) Colistin pharmacokinetics: the fog is lifting. *Clin Microbiol Infect.*, 18, 1, 30-9. DOI: 10.1111/j.1469-0691.2011.03667.x.
  67. Crellin K.C., Sible E., Van Antwerp J. (2003) Quantification and confirmation of identity of analytes in various matrices with in-source collision-induced dissociation on a single quadrupole mass spectrometer. *Int J Mass Spectrom.*, 222, 1-3, 281-311. DOI:10.1016/S1387-3806(02)01023-0
  68. Cutler D.J. (1978) Linear systems analysis in pharmacokinetics. *J Pharmacokinet Biopharm.*, 6, 3, 265-82. DOI: 10.1007/BF01312266.
  69. Cybulski W. (2002) Standardy toksykologiczne stosowane u zwierząt konsumpcyjnych. *Mag. Wet.* 11, 10-14.
  70. Czarniak P., Boddy M., Sunderland B., Hughes J.D. (2016) Stability studies of lincomycin hydrochloride in aqueous solution and intravenous infusion fluids. *Drug Des Devel Ther.*, 7, 10, 1029-34. DOI: 10.2147/DDDT.S94710.
  71. Dai C., Li J., Tang S., Li J., Xiao X. (2014) Colistin-induced nephrotoxicity in mice involves the mitochondrial, death receptor, and endoplasmic reticulum pathways. *Antimicrob Agents Chemother.*, 58, 4075–4085. DOI: 10.1128/AAC.00070-14

72. Danysz A. (1996) *Podstawy farmakologii*. Volumed, Wrocław.
73. Davis S.S., Hardy J.G., Fara J.W. (1986) Transit of pharmaceutical dosage forms through the small intestine. *Gut*, 27, 8, 886–892. DOI: 10.1136/gut.27.8.886
74. De Vos P., Garrity G.M., Jones D., Krieg N.R., Ludwig W., Rainey F.A., Schleifer K.H., Whitman W.B. (2009) *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. New York: Springer.
75. Decolin D., Leroy P., Nicolas A., Archimbault P. (1997) Hyphenated liquid chromatographic method for the determination of colistin residues in bovine tissues. *J Chromatogr Sci.*, 35, 557-564. DOI: 10.1093/chromsci/35.12.557
76. DeGeeter M.J., Stahl G.L., Geng S. (1976) Effect of lincomycin on prevalence, duration, and quantity of *Salmonella typhimurium* excreted by swine. *Am J Vet Res.*, 37, 5, 525-9. DOI:10.2460/ajvr.1976.37.05.525
77. Delannoy S., Le D.L., Jouy E., Fach P., Drider D., Kempf I. (2017) Characterization of colistin-resistant *Escherichia coli* isolated from diseased pigs in France. *Front Microbiol.*, 8, 2278. DOI: 10.3389/fmicb.2017.02278
78. Dimitrova, D., Georgiev, K., Holding, A. M. E. T. A., Tsoneva, D. (2012) Pharmacokinetics of tilmicosin in broiler chickens after single oral application. *J M. Agric Balk. (Bulgaria)*, 15(1), 1–12.
79. Dotsikas Y., Markopoulou C.K., Koundourellis J.E., Loukas Y.L. (2011) Validation of a novel LC-MS/MS method for the quantitation of colistin A and B in human plasma. *J Sep Sci.* 34, 1, 37-45. DOI: 10.1002/jssc.201000680.
80. Draisci R., Palleschi L., Ferretti E., Achene .L, Cecilia A. (2001) Confirmatory method for macrolide residues in bovine tissues by micro-liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A.*, 10, 926, 1, 97-104. DOI: 10.1016/s0021-9673(01)00838-x.
81. Eadon M.T., Hack B.K., Alexander J.J., Xu C., Dolan M.E., Cunningham P.N. (2013) Cell cycle arrest in a model of colistin nephrotoxicity. *Physiol Genomics.*, 45, 877–888. DOI: 10.1152/physiolgenomics.00076.2013
82. EFSA (2012). The European Union summary report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2010. *EFSA J*, 10: 2598.
83. Egutkin N. L., Maidanov V.V., Nikitin Y.E. (1984) Colorimetric determination of lincomycin in the form of a Pd complex. *Pharm Chem J.*, 18, 2, 128-130. DOI:10.1007/BF00758844
84. Eichhorn G., Enstipp M. R., Georges J. Y., Hasselquist D., Nolet B. A. (2019) Resting metabolic rate in migratory and non-migratory geese following range expansion: Go south, go low. *Oikos*, 128, 10, 1424–1434. DOI:10.1111/oik.06468
85. El Ries M.A. (1994) Spectrophotometric and indirect determination of lincomycin by atomic absorption spectroscopy (AAS). *Anal Lett.*, 27, 8, 1517-1531. DOI:10.1080/00032719408006386
86. El Tahir Y., Elshafie E.I., Asi M.N., Al-Kharousi K., Al Toobi A.G., Al-Wahaibi Y., Al-Marzooqi W. (2021) Detection of residual antibiotics and their differential distribution in broiler chicken tissues using enzyme-linked immunosorbent assay. *Antibiotics (Basel).*, 26, 10, 11, 1305. DOI: 10.3390/antibiotics10111305.
87. Elbadawy, M., Aboubakr, M. (2017) Efficacy of colimox® (a new combination of amoxicillin and colistin) in the control of experimentally induced necrotic enteritis in broiler chickens. *Int J Pharmacol Toxicol.*, 5, 1, 51-56. DOI: 10.14419/ijpt.v5i1.7193

88. Elbadawy, M., Aboubakr, M., Abugomaa, A. (2019) Pharmacokinetics of tylvalosin in broiler turkeys (*Meleagris Gallopavo*) after single intravenous and oral administration. *Front Vet Sci.*, 6, 355. DOI:10.3389/fvets.2019.00355
89. Elkomy A., Aboubakr M. (2020) Bioequivalence study of two oral lincomycin formulations (lincopharm 800<sup>®</sup> and lincoyosr<sup>®</sup>) in broiler chickens. *J Pharmacol Toxicol.*, 8, 1, 60-64. DOI:10.14419/ijpt.v8i1.30478
90. Elkomy A., Abd E.-H. A., Elsayed M., Gamal E.-D. A., Mobarez E. A., Azoz H. A., Afify A. E. (2016) Pharmacokinetics of tilmicosin in healthy and experimentally *Pastreulla Multocida* infected lactating goats. *WJPPS.*, 5, 2429–2438. DOI: 10.20959/wjpps20166-7091
91. Elkomy A., Eltanany N., Aboubakr M., Roushdy M.Z., Elbadawy M. (2018) Pharmacokinetics and tissue residues of tilmicosin in normal and experimentally *Mycoplasma gallisepticum*-infected broiler chickens. *Benha Med J.*, 34, 188–205. DOI:10.21608/bvmj.2018.44745
92. Elkomy A.A., Farag E., El Gharbawy E.S.I, Elbadawy M. (2019) Comparative studies on the efficacy of lincomycin and bacitracin for the control of necrotic enteritis in broiler chickens. *Int J Basic Clin Pharmacol.*, 8, 6, 1153–1158. DOI: 10.18203/2319-2003.ijbcp20192177
93. Elsayed M., Elkomy A., Aboubakr M., Morad M. (2014) Tissue residues, hematological and biochemical effects of tilmicosin in broiler chicken. *Vet Med Int.*, 502872. DOI: 10.1155/2014/502872
94. Elverdam I., Larsen P., Lund E. (1981) Isolation and characterization of three new polymyxins in polymyxins B and E by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr A.*, 218, 653-661. DOI: 10.1016/s0021-9673(00)82091-9
95. EMA, European Medicines Agency. (1998) Lincomycin: Summary report (EMEA/MRL/497/98-FINAL-corr1). [https://www.ema.europa.eu/en/documents/mrl-report/lincomycin-summary-report-1-committee-veterinary-medicinal-products\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/mrl-report/lincomycin-summary-report-1-committee-veterinary-medicinal-products_en.pdf) - źródło dostępne 30.03.2026r.
96. EMA, The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products, Veterinary Medicines Evaluation Unit, Committee for Veterinary Medicinal Products. (2002) Tilmicosin (extension to chicken), summary report 2. Retrieved from <http://www.emea.eu.int/pdfs/vet/mrls/039098en.pdf> - źródło dostępne 30.03.2026r.
97. Escoula L., Coste M., Larrieu G. (1981) Biodisponibilité de l'association érythromycine-colistine chez les veaux. *Ann Rech Vet.*, 12, 321-326.
98. Fadel C., Łebkowska-Wieruszewska B., Lisowski A., Laut S., Poapolathep A., Giorgi M. (2023) Disposition kinetics of robenacoxib following intravenous and oral administration in geese (*Anser anser domesticus*). *J Vet Pharmacol Ther.*, 46, 6, 413–420. DOI: 10.1111/jvp.13398
99. Fadel C., Łebkowska-Wieruszewska B., Sartini I., Lisowski A., Poapolathep A., Giorgi M. (2022) Robenacoxib pharmacokinetics in sheep following oral, subcutaneous, and intravenous administration. *J Vet Pharmacol Ther.*, 45, 550–557. DOI: 10.1111/jvp.13089
100. Fahr A., Hoogevest P. V., May S., Bergstrand N. Leigh S.M.L. (2005) Transfer of lipophilic drugs between liposomal membranes and biological interfaces: Consequences for drug delivery. *Eur J Pharm Sci.*, 26, 251-265. DOI: 10.1016/j.ejps.2005.05.012.
101. Falagas M.E., Kasiakou S.K. (2005) Colistin: the revival of polymyxins for the management of multidrug-resistant gram-negative bacterial infections. *Clin Infect Dis.*, 1, 40, 9,1333-41. DOI: 10.1086/429323.

102. FAO (2006) Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. Meeting. Residue Evaluation of Certain Veterinary Drugs: Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, 66th Meeting 2006 (Vol. 2). Food & Agriculture Org. <https://www.fao.org/4/a0652e/a0652e.pdf> - źródło dostępne 30.03.2026r.
103. FAO (2009) TILMICOSIN, First draft prepared by Shixin Xu, Beijing, China and Dieter Arnold, Berlin, Germany - Addendum to the monographs prepared by the 47th meeting of the Committee and published in the FAO Food and Nutrition Paper 41/9: [https://www.fao.org/fileadmin/user\\_upload/vetdrug/docs/6-2009-tilmicosin.pdf](https://www.fao.org/fileadmin/user_upload/vetdrug/docs/6-2009-tilmicosin.pdf) - źródło dostępne 30.03.2026r.
104. FAO (2019) FAO statistical database (FAOstat), <https://www.fao.org/faostat/en/> - źródło dostępne 30.03.2026r.
105. FAO, Expert Committee on Food Additives (2004) Residues of some veterinary drugs in animals and foods: FAO Food and Nutrition Paper. [https://www.fao.org/fileadmin/user\\_upload/vetdrug/docs/41-13-lincomycin.pdf](https://www.fao.org/fileadmin/user_upload/vetdrug/docs/41-13-lincomycin.pdf) - źródło dostępne 30.03.2026r.
106. Farrington W.H., Cass S.D., Patey A.L., Shearer G. (1988) A method for the analysis of lincomycin in porcine and bovine kidney. *Food Addit Contam.*, 5, 1, 67-75. DOI: 10.1080/02652038809373664.
107. Fass R.J. (1981) Lincomycin and clindamycin. In: Kagan, B.M., ed., *Antimicrobial Therapy*, 3rd Ed., Philadelphia: W.B. Saunders Co., str. 97-114.
108. Fekry E., Abdeen E., Hashem Y.M., Abdelaziz E.E., Mostapha A.E.D.H. (2023) Molecular characterization and antimicrobial susceptibility of *Mycoplasma* species isolated from broilers and breeder chickens. *Alex J Vet Sci.*, 79, 1, 17–23. DOI: 10.5455/ajvs.148713
109. Fish R.D. (2000) Withdrawal time estimation of veterinary drugs: extending the range of statistical methods. *J Vet Pharmacol Therap.*, 23, 159-162. DOI: 10.1046/j.1365-2885.2000.00256.x
110. Fricke J. A., Clark C. R., Boison J. O., Chirino-Trejo M., Inglis T. E., Dowling P. M. (2008) Pharmacokinetics and tissue depletion of tilmicosin in turkeys. *J Vet Pharm Therap.*, 31, 6, 591–594. DOI: 10.1111/j.1365-2885.2008.00985.x
111. Friedlander L.G., Arnold D. (2006) Colistin. [http://www.fao.org/fileadmin/user\\_upload/vetdrug/docs/2-2006-colistin.pdf](http://www.fao.org/fileadmin/user_upload/vetdrug/docs/2-2006-colistin.pdf) - źródło dostępne 30.03.2026r.
112. Froman J., Gross L., Curatola S. (1970) Serum and urine levels following parenteral administration of sodium colistimethate to normal individuals. *J Urol.*, 103, 2, 210-214. DOI: 10.1016/s0022-5347(17)61924-4.
113. Fu Q., Li X., Zheng K., Ke Y., Wang Y., Wang L., Yu F., Xia X. (2017) Determination of colistin in animal tissues, egg, milk, and feed by ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Food Chem.* 15, 248, 166-172. DOI: 10.1016/j.foodchem.2017.12.029.
114. Gabrielsson J., Weiner D. (2001) *Pharmacokinetic and pharmacodynamic data analysis: concepts and applications*. 4th ed. Sweden: Swedish Pharmaceutical Press.
115. Gao G., Zhao X., Li Q., He C., Zhao W., Liu S., Ding J., Ye W., Wang J., Chen Y., Wang H., Li J., Luo Y., Su J., Huang Y., Liu Z., Dai R., Shi Y., Meng H., Wang Q. (2016) Genome and metagenome analyses reveal adaptive evolution of the host and interaction with the gut microbiota in the goose. *Sci Rep.*, 6, 32961. DOI: 10.1038/srep32961
116. Garcia M.A., Solans C., Aramayona J.J., Rueda S., Bregante M.A. (2000) Development of a method for the determination of danofloxacin in plasma by HPLC

- with fluorescence detection. *Biomed Chromatogr.*, 14, 89–92. DOI:10.1002/(SICI)10990801(200004)
117. Ghanjaoui M. E., Ghanjaoui A., Mandil A., Ait Sidi Mou A., Slimani R. (2020) High performance liquid chromatography quality control. *Int J Adv Chem.*, 8, 160-169.
  118. Gheith I., El-Mahmoudy A., Elmajdoub A., Awidat S. (2015) Pharmacovigilance of Tilmicosin in Mice. *Acta Sci Vet.*, 43, 1318.
  119. Giguère S. (2013) Macrolides, azalides, and ketolides. W S. Giguère, J. F. Prescott, & P. M. Dowling (Eds.), *Antimicrobial therapy in veterinary medicine*. John Wiley & Sons. DOI:10.1002/9781118675014.ch13
  120. Gilbert D.N. (1994) Aspects of the safety profile of oral antibacterial agents. *Infect Dis Clin Pract.*, 3, 236-247.
  121. Goetting V., Lee K.A., Tell L.A. (2011) Pharmacokinetics of veterinary drugs in laying hens and residues in eggs: a review of the literature. *J Vet Pharmacol Therap.*, 34, 521–556. DOI: 10.1111/j.1365-2885.2011.01287.x
  122. Goodman L.S., Gilman A., eds (1975) *The Pharmacological Basis of Therapeutics*, 5th ed., New York: Macmillan Publishing Co., str. 1227-1228.
  123. Gouri S. Venkatachalam D., Dumka V.K. (2014) Pharmacokinetics of lincomycin following single intravenous administration in buffalo calves. *Trop Anim Health Prod.*, 46, 6, 1099-1102. DOI:10.1007/s11250-014-0595-4.
  124. Gourlay R. N., Thomas L. H., Wyld S. G., Smith C. J. (1989) Effect of a new macrolide antibiotic (tilmicosin) on pneumonia experimentally induced in calves by *Mycoplasma bovis* and *Pasteurella haemolytica*. *Res Vet Sci.*, 47, 1, 84–89.
  125. Grégoire N., Aranzana-Climent V., Magr'éault S., Marchand S., Couet W. (2017) Clinical Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Colistin. *Clin Pharmacokinet.*, 56, 12, 1441–1460. DOI:10.1007/s40262-017-0561-1
  126. Grabowski T. (2015) Farmakokinytyka i biofarmacja, [www.biokinetica.pl](http://www.biokinetica.pl) - źródło dostępne 30.03.2026r.
  127. Greenlees, K.J., Anadon, A., & Cerniglia, C. (2000). Lincomycin. In: *Toxicological evaluation of certain veterinary drug residues in food*. WHO Food Additives Series 45. Geneva. <https://www.inchem.org/documents/jecfa/jecmono/v45je02.htm>- źródło dostępne 30.03.2026r.
  128. Gróznér D., Kreizinger Z., Sulyok K.M., Rónai Z., Hrivnák V., Turcsányi I., Jánosi S., Gyuranecz M. (2016) Antibiotic susceptibility profiles of *Mycoplasma* sp. 1220 strains isolated from geese in Hungary. *BMC Vet Res.*, 12, 1, 170. DOI:10.1186/s12917-016-0799-0
  129. Grubb B.R. (1983) Allometric relations of cardiovascular function in birds. *Am J Physiol.*, 245, 4, 567–572. DOI:10.1152/ajpheart.1983.245.4.H567
  130. Guo Y., Xie X., Diao Z., Wang Y., Wang B., Xie K., Wang X., Zhang P. (2021) Detection and determination of spectinomycin and lincomycin in poultry muscles and pork by ASE-SPE-GC-MS/MS. *J Food Compos Anal.*, 101, 103979. DOI: 10.1016/j.jfca.2021.103979
  131. Guyonnet J., Manco B., Baduel L., Kaltsatos V., Aliabadi M.H., Lees P. (2010) Determination of a dosage regimen of colistin by pharmacokinetic/pharmacodynamic integration and modeling for treatment of G.I.T. disease in pigs. *Res Vet Sci.*, 88, 2, 307–314. DOI:10.1016/j.rvsc.2009.09.001
  132. Hamdy A.H., Kratzer D.D. (1981) Therapeutic effects of parenteral administration of lincomycin on experimentally transmitted swine dysentery. *Am J Vet Res.*, 42, 2, 178-182.
  133. Hermann T.W. (2002) Farmakokinytyka. Teoria i praktyka. PZWL.

134. Herrera M., Ding H., McClanahan R., Owens J.G., Hunter R.P. (2007) Quantitative determination of tilmicosin in canine serum by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.*, 15, 857, 1, 9-14. DOI: 10.1016/j.jchromb.2007.06.017.
135. Hoar B.R., Jelinski M.D., Ribble C.S., Janzen E.D., Johnson J.C. (1998) A comparison of the clinical field efficacy and safety of florfenicol and tilmicosin for the treatment of undifferentiated bovine respiratory disease of cattle in western Canada. *Can Vet J.*, 39, 161-166.
136. Holska W., Gwozdz E. (1989) Determination of colistin concentration by isotachopheresis. *J Liq Chromatogr Relat Technol.*, 12, 14, 2761-2767.
137. Hornish R.E., Gosline R.E., Nappier J.M. (1987) Comparative metabolism of lincomycin in the swine, chicken, and rat. *Drug Metab Rev.*, 18, 177-214. DOI: 10.3109/03602538708998305
138. Horton D., Wander J.D., Foltz R.L. (1974) Chemical-ionization mass spectrometry of lincomycin and clindamycin, *Anal Biochem.*, 59, 2, 452-461, DOI:10.1016/0003-2697(74)90298-X.
139. Hou L., Jiang Z., Ye M., Sun X., Liu K., Zhu Y., Wang X., Chen L., Gu R., Fang B. (2024) Determination of lincomycin residues of animal derived food by pre-column derivatization with HPLC-UVD. *Arab J Chem.*, 17, 1, 105439. DOI:10.1016/j.arabjc.2023.105439
140. Huang J.X., Yao C.Y., Yang J.Y., Li Z.F., He F., Tian Y.X., Wang H., Xu Z.L., Shen Y.D. (2019a) Design of Novel Haptens and Development of Monoclonal Antibody-Based Immunoassays for the Simultaneous Detection of Tylosin and Tilmicosin in Milk and Water Samples. *Biomolecules.* 23, 9, 12, 770. DOI:10.3390/biom9120770
141. Huang Z., Hu Z., Zheng H., Xia X., Gu X., Shen X., Yang H., Ding H. (2020) The PK/PD integration and resistance of tilmicosin against *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Pathogens (Basel)*, 9, 6, 487. DOI:10.3390/pathogens9060487
142. Huang Z., Wu Y., Zhou Z., Xia X., Gu X., Cai Q., Shen X., Yang, H., Ding H. (2019b) Pharmacokinetic and pharmacodynamic integration and resistance analysis of tilmicosin against *mycoplasma gallisepticum* in an in vitro dynamic model. *Front Pharmacol.*, 10, 670. DOI:10.3389/fphar.2019.00670
143. Huimin L., Ji-An, L. I., Jin-Gang N. I. U. (2012) Application of Flow Feeding Technology to Lincomycin Fermentation. *Chin J Pharm.*, 43, 739-742. [https://caod.oriprobe.com/articles/30952011/Application\\_of\\_Flow\\_Feeding\\_Technology\\_to\\_Lincomyc.htm](https://caod.oriprobe.com/articles/30952011/Application_of_Flow_Feeding_Technology_to_Lincomyc.htm) - źródło dostępne 30.03.2026r.
144. Ji L.W., Dong L.L., Ji H., Feng X.W., Li D., Ding R.L., Jiang S.X. (2014) Comparative pharmacokinetics and bioavailability of tylosin tartrate and tylosin phosphate after a single oral and i.v. administration in chickens. *J Vet Pharmacol Ther.*, 37, 3, 312–315. DOI:10.1111/jvp.12092
145. Ji X., Yang H., Wang J., Zhou W., Wang X., Qian M. (2019) Evaluation of Tilmicosin Contamination in Eggs Following Its Administration to Laying Hens and Subsequent Assessment of Dietary Risks to Chinese Consumers. *J Food Sci.*, 84, 10, 3054-3062. DOI: 10.1111/1750-3841.14794.
146. Jordan F.T., Horrocks B.K. (1996) The minimum inhibitory concentration of tilmicosin and tylosin for *mycoplasma gallisepticum* and *Mycoplasma synoviae* and a comparison of their efficacy in the control of *Mycoplasma gallisepticum* infection in broiler chicks. *Avian Dis.*, 40, 2, 326-334.
147. Jordan W.H., Byrd R.A., Cochrane R.L., Hanasono G.K., Hoyt J.A., Main B.W., Meyerhoff R.D., Sarazan R.D. (1993) A review of the toxicology of the antibiotic Micotil 300. *Vet Hum Toxicol.*, 35, 151–158.

148. Joshi P.R., Thummeepak R., Paudel S.; Acharya M., Pradhan S., Banjara M.R., Leungtongkam U., Sitthisak S. (2019) Molecular characterization of colistin-resistant *Escherichia coli* isolated from chickens: First report from Nepal. *Microb Drug Resist.*, 25, 846–854. DOI: 10.1089/mdr.2018.0326.
149. Juhel-Gaugain M., Anger B., Laurentie M. (1999) Multiresidue chromatographic method for the determination of macrolide residues in muscle by high-performance liquid chromatography with UV detection. *J AOAC Int.*, 82, 5, 1046-1053.
150. Julious S.A., Debnarot C.A.M. (2000) Why are pharmacokinetic data summarized by arithmetic means? *J Biopharm Stat.*, 10, 55–71. DOI:10.1081/BIP-100101013
151. Kagan F., Grostic M.F. (1972) Mass spectra of lincomycin, lincomycin analogs and degradation products. *J Mass Spectrom.*, 6, 11, 1217-1223. DOI: 10.1002/oms.1210061107
152. Kalill H.M., Mohamed A.S., El Said H.A., Salah H., El Deen M.S. (2022) Studies on the Compatibility between lincomycin and kitassamycin in the control of necrotic enteritis in broiler chickens. *Med Agric Environ Sci.*, 2, 2, 3–12. DOI:10.55162/mcaes.02.010
153. Kaneene J.B., Coe P.H., Smith J.H., Rapnicki P., Smith C.L., Gerloff B., Morrow D.A. (1986) Drug residues in milk after intrauterine injection of oxytetracycline, lincomycin-spectinomycin, and povidone-iodine in cows with metritis. *Am J Vet Res.*, 47, 6, 1363-1365.
154. Kapusnik-Uner J.E., Sande M.A., Chambers H.F. (1996) Chapter 47. Antimicrobial agents (continued): Tetracyclines, chloramphenicol, erythromycin, and miscellaneous antibacterial agents. W: Hardeman, J.G. & Limbird, L.E., eds, Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, 9th Ed., New York:MacMillan, str. 1123-1152.
155. Karnik N.D., Sridharan K., Jadhav S.P., Kadam P.P., Naidu R.K., Namjoshi R.D., Gupta V., Gore M.S., Surase P.V., Mehta P.R., Gogtay J.A., Thatte U.M., Gogtay N.J. (2013) Pharmacokinetics of colistin in critically ill patients with multidrug-resistant Gram-negative bacilli infection. *Eur J Clin Pharmacol* 69, 7, 1429–1436. DOI: 10.1007/s00228-013-1493-9.
156. Kart A., Karapehliyan M., Yapar K., Citil M., Akpınar A. (2007) Protection through L-Carnitine on tissue oxidant status and sialic acid content in tilmicosin-induced alterations in BALB/c Mice. *Acta Vet Brno.*, 76, 203–207. DOI: 10.2754/avb200776020203
157. Katzung B.G., Masters S.B., Trevor A.J. (2004) Basic & clinical pharmacology. McGraw-Hill Education.
158. Kaufmann A., Widmer M. (2013) Quantitative analysis of polypeptide antibiotic residues in a variety of food matrices by liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. *Anal Chim Acta*, 797, 81-88. DOI: 10.1016/j.aca.2013.08.032
159. Keleş O., Bakirel T., Sener S. (2001) Pharmacokinetics and tissue levels of tilmicosin in fowls. *Turk J Vet Anim Sci.*, 25, 629–634. <https://journals.tubitak.gov.tr/veterinary/vol25/iss4/30-> źródło dostępne 30.03.2026r.
160. Kempf I., Fleury M.A., Drider D., Bruneau M., Sanders P., Chauvin C., Madec J.Y., Jouy E. (2013) What do we know about resistance to colistin in Enterobacteriaceae in avian and pig production in Europe? *Int J Antimicrob Agents.*, 42, 379–383. DOI: 10.1016/j.ijantimicag.2013.06.012
161. Kempf I., Reeve-Johnson L., Gesbert F., Guittet M. (1997) Efficacy of tilmicosin in the control of experimental *Mycoplasma gallisepticum* infection in chickens. *Avian Dis.*, 41, 4, 802-807.

162. Khalil S.R., Abdel-Motal S.M., Abd-Elsalam M., Abd El-Hameed N.E., Awad A. (2020) Restoring strategy of ethanolic extract of *Moringa oleifera* leaves against Tilmicosin-induced cardiac injury in rats: Targeting cell apoptosis-mediated pathways. *Gene.*, 10, 730, 144272. DOI: 10.1016/j.gene.2019.144272.
163. Khan E.A, Ma J, Xiaobin M, Jie Y, Mengyue L, Hong L, Shah L, Liu A. (2021) Safety evaluation study of lincomycin and spectinomycin hydrochloride intramuscular injection in chickens. *Toxicol Rep.*, 9, 204–209. DOI: 10.1016/j.toxrep.2022.01.012.
164. Kim J.H., Ko J.W., Kim J.W., Jeong J.S., Kim C.Y., Shin I.S., Kim T.W. (2024) Oral bioavailability and egg drug residue of lincomycin in laying hens after different treatment. *Poult Sci.*, 103, 1, 103147. DOI: 10.1016/j.psj.2023.103147.
165. Kitagawa T., Ohtani W., Maeno Y., Fujiwara K., Kimura Y. (1985) Sensitive enzyme immunoassay of colistin and its application to detect residual colistin in rainbow trout tissue. *J Assoc Off Anal Chem.*, 68, 4, 661–664.
166. Koch-Weser J., Sidel V.W., Federman E.B., Kanarek P., Finer D.C., Eaton A.E. (1970) Adverse effects of sodium colistimethate. Manifestations and specific reaction rates during 317 courses of therapy. *Ann Intern Med.*, 72, 6, 857–868. DOI: 10.7326/0003-4819-72-6-857
167. Komura S., Kurahashi K. (1979) Partial purification and properties of L-2,4-diaminobutyric acid activating enzyme from a polymyxin E producing organism. *J Biochem.*, 86, 1013–1021. DOI: 10.1093/oxfordjournals.jbchem.a132594.
168. Konturek P. C., Brzozowski T., Konturek S. J. (2011) Stress and the gut: pathophysiology, clinical consequences, diagnostic approach and treatment options. *J Physiol Pharmacol.*, 62, 6, 591–599.
169. Kozák J. (2021) Goose production and goose products. *Worlds Poult Sci J.*, 77, 403–414. DOI:10.1080/00439339.2021.1885002
170. Kozdruń W., Czekaj H., Styś-Fijoł N., Piekarska K. (2018) Problemy lekarsko-weterynaryjne u drobiu wodnego, cz.I. Choroby bakteryjne drobiu wodnego. *Polskie drobiarstwo*, 12, 52-55.
171. Kozdruń W., Czekaj H., Styś-Fijoł N., Piekarska K. (2019) Problemy lekarsko-weterynaryjne u drobiu wodnego, cz.II. Choroby bakteryjne drobiu wodnego. *Polskie drobiarstwo*, 1, 55-59.
172. Kristensen H.K., Hansen S.H. (1993) Separation of polymyxins by micellar electrokinetic capillary chromatography. *J Chromatogr A.*, 628, 2, 309-315. DOI: 10.1016/0021-9673(93)80013-X
173. Książkiewicz J. (2006) The role and importance of geese species included by genetic stock protection program. *Wiadomosci Zootechniczne*, 4, 34–38.
174. Kucers A., Bennet N.McK. (1979) *The Use of Antibiotics. A Comprehensive Review with Clinical Emphasis*, 3rd Ed., London, William Heinemann Medical Books, str. 470-495.
175. Kumar H., Chen B.H., Kuca K., Nepovimova E., Kaushal A., Nagraik R., Bhatia S.K., Dhanjal D.S., Kumar V., Kumar A., Upadhyay N.K., Verma R., Kumar D. (2020) Understanding of colistin usage in food animals and available detection techniques: a review. *Animals*, 10, 10, 1892. DOI:10.3390/ani10101892.
176. Kumar H., Kumar D., Nepovimova E., Oulkar D., Kumar A., Azad R.M.R., Budakoti S. K., Upadhyay N.K., Verma R., Kučca K. (2021) Determination of Colistin B in chicken muscle and egg using ultra-high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Int J Environ Res Public Health.*, 18, 5, 2651. DOI:10.3390/ijerph18052651.

177. Kuroha M., Son D.-S., Shimoda M. (2001) Effects of altered plasma  $\alpha$ -1-acid glycoprotein levels on pharmacokinetics of some basic antibiotics in pigs: simulation analysis. *J Vet Pharam Therap.*, 24, 6, 423-431. DOI:10.1046/j.1365-2885.2001.00367.x
178. Lacourse W.R., Dasenbrock C.O. (1999) Pulsed electrochemical detection of sulfur-containing antibiotics following high performance liquid chromatography. *J Pharm Biomed Anal.*, 19, 1-2, 239-252. DOI:10.1016/S0731-7085(98)00089-2
179. Lashev L., Haritova A. (2003) Pharmacokinetics of colistin in broiler chickens. *Bulg J Vet Med.*, 6, 1, 21–26.
180. Le T., He H., Niu X., Chen Y., Xu J. (2013) Development of an immunochromatographic assay for detection of tylosin and tilmicosin in muscle, liver, fish and eggs. *Food Agric Immunol.*, 24, 4, 467–480. DOI:10.1080/09540105.2012.716025
181. Le T., Zhu L., Yang X. (2015) A quantum dot-based immunoassay for screening of tylosin and tilmicosin in edible animal tissues. *Food Addit. Contam. Part A*, 32, 5, 719-724. DOI: 10.1080/19440049.2015.1020529
182. Lee H.J., Kim K.B. (2011) Application of Column-Switching Methods in HPLC for Evaluating Pharmacokinetic Parameters. *Adv Chromatogr.*, 49, 291-340. DOI: 10.1201/b10721-8.
183. Leksykon.com.pl (2025) <https://leksykon.com.pl/leksykon-lekow/colistin-tzf-100015412/interakcje-leku/> - źródło dostępne 30.03.2026r.
184. Lewicki J. (2006) Pozostałości leków weterynaryjnych w żywności pochodzenia zwierzęcego- zasady wyznaczania okresów karencji w Unii Europejskiej. *Mag Wet., Supl.-Drób*, 22-24.
185. Li B., Gong S.Y., Zhou X.Z., Yang Y.J., Li J.Y., Wei X.J., Cheng F.S., Niu J.R., Liu X.W., Zhang J.Y. (2017) Determination of antibacterial agent tilmicosin in pig plasma by LC/MS/MS and its application to pharmacokinetics. *Biomed Chromatogr.*, 31, 3. DOI: 10.1002/bmc.3825.
186. Li J., Coulthard K., Milne R., Nation R.L., Conway S., Peckham D., Etherington C., Turnidge, J. (2003a) Steady-state pharmacokinetics of intravenous colistin methanesulphonate in patients with cystic fibrosis. *J Antimicrob Chemother.*, 52, 6, 987–992. DOI:10.1093/jac/dkg468.
187. Li J., Milne R.W., Nation R.L., Turnidge J.D., Smeaton T.C., Coulthard K. (2004) Pharmacokinetics of colistin methanesulphonate and colistin in rats following an intravenous dose of colistin methanesulphonate. *J Antimicrob Chemother.*, 53, 5, 837–840. DOI: 10.1093/jac/dkh167
188. Li J., Milne R.W., Nation R.L., Turnidge J.D., Smeaton T.C., Coulthard K. (2003b) Use of high-performance liquid chromatography to study the pharmacokinetics of colistin sulfate in rats following intravenous administration. *Antimicrob Agents Chemother.*, 47, 5, 1766–1770. DOI:10.1128/AAC.47.5.1766-1770.2003.
189. Li J., Nation R.L., Milne R.W., Turnidge J.D., Coulthard K. (2005) Evaluation of colistin as an agent against multi-resistant Gram-negative bacteria. *Int J Antimicrob Agents.*, 25, 1, 11-25. DOI: 10.1016/j.ijantimicag.2004.10.001.
190. Li L., Sun J., Liu B., Zhao D., Ma J., Deng H., Li X., Hu F., Liao X., Liu Y. (2013) Quantification of lincomycin resistance genes associated with lincomycin residues in waters and soils adjacent to representative swine farms in China. *Front Microbiol.*, 3, 4, 364. DOI: 10.3389/fmicb.2013.00364.
191. Li X., Wu X., Wang J., Hua Q., Wu J., Shen X., Sun Y., Lei H. (2019) Three lateral flow immunochromatographic assays based on different nanoparticle probes for on-

- site detection of tylosin and tilmicosin in milk and pork. *Sens Actuators B Chem.*, 301, 127059.
192. Lin B., Zhang C., Xiao X. (2005) Toxicity, bioavailability and pharmacokinetics of a newly formulated colistin sulfate solution. *J Vet Pharmacol Therap.*, 28, 349-354. DOI:10.1111/j.1365-2885.2005.00666.x.
193. Liu T., Zhang C., Zhang F., Nie B., Yuan F., Huang H., Li H. (2019) Sensitive determination of four polypeptide antibiotic residues in milk powder by high performance liquid chromatography–electrospray tandem mass spectrometry. *Chromatographia*, 82, 10, 1479-1487. DOI:10.1007/s10337-019-03777-y
194. Liu Y.Y., Wang Y., Walsh T.R., Yi L.X., Zhang R., Spencer J., Doi Y., Tian G., Dong B., Huang X. (2016) Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism *mcr-1* in animals and human beings in China: Amicrobiological and molecular biological study. *Lancet Infect Dis.*, 16, 161–168. DOI: 10.1016/S1473-3099(15)00424-7.
195. Liu Z., Chen J., Zhao S., Pang Y., Shen X., Lei H., Li X. (2021) Immunochromatographic assays based on three kinds of nanoparticles for the rapid and highly sensitive detection of tylosin and tilmicosin in eggs. *Mikrochim Acta.*, 31, 189, 42. DOI: 10.1007/s00604-021-05151-y.
196. Löhren U., Ricci A., Cummings T.S. (2008) Guidelines for antimicrobial use in poultry. *W Guide to Antimicrobial Use in Animals* Luca, G., Jensen, L.B., Kruse, H., Eds.; Blackwell Publishing, Ltd.: Oxford, UK, str. 126–142.
197. Lu, L., Chen, Y., Wang, Z., Li, X., Chen, W., Tao, Z., Shen, J., Tian, Y., Wang, D., Li, G., Chen, L., Chen, F., Fang, D., Yu, L., Sun, Y., Ma, Y., Li, J., Wang, J. (2015) The goose genome sequence leads to insights into the evolution of waterfowl and susceptibility to fatty liver. *Genome Biol.*, 16(1), 89. DOI: 10.1186/s13059-015-0652-y
198. Luo W., Hansen E.B. Jr, Ang C.Y., Thompson H.C. Jr. (1996a) Determination of lincomycin residue in salmon tissues by ion-pair reversed-phase liquid chromatography with electrochemical detection. *J AOAC Int.*, 79, 4, 839-843. DOI:10.1093/JAOAC/79.4.839
199. Luo W., Yin B., Ang C.Y., Rushing L., Thompson H.C. Jr. (1996b) Determination of lincomycin residues in salmon tissues by gas chromatography with nitrogen-phosphorus detection. *J Chromatogr B Biomed Appl.*, 13, 687, 405-411. DOI: 10.1016/s0378-4347(96)00238-1.
200. Main B.W., Means J.R., Rinkema L.E., Smith W.C., Sarazan R.D. (1996) Cardiovascular effects of the macrolide antibiotic tilmicosin, administered alone and in combination with propranolol or dobutamine, in conscious unrestrained dogs. *J Vet Pharmacol Ther.*, 19, 225–232. DOI: 10.1111/j.1365-2885.1996.tb00042.x.
201. Mateusen B., Maes D., Van Goubergen M., Verdonck M., de Kruif A. (2002) Effectiveness of treatment with lincomycin hydrochloride and/or vaccination against *Mycoplasma hyopneumoniae* for controlling chronic respiratory disease in a herd of pigs. *Vet Rec.*, 3, 151, 135-140. DOI: 10.1136/vr.151.5.135.
202. McGann P., Snesrud E., Maybank R., Corey B., Ong A.C., Clifford R., Hinkle M., Whitman T., Lesho E., Schaecher K.E. (2016) *Escherichia coli* Harboring *mcr-1* and *blaCTX-M* on a Novel *IncF* Plasmid: First Report of *mcr-1* in the United States. *Antimicrob Agents Chemother.*, 20, 60, 4420-4421. DOI: 10.1128/AAC.01103-16. Errata w: *Antimicrob Agents Chemother.*, 2016, 22, 60, 5107. DOI: 10.1128/AAC.01353-16.

203. McKay S.G., Morck D.W., Merrill J.K., Olson M.E., Chan S.C., Pap K.M. (1996) Use of tilmicosin for treatment of pasteurellosis in rabbits. *Am J Vet Res.*, 57, 8, 1180-1184.
204. MDS vetmanual, <https://www.msdsvetmanual.com/multimedia/table/dosages-of-lincosamides> - źródło dostępne 30.03.2026r.
205. Mead A., Richez P., Azzariti S., Pelligand L. (2021) Pharmacokinetics of colistin in the gastrointestinal tract of poultry following dosing via drinking water and its bactericidal impact on enteric *Escherichia coli*. *Front Vet Sci.*, 8, 698135. DOI:10.3389/fvets.2021.698135.
206. Mercier T., Tissot F., Gardiol C., Corti N., Wehrli S., Guidi M., Csajka C., Buclin T., Couet W., Marchetti O., Decosterd L.A. (2014) High-throughput hydrophilic interaction chromatography coupled to tandem mass spectrometry for the optimized quantification of the anti-Gram-negatives antibiotic colistin A/B and its pro-drug colistimethate. *J Chromatogr A.*, 21, 1369, 52-63. DOI: 10.1016/j.chroma.2014.09.063.
207. Michalopoulos A.S., Falagas M.E. (2011) Colistin: recent data on pharmacodynamics properties and clinical efficacy in critically ill patients. *Ann Intensive Care.*, 1, 30. DOI:10.1186/2110-5820-1-30
208. Mizuyachi K., Hara K., Wakamatsu A., Nohda S., Hiramata T. (2011) Safety and pharmacokinetic evaluation of intravenous colistin methanesulfonate sodium in Japanese healthy male subjects. *Curr Med Res Opin.*, 27, 12, 2261-2270. DOI: 10.1185/03007995.2011.626557.
209. Moats W.A. (1991) Determination of lincomycin in milk and tissues by reversed-phase liquid chromatography. *J Agric Food Chem.*, 39, 10, 1812-1816. DOI: 10.1021/jf00010a024
210. Modric S., Webb A. I., Derendorf H. (1998) Pharmacokinetics and pharmacodynamics of tilmicosin in sheep and cattle. *J Vet Pharm Therap.*, 21, 444-452. DOI:10.1046/j.1365-2885.1998.00177.x
211. Molina J., Cordero E., Pachon J. (2009) New Information about the polymyxin/colistin class of antibiotics. *Expert Opin Pharmacother.*, 10, 2811-2828. DOI: 10.1517/14656560903334185
212. Montesissa C., Capolongo F., Santi A., Biancotto G., Dacasto M. (2004) Metabolism of tilmicosin by rabbit liver microsomes and hepatocytes. *Vet J.*, 167, 1, 87-94. DOI:10.1016/s1090-0233(03)00077-7.
213. Moore J.N., Barton M.H. (2003) Treatment of endotoxemia. *Vet Clin North Am Equine Pract.*, 19, 3, 681-695. DOI: 10.1016/j.cveq.2003.08.006
214. Moran J.W., Turner J.M., Coleman M.R. (1997) Determination of tilmicosin in bovine and porcine sera by liquid chromatography. *J AOAC Internat.*, 80, 6, 1183-1190.
215. Murray C.J.L., Ikuta K.S., Sharara F., Swetschinski L., Aguilar G.R., Gray A., Han C., Bisignano C., Rao P., Wool E. (2022) Global burden of bacterial anti-microbial resistance in 2019: A systematic analysis. *Lancet*, 399, 629-655. DOI: 10.1016/S0140-6736(21)02724-0
216. Naccari F., Giofrè F., Pellegrino M., Calò M., Licata P., Carli S. (2001) Effectiveness and kinetic behaviour of tilmicosin in the treatment of respiratory infections in sheep. *Vet Rec.*, 148, 773-776. DOI:10.1136/vr.148.25.773
217. Nakajima K. (1967) Structure-activity relationships of colistins. *Chem Pharmac Bull.*, 15, 1219-1224. DOI: 10.1248/cpb.15.1219
218. Nakamura S. (1997) Mechanisms of quinolone resistance. *J Infect Chemother.*, 3, 128-138. DOI: 10.1007/BF02490039

219. Newton B. A. (1956) The properties and mode of action of the polymyxins. *Bacteriol Rev.*, 20, 14-27. DOI: 10.1128/br.20.1.14-27.1956
220. Ngho M.A. (1996) Determination of tilmicosin in bovine milk by liquid chromatography with ultraviolet detection. *J AOAC Intern.*, 79, 3, 652-655.
221. Nielsen, P., Gyrd-Hansen N. (1998) Bioavailability of Spiramycin and Lincomycin After Oral Administration to Fed and Fasted Pigs. *J Vet Pharmacol Ther.*, 21, 4, 251–256. DOI:10.1046/j.1365-2885.1998.00131.x
222. Nigam A., Kumari A., Jain R., Batra S. (2015) Colistin neurotoxicity: revisited. *BMJ Case Rep.*, 2015, bcr2015210787. DOI:10.1136/bcr-2015-210787.
223. Nolan L.K., Barnes H.J., Abdul-Aziz T., Logue C.M., Vaillancourt J-P. (2015) Colibacillosis. W: Brugere-Picoux J, Vaillancourt J-P, Shivaprasad HL, Venne D, Bouzouaia M, Association française pour l'avancement des sciences (AFAS), editors. *Manual of Poultry Diseases*. China: Toppan Printing Leefung, str. 301–315.
224. Nolan L.K., Vaillancourt J-P., Barbieri N., Logue C.M. (2020) Colibacillosis. In: Swayne DE, Boulianne M, Logue CM, McDougald LR, Nair VL, Suarez DL, editors. *Diseases of Poultry*. 14th Edition. Hoboken: John Wiley and Sons, Inc, str.770–830.
225. Norcia L.J., Silvia A.M., Hayashi S.F. (1999) Studies on time-kill kinetics of different classes of antibiotics against veterinary pathogenic bacteria including *Pasteurella*, *Actinobacillus* and *Escherichia coli*. *J Antibiot (Tokyo)*., 52, 1, 52-60. DOI: 10.7164/antibiotics.52.52.
226. Oda S.S., Derbalah A.E. (2018) Impact of Diclofenac Sodium on Tilmicosin-Induced Acute Cardiotoxicity in Rats (Tilmicosin and Diclofenac Cardiotoxicity). *Cardiovasc Toxicol.*, 18, 1, 63-75. DOI: 10.1007/s12012-017-9414-2.
227. Okruszek A., Wołoszyn J., Haraf G., Orkusz A., Wereńska M. (2013) Chemical composition and amino acid profiles of goose muscles from native Polish breeds. *Poult Sci.*, 92, 1127–1133 DOI: 10.3382/ps.2012-02486.
228. Olaitan A.O., Morand S. Rolain J.M. (2014) Mechanisms of polymyxin resistance: Acquired and intrinsic resistance in bacteria. *Front Microbiol.*, 5, 643. DOI: 10.3389/fmicb.2014.00643
229. Olsen C.A., Ziegler H.L., Nielsen H.M., Frimodt-Moller N., Jaroszewski J.W., Franzyk H. (2010) Antimicrobial, hemolytic, and cytotoxic activities of  $\beta$ -peptoid-peptide hybrid oligomers: Improved properties compared to natural AMPs. *Chembiochem.*, 11, 1356–1360. DOI:10.1002/cbic. 20100 0232
230. O'Neil M.J. (2006) *The Merck Index - An Encyclopedia of Chemicals, Drugs, and Biologicals*. Whitehouse Station, NJ: Merck and Co., Inc. str. 953.
231. Ose E.E., Tankinson L.V. (1988) Single-dose treatment of Proceedings of the 6-th International EAVPT Congress, Edinburg, 7-neonatal calf pneumonia with the new macrolide antibiotic tilmicosin. *Vet Rec.*, 123, 367. DOI: 10.1136/vr.123.14.367
232. Osol A., Hoover J.E., et al. (eds.) (1975) *Remington's Pharmaceutical Sciences*. 15th ed. Easton, Pennsylvania: Mack Publishing Co. str. 1136.
233. Ouyang Q., Hu S., Tang B., Hu B., Hu J., He H., L.L., Wang J. (2022) Comparative transcriptome analysis provides novel insights into the effect of lipid metabolism on laying of geese. *Animals*, 12, 14, 1775. DOI:10.3390/ani12141775
234. Papich M.G., Riviere J.E. (2001) Chloramphenicol and derivatives, macrolides, lincosamides, and miscellaneous antimicrobials. *J Vet Pharmacol Therap.*, 10, 903–952.
235. Park N., Pervin R., Hossain Md.A., Park S. (2019) Establishment of withdrawal period after oral administration of lincomycin and colistin combination in broiler chicken. *Pak Vet J.*, 40, 267–270. DOI:10.29261/pakvetj/2019.115

236. Parker R.M., Patel R.K.P. (1994) Determination of tilmicosin in ovine milk using high-performance liquid chromatography. *Analyst.*, 119, 12, 2577-2579. DOI: 10.1039/an9941902577
237. Paterson D.L., Harris P.N. (2016) Colistin resistance: a major breach in our last line of defence. *Lancet Infect Dis.*, 16, 2, 132-133. DOI: 10.1016/S1473-3099(15)00463-6.
238. Peng D., Ye S., Wang Y., Chen D., Tao Y., Huang L., Liu Z., Dai M., Wang X., Yuan Z. (2012) Development and validation of an indirect competitive enzyme-linked immunosorbent assay for the screening of tylosin and tilmicosin in muscle, liver, milk, honey and eggs. *J Agric Food Chem.*, 11, 60, 44-51. DOI: 10.1021/jf2037449.
239. Pintado V., San Miguel L.G., Grill F., Mejía B, Cobo J, Fortún J, Martín-Dávila P, Moreno S. (2008) Intravenous colistin sulphomethate sodium for therapy of infections due to multidrug-resistant Gram-negative bacteria. *J Infect.*, 56, 3, 185–190. DOI: 10.1016/j.jinf.2008.01.003
240. Pishnian Z., Haeili M., Feizi A. (2019) Prevalence and molecular determinants of colistin resistance among commensal Enterobacteriaceae isolated from poultry in northwest of Iran. *Gut Pathog.*, 11, 2. DOI: 10.1186/s13099-019-0282-0
241. Poirel L., Jayol A., Nordmann P. (2017) Polymyxins: Antibacterial Activity, Susceptibility Testing, and Resistance Mechanisms Encoded by Plasmids or Chromosomes. *Clin Microbiol Rev.*, 30, 2, 557-596. dDOI: 10.1128/CMR.00064-16.
242. Pouplin T., Bang N. D., Toi P. V., Phuong P. N., Dung N. H., Duong T. N., Caws M., Thwaites G. E., Tarning J., Day J. N. (2016) Naïve pooled pharmacokinetic analysis of pyrazinamide, isoniazid and rifampicin in plasma and cerebrospinal fluid of Vietnamese children with tuberculous meningitis. *BMC Infect Dis.*, 16, 144. DOI: 10.1186/s12879-016-1470-x
243. Prescott J.F. (2000) Lincosamides, macrolides, and pleuromulins. W: rd 11 August, 1994, Backwell Scientific Publications, Oxford, London, Antimicrobial Therapy in Veterinary Medicine, 3 ed., eds. JF Edinburg, Paris, Berlin, Vienna, Melbourne, Boston, 134-135.
244. Pristovšek P., Kidrič J. (1999) Solution structure of polymyxins B and E and effect of binding to lipopolysaccharide: an NMR and molecular modelling study. *J Med Chem.*, 42, 4604-4613. DOI: 10.1021/jm991031b
245. Pristovšek P., Kidrič J. (2001) Peptides neutralizing lipopolysaccharide – structure and function. *Mini Rev Med Chem.*, 1, 409-416. DOI: 10.2174/1389557013406729
246. Pudyszak K. (2006) Gęś biłgorajska – wczoraj i dziś. *Hodowca Drobiu*, 1, 30–33.
247. Qin Y., Jatamunua F., Zhang J., Li Y., Han Y., Zou N., Shan J., Jiang Y., Pan C. (2017) Analysis of sulfonamides, tilmicosin and avermectins residues in typical animal matrices with multi-plug filtration cleanup by liquid chromatography-tandem mass spectrometry detection. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.*, 15, 1053, 27-33. DOI: 10.1016/j.jchromb.2017.04.006.
248. Ramadan A. (1997) Pharmacokinetics of tilmicosin in serum and milk of goats. *Res Vet Sci.*, 62, 1, 48–50. DOI:10.1016/s0034-5288(97)90179-x
249. Rasmussen F. (1966) Mammary Excretion of Lincomycin in Cows. *Acta Vet Scand.*, 7, 97–98. DOI:10.1186/BF03547100
250. Rassouli A., Al-Qushawi A., Atyabi F., Peighambari S.M., Esfandyari-Manesh M., Shams G.R. (2016) Pharmacokinetics and bioavailability of three promising tilmicosin-loaded lipid nanoparticles in comparison with tilmicosin phosphate

- following oral administration in broiler chickens. *Turk J Vet Anim Sci.*, 40, 5, 540-547. DOI:10.3906/vet-1601-32
251. Ravindran V. (2013) Feed enzymes: the science, practice, and metabolic realities. *J Appl Poult Res.*, 22, 3, 628–36. DOI:10.3382/japr.2013-00739
252. Readnour R.S., Coleman M.R., Leadbetter M.G. (1997) Liquid chromatographic determination of tilmicosin in swine feed at 200-400 mg/kg level: interlaboratory study. *J AOAC Int.* 80, 6, 1156-1160.
253. Rhouma M., Beaudry F., Letellier A. (2016) Resistance to colistin: what is the fate for this antibiotic in pig production? *Int J Antimicrob Agents.*, 48, 2, 119-126. DOI: 10.1016/j.ijantimicag.2016.04.008.
254. Riegelman S., Collier P. (1980) The application of statistical moment theory to the evaluation of in vivo dissolution time and absorption time. *J Pharmacokinet Biopharm.*, 8, 5, 509-534. DOI: 10.1007/BF01059549.
255. Riviere J. E., Papich M. G. (2013) *Veterinary pharmacology and therapeutics*, John Wiley & Sons.
256. Roberts M., Magnusson B., Burczynski F., Weiss M. (2002) Enterohepatic Circulation. *Clin Pharmacokinet.*, 41, 751-790. DOI: 10.2165/00003088-200241100-00005.
257. Rodríguez-Gascón A., Solinís M. Á., Isla A. (2021) The role of PK/PD analysis in the development and evaluation of antimicrobials. *Pharmaceutics*, 13, 6, 833. DOI:10.3390/pharmaceutics13060833
258. Roliński Z. (2008) *Farmakologia i farmakoterapia weterynaryjna*. Powszechnie Wydawnictwo Rolnicze i Leśne.
259. Rosenbaum S. (2011) *Basic pharmacokinetics and pharmacodynamics. An integrated textbook and Computer simulations*. by John Wiley & Sons, Inc.
260. Roudaut B. (1989) Depletion of colistin in eggs following medication of laying hens. *Vet Q.*, 11, 3, 183–185. DOI: 10.1080/01652176.1989.9694219
261. Rougière N., Carré B. (2010) Comparison of gastrointestinal transit times between chickens from D+ and D-genetic lines selected for divergent digestion efficiency. *Animal.*, 4, 11, 1861-1872. DOI:10.1017/S1751731110001266
262. Rozporządzenie Komisji (WE) nr 37/2010 (2009). On pharmacologically active substances and their classification regarding maximum residue limits in foodstuffs of animal origin (Text with EEA relevance). Official Journal of the European Union, L 15/1. [https://health.ec.europa.eu/system/files/2016-11/reg\\_2010\\_37\\_en\\_0.pdf](https://health.ec.europa.eu/system/files/2016-11/reg_2010_37_en_0.pdf) - źródło dostępne 30.03.2026r.
263. Rozporządzenie Komisji (WE) nr 543/2008 (2008) wprowadzające szczegółowe przepisy wykonawcze do rozporządzenia Rady (WE) nr 1234/2007 w sprawie niektórych norm handlowych w odniesieniu do mięsa drobiowego - źródło dostępne 30.03.2026r.
264. 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, Dz.U.UE.L.2019.4.43, <https://sip.lex.pl/akty-prawne/dzienniki-UE/rozporzadzenie-2019-6-w-sprawie-weterynaryjnych-produktow-leczniczych-i-69130877> - źródło dostępne 30.03.2026r.
265. Rozporządzenie wykonawcze Komisji (UE) 2021/808 z dnia 22 marca 2021 r. w sprawie wydajności metod analitycznych w odniesieniu do pozostałości substancji farmakologicznie czynnych stosowanych u zwierząt, od których lub z których pozyskuje się żywność, oraz interpretacji wyników, jak również w sprawie metod stosowanych do pobierania próbek. (Commission Implementing Regulation (EU) 2021/808 of 22 March 2021 document (EU 2021/808): <https://sip.lex.pl/akty->

- [prawne/dzienniki-UE/rozporzadzenie-wykonawcze-2021-808-w-sprawie-wydajnosci-metod-analitycznych-69444186](#) - źródło dostępne 30.03.2026r.
266. Saga T., Yamaguchi K. (2009) History of antimicrobial agents and resistant bacteria. *JMAJ* 52, 2, 103–108.
  267. Sartini I., Łebkowska-Wieruszewska B., Lisowski A., Poapolathep A., Sitovs A., Giorgi M. (2021) Doxycycline pharmacokinetics in geese. *J Vet Pharmacol Ther.*, 44, 975–981. DOI:10.1111/jvp.13002.
  268. Sartini I., Vercelli C., Łebkowska-Wieruszewska B., Lisowski A., Fadel C., Poapolathep A., Dessì F., Giorgi M. (2023) Pharmacokinetics and antibacterial activity of tiamulin after single and multiple oral administrations in geese. *Vet Anim Sci.*, 22, 100317. DOI:10.1016/j.vas.2023.100317
  269. Sato H., Ouchi M., Koumi J. (1972) Distribution of colistin sulfate in the body. Distribution and metabolism of orally administered colistin sulfate in chickens and pigs. *Jpn J Antibiot.*, 25, 4, 239-245.
  270. Schindler M., Osborn M.J. (1979) Interaction of divalent cations and polymyxin B with lipopolysaccharide. *Biochemistry*, 18, 4425–4430. DOI: 10.1021/bi00587a024.
  271. Schreier J., Karasova D., Crhanova M., Rychlik I., Rautenschlein S., Jung A. (2022) Influence of lincomycin-spectinomycin treatment on the outcome of *Enterococcus cecorum* infection and on the cecal microbiota in broilers. *Gut Pathog.*, 14, 3, 3. DOI: 10.1186/s13099-021-00467-9.
  272. Schwarz S., Johnson A.P. (2016) Transferable resistance to colistin: a new but old threat. *J Antimicrob Chemother.*, 71, 8, 2066-2070. DOI: 10.1093/jac/dkw274.
  273. Scoreaux B., Shryock T.R. (1998) Intracellular accumulation, subcellular distribution and efflux of tilmicosin in swine phagocytes. *J Vet Pharmacol Ther.*, 21, 257–268. DOI:10.1046/j.1365-2885.1998.00133.x
  274. Seong P.N., Cho S.H., Park K.M., Kang G.H., Park B.Y., Moon S.S., Ba H.V. (2015) Characterization of chicken by-products by mean of proximate and nutritional compositions. *Korean J Food Sci Anim Resour.*, 35, 2, 179–188. DOI:10.5851/kosfa.2015.35.2.179.
  275. Shamakh M., Azoz H., Attia T. (2022) Kinetic Disposition of Lincomycin After Oral Administration in Broiler Chickens. *J Curr Vet Res.*, 4, 1, 13-17. DOI: 10.21608/jcivr.2022.239549
  276. Sharma M., Dumka K.V., Singla S., Kaur R., Singh K.R. (2019) Disposition Kinetics of lincomycin following intravenous administration in hypothyroid goats. *Indian J Anim Res.*, 53, 12, 1675-1678. DOI: 10.18805/ijar.B-3717.
  277. Sharma M., Dumka V.K. (2016) Pharmacokinetics of lincomycin following intravenous administration in febrile goats. *Indian J Anim Res.*, 52, 4, 605-609. DOI: 10.18805/ijar.v0iOF.6834.
  278. Sharma N., Vemu B., Dumba V.K. (2017) Pharmacokinetics of lincomycin following single intramuscular administration in goats. *Int J Agric Res.*, 7, 555-560.
  279. Shen J., Li C., Jiang H., Zhang S., Guo P., Ding S., Li X. (2005) Pharmacokinetics of tilmicosin after oral administration in swine. *Am J Vet Res.*, 66, 1071–1074. DOI:10.2460/ajvr.2005.66.1071
  280. Short C.R. (1994) Consideration of sheep as a minor species: Comparison of drug metabolism and disposition with other domestic ruminants. *Vet Hum Toxicol.*, 36, 24–40.
  281. Sin D.W., Ho C., Wong Y., Ho S., Ip A.C. (2004b) Simultaneous determination of lincomycin and virginiamycin M1 in swine muscle, liver and kidney by liquid chromatography–electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Anal Chim Acta.*, 517, 39–45. DOI:10.1016/j.aca.2004.04.037.

282. Sin D.W., Wong Y., Mak C., Sze S., Yao W. (2006) Determination of five phenolic antioxidants in edible oils: Method validation and estimation of measurement uncertainty. *J Food Compos Anal.*, 19, 784–791, DOI:10.1016/j.jfca.2005.12.005.
283. Sin D.W., Wong Y.C., Ip A.C. (2004) Quantitative analysis of lincomycin in animal tissues and bovine milk by liquid chromatography electrospray ionization tandem mass spectrometry. *J Pharm Biomed Anal.*, 18, 34, 651-659. DOI: 10.1016/s0731-7085(03)00634-4.
284. Singh A.K., Bhunia A.K. (2019) Animal-Use Antibiotics Induce Cross-Resistance in Bacterial Pathogens to Human Therapeutic Antibiotics. *Curr Microbiol.*, 76, 10, 1112-1117. DOI: 10.1007/s00284-019-01744-2.
285. Skov R.L., Monnet D.L. (2016) Plasmid-mediated colistin resistance (*mcr-1* gene): three months later, the story unfolds. *Euro Surveill.*, 21, 9, 30155. DOI: 10.2807/1560-7917.ES.2016.21.9.30155.
286. Slavić D., Boerlin P., Fabri M., Klotins K.C., Zoethout J.K., Weir P.E., Bateman D. (2011) Antimicrobial susceptibility of *Clostridium perfringens* isolates of bovine, chicken, porcine, and turkey origin from Ontario. *Can J Vet Res.*, 75, 2, 89–97.
287. Soback S., Ziv G., Bogin E., Cohen Z., Earon Y. (1987) Pharmacokinetic changes of several antibiotics in chickens during induced fatty liver. *Res Vet Sci.*, 43, 1, 49–54.
288. Soliman A.M., Elbestawy A.R., Ibrahim S. (2016) Pharmacokinetics, bio-equivalence and tissue residues of two oral colistin formulations in broiler chickens. *Int J Pharm Pharm Sci.*, 8, 4, 166–170. <https://journals.innovareacademics.in/index.php/ijpps/article/view/9607> - źródło dostępne 30.03.2026r.
289. Son D.S., Osabe M., Shimoda M., Kokue E. (1998) Contribution of alpha 1-acid glycoprotein to species difference in lincosamides-plasma protein binding kinetics. *J Vet Pharm Therap.*, 21, 1, 34–40. DOI:10.1046/j.1365-2885.1998.00111.x
290. Spížek J., Režanka T. (2004) Lincomycin, clindamycin and their applications. *Appl Microbiol Biotechnol.*, 64, 4, 455-464. DOI: 10.1007/s00253-003-1545-7.
291. Stefaniuk E.M., Tyski S. (2019) Colistin Resistance in Enterobacterales Strains - A Current View. *Pol J Microbiol.*, 68, 4, 417-427. DOI: 10.33073/pjm-2019-055.
292. Stipkovits L., Szathmary S. (2012) Mycoplasma infection of ducks and geese. *Poult Sci.*, 91, 2812–2819. DOI: 10.3382/ps.2012-02310
293. Stobba-Wiley C.M., Chang J.P., Elsbury D.T., Moran J.W., Turner J.M., Readnour R.S. (2000) Determination of tilmicosin residues in chicken, cattle, swine, and sheep tissues by liquid chromatography. *J AOAC Int.*, 83, 4, 837-846.
294. Stobba-Wiley C.M., Readnour R.S. (2000) Determination of tilmicosin residues in cow and sheep milk by liquid chromatography. *J AOAC Int.*, 83, 3, 555-562.
295. Storm D.R., Rosenthal K.S., Swanson P.E. (1977) Polymyxin and related peptide antibiotics. *Annu Rev Biochem.*, 46, 723–63. DOI: 10.1146/annurev.bi.46.070177.003451.
296. Stuart A.D., Brown T.D.K., Imrie G., Tasker J.B., Mockett A.P.A. (2007) Intracellular accumulation and transepithelial transport of aivlosin, tylosin and tilmicosin. *The Pig Journal*, 60, 26–35.
297. Studer R.O., Lergier W., Lanz P., Bohni E., Vogler K. (1965) Syntheses in the polymyxin series. 10. Synthesis of colistin A (polymyxin E-1). *Helv Chim Acta.*, 48, 6, 1371-1378. DOI: 10.1002/hlca.19650480617
298. Stypulkowska K., Blazewicz A., Brudzikowska A., Grzeskiewicz M.W., Sarna K., Fijalek Z. (2015) Development of high performance liquid chromatography methods with charged aerosol detection for the determination of lincomycin, spectinomycin

- and its impurities in pharmaceutical products. *J Pharm Biomed Anal.*, 10, 112, 8-14. DOI: 10.1016/j.jpba.2015.03.036.
299. Suzuki T., Hayashi K., Fujikawa K. (1963c) Studies on the Chemical Structure of Colistin. III. Enzymatic Hydrolysis of Colistin A. *J Biochem.*, 54, 412-418. DOI: 10.1093/oxfordjournals.jbchem.a127807
300. Suzuki T., Inouye H., Fujikawa K., Nagsawa S. (1963b) Studies on the Chemical Structure of Colistin. II. Amino Acid Sequence of Colistin A. *J Biochem.*, 54, 173-180.
301. Suzuki T., Inouye H., Fujikawa K., Suketa Y. (1963a) Studies on the Chemical Structure of Colistin: I. Fractionation, Molecular Weight Determination, Amino Acid and Fatty Acid Composition. *J Biochem.*, 34, 25-33. DOI: 10.1093/oxfordjournals.jbchem.a127742
302. Szúnyog J., Adams E., Liekens K., Roets E., Hoogmartens J. (2002) Analysis of a formulation containing lincomycin and spectinomycin by liquid chromatography with pulsed electrochemical detection. *J Pharm Biomed Anal.*, 20, 29, 1-2, 213-220. DOI: 10.1016/s0731-7085(02)00015-8.
303. Tang Y., Wang X., Lu Y., Guo Y., Xie K., Chen L., Chen J., He Z., Guan F., Gao P., Zhang T., Zhang G., Dai G. (2022) Qualitative and quantitative determination of tilmicosin in poultry eggs by gas chromatography tandem mass spectrometry after derivatization with acetic anhydride. *Food Chem.*, 1, 384, 132572. DOI: 10.1016/j.foodchem.2022.132572.
304. Tao Y., Yu G., Chen D., Pan Y., Liu Z., Wei H., Peng D., Huang L., Wang Y., Yuan Z. (2012) Determination of 17 macrolide antibiotics and avermectins residues in meat with accelerated solvent extraction by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.*, 15, 897, 64-71. DOI: 10.1016/j.jchromb.2012.04.011.
305. Taşçı F., Canbay H.S., Doğanürk M. (2021) Determination of antibiotics and their metabolites in milk by liquid chromatography-tandem mass spectrometry method. *Food Cont.*, 127, 108147. DOI: 10.1016/j.foodcont.2021.108147
306. Teo J.W.P., Kalisvar M., Venkatachalam I., Ng O.T., Lin R.T.P., Octavia S. (2018) mcr-3 and mcr-4 variants in carbapenemase-producing clinical Enterobacteriaceae do not confer phenotypic polymyxin resistance. *J Clin Microbiol.*, 22, 56, e01562-17. DOI: 10.1128/JCM.01562-17.
307. Terakado S., Azechi H., Omae K., Koyama T., Ninomiya K, Kashiwazaki M. (1972) Distribution of colistin sulfate and changes with time in intestinal E. coli counts in pigs following oral administration. Seventy-third Congress of Japan Society of Veterinary Medicine (translation), 5-22.
308. Thomas A.H., Holloway I. (1978) Thin-layer chromatographic method for the identification of the polymyxins. *J Chromatogr A.*, 161, 417-420. DOI: 10.1016/S0021-9673(01)85266-3
309. Thomas A.H., Thomas J.M., Holloway I. (1980) Microbiological and chemical analysis of polymyxin B and polymyxin E (colistin) sulphates. *Analyst*, 105, 1256, 1068-1075. DOI:10.1039/AN9800501068
310. Thompson T.S., Noot D.K., Calvert J., Pernal S.F. (2003) Determination of lincomycin and tylosin residues in honey using solid-phase extraction and liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry. *J Chromatogr A.*, 12, 1020, 2, 241-50. DOI: 10.1016/j.chroma.2003.08.095.
311. Tikhomirov M., Poźniak B., Smutkiewicz A., Świtła M. (2020) Pharmacokinetics of florfenicol and thiamphenicol after single oral and intravenous, as well as multiple

- oral administrations to geese. *Br Poult Sci.*, 12 1–7. DOI:10.1080/00071668.2020.1824290
312. Toutain P. L., Bousquet-Mélou A. (2004a) Bioavailability and its assessment. *J Vet Pharmacol Ther.*, 27, 455–466. DOI: 10.1111/j.1365-2885.2004.00604.x.
313. Toutain P. L., Bousquet-Mélou A. (2004b) Plasma terminal half-life. *J Vet Pharmacol Ther.*, 27, 427–439. DOI: 10.1111/j.1365-2885.2004.00600.x.
314. Toutain P. L., Bousquet-Mélou A. (2004c) Plasma clearance. *J Vet Pharmacol Ther.*, 27, 415–425. DOI: 10.1111/j.1365-2885.2004.00605.x.
315. Toutain P. L., Bousquet-Mélou A. (2004d) Volumes of distribution. *J Vet Pharmacol Ther.*, 27, 441–453. DOI: 10.1111/j.1365-2885.2004.00602.x.
316. Toutain P. L., Lees P. (2004) Integration and modelling of pharmacokinetic and pharmacodynamic data to optimize dosage regimens in veterinary medicine. *J Vet Pharmacol Ther.*, 27, 6, 467–477. DOI:10.1111/j.1365-2885.2004.00613.x
317. Toutain P.L., Ferran A., Bousquet-Melou A. (2010) Species differences in pharmacokinetics and pharmacodynamics. In: Cunningham F, Elliott J, Lees P (eds). *Comparative and Veterinary Pharmacology*. 1st ed., Berlin, Germany: SpringerVerlag.str. 19–48.
318. Treiber, F.M.; Beranek-Knauer, H. (2021) Antimicrobial residues in food from animal origin—A review of the literature focusing on products collected in stores and markets worldwide. *Antibiotics*, 10.5, 534. DOI: 10.3390/antibiotics10050534
319. Urso, R., Bardi, P., Giorgi, G. (2002) A short introduction to pharmacokinetics. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.*, 6, 33-44.
320. US Food and Drug Administration (FDA) (1998) Freedom of Information Summary, NADA 141-069. <http://www.fda.gov/cvm/FOI/941.htm> w COLISTIN, First draft prepared by Lynn G. Friedlander, Rockville, MD, United States and Dieter Arnold, Berlin, Germany: [https://www.fao.org/fileadmin/user\\_upload/vetdrug/docs/2-2006-colistin.pdf](https://www.fao.org/fileadmin/user_upload/vetdrug/docs/2-2006-colistin.pdf) - źródło dostępne 30.03.2026r.
321. USPC (2008) United States Pharmacopeial Convention, Lincosamides (Veterinary—Systemic). In Clindamycin; Lincomycin. <https://cdn.ymaws.com/www.aavpt.org/resource/resmgr/imported/lincosamides.pdf> - źródło dostępne 30.03.2026r.
322. Van Donkersgoed J., Dubeski P. L., VanderKop M., Aalhus J. L., Bygrove S., Starr W. N. (2000) The effect of animal health products on the formation of injection site lesions in subprimals of experimentally injected beef calves. *Can Vet J.*, 41, 8, 617–622.
323. Varga, J., Fodor, L., Makrai, L. (2001) Characterisation of some *Ornithobacterium rhinotracheale* strains and examination of their transmission via eggs. *Acta Vet Hung.*, 49, 2, 125-130. DOI: 10.1556/004.49.2001.2.1
324. Vinarov Z., Abdallah M., Agundez J.A.G., Allegaert K., Basit A.W., Braeckmans M., Ceulemans J., Corsetti M., Griffin B.T., Grimm M., Keszthelyi D., Koziolok M., Madla C.M., Matthys C., McCoubrey L.E., Mitra A., Reppas C., Stappaerts J., Steenackers N., Trevaskis N.L., Vanuytsel T., Vertzoni M., Weitschies W., Wilson C., Augustijns P. (2021) Impact of gastrointestinal tract variability on oral drug absorption and pharmacokinetics: An UNGAP review. *Eur J Pharm Sci.*, 1, 162, 105812. DOI:10.1016/j.ejps.2021.105812
325. VMD, Lincomycin VMD injectabilis 100 mg/ml, roztwór do wstrzykiwań dla świń: <https://www.google.com/url?sa=t&source=web&rct=j&opi=89978449&url=https://rejstrymedyczne.ezdrowie.gov.pl/api/rpl/medicinal-products/16948/leaflet-> źródło dostępne 30.03.2026r.

326. Vranic M.L., Marangunich L., Fernandez Courel H., Fernandez Suarez A. (2003) Estimation the withdrawal period for veterinary drugs used in food producing animals. *Anal Chim Acta.*, 483, 251-257. DOI: 10.1016/S0003-2670(03)00257-5
327. Vučićević-Prčetić K., Cservenák R., Radulović Niko. (2011) Development and validation of liquid chromatography tandem mass spectrometry methods for the determination of gentamicin, lincomycin, and spectinomycin in the presence of their impurities in pharmaceutical formulations. *J Pharm Biomed Anal.*, 56.4, 736-742. DOI: 10.1016/j.jpba.2011.07.031
328. Walsh T.R., Wu Y. (2016). China bans colistin as a feed additive for animals. *Lancet Infect Dis.*, 16, 10, 1102-1103. DOI: 10.1016/S1473-3099(16)30329-2.
329. Wan E.C., Ho C., Sin D.W., Wong Y.C. (2006) Detection of residual bacitracin A, colistin A, and colistin B in milk and animal tissues by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem.*, 385.1, 181-188. DOI: 10.1007/s00216-006-0325-5
330. Wang Q., Pei X., Peng T., Xie J., Xie S., Sun Y., Wang C., Li X., H. (2016) Determination of tilmicosin by fluorescence-based immunochromatography. *Anal Lett.*, 2016, 49.13: 2052-2062. DOI:10.1080/00032719.2015.1134561
331. Wang S. Li S., WangW., Guo X., Pan J., Dong X. (2023) HPLC-MS/MS method for the simultaneous determination of lysine-derived markers for protein carbonylation in meat. *Jof Food Comp and Anal.*, 122, 105459. DOI: 10.2139/ssrn.4330940
332. Wang X.; Wang Y.; Zhou Y.; Li J.; Yin W.; Wang S.; Zhang S.; Shen J.; Wang Y. (2018) Emergence of a novel mobile colistin resistance gene, *mcr-8*, in NDM-producing *Klebsiella pneumoniae*. *Emerg. Microbes Infect.*, 7, 122. DOI: 10.1038/s41426-018-0124-z
333. Wang Y., Yang J.Y., He Y., Li L., Huang J.X., Tian Y.X., Wang H., Xu Z.L., Shen Y.D. (2021) Development of time-resolved fluorescence immunochromatographic assays for simultaneously detecting tylosin and tilmicosin in milk in group-screening manner. *Foods.*, 10.8, 1838. DOI: 10.3390/foods10081838
334. Waxman S., Prados A.P., De Lucas J.J., Wiemeyer G., Torres-Bianchini L., Andres M.I. S., Rodríguez C. (2019) Evaluation of allometric scaling as a tool for extrapolation of the enrofloxacin dose in American black vultures (*Coragyps atratus*). *Am J Vet Res.*, 80 (8), 727–735. DOI:10.2460/ajvr.80.8.727.
335. Wenzl T., Haedrich J., Schaechtele A., Piotr R., Stroka J., Eppe G., Scholl G. (2016). Guidance document on the estimation of LOD and LOQ for measurements in the field of contaminants in food and feed. European Union Reference Laboratory 11–18. Publications Office of the European Union. DOI:10.2787/8931
336. WHO (1996) 878. TILMICOSIN First draft prepared by Dr G. Roberts Commonwealth Department of Health and Family Services Canberra, Australia: <https://www.inchem.org/documents/jecfa/jecmono/v38je06.htm>- źródło dostępne 30.03.2026r.
337. WHO (2000) Greenlees K.J., Anadon A. Lincomycin, Toxicological Evaluation Of Certain Veterinary Drug Residues In Food, Who Food Additives Series 45. Prepared by the Fifty-fourth meeting of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA), International Programme On Chemical Safety World Health Organization. [https://www.google.com/url?sa=t&source=web&rct=j&opi=89978449&url=https://www.inchem.org/documents/jecfa/jecmono/v45je02.htm&ved=2ahUKEwjgt2I\\_quTAXvExAIHea8Ih0QFnoECBwQAQ&usq=AOvVaw0KyzPrCxSB\\_S4gYOD6w4P9](https://www.google.com/url?sa=t&source=web&rct=j&opi=89978449&url=https://www.inchem.org/documents/jecfa/jecmono/v45je02.htm&ved=2ahUKEwjgt2I_quTAXvExAIHea8Ih0QFnoECBwQAQ&usq=AOvVaw0KyzPrCxSB_S4gYOD6w4P9) - źródło dostępne 30.03.2026r.

338. WHO (2004), Evaluations of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA) LINCOMYCIN: <https://apps.who.int/food-additives-contaminants-jecfa-database/Home/Chemical/4170>- źródło dostępne 30.03.2026r.
339. WHO (2006) Evaluations of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA) COLISTIN: <https://apps.who.int/food-additives-contaminants-jecfa-database/Home/Chemical/3723>- źródło dostępne 30.03.2026r.
340. WHO (2008) Evaluations of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA) TILMICOSIN: <https://apps.who.int/food-additives-contaminants-jecfa-database/Home/Chemical/514>- źródło dostępne 30.03.2026r.
341. Wijayanti A.D., Muzaki A.Y., Wibisono C., Widiasih D.A. (2024) Therapeutic effects of lincomycin and level of drug degradation in broiler tissues after treatment. *Vet World.*, 5, 1026-1034. DOI: 10.14202/vetworld.2024.1026-1034.
342. Wu I.-L., Turnipseed S.B., Andersen W.C., Madson M.R. (2020) Analysis of peptide antibiotic residues in milk using liquid chromatography-high resolution mass spectrometry (LC-HRMS). *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess.*, 37.8, 1264-1278. DOI: 10.1080/19440049.2020.1766703
343. Wu Y., Jiang S., Li D., Wu Y., Li Q., Wang X., Liu B., Bao H., Wu D., Hu X. (2024) Clinical Efficacy and Safety of Colistin Sulfate in the Treatment of Carbapenem-Resistant Organism Infections in Patients with Hematological Diseases. *Infect Dis Ther* 13, 141–154 DOI:10.1007/s40121-023-00909-8
344. Xavier B.B. Lammens C. Ruhal, R. Kumar-Sing S. Butaye P. Goossens H. Malhotra-Kumar, S. (2016) Identification of a novel plasmid-mediated colistin-resistance gene, *mcr-2*, in *Escherichia coli*, *Euro Surveill.*, 7, 21, 27, 30280. DOI: 10.2807/1560-7917.ES.2016.21.28.30282
345. Xiong, J., Zhu, Q., Yang, S., Zhao, Y., Cui, L., Zhuang, F., Qiu, Y., Cao, J. (2019) Comparison of pharmacokinetics of tilmicosin in healthy pigs and pigs experimentally infected with *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *N Z Vet J.*, 67, 5, 257–263. DOI:10.1080/00480169.2019.1633434
346. Xu Z.L., Deng H., Deng X.F., Yang J.Y., Jiang Y.M., Zeng D.P., Huang F., Shen Y.D., Lei H.T., Wang H. i in. (2012) Monitoring of organophosphorus pesticides in vegetables using monoclonal antibody-based direct competitive ELISA followed by HPLC–MS/MS. *Food Chem.*, 131.4, 1569-1576.
347. Yamaguchi T., Okihashi M., Harada K., Uchida K., Konishi Y., Kajimura K., Hirata K., Yamamoto Y. (2015) Rapid and easy multiresidue method for the analysis of antibiotics in meats by ultrahigh-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *J Agric Food Chem.*, 63.21, 5133-5140. DOI: 10.1021/acs.jafc.5b00170
348. Yan, X., Liu, J., Jia, Y., Yao, Z., Zhou, M., Song, S., Yuan, S., Zhang, D., Zhang, N. (2023) The pharmacokinetics of tilmicosin in plasma and joint dialysate in an experimentally *Mycoplasma synoviae* infection model. *Poul Sci.*, 102, 102572. DOI:10.1016/j.psj.2023.102572
349. Yang B., Liu S., Guo Y., Qu H., Feng Y., Wang Y., Dong B., Dong Y., Zhao S., Huang S., Zhao L., Zhang J., Ji C., Ma Q. (2024) Pharmacokinetics of Tilmicosin in Plasma, Urine and Feces after a Single Intra-gastric Administration in Donkey (*Equus asinus*). *J Vet Pharmacol Ther.*, 47, 4, 257-265. DOI: 10.1111/jvp.13446.
350. Yang Y.Q., Li Y.X., Lei C.W., Zhang A.Y., Wang H.N. (2018) Nove lplasmid-mediated colistin resistance gene *mcr-7.1* in *Klebsiella pneumoniae*. *J Antimicrob Chemother.*, 73, 1791–1795. DOI: 10.1093/jac/dky111

351. Yáñez J.A., Remsberg C.M., Sayre C.L., Forrest M.L., Davies N.M. (2011) Flip-flop pharmacokinetics-delivering a reversal of disposition: challenges and opportunities during drug development. *Ther Deliv.*, 2, 5, 643-72. DOI: 10.4155/tde.11.19.
352. Yassin A.K., Zhang J., Wang J., Chen L., Kelly P., Butaye P., Lu G., Gong J., Li M., Wang Y. et al. (2017) Identification and characterization of mcr mediated colistin resistance in extra intestinal *Escherichia coli* from poultry and live stock in China. *FEMS Microbiol Lett.*, 364, fnx242. DOI: 10.1093/femsle/fnx242
353. Yazar E., Altunok V., Elmas M., Tras B., Bas A.L., Ozdemir V. (2002) The effect of tilmicosin on cardiac superoxide dismutase and glutathione peroxidase activities. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health.*, 49, 209–210. DOI: 10.1046/j.1439-0450.2002.00545.x
354. Yazar, E Oztekin E., Sivrikaya A., Col R., Elmas M., Bas A. (2004) Effects of different doses of tilmicosin on malondialdehyde and glutathione concentrations in mice. *Acta Vet Brno.*, 73, 69–72. DOI:10.2754/AVB200473010069
355. Yibar A., Özcan A., Karaca M.Y. (2014) Determination of erythromycin, spiramycin, tilmicosin and tylosin in animal feedingstuffs by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Kafkas Univ Vet Fak Derg.*, 20.3, 439-444. DOI:10.9775/kvfd.2013.10365
356. Yin W., Li H., Shen Y., Liu Z., Wang S., Shen Z., Zhang R., Walsh T.R., Shen J., Wang Y. (2017) Novel plasmid-mediated colistin resistance gene mcr-3 in *Escherichia coli*. *MBio*, 27, 8, e00543-17. DOI: 10.1128/mBio.00543-17
357. Yipel M., Tekeli İ.O., Kürekçi C. (2018) Multi-class antibiotic residue screening of chicken muscle by LC-MS/MS. *FÜ Sağ Bil Vet Derg.*, 32, 99-10.
358. Youssef M.A., Ibrahim H.M., Farag E.-S.M., El-Khodery S.A. (2016) Effects of tilmicosin phosphate administration on echocardiographic parameters in healthy donkeys (*Equus asinus*): An experimental study. *J Equine Vet Sci.*, 38, 24–29. DOI:10.1016/j.jevs.2016.01.004
359. Yu J., Yang H.M., Lai Y.Y., Wan X.L., Wang Z.Y. (2020) The body fat distribution and fatty acid composition of muscles and adipose tissues in geese. *Poult Sci.*, 99, 9, 4634–4641. DOI:10.1016/j.psj.2020.05.052
360. Zavascki A.P., Nation R.L. (2017) Nephrotoxicity of Polymyxins: is there any difference between Colistimethate and Polymyxin B? *Antimicrob Agents Chemother.*, 61, e02319-16. DOI: 10.1128/AAC.02319-16.
361. Zeng Z., Wu J., Yang G., Chen Z., Huang X., Ding H. (2010) Study of colistin depletion in duck tissues after intramuscular and oral administration. *J Vet Pharmacol Ther.*, 33, 4, 408–410. DOI:10.1111/j.1365-2885.2009.01136.x.
362. Zhang L., Zhao L., Liu Y., Liu J., Li X. (2017) Pharmacokinetics of tilmicosin in healthy pigs and in pigs experimentally infected with *Haemophilus parasuis*. *J Vet Sci.*, 31, 18, 431-437. DOI: 10.4142/jvs.2017.18.4.431.
363. Zhang M., Qian K., Li G.H., Duan M.H., Li Z.E., Dai Y., Chen J.C., Yang F. (2023) Depletion of tilmicosin residue in Gushi chickens following oral administration via drinking water. *J Vet Pharmacol.*, 47, 114–120. DOI:10.1111/jvp.13416
364. Zhang N., Liu Z., Wei Y., Zhang C., Mao C., Cai Q., Shen X., Ding H. (2020) Comparison of the pharmacokinetics of tilmicosin in plasma and lung tissue in healthy chickens and chickens experimentally infected with *Mycoplasma gallisepticum*. *J Vet Pharmacol Ther.*, 43, 4, 347–354. DOI:10.1111/jvp.12847
365. Zhang N., Ye X., Wu Y., Huang Z., Gu X., Cai Q., Shen X., Jiang H., Ding H. (2017) Determination of the mutant selection window and evaluation of the killing of *Mycoplasma gallisepticum* by danofloxacin, doxycycline, tilmicosin, tylvalosin and valnemulin. *PloS One*, 12, 1, e0169134. DOI:10.1371/journal.pone.0169134

366. Zhang N., Zhou M., Yan X., Liu J., Yuan S., Yang H., Ding H., Zhang D., Bai Y. (2022) Pharmacokinetic and Pharmacodynamic integration of tilmicosin against *Mycoplasma gallisepticum* in the target infection site in chickens. *Front Vet Sci.*, 29, 9, 952599. DOI: 10.3389/fvets.2022.952599
367. Zhang P., Hao H., Li J., Ijaz A., Cheng G., Chen D., Tao Y., Huang L., Wang Y., Dai M. (2016) The epidemiologic and pharmacodynamic cutoff values of tilmicosin against *Haemophilus parasuis*. *Front. Microbiol.*, 7, 385–389. DOI: 10.3389/fmicb.2016.00385
368. Zhang Y., Jiang H., Jin X., Shen Z., Shen J., Fu C., Guo J. (2004) Residue depletion of tilmicosin in chicken tissues. *J Agric Food Chem.*, 52, 9, 2602–2605. DOI:10.1021/jf035515z
369. Zhao M., Wu X.J., Fan Y.X., Zhang Y.Y., Guo B.N., Yu J.C., Cao G.Y., Chen Y.C., Wu J.F., Shi Y.G., Li J., Zhang J. (2018) Pharmacokinetics of colistin methanesulfonate (CMS) in healthy Chinese subjects after single and multiple intravenous doses. *Int J Antimicrob Agents.*, 51, 5, 714-720. DOI: 10.1016/j.ijantimicag.2017.12.025.
370. Zheng Y., Liu Y., Guo H., He L., Fang B., Zeng Z. (2011) Molecularly imprinted solid-phase extraction for determination of tilmicosin in feed using high performance liquid chromatography. *Anal Chim Acta.*, 1, 690, 269-274. DOI: 10.1016/j.aca.2011.02.029.
371. Zi-ming W. (2009) Determination of Lincomycin Hydrochloride Injection by UV Spectrophotometry. *Progress in Veterinary Medicine*. [https://en.cnki.com.cn/Article\\_en/CJFDTOTAL-DYJZ200912017.htm](https://en.cnki.com.cn/Article_en/CJFDTOTAL-DYJZ200912017.htm) - źródło dostępne 30.03.2026r.
372. Ziv G., Nouws F.M., Van Ginnekin C.A.M. (1982) The pharmacokinetics and tissue levels of polymyxin B, colistin and gentamicin in calves. *J Vet Pharmacol Therap.*, 5, 45-58.
373. Ziv G., Shem-Tov M., Glickman A., Winkler M., Saran A. (1995) Tilmicosin antibacterial activity and pharmacokinetics in cows. *J Vet Pharmacol Therap.*, 18, 5, 340–345. DOI:10.1111/j.1365-2885.1995.tb00601.x
374. Ziv G., Sulman F.G. (1973a) Passage of polymyxin from serum into milk in ewes. *Am J Vet Res.*, 34, 317-322. DOI:10.2460/ajvr.1973.34.03.317
375. Ziv G., Sulman F.G. (1973b) Penetration of lincomycin and clindamycin into milk in ewes. *Br Vet J.*, 129, 83–91. DOI:10.1016/S0007-1935(17)36593-4.
376. Zoetis, Lincocin, 400 mg/g proszek do podania w wodzie do picia dla świń i kur: [https://www.google.com/url?sa=t&source=web&rct=j&opi=89978449&url=https://www.zoetis.com.pl/\\_locale-assets/charakterystyki-produktow/lincocin\\_qrd\\_2025.02\\_dec.pdf](https://www.google.com/url?sa=t&source=web&rct=j&opi=89978449&url=https://www.zoetis.com.pl/_locale-assets/charakterystyki-produktow/lincocin_qrd_2025.02_dec.pdf) - źródło dostępne 30.03.2026r.

## X. SPIS RYCIN I TABEL

- Ryc. 1. Gęś biłgorajska (Gospodstwo agroturystyczne - Majatek „Rutka”, Puchaczów)  
(Źródło: Autor).
- Ryc.2. Wzór strukturalny tylmikozyiny  
(Źródło:<https://www.medchemexpress.com/Tilmicosin.html>).
- Ryc. 3. Wzór strukturalny kolistyny  
(Źródło:<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Colistin>).
- Ryc. 4. Wzór strukturalny linkomycyny  
(Źródło:<https://www.medchemexpress.com/lincomycin-standard.html>).
- Ryc. 5. Metabolizm leków w wątrobie  
(Źródło:<http://e-biotechnologia.pl/artykuly/metabolizm-ksenobiotykow/>).
- Ryc. 6. Typowy profil zależności stężenia leku w osoczu od czasu, pokazujący parametry farmakokinetyczne i farmakodynamiczne, uzyskany po doustnym podaniu pojedynczej dawki leku (Źródło:<https://www.pharmacy180.com/article/plasma-drug-concentration-time-profile-2506/>).
- Ryc. 7. Schemat podawania tylmikozyiny (Źródło: Autor).
- Ryc. 8. Półlogarytmiczny wykres średnich ( $\pm$ SD) stężeń tylmikozyiny w osoczu w czasie, po podaniu IV, SC, jednorazowym PO oraz wielokrotnym PO (Źródło: Autor).
- Ryc. 9. Średnie stężenia tylmikozyiny w wątrobie, nerkach i mięśniach po 5. dniu wielokrotnego podawania doustnego (25 mg/kg) u gęsi (Źródło: Autor).
- Ryc.10. Obliczony okres karencji dla tylmikozyiny w wątrobie gęsi po wielokrotnym doustnym podaniu w dawce 25 mg/kg przez pięć kolejnych dni (Źródło: Autor).
- Ryc: 11. Obliczony okres karencji dla tylmikozyiny w mięśniach gęsi po wielokrotnym doustnym podaniu w dawce 25 mg/kg przez pięć kolejnych dni (Źródło: Autor).
- Ryc. 12. Obliczony okres karencji dla tylmikozyiny w nerkach gęsi po wielokrotnym doustnym podaniu w dawce 25 mg/kg przez pięć kolejnych dni (Źródło: Autor).
- Ryc. 13. Schemat podawania kolistyny (Źródło: Autor).
- Ryc. 14. Półlogarytmiczne krzywe średniego stężenia KOL w osoczu w funkcji czasu po jednorazowym podaniu dożylnym (1 mg/kg) i doustnym (30 mg/kg) oraz wielokrotnym (2,5 mg/kg) doustnym u gęsi (n = 16) (Źródło: Autor).
- Ryc. 15. Histogram średnich ( $\pm$ SD) stężeń KOL w wybranych tkankach w czasie po pięciu dniach wielokrotnego podawania doustnego (2,5 mg/kg) u gęsi (Źródło: Autor).

- Ryc. 16. Schemat podawania LIN (Źródło: Autor).
- Ryc.17. Półlogarytmiczne krzywe średniego stężenia LIN w osoczu w funkcji czasu ( $\pm$  SD) po jednorazowym dożylnym (15 mg/kg), domięśniowym (15 mg/kg) oraz jednorazowym (50 mg/kg) i wielokrotnym (5 mg/kg) podaniu doustnym u gęsi (Źródło: Autor).
- Ryc. 18. Półlogarytmiczny wykres stężeń LIN w mięśniach, wątrobie, nerkach oraz płucach i sercu gęsi w kolejnych punktach pobierania próbek po wielokrotnym podaniu doustnym (Źródło: Autor).
- Ryc. 19. Obliczony okres karencji dla LIN w mięśniach gęsi po wielokrotnym doustnym podaniu w dawce 5 mg/kg przez siedem kolejnych dni (Źródło: Autor).
- Ryc. 20. Obliczony okres karencji dla LIN w nerkach gęsi po wielokrotnym doustnym podaniu w dawce 5 mg/kg przez siedem kolejnych dni (Źródło: Autor).
- Ryc. 21. Obliczony okres karencji dla LIN w wątrobie gęsi po wielokrotnym doustnym podaniu w dawce 5 mg/kg przez siedem kolejnych dni (Źródło: Autor).
- Ryc. 21. Obliczony prowizoryczny okres karencji dla LIN w sercu gęsi po wielokrotnym doustnym podaniu w dawce 5 mg/kg przez siedem kolejnych dni (Źródło: Autor).
- Ryc. 22. Obliczony prowizoryczny okres karencji dla LIN w płucach gęsi po wielokrotnym doustnym podaniu w dawce 5 mg/kg przez siedem kolejnych dni (Źródło: Autor).
- Tab.1. Najwyższe dopuszczalne stężenie pozostałości wybranych antybiotyków w tkankach oraz produktach pochodzenia zwierzęcego (Źródło: w tabeli).
- Tab.2. Wyniki walidacji metody HPLC do ilościowego oznaczania tylmikozyiny w osoczu i wybranych tkankach u gęsi (Źródło: Autor).
- Tab.3. Średnie wartości parametrów farmakokinetycznych tylmikozyiny i zakres wartości po dożylnym (5 mg/kg), podskórnym (10 mg/kg), pojedynczym (25 mg/kg) i wielokrotnym (25 mg/kg przez 5 dni) podaniu doustnym (Źródło: Autor).
- Tab. 4. Parametry farmakokinetyczne wraz z SD ( $\pm$ ) w badanych tkankach w 5. dniu po wielokrotnym doustnym podaniu dawki 25 mg/kg u gęsi (Źródło: Autor).
- Tab. 5. Wyniki walidacji metody UHPLC-MS/MS do ilościowego oznaczania KOL w osoczu i tkankach u gęsi (Źródło: Autor).
- Tab. 6. Parametry PK dla KOL u gęsi po jednorazowym podaniu dożylnym (1 mg/kg) i doustnym (30 mg/kg) oraz podaniu wielokrotnym doustnym (2,5 mg/kg przez 5 dni) (Źródło: Autor)

Tab. 7. Wyniki walidacji metody oznaczania stężeń LIN w osoczu i różnych tkankach gęsi (Źródło: Autor).

Tab. 8. Średnie wartości parametrów PK dla LIN (i zakres wartości) po dożylnym (15 mg/kg), domięśniowym (15 mg/kg), jednorazowym (50 mg/kg) i wielokrotnym (5 mg/kg przez 7 dni) podaniu doustnym (Źródło: Autor).

## **XI. PUBLIKACJE WCHODZĄCE W SKŁAD CYKLU**

# Disposition kinetics and tissue residues of tilmicosin following intravenous, subcutaneous, single and multiple oral dosing in geese (*Anser anser domesticus*)

Krzysztof Bourdo<sup>1</sup> | Charbel Fadel<sup>2,3,4</sup>  | Mario Giorgi<sup>2,4</sup>  | Andrejs Šitovs<sup>5</sup>  |  
Annart Poapolathep<sup>6</sup> | Beata Łebkowska-Wieruszewska<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Pharmacology, Toxicology and Environmental Protection, University of Life Sciences, Lublin, Poland

<sup>2</sup>Department of Veterinary Sciences, University of Sassari, Sassari, Italy

<sup>3</sup>Department of Veterinary Medicine, Lebanese University, Beirut, Lebanon

<sup>4</sup>Department of Veterinary Sciences, University of Pisa, Pisa, Italy

<sup>5</sup>Department of Pharmacology, Riga Stradins University, Riga, Latvia

<sup>6</sup>Faculty of Veterinary Medicine, Department of Pharmacology, Kasetsart University, Bangkok, Thailand

## Correspondence

Beata Łebkowska-Wieruszewska,  
Department of Pharmacology, Toxicology and Environmental Protection, University of Life Sciences, Lublin, Poland.  
Email: [lebkwowska.wieruszewska@up.lublin.pl](mailto:lebkwowska.wieruszewska@up.lublin.pl)

## Abstract

Tilmicosin (TMC), a semi-synthetic macrolide antibiotic, is widely used in veterinary medicine due to its broad-spectrum, bacteriostatic properties. Frequently administered in various birds species, it is likely used off-label in geese as well. The study sought to investigate TMC's pharmacokinetics, tissue residues, in geese through in vivo experiments. The study involved longitudinal open studies on 15 healthy adult males, with three phases separated by one-month washout periods. Geese were administered TMC through intravenous (IV, 5 mg/kg), subcutaneous (SC, 10 mg/kg), and oral (PO, 25 mg/kg for five consecutive days) routes, with blood samples drawn at specific intervals. Tissue samples were also collected for subsequent analysis at pre-assigned times. TMC in goose plasma was quantified by a fully validated HPLC method. Plasma concentrations were quantified up to 4 hr for the PO and IV routes, and up to 10 hr in the SC route. Significant variations in bioavailability were observed between SC (87%) and PO (4%) routes. The body extraction ratio was low at 0.03, suggesting minimal ability of the liver and kidneys to eliminate TMC. Multiple oral doses showed no plasma accumulation, but tissue data revealed extensive distribution and prolonged residence, up to 120 h, suggesting a sustained therapeutic effect despite the brief plasma half-life. Regarding the multiple PO doses, provisional withdrawal times of 6, 7.5, and 8 days were suggested for the liver, muscles, and kidneys, respectively, according to the MRL set for these matrices in chickens by EMA. In conclusion, while the practical oral administration is discouraged at the population level, SC administration of TMC may be appropriate for geese, albeit impractical for flock therapy.

## KEYWORDS

geese, pharmacokinetics, routes of administration, tilmicosin, tissue residues

## 1 | INTRODUCTION

Geese stand as one of the earliest avian species to be commercially domesticated. Within the realm of birds, geese possess several advantageous biological characteristics, including rapid growth

and the ability to efficiently utilize green forages (Romanov, 1999). These traits make geese highly profitable in various parts of the world, where they are raised for their meat, fatty liver, eggs, and feathers (Hugo, 1995; Romanov, 1999). Despite being less prevalent than poultry, the global demand for geese has surged in recent

years, notably in countries such as China, Hungary, France, Ukraine, Egypt, and Poland, leading to a significant increase in geese production (Cilavdaroglu et al., 2020; Fadel, Łebkowska-Wieruszewska, Lisowski, et al., 2023; Kozák et al., 2010). Indeed, waterfowl meat and eggs are highly prized globally due to their excellent nutritional quality.

The prevalence of bacterial infections in farms has increased significantly due to unfavorable environmental factors like heat/cold stress and intensive farming (Bilal et al., 2021). Geese are susceptible to gastrointestinal and respiratory infections caused by bacteria such as *Escherichia coli*, *Pasteurella multocida*, *Salmonella* spp., and *Mycoplasma* spp. (Olsen et al., 2010; Sartini et al., 2023; Fadel, Łebkowska-Wieruszewska, Bourdo, et al., 2023). Such infections lead to substantial economic losses, resulting in decreased growth and egg production, as well as heightened mortality and treatment expenses in domestic goose industry worldwide (Stipkovits & Szathmary, 2012). Additionally, wild birds could serve as significant reservoirs and carriers of pathogenic bacterial strains, posing a threat to other domestic poultry.

Tilmicosin (TMC), a semi-synthetic macrolide antibiotic, is widely used in veterinary medicine due to its broad-spectrum, bacteriostatic properties. It has significant potential in various clinical veterinary applications. Its effectiveness is attributed to its extensive distribution, prolonged half-life, and preferential accumulation in tissues (Debono et al., 1989). It is licensed in many countries for managing bacterial infections in rabbits, turkeys, chickens, pigs, sheep, and cattle (Christodouloupoulos et al., 2002; Hoar et al., 1998; Moore et al., 1996).

Although specific data or statistics on practitioners using TMC in geese by extrapolating the dose are lacking, it is likely that such off-label usage occurs in practice. This likelihood stems from the widespread occurrence of mycoplasmosis, a respiratory condition treated with TMC, affecting not just chickens but also ducklings, turkeys, pigeons, and geese. While the pharmacokinetics (PK) of TMC have been studied in various animal species, research in geese is notably absent. This gap in comprehensive data regarding antibacterial use in geese presents a significant challenge for the industry. It is essential to comprehend the efficacy and proper utilization of antibacterials in geese to address health concerns and ensure the birds' well-being. Moreover, the limited knowledge in this area raises concerns about antimicrobial resistance, a pressing global issue demanding cautious antibiotic use in livestock farming. Therefore, it is essential to conduct targeted research on the pharmacological properties of antimicrobials in geese, avoiding risky extrapolations from other species. Hence, the primary objective of this study was to examine and present a comprehensive analysis of the PK characteristics and tissue residue patterns of TMC in healthy geese, with the additional aim of suggesting provisional withdrawal periods in tissues. This investigation encompassed single and repeated oral (PO) administrations, intravenous (IV), and subcutaneous (SC) administrations. The authors theorize that the PK and residue profile of TMC in geese may exhibit notable differences compared to other animal species, necessitating a

comprehensive investigation to elucidate its optimal administration regimen in this avian species.

## 2 | MATERIALS AND METHODS

### 2.1 | Chemicals and reagents

The pure powders of TMC and phthalimide, both with a standard purity of 99.0% and the latter used as the internal standard (IS), were obtained from Sigma-Aldrich in Milan, Italy. Acetonitrile (ACN), formic acid, and dichloromethane ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ) were purchased from VWR chemicals (Oud-Heverlee, Belgium) in high-performance liquid chromatography (HPLC) grade. With the aid of a Milli-Q Millipore Water System, deionized water was produced (Millipore, Darmstadt, Germany). The aqueous and organic components of the mobile phase were degassed under pressure and combined in the HPLC system. The mobile phases were filtered through 0.2  $\mu\text{m}$  cellulose acetate membrane filters using a solvent filtration apparatus (Sartorius Stedim Biotech, Goettingen, Germany).

### 2.2 | Animals

This study utilized 15 healthy adult male Bilgorajska geese, aged 2 years, with weights ranging from 4.1 to 5.6 kg. These geese were sourced from a local farm (Majątek Rutka, Puchaczowmic, Poland). They have not received any prior antibiotic treatment and were individually distinguished by rings on their left legs. Prior to the study, a thorough evaluation by the supervising veterinarians (B. L-W; C F) confirmed their good health through physical examination, serum chemistry, and hematological analyses. The geese underwent a week-long acclimatization period in the new environment, which included daily monitoring of their behavior and appetite. They were housed in a 60 m<sup>2</sup> enclosed area with an indoor shelter measuring 8 m<sup>2</sup> and had unrestricted access to feed and water. The animal experiment was carried out in accordance with European law (2010/63/UE) and approved (nr. 105/2022) by the Institutional Animal Care and Use Committee of the University of Lublin (Poland).

The study design involved a series of longitudinal, open studies conducted on the previously described geese. Each phase was separated by a one-month washout period. The oral dose was chosen based on the recommended dosage for chickens and turkeys (according to the UK label). Similarly, the SC dose was selected based on the recommended dosage for sheep and cattle (according to both UK and US labels). Lastly, the authors intentionally selected a lower IV dose in the present study to focus on assessing the primary PK parameters.

In the initial phase, geese received a single IV dose of TMC at 5 mg/kg (Micorion®, Orion pharma, 300 mg/mL), administered through a sterile 20-gauge 3.75 cm needle in the left-wing vein. In the second phase, a single SC dose of TMC (10 mg/kg; Micorion®,

Orion pharma) was administered in the inter-scapular region. The third phase involved a multiple oral administration of TMC solution (25 mg/kg; Tylmiskan®, ScanVet, 300 mg/mL) via crop gavage, with the cannula being flushed promptly afterward with 5 mL of water to ensure proper delivery. Geese received multiple PO administrations of TMC solution (25 mg/kg) for five consecutive days at 08:00 am. As for the blood samples, approximately 1 mL each was drawn from the right-wing vein at specific time intervals during all phases: 0, 0.085 (for IV administration only), 0.25, 0.5, 0.75, 1, 1.5, 2, 4, 6, 8, 10, 24, and 48 (except for the multiple PO) hour. For the oral administrations, blood sampling occurred on the first and fifth days following the same aforementioned pattern. The blood was collected in heparinized tubes and then centrifuged at 1500×g. Subsequently, the plasma was carefully harvested and stored at a temperature of -20°C. The analysis of the stored plasma was conducted within 40 days from the time of collection, after each phase. Following the multiple administration, sets of three geese were euthanized at specific time points: 24, 48, 76, 92, and 120 h after the last oral dose of the multiple administration. Tissue samples, including approximately 20 g of muscle, liver, and kidney, were collected and stored at -20°C for subsequent analysis.

### 2.3 | Tilmicosin quantification in plasma and tissues

In a previous study by Zhang et al. (2016), a validated method for preparing and measuring TMC concentrations in pig plasma was established. This method was adapted in this study with some modifications. For plasma extraction, 0.2 mL was combined with 40 µL of 25 µg/mL IS and briefly vortexed. Then, 1.2 mL of CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> was added, and the mixture was vortexed for 50 s. After a 10-min centrifugation at 4000×g, the lower layer (1.4 mL) was collected. The remaining plasma layer underwent a double extraction using an additional 1.2 mL of CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, followed by a 40-s vortex and a 4-min centrifugation at 4000×g. The lower layer was collected again and combined with the previously collected solution and was gently evaporated with nitrogen at 45°C. After reconstitution in 100 µL of the mobile phase and vortexing for 40 s, samples were transferred into vials and injected onto HPLC, with an injection volume of 50 µL.

For tissue samples, the muscle, liver, and kidney samples were thawed and immediately dissected into small pieces (Garcia et al., 2000; Sartini et al., 2021). An aliquot of 1 g per tissue was placed into a plastic tube with 3 mL of homogenization solution (0.1 M dihydrogen phosphate buffer at pH 7.1). This suspension was homogenized for approximately 1 min, and then 0.3 mL was processed as previously described for plasma samples. The method used for plasma analysis was seamlessly adapted and validated for these diverse tissues, with slight variations in volumes. Initially, to the 0.3 mL, 200 µL of 25 ppm of the IS was added instead. Then, subsequent process involved a double extraction with 2.4 mL of CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> used each time.

### 2.4 | HPLC conditions

The HPLC system was an LC Jasco consisting of a ternary gradient system (PU 980), in-line degasser (DG-2080-53), autosampler (AS2055), and a UV detector that was set to wavelength of 285 nm. The chromatographic separation assay was performed with a Luna C18 analytical column (250×4.6 mm inner diameter, 5 µm particle size, Phenomenex) maintained at 30°C using a Peltier system (CO4062) (Jasco). The mobile phase consisted of 0.1% formic acid of 5 mM of ammonium formate in water (phase A) and ACN (phase B). The column was eluted isocratically using 24% A and 76% B at a flow rate of 0.8 mL/min.

### 2.5 | Validation of the analytical method for plasma and tissues

TMC's stock solution of 1 mg/mL was dissolved in ACN, and the remaining series of dilutions was dissolved in mobile phase. As for the IS, it was dissolved in MeOH. All solutions were stored at -20°C. Dilutions at 5, 2.5, 1, 0.5, 0.1, and 0.01 µg/mL were used for TMC calibration curve in plasma. Linearity was assessed from 0.01 to 5 µg/mL using residual plot, fit test, and back calculation. Six plasma samples spiked with IS at high (5 µg/mL), middle (2.5 µg/mL), and low (0.01 µg/mL) concentration standards were analyzed using the same instrument and operator on the same day and three different days, respectively, to determine the intra-day and inter-day precision. Drug recoveries were evaluated based on detector responses of quality control samples and pure standards. The Limit of Detection (LOD) was estimated as the plasma drug concentration that produced a signal-to-noise ratio of 3, and Lower Limit of Quantification (LLOQ) was determined as the lowest plasma concentration that produced a signal-to-noise ratio of 5 (Anonymous, 2012).

### 2.6 | Pharmacokinetic and statistical analysis

PK analyses were conducted employing PKanalix™ software (R1, 2023), using a non-compartmental approach. The concentration versus time curves were used to directly calculate the maximum plasma concentration ( $C_{max}$ ) and the time required to reach it ( $T_{max}$ ). By analyzing the concentration-time curve using least squares regression, the elimination half-life ( $t_{1/2}$ ) was calculated. The area under the curve (AUC) was calculated by linear log trapezoidal rule for the IV administration and by the linear-up log-down rule for the PO and SC administrations. The  $AUC_{rest}$  for each individual was less than 20% of  $AUC_{(0-\infty)}$ , and the coefficient of determination ( $R^2$ ) of the terminal phase regression line was greater than 95%. Values below the LLOQ were excluded from the PK analysis. The accumulation index has been calculated as the ratio between  $AUC_{0-\infty}$  after the last administration in the multiple dose protocols and  $AUC_{0-\infty}$  after the single dose (Toutain & Bousquet-Mélou, 2004a). A value close to 1 indicates that no accumulation occurred.

The PO and SC bioavailability (F) was calculated using the following equation:

$$F\% = 100 \times \frac{\text{AUC(PO or SC)} \times \text{Dose (IV)}}{\text{AUC(IV)} \times \text{Dose (PO or SC)}}$$

The mean absorption time (MAT) was calculated using the following equation:

$$\text{MAT}_{(\text{PO or SC})} = \text{MRT}_{(\text{PO or SC})} - \text{MRT}_{(\text{IV})}$$

The body extraction ratio ( $E_{\text{body}}$ ) for TMC after IV administration was calculated using  $\text{Cl}/\text{CO}$  (Toutain & Bousquet-Mélou, 2004b), where CO (mL/kg/min) is the cardiac output calculated according to the allometric equation in birds:  $290.7 \times \text{body weight (in kg)}^{0.69}$  (Grubb, 1983).

To assess statistically significant variations in PK variables among the treatment groups, a one-way analysis of variance was employed, followed by the application of Bonferroni's multiple comparison test as a post-hoc analysis. A  $p$ -value  $< .05$  was considered statistically significant. GraphPad InStat was used for the analyses (GraphPad Software 5.3v).

## 2.7 | Residue analysis

A naïve pooled-data approach using a non-compartmental analysis (Pouplin et al., 2016) was used to calculate the PK parameters for TMC in all the selected tissues. The drug's tissue penetration was evaluated by comparing the mean  $\text{AUC}_{\text{tissues}}$  in each tissue with the individual  $\text{AUC}_{\text{Multi PO}}$  values ( $\text{AUC}_{(0-\infty) \text{ tissue/plasma}}$ ).

Withdrawal times (WT) for TMC in geese tissues were calculated using the EMA-developed software WT 1.4 (Anonymous, 2018). The WT was determined as the point at which the upper one-sided tolerance limit (99%) with a 95% confidence interval fell below the maximum residue limit (MRL). For this study, the MRL values specified by EMA for TMC in chicken tissues, 1 µg/g for liver, 0.25 µg/g for kidneys, and 0.075 µg/g for muscles, were employed, as outlined in the summary report (EMA, 2002).

## 3 | RESULTS

### 3.1 | Analytical method validation

The quantitative HPLC method was fully validated for each of the goose tissues and plasma in terms of linearity, intra-day and inter-day precision, recovery, LOD, and LLOQ, according to the EMA guidelines (Anonymous, 2012). Table 1 presents the outcomes of the analytical method validation, showcasing key parameters assessed in plasma and all analyzed tissues. The method exhibited excellent recovery rates, low LLOQs, and linearity across the range of 0.01–5 µg/mL for each matrix studied.

### 3.2 | Animals

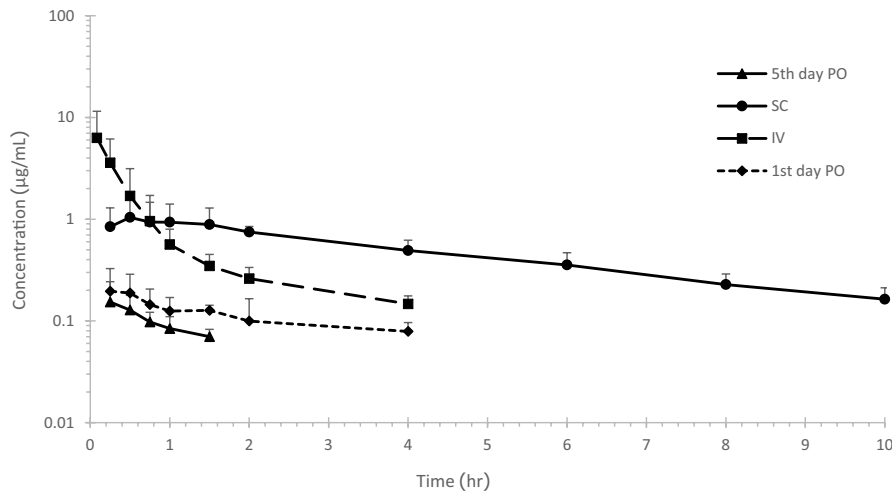
Throughout the entire study period, the geese did not exhibit any noticeable immediate or delayed (up to 7 days) adverse effects, either locally or systemically.

### 3.3 | Pharmacokinetics

Plasma concentrations were quantified up to 4 h for the PO and IV routes, and up to 10 h in the SC route. Figure 1 depicts the semi-logarithmic plot of the mean ( $\pm$ SD) plasma TMC concentrations over time following IV, SC, single, and multiple PO administrations. Table 2 displays the mean PK parameters based on non-compartmental analysis. With the exception of  $T_{\text{max}}$ , which is presented as a categorical variable with its median value and range, and the terminal half-life expressed as the harmonic mean, the PK parameters of TMC have been displayed as geometric means along with their respective ranges (Julious & Debnarot, 2000). A short terminal half-life, a relatively fast clearance, and moderate volume of distribution were observed after IV administration. The body extraction rate was low at 0.03. The absolute bioavailability was low (4%) for the oral administration, and rather high after SC administration (87%). The accumulation ratio of 1.06 suggested that no plasma accumulation occurred after multiple PO.

TABLE 1 Results of the HPLC method validation for tilmicosin quantification in plasma and different tissues in geese.

Parameter	Unit	Matrix			
		Plasma	Muscle	Kidney	Liver
Equation		$y = 0.3566x - 0.0176$	$y = 0.289x + 0.03$	$y = 0.373x - 0.163$	$y = 0.267x + 0.246$
$R^2$		.997	.991	.999	.999
Inter-day CV	%	12.3	4.7	11.9	15.4
Intra-day CV	%	2.9	2.1	3.8	4.1
Recovery	%	86	94	91	89
LLOQ	µg/mL; µg/g	0.01	0.01	0.01	0.01
LOD	µg/mL; µg/g	0.005	0.007	0.007	0.007



**FIGURE 1** Semi-logarithmic mean plasma concentration–time curves of tilmicosin following intravenous (5 mg/kg), subcutaneous (10 mg/kg), and oral (25 mg/kg) administrations in geese ( $n=15$ ).

**TABLE 2** Mean pharmacokinetic parameters of tilmicosin and range in geese ( $n=15$ ) after intravenous (5 mg/kg), subcutaneous (10 mg/kg), single (25 mg/kg), and multiple (25 mg/kg for 5 days) oral administrations.

Parameter	Unit	IV			SC			PO			Multi PO		
		Geo mean	Max	Min	Geo mean	Max	Min	Geo mean	Max	Min	Geo mean	Max	Min
$AUC_{(0-\infty)D}$	$h^*ug/mL$	0.61	1.54	0.24	0.52	0.89	0.37	0.02 <sup>a,b</sup>	0.03	0.01	0.02 <sup>a,b</sup>	0.03	0.01
$\lambda_z$	1/h	0.37	0.72	0.3	0.19 <sup>a,b</sup>	0.29	0.15	0.58	0.95	0.17	0.28	1.25	0.14
$t_{1/2}^f$	h	1.86	2.33	0.96	3.62 <sup>a,b</sup>	4.57	2.35	1.18	4.06	0.73	2.45	4.96	0.56
Cl	L/h/kg	1.63	4.02	0.65	0	—	—	—	—	—	—	—	—
$V_d$	L/kg	4.87	7.77	1.57	—	—	—	—	—	—	—	—	—
$MRT_{(0-\infty)}$	h	1.41	2.27	0.71	5.42 <sup>a,c</sup>	6.97	3.79	1.8	5.39	1.19	3.68 <sup>a</sup>	7.53	0.93
$C_{maxD}$	$\mu g/mL$	—	—	—	0.106 <sup>c,d</sup>	0.195	0.056	0.021	0.036	0.009	0.013	0.033	0.008
$T_{max}^e$	h	—	—	—	0.50	2	0.50	0.50	1.50	0.25	0.25	0.50	0.25
$F$	%	—	—	—	86.32 <sup>c,d</sup>	179.03	29.86	3.98	6.80	1.28	3	6.95	0.75
MAT	h	—	—	—	4.02	6.26	2.33	1.31	3.61	0.48	3.11	5.33	1.80

Note:  $AUC_{(0-\infty)D}$ , area under the curve from 0h to infinity normalized per 1 mg/kg;  $\lambda_z$ , terminal phase rate constant;  $t_{1/2}$ , terminal half-life; Cl, plasma clearance;  $V_d$ , volume of distribution;  $MRT_{(0-\infty)}$ , mean residence time from 0h to infinity;  $C_{maxD}$ , peak plasma concentration normalized per 1 mg/kg;  $T_{max}$ , time of peak concentration;  $F$ , bioavailability; MAT, mean absorption time.

<sup>a</sup>Statistically different from IV.

<sup>b</sup>Statistically different from SC.

<sup>c</sup>Statistically different from single PO.

<sup>d</sup>Statistically different from multiple PO.

<sup>e</sup>Median value.

<sup>f</sup>Harmonic mean.

### 3.4 | Tissue residues

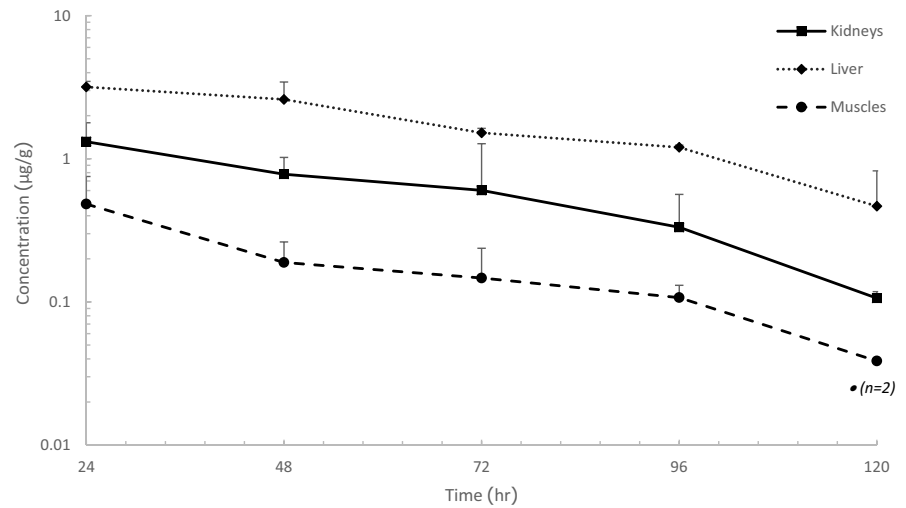
Figure 2 depicts the semi-logarithmic plot of the mean ( $\pm$ SD) tissues' concentrations of TMC over time after the fifth day of multiple oral administration. TMC was detected in all tissues at every sampled time point, except for muscles at 120h (detected in two geese only), with peak concentrations observed at 24h after the fifth day of oral administration in all matrices. Accordingly, Table 3 displays the PK parameters in different tissues. The liver exhibited the highest drug residue levels, substantially exceeding the LLOQ at 120h (0.35  $\mu g/g$ ), with an  $AUC_{(0-t)plasma/tissue}$  of 320.16, compared to 144.72 and 44.20

in kidneys and muscles, respectively. The calculated provisional WTs were determined as 6, 7.5, and 8 days for the liver, muscles, and kidneys, respectively.

## 4 | DISCUSSION

Understanding the disposition kinetics of a drug is crucial for formulating an effective dosage schedule. In antimicrobial chemotherapy, it is equally important to take into account the susceptibility of the infecting microorganism to effective and nontoxic drug concentrations

**FIGURE 2** Mean concentrations in liver, kidney, and muscle of tilmicosin following the fifth day of multiple oral administration (25 mg/kg) to geese ( $n=3$  per time point).



**TABLE 3** Pharmacokinetic parameters and SD ( $\pm$ ) in different tissues on the fifth day following multiple oral administrations at a dose of 25 mg/kg in geese.

		Tissue		
		Liver	Kidney	Muscle
AUC <sub>(0-∞)</sub>	µg*h/mg	227.32	75.50	23.33
t <sub>1/2</sub>	h	30.89	19.18	24.93
$\lambda_z$	1/h	0.022	0.036	0.028
MRT <sub>(0-∞)</sub>	h	63.04	53.79	54.57
AUC <sub>(0-∞) tissue/plasma</sub>		320.16	144.72	44.20
		$\pm 194$	$\pm 76$	$\pm 23$

Note: AUC<sub>(0-∞)</sub>, area under the curve from zero to infinity; t<sub>1/2</sub>, terminal half-life;  $\lambda_z$ , terminal phase rate constant; MRT<sub>(0-∞)</sub>, mean residence time zero to infinity; AUC<sub>(0-∞) tissue/plasma</sub> = area under the curve ratio from time zero to infinity ratio of tissue/plasma.

in both plasma and tissues. Additionally, assessing residues in tissues is essential for safety considerations and ensuring the well-being of consumers and related aspects. Due to documented toxicity associated with IV administration in prior literature (Jordan et al., 1993), a deliberately lower IV dose was selected. This choice was necessary to assess some primary PK parameters. Moreover, despite TMC being administered to chickens and turkeys as a flock therapy through drinking water, individual oral gavage was intentionally employed to ensure precise dosing and eliminate stability concerns.

To the authors' knowledge, this is the first TMC investigation to be ever conducted on geese. At the administered doses in the present study, and consistent with observations across diverse animal species (Modric et al., 1998; Naccari et al., 2001; Ziv et al., 1995), none of the animals exhibited any visible systemic, or local effects, such as inflammation, edema, or sensitivity at the injection site. Indeed, the generally favorable safety profile of TMC (excluding the IV route) solidifies its role, making it a valuable and dependable choice for veterinarians, despite being an old drug.

The bioavailability exhibited substantial disparity between the two extra-vascular routes, registering 87% SC and 4% PO. Given the markedly low absolute F % and the high individual variability observed via the oral route, its recommendation in geese may be discouraged, due to the potential likelihood of inadequate systemic concentrations for a significant subset of individuals, at a population level (Toutain & Bousquet-Mélou, 2004c). Gastrointestinal

physiology, gastric emptying rates, enzymatic activity, product formulation, and feeding state may underlie the limited oral bioavailability (Fadel et al., 2022; Tikhomirov et al., 2020). Previously, it was assumed that macrolides, in general, have high oral bioavailability (Clark et al., 2008; Papich & Riviere, 2001). However, later studies have shown a low-to-moderate value for tylosin tartrate (26%; Ji et al., 2014) and tylvalosin (54%; Elbadawy et al., 2019) in chickens and turkeys, respectively. The findings of the present study are further in discordance with these earlier presumptions. This is noteworthy, especially given the lack of preceding oral bioavailability evaluations for TMC in any animal species. It is unclear how TMC would behave in other avian species, due to the physiological differences between geese and other birds. Geese have a unique lipid metabolism and high-fat storage capacity, crucial for energy before migration, which may affect the PK of lipophilic drugs like TMC (Eichhorn et al., 2019; Lu et al., 2015; Ouyang et al., 2022). Additionally, their superior digestion of dietary fiber compared to other avian species, along with their aquatic diet's impact on their gut microbiome, could interact with the host genome, potentially altering drug bioavailability (Gao et al., 2016; Ouyang et al., 2022).

In previous literature, TMC was generally characterized by a moderate-to-rapid absorption after oral or SC injection (Avci & Elmas, 2014; Dimitrova et al., 2012; El-Komy et al., 2016, 2018). In broiler chickens, the oral  $T_{max}$  was reported to be around 3 to 4 h (Abu-Basha et al., 2007; Dimitrova et al., 2012). Although the  $T_{max}$

in this study was short, with 0.5 h after extra-vascular administrations (Table 3), the observed MAT exceeded the  $t_{1/2}$ , indicating the potential occurrence of a flip-flop phenomenon. It has been proposed to have occurred in horses as well (Clark et al., 2008). This was particularly evident for the SC route, where the  $t_{1/2}$  value (3.62 h) showed a significant difference compared to the IV route (1.86 h). Species-specific differences in SC tissue perfusion, local blood flow, or injection site characteristics may contribute to a delayed SC absorption phase (Yáñez et al., 2011). Notably, previous literature reported that residues of TMC may persist longer at the injection site due to the typically high concentration and the internal inflammatory changes that ensue (Clark et al., 2008; Van Donkersgoed et al., 2000). Furthermore, given its pKa of approximately 8, TMC exists in both ionized and non-ionized forms (Brown & Mockett, 2007). Should the subcutaneous pH at the injection site be lower, favoring the ionized state of the drug? It may result in delayed absorption.

In the current study, the  $E_{\text{body}}$  was deemed to be relatively low, averaging 0.03. This implies a limited ability of the liver and kidneys to eliminate the drug (Toutain & Bousquet-Mélou, 2004b). It has been previously established that TMC undergoes minimal metabolism in cattle, chickens, pigs, and rabbits (Montesissa et al., 2004), predominantly being excreted unchanged, mainly through passive mechanisms such as renal glomerular filtration (Short, 1994). While this pattern may also hold true for geese due to the low  $E_{\text{body}}$ , additional assessments are required to confirm this aspect.

When considering plasma half-life values, it is crucial to note that the oral  $t_{1/2}$  observed in this study was notably shorter than in fowls (30 h; Keleş et al., 2001), chickens (25.98 h, Zhang et al., 2020; 45 h, Abu-Basha et al., 2007; 21.86 h, Attia et al., 2018; 32 h, Dimitrova et al., 2012), and pigs (12.93 h; Xiong et al., 2019). The SC  $t_{1/2}$  found in geese was also lower than that found in sheep (12 h, Naccari et al., 2001; 34.6 h, Modric et al., 1998) and cattle (29.4 h; Modric et al., 1998). The shorter  $t_{1/2}$  observed in geese may be attributed to a potentially distinct biotransformation rate, a highly efficient excretory system (passive), tissue sequestration, a minimal plasma protein binding, stress states, unique drug transport mechanisms (Zhang et al., 2020), etc. Yet, the lack of IV data in previous studies hinders the capacity to make assumptions about potential variations concerning  $Cl$  or  $V_d$ . These results emphasize the importance of acknowledging inter-species variations in bird species and caution against extrapolating data to minor species due to significant variability in PK parameters. Additionally, as elaborated in the ensuing sections, evaluating and contrasting tissue kinetics, rather than focusing on plasma parameters and  $t_{1/2}$ , would provide a sounder foundation for recommending the optimal regimen and frequency of TMC administration.

Recognized for its high lipophilicity, TMC exhibits a high volume of distribution and consequently an extensive accumulation in tissues (Giguère, 2013). The  $V_d$  of 4.87 L/kg after IV administration aligns with findings in various species, including cows, sheep, goats, and swine (Modric et al., 1998; Ramadan, 1997; Shen et al., 2005; Ziv et al., 1995). This broad distribution is linked to TMC's inclination

for low binding with plasma proteins (Ziv et al., 1995). A recent investigation in chickens (Zhang et al., 2023) revealed that at a plasma concentration of 2  $\mu\text{g/mL}$ , only 9.51% of TMC was bound to plasma proteins. This is consistent with a trend of minimal plasma concentrations corresponding to higher tissue levels (Abu-Basha et al., 2007; Clark et al., 2008; Giguère, 2013). Consequently, this extensive tissue distribution of TMC results in a poor correlation between plasma concentrations and clinical effects, underscoring the significance of evaluating tissue residues during administration (Carbon, 1998; El-Komy et al., 2018; Gourlay et al., 1989; Xiong et al., 2019; Ziv et al., 1995). In geese, the current results align with prior findings (Attia et al., 2018; Clark et al., 2008; Fricke et al., 2008; Keleş et al., 2001; Zhang et al., 2004, 2020), showing elevated TMC levels in the liver, followed by the kidneys and muscles. This distribution pattern may be due to factors such as organ blood flow and tissue affinity (Yan et al., 2023).

Figure 2 illustrates a prolonged TMC residence in tissues, remaining quantifiable up to 120 h. As discussed earlier, the apparent paradox between TMC's short  $t_{1/2}$  and its prolonged residence in tissues could be attributed to factors such as tissue binding, sequestration, and slow release. Notably, the  $AUC_{(0-\infty)}(\text{tissue/plasma})$  ratio was substantially elevated, measuring 320.16, 144.72, and 44.20 for the liver, kidneys, and muscles, respectively. This reaffirms a profound tissue penetration, consistent with findings from prior studies (El-Komy et al., 2018; Fricke et al., 2008; Keleş et al., 2001). In Modric et al. (1998), TMC displayed a lung-to-serum ratio ranging from 86 to 178 in infected and non-infected groups, respectively. Moreover, the notable intracellular penetration of TMC, a characteristic shared among macrolide antibiotics crucial for their effectiveness against intracellular organisms, contributes to prolonged tissue residence despite rapid plasma elimination (Meyer et al., 1993). Radiolabeled TMC investigations at 4 hr in chicken heterophils, macrophages, and monocytes unveiled intracellular/extracellular concentration ratios of 138, 32, and 66, respectively (Scoreaux & Shryock, 1998). Additionally, the plasma accumulation ratio of 1.06 lends support to the idea that TMC did not accumulate in plasma with repeated doses but instead exhibited a distinct and preferential distribution to specific target organs.

The computed provisional WT<sub>s</sub> established at 6, 7.5, and 8 days were suggested for the liver, muscles, and kidneys, respectively (Figures S1–S3 in Supplementary Material). After administering TMC in drinking water for 5 days, previous studies suggested a WT of 10 days for both chickens exposed to a dosage of 75 mg/L (Zhang et al., 2004), and fowls exposed to 50 mg/L (Keleş et al., 2001). The observed differences in WT are influenced by factors such as species-specific differences in drug PK and variations in research methodologies, including dosing regimens and administration routes. Moreover, it is worth mentioning that the WT<sub>s</sub> of TMC in geese are anticipated to vary substantially between the oral and SC, for the same dose, owing to differences in bioavailability.

As mentioned earlier, plasma TMC levels are inadequate indicators of total body TMC or effective therapeutic levels, underlining the need to evaluate tissues' concentrations (Gourlay et al., 1989;

Zhang et al., 2017). In Ziv et al. (1995), therapeutic levels persisted in cow's milk for 8–9 days despite a plasma  $t_{1/2}$  of 4.18 h, following a 10 mg/kg SC administration. Existing literature consistently highlights the relevance of AUC/MIC and  $C_{max}$ /MIC as key pharmacokinetic/pharmacodynamic (PK/PD) indices for predicting the antimicrobial efficacy of TMC (Chen et al., 2023; Huang et al., 2019). In a recent study by Huang et al. (2020), the estimated values for  $AUC_{(0-96\text{ h})}/MIC$  and  $C_{max}/MIC$ , necessary for a  $3\text{Log}_{10}$  (CFU/mL) reduction against *Mycoplasma* species from baseline, were reported as 96.72 h and 1.91, respectively. While the majority of PK/PD studies traditionally emphasize plasma, serum, and other body fluid concentrations, there is a growing recognition of the importance of considering tissue concentrations, especially in the context of antimicrobials and bacterial infections (Barbour et al., 2010; Rodríguez-Gascón et al., 2021). The key lies in assessing free drug concentrations at the specific site of action, enhancing the ability to predict clinical outcomes and optimize dosing regimens (Zhang et al., 2022). Considering the MIC range against *Mycoplasma gallisepticum* (0.0156 to 0.038  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , Zhang et al., 2017, 2023), tissue PK data substantially exceeded thresholds set by these two PK/PD indices ( $AUC_{(0-96\text{ hr})}/MIC > 774\text{ h}$ ;  $C_{max}/MIC > 12$ ). Preliminary assessment indicates effective tissue concentrations for *Mycoplasma* treatment when administered the current dosing regimens (PO and SC), even with conservative assumptions of minimal lung tissue concentrations (Zhang et al., 2023). Further in vivo PK/PD studies and tissue protein bindings are crucial to understand the complex drug exposure and antimicrobial activity relationship. Nonetheless, it is crucial to acknowledge that while therapeutic efficacy might be evident with such administration, the inherent individual variability resulting from an already minimal bioavailability could imply that some geese might receive inadequate dosages, introducing uncertainty and potential inconsistency in therapeutic outcomes on a population level. Therefore, caution should be exercised when recommending oral administration of TMC in geese.

In summary, this study in geese provides a comprehensive investigation into the tissue and plasma pharmacokinetics of TMC. Significant variations in bioavailability were observed between subcutaneous (87%) and oral (4%) routes. While oral administration may not be recommended at a population level, the SC administration shows a favorable PK profile, despite not being the optimal administration route for flock therapy. Nonetheless, additional investigations involving SC multiple doses, pharmacodynamics, and tissue studies are imperative for a comprehensive evaluation.

#### AUTHOR CONTRIBUTIONS

KB and BŁW conceived the presented idea. KB, BŁW, AS, and CF carried out the experiment. MG, BŁW, and AP supervised the study. All authors discussed the results, contributed to the manuscript, and approved the final version.

#### ACKNOWLEDGMENTS

None of the authors has any financial or personal relationships that could inappropriately influence or bias the content of this paper. This

research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

#### CONFLICT OF INTEREST STATEMENT

The authors declare that there are no conflicts of interest in publishing this work.

#### DATA AVAILABILITY STATEMENT

The datasets used and/or analyzed during the current study are available from the corresponding author, upon reasonable request.

#### ETHICS STATEMENT

The animal experiment was carried out in accordance with European law (2010/63/UE) and approved (nr. 105/2022) by the Institutional Animal Care and Use Committee of the University of Lublin (Poland).

#### ORCID

Charbel Fadel  <https://orcid.org/0000-0001-9996-5942>

Mario Giorgi  <https://orcid.org/0000-0003-3657-4703>

Andrejs Šitovs  <https://orcid.org/0000-0002-9529-8799>

#### REFERENCES

- Abu-Basha, E. A., Idkaidek, N. M., & Al-Shunnaq, A. F. (2007). Pharmacokinetics of tilmicosin (Provitil powder and pulmotil liquid AC) oral formulations in chickens. *Veterinary Research Communications*, 31, 477–485. <https://doi.org/10.1007/s11259-006-3543-6>
- Anonymous. (2012). Guideline on Bioanalytical Method Validation. EMEA/CHMP/EWP/192217/2009. EMA Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP) Rev. [https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-bioanalytical-method-validation\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-bioanalytical-method-validation_en.pdf)
- Anonymous. (2018). *Guideline on determination of withdrawal periods for edible tissues*. European Medicines Agency. [https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-determination-withdrawal-periods-edible-tissues-revision-1\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-determination-withdrawal-periods-edible-tissues-revision-1_en.pdf)
- Attia, T., Latif, A., El-Hanbally, S., El-Gendy, H., & El Gendy, H. (2018). Disposition kinetics, in vitro plasma protein binding and tissue residues of tilmicosin in healthy and experimentally (CRD) infected broiler chickens. *International Journal of Basic & Clinical Pharmacology*, 7(11), 2201–2208. <https://doi.org/10.18203/2319-2003.ijbcp20184328>
- Avci, T., & Elmas, M. (2014). Milk and blood pharmacokinetics of tylosin and tilmicosin following parenteral administrations to cows. *Scientific World Journal*, 2014, 1–6. <https://doi.org/10.1155/2014/869096>
- Barbour, A., Scaglione, F., & Derendorf, H. (2010). Class-dependent relevance of tissue distribution in the interpretation of anti-infective pharmacokinetic/pharmacodynamic indices. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 35(5), 431–438. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2010.01.023>
- Bilal, R. M., Hassan, F. U., Farag, M. R., Nasir, T. A., Ragni, M., Mahgoub, H. A., & Alagawany, M. (2021). Thermal stress and high stocking densities in poultry farms: Potential effects and mitigation strategies. *Journal of Thermal Biology*, 99, 102944. <https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2021.102944>
- Brown, T., & Mockett, A. (2007). Intra-cellular accumulation and trans-epithelial transport of aivlosin, tylosin and tilmicosin. *The Pig Journal*, 60, 26–35.

- Carbon, C. (1998). Pharmacodynamics of macrolides, azalides, and streptogramins: Effect on extracellular pathogens. *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*, 27(1), 28–32. <https://doi.org/10.1086/514619>
- Chen, Y., Ji, X., Zhang, S., Wang, W., Zhang, H., & Ding, H. (2023). Pharmacokinetic/pharmacodynamic integration of tilmicosin against *Pasteurella multocida* in a piglet tissue cage model. *Frontiers in Veterinary Science*, 10, 1260990. <https://doi.org/10.3389/fvets.2023.1260990>
- Christodouloupolous, G., Warnick, L. D., Papaioannou, N., & Fthenakis, G. C. (2002). Tilmicosin administration to young lambs with respiratory infection: Safety and efficacy considerations. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 25(5), 393–397. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2885.2002.00433.x>
- Cilavdaroglu, E., Yamak, U. S., & Boz, M. A. (2020). Geese meat production. *Black Sea Journal of Agriculture*, 3, 66–70.
- Clark, C., Dowling, P. M., Ross, S., Woodbury, M., & Boison, J. O. (2008). Pharmacokinetics of tilmicosin in equine tissues and plasma. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 31(1), 66–70. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2885.2007.00909.x>
- Debono, M., Willard, K. E., Kirst, H. A., Wind, J. A., Crouse, G. D., Tao, E. V., Vicenzi, J. T., Counter, F. T., Ott, J. L., Ose, E. E., & Omura, S. (1989). Synthesis and antimicrobial evaluation of 20-deoxo-20-(3,5-dimethylpiperidin-1-yl) desmycosin (tilmicosin, EL-870) and related cyclic amino derivatives. *Journal of Antibiotics*, 42, 1253–1267. <https://doi.org/10.7164/antibiotics.42.1253>
- Dimitrova, D., Georgiev, K., & Tsoneva, D. (2012). Pharmacokinetics of tilmicosin in broiler chickens after single oral application. *Institute of Mountain Animal Stockbreeding and Agriculture, Troyan Bulgaria*, 15, 1–12.
- Eichhorn, G., Enstipp, M. R., Georges, J. Y., Hasselquist, D., & Nolet, B. A. (2019). Resting metabolic rate in migratory and non-migratory geese following range expansion: Go south, go low. *Oikos*, 128(10), 1424–1434. <https://doi.org/10.1111/oik.06468>
- Elbadawy, M., Aboubakr, M., & Abugomaa, A. (2019). Pharmacokinetics of tylvalosin in broiler turkeys (*Meleagris Gallopavo*) after single intravenous and oral administration. *Frontiers in Veterinary Science*, 6, 355. <https://doi.org/10.3389/fvets.2019.00355>
- El-Komy, A., Abd, E.-H. A., El Sayed, M., Gamal, E.-D. A., Mobarez, E. A., Azoz, H. A., & Afify, A. E. (2016). Pharmacokinetics of tilmicosin in healthy and experimentally *Pasteurella Multocida* infected lactating goats. *WJPPS*, 5, 2429–2438.
- El-Komy, A. A., Eltanany, N., Aboubakr, M., Mohamed, Z., & Elbadawy, M. J. (2018). Pharmacokinetics and tissue residues of tilmicosin in normal and experimentally mycoplasma gallisepticum-infected broiler chickens. *Benha Veterinary Medical Journal*, 5(1), 11–16. BVMJ-34(2): 188-205, 2018.
- EMA, The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products, Veterinary Medicines Evaluation Unit, Committee for Veterinary Medicinal Products. (2002). Tilmicosin (extension to chicken), summary report 2. Retrieved from <http://www.emea.eu.int/pdfs/vet/mrls/O39098en.pdf>
- Fadel, C., Łebkowska-Wieruszewska, B., Bourdo, K., Poapolathep, A., Hassoun, G., & Giorgi, M. (2023). Metronidazole pharmacokinetics in geese (*Anser anser domesticus*) after intravenous and oral administrations. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 47, 208–214. <https://doi.org/10.1111/jvp.13421>
- Fadel, C., Łebkowska-Wieruszewska, B., Lisowski, A., Laut, S., Poapolathep, A., & Giorgi, M. (2023). Disposition kinetics of robenacoxib following intravenous and oral administration in geese (*Anser anser domesticus*). *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 46, 413–420. <https://doi.org/10.1111/jvp.13398>
- Fadel, C., Łebkowska-Wieruszewska, B., Sartini, I., Lisowski, A., Poapolathep, A., & Giorgi, M. (2022). Robenacoxib pharmacokinetics in sheep following oral, subcutaneous, and intravenous administration. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 45, 550–557. <https://doi.org/10.1111/jvp.13089>
- Fricke, J. A., Clark, C. R., Boison, J. O., Chirino-Trejo, M., Inglis, T. E., & Dowling, P. M. (2008). Pharmacokinetics and tissue depletion of tilmicosin in turkeys. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 31(6), 591–594. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2885.2008.00985.x>
- Gao, G., Zhao, X., Li, Q., He, C., Zhao, W., Liu, S., Ding, J., Ye, W., Wang, J., Chen, Y., Wang, H., Li, J., Luo, Y., Su, J., Huang, Y., Liu, Z., Dai, R., Shi, Y., Meng, H., & Wang, Q. (2016). Genome and metagenome analyses reveal adaptive evolution of the host and interaction with the gut microbiota in the goose. *Scientific Reports*, 6, 32961. <https://doi.org/10.1038/srep32961>
- García, M. A., Solans, C., Aramayona, J. J., Rueda, S., & Bregante, M. A. (2000). Development of a method for the determination of danofloxacin in plasma by HPLC with fluorescence detection. *Biomedical Chromatography*, 14, 89–92. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1099-0801\(200004\)14:2<89::AID-BMC931>3.0.CO;2-N](https://doi.org/10.1002/(SICI)1099-0801(200004)14:2<89::AID-BMC931>3.0.CO;2-N)
- Giguère, S. (2013). Macrolides, azalides, and ketolides. In S. Giguère, J. F. Prescott, & P. M. Dowling (Eds.), *Antimicrobial therapy in veterinary medicine*. John Wiley & Sons. <https://doi.org/10.1002/9781118675014.ch13>
- Gourlay, R. N., Thomas, L. H., Wyld, S. G., & Smith, C. J. (1989). Effect of a new macrolide antibiotic (tilmicosin) on pneumonia experimentally induced in calves by mycoplasma bovis and *Pasteurella haemolytica*. *Research in Veterinary Science*, 47(1), 84–89.
- Grubb, B. R. (1983). Allometric relations of cardiovascular function in birds. *The American Journal of Physiology*, 245(4), H567–H572. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.1983.245.4.H567>
- Hoar, B. R., Jelinski, M. D., Ribble, C. S., Janzen, E. D., & Johnson, J. C. (1998). A comparison of the clinical field efficacy and safety of florfenicol and tilmicosin for the treatment of undifferentiated bovine respiratory disease of cattle in western Canada. *Canadian Veterinary Journal-Revue Veterinaire Canadienne*, 39, 161–166.
- Huang, Z., Hu, Z., Zheng, H., Xia, X., Gu, X., Shen, X., Yang, H., & Ding, H. (2020). The PK/PD integration and resistance of tilmicosin against *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Pathogens (Basel, Switzerland)*, 9(6), 487. <https://doi.org/10.3390/pathogens9060487>
- Huang, Z., Wu, Y., Zhou, Z., Xia, X., Gu, X., Cai, Q., Shen, X., Yang, H., & Ding, H. (2019). Pharmacokinetic and pharmacodynamic integration and resistance analysis of tilmicosin against mycoplasma gallisepticum in an in vitro dynamic model. *Frontiers in Pharmacology*, 10, 670. <https://doi.org/10.3389/fphar.2019.00670>
- Hugo, S. (1995). Geese: The underestimated species. *World Animal Review*, 83, 64–67.
- Ji, L. W., Dong, L. L., Ji, H., Feng, X. W., Li, D., Ding, R. L., & Jiang, S. X. (2014). Comparative pharmacokinetics and bioavailability of tylosin tartrate and tylosin phosphate after a single oral and i.v. administration in chickens. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 37(3), 312–315. <https://doi.org/10.1111/jvp.12092>
- Jordan, W. H., Byrd, R. A., Cochrane, R. L., Hanasono, G. K., Hoyt, J. A., Main, B. W., Meyerhoff, R. D., & Sarazan, R. D. (1993). A review of the toxicology of the antibiotic MICOTIL 300. *Veterinary and Human Toxicology*, 35, 151–158.
- Julious, S. A., & Debrant, C. A. M. (2000). Why are pharmacokinetic data summarized by arithmetic means? *Journal of Biopharmaceutical Statistics*, 10, 55–71. <https://doi.org/10.1081/BIP-100101013>
- Keleş, O., Bakirel, T., & Sener, S. (2001). Pharmacokinetics and tissue levels of tilmicosin in fowls. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 25, 629–634. <https://journals.tubitak.gov.tr/veterinary/vol25/iss4/30>
- Kozák, J., Gara, I., & Kawada, T. (2010). Production and welfare aspects of goose down and feather harvesting. *World's Poultry Science Journal*, 66, 767–778. <https://doi.org/10.1017/S0043933910000723>

- Lu, L., Chen, Y., Wang, Z., Li, X., Chen, W., Tao, Z., Shen, J., Tian, Y., Wang, D., Li, G., Chen, L., Chen, F., Fang, D., Yu, L., Sun, Y., Ma, Y., Li, J., & Wang, J. (2015). The goose genome sequence leads to insights into the evolution of waterfowl and susceptibility to fatty liver. *Genome Biology*, 16(1), 89. <https://doi.org/10.1186/s13059-015-0652-y>
- Meyer, A., Bril-Bazuin, C., Mattie, H., & Van Den Broek, P. (1993). Uptake of azithromycin by human monocytes and enhanced intracellular antibacterial activity against *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 37, 2318–2322. <https://doi.org/10.1128/AAC.37.11.2318>
- Modric, S., Webb, A. I., & Derendorf, H. (1998). Pharmacokinetics and pharmacodynamics of tilmicosin in sheep and cattle. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 21, 444–452. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2885.1998.00177.x>
- Montesissa, C., Capolongo, F., Santi, A., Biancotto, G., & Dacasto, M. (2004). Metabolism of tilmicosin by rabbit liver microsomes and hepatocytes. *Veterinary Journal (London, England: 1997)*, 167(1), 87–94. [https://doi.org/10.1016/s1090-0233\(03\)00077-7](https://doi.org/10.1016/s1090-0233(03)00077-7)
- Moore, G. M., Basson, R. P., & Tonkinson, L. V. (1996). Clinical field trials with tilmicosin phosphate in feed for the control of naturally acquired pneumonia caused by *Actinobacillus pleuropneumoniae* and *Pasteurella multocida* in swine. *American Journal of Veterinary Research*, 57, 224–228.
- Naccari, F., Giofrè, F., Pellegrino, M., Calò, M., Licata, P., & Carli, S. (2001). Effectiveness and kinetic behaviour of tilmicosin in the treatment of respiratory infections in sheep. *The Veterinary Record*, 148, 773–776. <https://doi.org/10.1136/vr.148.25.773>
- Olsen, C. A., Ziegler, H. L., Nielsen, H. M., Frimodt-Møller, N., Jaroszewski, J. W., & Franzyk, H. (2010). Antimicrobial, hemolytic, and cytotoxic activities of  $\beta$ -peptid-peptide hybrid oligomers: Improved properties compared to natural AMPs. *Chembiochem*, 11, 1356–1360. <https://doi.org/10.1002/cbic.201000232>
- Ouyang, Q., Hu, S., Tang, B., Hu, B., Hu, J., He, H., Li, L., & Wang, J. (2022). Comparative transcriptome analysis provides novel insights into the effect of lipid metabolism on laying of geese. *Animals: An Open Access Journal from MDPI*, 12(14), 1775. <https://doi.org/10.3390/ani12141775>
- Papich, M. G., & Riviere, J. E. (2001). Chloramphenicol and derivatives, macrolides, lincosamides, and miscellaneous antimicrobials. *Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 10, 903–952.
- Pouplin, T., Bang, N. D., Toi, P. V., Phuong, P. N., Dung, N. H., Duong, T. N., Caws, M., Thwaites, G. E., Tarning, J., & Day, J. N. (2016). Naïve pooled pharmacokinetic analysis of pyrazinamide, isoniazid and rifampicin in plasma and cerebrospinal fluid of Vietnamese children with tuberculous meningitis. *BMC Infectious Diseases*, 16, 144. <https://doi.org/10.1186/s12879-016-1470-x>
- Ramadan, A. (1997). Pharmacokinetics of tilmicosin in serum and milk of goats. *Research in Veterinary Science*, 62(1), 48–50. [https://doi.org/10.1016/s0034-5288\(97\)90179-x](https://doi.org/10.1016/s0034-5288(97)90179-x)
- Rodríguez-Gascón, A., Solinis, M. Á., & Isla, A. (2021). The role of PK/PD analysis in the development and evaluation of antimicrobials. *Pharmaceutics*, 13(6), 833. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13060833>
- Romanov, M. N. (1999). Goose production efficiency as influenced by genotype, nutrition and production systems. *World's Poultry Science Journal*, 55(3), 281–294. <https://doi.org/10.1079/WPS19990021>
- Sartini, I., Łebkowska-Wieruszewska, B., Lisowski, A., Poapolathep, A., Sitovs, A., & Giorgi, M. (2021). Doxycycline pharmacokinetics in geese. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 44, 975–981. <https://doi.org/10.1111/jvp.13002>
- Sartini, I., Vercelli, C., Lebkowska-Wieruszewska, B., Lisowski, A., Fadel, C., Poapolathep, A., Dessi, F., & Giorgi, M. (2023). Pharmacokinetics and antibacterial activity of tiamulin after single and multiple oral administrations in geese. *Veterinary and Animal Science*, 22, 100317. <https://doi.org/10.1016/j.vas.2023.100317>
- Scoreaux, B., & Shryock, T. R. (1998). Intracellular accumulation, sub-cellular distribution and efflux of tilmicosin in swine phagocytes. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 21, 257–268. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2885.1998.00133.x>
- Shen, J., Li, C., Jiang, H., Zhang, S., Guo, P., Ding, S., & Li, X. (2005). Pharmacokinetics of tilmicosin after oral administration in swine. *American Journal of Veterinary Research*, 66, 1071–1074. <https://doi.org/10.2460/ajvr.2005.66.1071>
- Short, C. R. (1994). Consideration of sheep as a minor species: Comparison of drug metabolism and disposition with other domestic ruminants. *Veterinary and Human Toxicology*, 36, 24–40.
- Stipkovits, L., & Szathmary, S. (2012). Mycoplasma infection of ducks and geese. *Poultry Science*, 91, 2812–2819. <https://doi.org/10.3382/ps.2012-02310>
- Tikhomirov, M., Poźniak, B., Smutkiewicz, A., & Świtła, M. (2020). Pharmacokinetics of florfenicol and thiamphenicol after single oral and intravenous, as well as multiple oral administrations to geese. *British Poultry Science*, 12, 1–7. <https://doi.org/10.1080/00071668.2020.1824290>
- Toutain, P. L., & Bousquet-Mélou, A. (2004a). Plasma terminal half-life. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 27(6), 427–439. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2885.2004.00600.x>
- Toutain, P. L., & Bousquet-Mélou, A. (2004b). Plasma clearance. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 27(6), 415–425. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2885.2004.00605.x>
- Toutain, P. L., & Bousquet-Mélou, A. (2004c). Bioavailability and its assessment. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 27, 455–466. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2885.2004.00604.x>
- Van Donkersgoed, J., Dubeski, P. L., VanderKop, M., Aalhus, J. L., Bygrove, S., & Starr, W. N. (2000). The effect of animal health products on the formation of injection site lesions in subprimals of experimentally injected beef calves. *The Canadian Veterinary Journal = La Revue Veterinaire Canadienne*, 41(8), 617–622.
- Xiong, J., Zhu, Q., Yang, S., Zhao, Y., Cui, L., Zhuang, F., Qiu, Y., & Cao, J. (2019). Comparison of pharmacokinetics of tilmicosin in healthy pigs and pigs experimentally infected with *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *New Zealand Veterinary Journal*, 67(5), 257–263. <https://doi.org/10.1080/00480169.2019.1633434>
- Yan, X., Liu, J., Jia, Y., Yao, Z., Zhou, M., Song, S., Yuan, S., Zhang, D., & Zhang, N. (2023). The pharmacokinetics of tilmicosin in plasma and joint dialysate in an experimentally Mycoplasma synoviae infection model. *Poultry Science*, 102, 102572. <https://doi.org/10.1016/j.psj.2023.102572>
- Yáñez, J. A., Remsberg, C. M., Sayre, C. L., Forrest, M. L., & Davies, N. M. (2011). Flip-flop pharmacokinetics—delivering a reversal of disposition: Challenges and opportunities during drug development. *Therapeutic Delivery*, 2, 643–672. <https://doi.org/10.4155/tde.11.19>
- Zhang, L., Xie, H., Wang, Y., Wang, H., Hu, J., & Zhang, G. (2022). Pharmacodynamic parameters of pharmacokinetic/pharmacodynamic (PK/PD) integration models. *Frontiers in Veterinary Science*, 9, 860472. <https://doi.org/10.3389/fvets.2022.860472>
- Zhang, M., Qian, K., Li, G. H., Duan, M. H., Li, Z. E., Dai, Y., Chen, J. C., & Yang, F. (2023). Depletion of tilmicosin residue in Gushi chickens following oral administration via drinking water. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 47, 114–120. <https://doi.org/10.1111/jvp.13416>
- Zhang, N., Liu, Z., Wei, Y., Zhang, C., Mao, C., Cai, Q., Shen, X., & Ding, H. (2020). Comparison of the pharmacokinetics of tilmicosin in plasma and lung tissue in healthy chickens and chickens experimentally infected with *Mycoplasma gallisepticum*. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 43(4), 347–354. <https://doi.org/10.1111/jvp.12847>
- Zhang, N., Ye, X., Wu, Y., Huang, Z., Gu, X., Cai, Q., Shen, X., Jiang, H., & Ding, H. (2017). Determination of the mutant selection window

and evaluation of the killing of mycoplasma gallisepticum by danofloxacin, doxycycline, tilmicosin, tylvalosin and valnemulin. *PLoS One*, 12(1), e0169134. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0169134>

- Zhang, P., Hao, H., Li, J., Ijaz, A., Cheng, G., Chen, D., Tao, Y., Huang, L., Wang, Y., & Dai, M. (2016). The epidemiologic and pharmacodynamic cutoff values of tilmicosin against *Haemophilus parasuis*. *Frontiers in Microbiology*, 7, 385–389. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00385>
- Zhang, Y., Jiang, H., Jin, X., Shen, Z., Shen, J., Fu, C., & Guo, J. (2004). Residue depletion of tilmicosin in chicken tissues. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(9), 2602–2605. <https://doi.org/10.1021/jf035515z>
- Ziv, G., Shem-Tov, M., Glickman, A., Winkler, M., & Saran, A. (1995). Tilmicosin antibacterial activity and pharmacokinetics in cows. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 18(5), 340–345. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2885.1995.tb00601.x>

## SUPPORTING INFORMATION

Additional supporting information can be found online in the Supporting Information section at the end of this article.

**How to cite this article:** Bourdo, K., Fadel, C., Giorgi, M., Šitovs, A., Poapolathep, A., & Łebkowska-Wieruszewska, B. (2024). Disposition kinetics and tissue residues of tilmicosin following intravenous, subcutaneous, single and multiple oral dosing in geese (*Anser anser domesticus*). *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 47, 416–426. <https://doi.org/10.1111/jvp.13461>



## Pharmacokinetics and tissue residues of colistin following intravenous, and single and repeated oral dosing in domestic geese (*Anser anser domesticus*)

Krzysztof Bourdo<sup>a</sup>, Charbel Fadel<sup>b,c</sup>, Mario Giorgi<sup>c</sup>, Anna Gajda<sup>d</sup>, Magdalena Bilecka<sup>d</sup>, Amnart Poapolathep<sup>e</sup>, Beata Łebkowska-Wieruszewska<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Department of Pharmacology, Toxicology and Environmental Protection, University of Life Sciences, Lublin, Poland

<sup>b</sup> Department of Veterinary Medicine, Lebanese University, Beirut, Lebanon

<sup>c</sup> Department of Veterinary Sciences, University of Pisa, Pisa, Italy

<sup>d</sup> Department of Pharmacology and Toxicology, National Veterinary Institute-National Research Institute in Pulawy, Poland

<sup>e</sup> Department of Veterinary Pharmacology, Kasetsart University, Bangkok, Thailand

### ARTICLE INFO

#### Keywords:

Antimicrobials  
Colistin  
Geese  
Pharmacokinetics  
Tissue residues

### ABSTRACT

Colistin, also known as polymyxin E, is a member of the polymyxin group of antibiotics. It is approved in Europe to treat enteric infections caused by Gram-negative bacteria, such as *Escherichia coli*, in poultry, although the similarity of infections between species make it likely used off-label in geese as well. This study investigated the pharmacokinetics and tissue residues of colistin in geese through *in vivo* experiments. The study involved longitudinal open studies on 16 healthy adult male geese, divided into three phases separated by one-month washout period. Geese were administered colistin via intravenous (IV, 1 mg/kg), single oral (PO, 30 mg/kg), and multiple oral (SID, 2.5 mg/kg for five consecutive days) routes, with blood samples drawn at specific intervals. Tissue samples were also collected at pre-assigned times for subsequent analysis. Colistin levels in geese plasma were quantified using a fully validated UHPLC-MS/MS method.

Plasma concentrations could be quantified up to 24 h for the single PO (n= 2) and IV (n= 4) routes, and up to 10 h (n= 6) from the last dose administered for the multiple PO route (n=6). The bioavailability was significantly low, averaging 3 %. The terminal half-life in geese was 2.18 h following IV administration, similar to values found in other avian species. Following IV administration, clearance and volume of distribution values were 0.11 mL·h<sup>-1</sup>·g<sup>-1</sup> and 0.41 mL·g<sup>-1</sup>, respectively. The body extraction ratio was low at 0.2 %, indicating minimal hepatic and renal elimination of colistin. Multiple oral doses showed no plasma accumulation, and tissue levels consistently remained below the maximum residue limit (MRL) set for food-producing animals. This study highlights the minimal systemic bioavailability and tissue penetration of colistin in geese, consistent with findings in other poultry and mammals. Future research should focus on intestinal colistin content in geese to optimize dosing strategies and minimize anti-microbial resistance.

### Introduction

Colistin, also known as polymyxin E, is part of the polymyxin group of antibiotics. Similar to other polypeptide antibiotics, colistin is a complex compound made up of over 13 cyclic polypeptides, varying primarily in the length of their fatty acyl segments (Decolin et al., 1997). The two main components, colistin A and B (polymyxin E1 and E2), can constitute up to 95 % of its total mass. Colistin has a narrow antimicrobial spectrum. It is effective against fermentative Gram-negative

bacteria such as *Escherichia coli*, *Klebsiella spp.*, and *Salmonella spp.*, as well as non-fermentative Gram-negative bacteria like *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa* (Poirel et al., 2017).

In veterinary medicine, colistin has been widely used, particularly in swine, bovine, and poultry, for prevention, treatment, and metaphylaxis (Catry et al., 2015; Rhouma et al., 2016; Elbadawy and Aboubakr, 2017). It has also been employed as a growth promoter in many countries, including China, India, and Vietnam (Kempf et al., 2016; Guetiya Wadoun et al., 2016). However, following the discovery of mobilized

\* Corresponding author.

E-mail addresses: [krzysztof.bourdo@gmail.com](mailto:krzysztof.bourdo@gmail.com) (K. Bourdo), [c.fadel@studenti.uniss.it](mailto:c.fadel@studenti.uniss.it) (C. Fadel), [mario.giorgi@unipi.it](mailto:mario.giorgi@unipi.it) (M. Giorgi), [anna.gajda@piwet.pulawy.pl](mailto:anna.gajda@piwet.pulawy.pl) (A. Gajda), [magdalena.bilecka@piwet.pulawy.pl](mailto:magdalena.bilecka@piwet.pulawy.pl) (M. Bilecka), [fvetamp@ku.ac.th](mailto:fvetamp@ku.ac.th) (A. Poapolathep), [lebkwowska.wieruszewska@up.lublin.pl](mailto:lebkwowska.wieruszewska@up.lublin.pl) (B. Łebkowska-Wieruszewska).

<https://doi.org/10.1016/j.tvj.2024.106245>

Accepted 11 September 2024

Available online 19 September 2024

1090-0233/© 2024 The Author(s). Published by Elsevier Ltd. This is an open access article under the CC BY license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

colistin resistance (*mcr*) genes (Liu et al., 2016), many countries have restricted its use as a feed additive and growth promoter. In 2015, the European Union limited the use of colistin in veterinary medicine to therapy or metaphylaxis, eliminating its use for prophylactic purposes. Its indications were specifically restricted to the treatment of gastrointestinal (GI) infections caused by non-invasive, susceptible Enterobacteriaceae in pigs, cattle, small ruminants, and poultry (EMA/CVMP, 2015; Catry et al., 2015).

Specifically, colistin is mainly employed in pig and cattle production to control enteric infections caused by *E. coli* and *Salmonella* (e.g. post-weaning diarrhoea in piglets) (Catry et al., 2015; Rhouma et al., 2016). For poultry, there are no relevant indications given other than the prohibition of its use against *Salmonella* infections (Löhren et al., 2008). Indeed, while not restricted for use against *Salmonella* in all countries, the World Health Organization (WHO) advocates for the reduction of colistin use in food animals, particularly in poultry, as a measure to prevent the spread of resistant bacteria, including *Salmonella*. Nonetheless, several publications mention that colistin is frequently used in poultry to treat mild colibacillosis (Kempf et al., 2016; Catry et al., 2015; Lima Barbieri et al., 2017), and in combination with amoxicillin for treating necrotic enteritis in broiler chickens (Elbadawy and Aoubakr, 2017).

When used in farm animals, including poultry, colistin is typically administered orally, through drinking water (Stefaniuk, Tyski, 2019). While there is no specific data on the use of colistin in geese, it is plausible that such off-label practices are occurring. This assumption is based on the widespread incidence of colibacillosis, which affects not only chickens but also geese, ducklings, turkeys, and pigeons (Lutful Kabir, 2010). While the pharmacokinetics (PK) of colistin have been studied in various animal species, research specific to geese is notably missing. This absence of comprehensive data on antibacterial use in geese poses a significant challenge for the industry. Understanding the efficacy and appropriate usage of antibacterials is crucial to address public health issues and ensure the well-being of the birds. Moreover, the growing problem of antimicrobial resistance to colistin highlights the need for targeted research each species to avoid suboptimal non-effective concentrations by relying on dosage extrapolations from other species. Therefore, the primary objective of this study was to conduct a detailed analysis of the PK characteristics and tissue residue patterns of colistin in healthy geese. This investigation included single intravenous (IV) administration, and both single and repeated oral (PO) administrations.

## Materials and methods

### Animals

This study used 16 healthy adult male Bilgorajska geese (*Anser anser domesticus*), aged between 22 and 26 months, with weights ranging from 2.8 to 4.5 kg. These geese were sourced from a local farm (Majątek Rutka, Puchaczow, Poland). They have not received any prior antibiotic treatment and were individually distinguished by rings on their left legs. Prior to the study, a thorough evaluation by the supervising veterinarians (K.B.; B.L-W) confirmed their healthy status. The geese underwent a week-long acclimatization period in the new environment, which included daily monitoring of their behavior and appetite. They were housed in a 60 m<sup>2</sup> enclosed area with an indoor shelter measuring 10 m<sup>2</sup> and had unrestricted access to feed and water. The animal experiment was carried out in accordance with European law (2010/63/UE) and approved (nr. 59/2022; 76/2023) by the Institutional Animal Care and Use Committee of the University of Lublin (Poland).

### Experimental applications

The study design involved a series of longitudinal, open studies conducted on the previously described geese. Each phase was separated

by a one-month washout period. The multiple PO doses used were based on the recommended doses for poultry (FAO, 2006; Mead et al., 2021). For IV administration, a lower dose was deliberately chosen to minimize potential toxic effects. In contrast, a higher dose was selected for the single PO administration to address the possibility of very low systemic concentrations, as observed with lower doses in previous poultry studies (FAO, 2006).

In the initial phase, geese received an IV dose of colistin at 1 mg/kg (Colistin TZF 1000000 IU), in 5 mL of saline solution, administered through a sterile 20-gauge 3.75 cm needle in the left-wing vein. In the second phase, a single oral administration of 30 mg/kg b.w. colistin solution (Colimed, Biofactor, Poland, 1200,000 IU/g) was administered via crop gavage, with the cannula being flushed promptly afterwards with 5 mL of water to ensure proper delivery. The third phase (multiple PO) involved administering a colistin solution (Colimed, Biofactor, Poland, 1200,000 IU/g) to geese via crop gavage at a dose of 2.5 mg/kg once a day for 5 consecutive days at 08:00 am.

Blood samples, approximately 1 mL each, were drawn from the right-wing vein at specific time intervals during all phases: 0, 5 (for IV administration only), 15, 30, 45 min, and 1, 1.5, 2, 4, 6, 8, 10, and 24 h. For the multiple PO, blood samples were taken every 24 h, just before the administration of the daily dose. On the fifth day, blood sampling followed the same pattern as the single PO, with an additional sample taken at 36 h. The blood was collected in heparinized tubes and then centrifuged at 1500 x g. Subsequently, the plasma was carefully harvested and stored at a temperature of -20° C. The analysis of the stored plasma was conducted within 40 days from the time of collection, after each phase. Regarding tissue sampling, sets of four geese were euthanized, via stunning and bleeding, at specific time points: 6, 10, 24 and 36 h after the last oral dose of the multiple administration. Samples of approximately 20 g of tissue were collected from muscle, liver, heart, lungs, and kidney, in each animal and stored at -20° C for subsequent analysis.

### Colistin quantification in plasma and tissues

The method determination for colistin in plasma was developed and validated by the authors. To extract colistin from plasma samples, 200 µl of plasma was aliquoted into polypropylene Eppendorf tubes. Then, 50 µl of the internal standard (IS) working solution (Polymyxin B; 2 µg/mL) was added and briefly vortex-mixed. Extraction was carried out using 800 µl of acetonitrile (ACN) containing 0.1 % formic acid (HCOOH) and 0.2 % trifluoroacetic acid (TFA). The samples were vortexed, stirred for 10 min, and then centrifuged at 15,000 x g for 10 min. Subsequently, 1 mL of the supernatant was transferred to a clean Eppendorf tube and evaporated to dryness using a nitrogen stream at 40° C. The dry residue was reconstituted in 0.2 mL of a solution containing 1 % HCOOH in water and 1 % HCOOH in ACN (95/5; v/v). This reconstituted mixture was then transferred to Eppendorf tubes with filters and centrifuged at 15,000 x g for 5 min. Finally, the supernatant was transferred to an HPLC vial with a glass insert and analyzed using UHPLC-MS/MS.

For tissue samples, the determination method was based on previous studies (Boison et al., 2015; Kumar et al., 2021). All tissues were homogenized using a mechanical mixer designed for laboratory use before extraction. 1 g of each tissue was weighed and placed into a polypropylene centrifuge tube. Then, 100 µl of the IS working solution (2 µg/mL) was added and briefly vortexed. Extraction was carried out using 7 mL of ACN containing 0.1 % HCOOH and 0.2 % TFA. The samples were stirred for 10 min and then centrifuged at 4500 x g for 10 minutes. Following centrifugation, 6 mL of the supernatant was transferred to a glass tube and evaporated to dryness using a nitrogen stream at 40° C. The dry residue was reconstituted in 0.5 mL of a solution containing 1 % HCOOH in water and 1 % HCOOH in ACN (95/5; v/v). The reconstituted solution was filtered through a 0.22 µm PVDF filter, transferred to an HPLC vial with a glass insert, and analyzed using

## UHPLC-MS/MS.

## UHPLC-MS/MS conditions

The analysis utilized ultra-high performance liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry (UHPLC-MS/MS). LC separation was conducted on a Shimadzu Nexera X2 UHPLC system (Shimadzu, Japan), employing a Luna Omega Polar C18 column (100×2.1 mm × 1.6 μm) coupled with a Security Guard ULTRA holder and cartridge for UHPLC C<sub>18</sub> columns (Phenomenex, USA). The mobile phase consisted of 1 % formic acid in water (solvent A) and 1 % formic acid in acetonitrile (solvent B). The gradient elution program was set as follows: starting with 5 % solvent B at 0.00 min, increasing to 30 % solvent B from 0.01 to 3.0 min, further increasing to 95 % solvent B from 3.01 to 4.50 min, and then decreasing back to 5 % solvent B from 4.51 to 6.0 min. The column oven temperature was maintained at 45° C, with a flow rate of 0.4 mL/min and an injection volume of 10 μL.

The mass spectrometry analysis was conducted using a SCIEX 5500 triple quadrupole mass spectrometer (Sciex, USA), controlled by Analyst 1.6.3 software (SCIEX, Framingham, MA, USA). The mass spectrometer operated in electrospray ionization (ESI+) mode with MS data acquisition performed in multiple reaction monitoring (MRM). The analysis monitored specific precursor ions for colistin at *m/z* 386 and corresponding product ions at *m/z* 380 and *m/z* 374, and for polymyxin B at *m/z* 402 with a product ion at *m/z* 396. Key mass spectrometer parameters included curtain gas at 20 psi, nebulizer gas at 50 psi, auxiliary gas at 60 psi, ion spray voltage at 5500 V, and a temperature of 400° C.

For colistin, the MS/MS parameters included declustering potential (DP) of 70 V, cell exit potential (CEP) of 15 V, entrance potential (EP) of 10 V, and collision energies (CE) of 16 V and 18 V for ion 1 and ion 2, respectively. For polymyxin B, the parameters were DP = 75 V, CE = 16 V, CEP = 16 V, and EP = 5 V.

## Validation of the analytical method for plasma and tissues

The UHPLC-MS/MS method was validated for plasma and each tissue type in terms of several parameters including linearity, precision (repeatability and within-laboratory reproducibility), recovery, limit of detection (LOD), and limit of quantification (LOQ).

Linearity was evaluated using blank plasma or tissue samples to prepare two calibration curves spanning concentrations from 5 to 10,000 ng/mL for plasma and 5–200 ng/g for tissues. Repeatability was assessed by analyzing samples (n = 6) spiked at three levels (50, 5000, and 10000 ng/mL for plasma; 5, 50, and 200 ng/g for tissues) on the same day using the same instrument and operator.

Within-laboratory reproducibility was determined by analyzing two additional sets of fortified samples, similar to those used for repeatability, over three different days with different operators. Precision was expressed as the coefficient of variation (CV, %) calculated from these measurements.

Concentrations were calculated relative to internal standards using matrix-matched calibration curves. Recovery (%) was evaluated by comparing the mean measured concentration to the spiked concentration of the samples in the same experiment. The LOD was defined as the drug concentration producing a signal-to-noise ratio of 3, and the LOQ was determined as the lowest concentration point on the matrix calibration curve, following the guidance document on the estimation of LOQ and LOD for measurements in the field of contaminants in feed and food (Wenzl et al., 2016).

## Pharmacokinetic and statistical analysis

PK analyses were performed using PKAnalix™ software (R1, 2023) employing a non-compartmental approach. Concentration-time curves were utilized to directly determine the maximum plasma concentration (C<sub>max</sub>) and the corresponding time (T<sub>max</sub>). The elimination half-life (t<sub>1/2</sub>)

was calculated by analyzing the concentration-time curve using least squares regression. The area under the curve (AUC) was computed using the linear log trapezoidal rule for the IV administration and the linear-up log-down rule for the PO administration. With the exception of T<sub>max</sub>, which is presented as a categorical variable with its median value and range, and the terminal half-life expressed as the harmonic mean, the PK parameters of colistin have been displayed as geometric means along with their respective ranges (Julious and Debarnot, 2000).

The accumulation index was calculated as the ratio of AUC<sub>(0-∞) D</sub> after the final dose in the multiple dose regimen to AUC<sub>(0-∞) D</sub> after the single dose (Toutain and Bosquet-Mélou, 2004a). A value approaching 1 suggests minimal accumulation occurred.

The PO bioavailability (F) was calculated using the following equation:

$$F\% = 100 \times \frac{AUC(PO) \times Dose(IV)}{AUC(IV) \times Dose(PO)}$$

The mean absorption time (MAT) was calculated using the following equation:

$$MAT_{(PO)} = MRT_{(PO)} - MRT_{(IV)}$$

The body extraction ratio (E<sub>body</sub>) for colistin after IV administration was calculated using Cl/CO (Toutain and Bosquet-Mélou, 2004a), where CO (mL/kg/min) is the cardiac output calculated according to the allometric equation in birds: 290.7 × body weight (in kg)<sup>0.69</sup> (Waxman et al., 2019).

Statistical analysis of PK variables among the treatment groups was conducted using repeated-measures ANOVA, followed by Bonferroni's multiple comparison test as a post-hoc analysis to assess significant variations. Normality was assessed for each parameter using the Shapiro test. The data were non-normally distributed, and min-max values were used to represent values instead of the standard deviation. A p-value < 0.05 was considered statistically significant. GraphPad InStat was used for the analyses (GraphPad Software 5.3 v).

## Residue analysis

Due to the limited number of time points available on the elimination curve, it was not feasible to use a naïve pooled-data approach with a non-compartmental analysis to calculate the PK parameters for colistin in the selected tissues. In addition, determining withdrawal times using EMA's software was impractical under the study conditions. Therefore, the present study focused on comparing tissue concentrations exclusively against the maximal residual limits (MRL) set by European commission for food-producing animals: 150 ng/g for muscle and liver, and 200 ng/g for kidneys (Commission Regulation EU No 37/2010, 2009).

## Results

## Analytical method validation

The UHPLC-MS/MS method was validated for plasma and each tissue type in terms of linearity, precision and recovery. Table 1 displays the validation outcomes of the analytical method, detailing the parameters evaluated in plasma and all analyzed tissues. The method exhibited satisfactory recovery rates and demonstrated good linearity across all matrices studied, along with low LOD and LOQ values.

## Animals

Following IV and single PO administrations, throughout the entire study period, the geese did not exhibit any noticeable immediate or delayed (up to 7 days) adverse effects, either locally or systemically. Furthermore, during tissue collection, no post-mortem macroscopic lesions or pathological changes were found.

**Table 1**

Results of the UHPLC-MS/MS method validation for colistin quantification in plasma and tissues in geese.

Parameter	Unit	Matrix					
		Plasma	Muscle	Kidney	Liver	Lung	Heart
Equation		$y = 1.049x - 74.24$	$y = 0.0942x + 3.106$	$y = 0.995x + 0.2723$	$y = 1.039x - 1.243$	$y = 1.049x - 1.590$	$y = 1.156x - 2.434$
R <sup>2</sup>		0.992	0.994	0.995	0.993	0.992	0.993
Repeatability, CV	%	8.5	9.4	6.9	6.7	9.0	6.8
Within-lab reproducibility, CV	%	8.3	7.4	6.2	6.3	6.9	6.3
Recovery	%	93.9	105	96.1	101	96.9	94.8
LOD	ng/mL; ng/g	2	2	2	2	2	2
LOQ	ng/mL; ng/g	5	5	5	5	5	5

### Pharmacokinetics

Plasma concentrations could be quantified up to 24 h for the single PO (n = 2) and IV (n = 4) routes, and up to 10 h (n = 6) from the last dose administered for the multiple PO route. Fig. 1 depicts the semi-logarithmic plot of the mean ( $\pm$  SD) plasma colistin concentrations over time following IV, single and multiple PO administrations. Table 2 displays the mean PK parameters based on non-compartmental analysis. AUC<sub>rest</sub> values for each individual were less than 20 % of AUC<sub>(0-∞)</sub>, and the coefficient of determination (R<sup>2</sup>) for the terminal phase regression line exceeded 95 %. Samples below the LOQ were excluded from the PK analysis.

A relatively short terminal half-life, slow clearance and low volume of distribution, were observed following IV administration. The body extraction rate was low at 0.2 %. The absolute bioavailability was very low after oral administration, and ranged between 0.5 % and 12 %. In the multiple PO administrations, there was no observed accumulation (< 1) of colistin in plasma by the fifth day of administration. Initially, plasma concentrations were undetectable in most geese during the first four 24-h samples. However, by the fifth day, plasma concentrations were detectable in 12 geese, with a mean concentration of 12 ng/mL.

### Tissue residues

Fig. 2 shows the histogram of the mean ( $\pm$  SD) tissue concentrations of colistin over time, following the fifth day of multiple PO administrations, in regard to the MRL set in poultry tissues (excluding lungs and

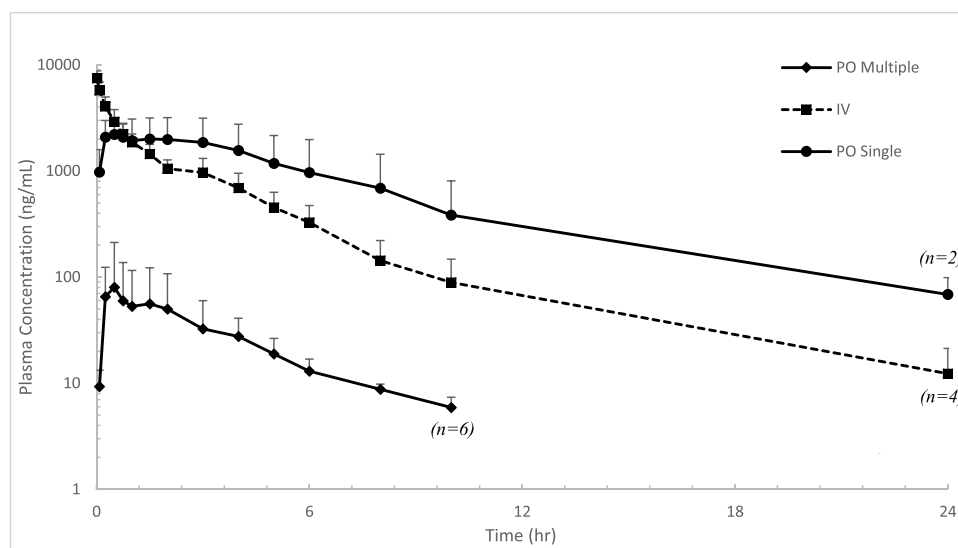
heart). Colistin was detected in all tissues at each sampled time point. For the liver, muscles, and kidneys, colistin did not exceed the MRL at any of the time points set for the corresponding tissues in poultry.

### Discussion

Understanding the disposition kinetics of a drug is essential for developing an effective dosage regimen. In antimicrobial chemotherapy, it is equally important to consider the susceptibility of the infecting microorganisms to determine the effective and non-toxic drug concentrations in both plasma and tissues. Additionally, assessing tissue residues is crucial for safety considerations and ensuring consumer well-being. To the authors' knowledge, this study represents the first PK investigation of colistin in geese. At the employed doses in the present study, and with a single PO dose up to 30 mg/kg, none of the animals showed any visible systemic or local effects.

The bioavailability of colistin in geese was found to be very low, averaging between 1.5 % and 5 %, and consistent with the 4 % bioavailability observed in broiler chickens (Soliman et al., 2016). Similarly, in mammals such as pigs, calves, dairy cows, and humans, colistin absorption from the gastrointestinal tract is minimal or absent (Guyonnet et al., 2010; Grégoire et al., 2017; Kumar et al., 2020). In pigs, colistin was found to be rapidly degraded in simulated gastric fluid due to pepsin-mediated cleavage of peptide bonds in the tail tripeptide moiety, retaining antimicrobial activity in the GI tract however (Grégoire et al., 2017).

Despite the low bioavailability in poultry, colistin is purposefully



**Fig. 1.** Semi logarithmic mean plasma concentration–time curves of colistin following intravenous (1 mg/kg), single (30 mg/kg) and multiple (SID, 2.5 mg/kg) oral administrations in geese (n = 16).

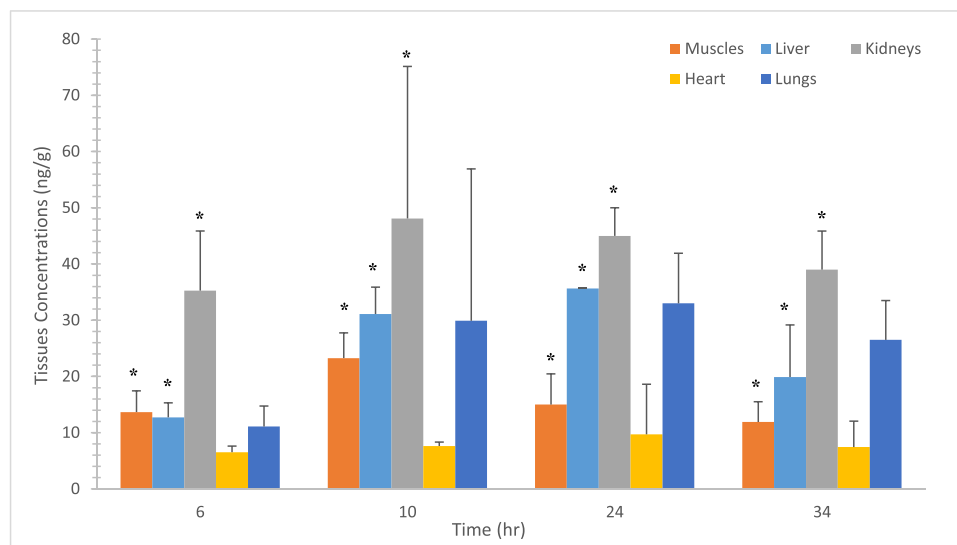
**Table 2**

Pharmacokinetic parameters of colistin in geese (n = 16) after intravenous (1 mg/kg), single (30 mg/kg) and multiple (SID, 2.5 mg/kg for 5 days) oral administrations.

Parameter	Unit	IV			Single PO			Multi PO		
		Geo mean	max	min	Geo mean	max	min	Geo mean	max	min
$AUC_{(0-\infty)D}$	$h \cdot ng \cdot mL^{-1}$	8774.05	11414.91	6496.81	274.70 <sup>a</sup>	839.23	132.4	132.94 <sup>a</sup>	380.50	65.915
$\lambda_z$	$h^{-1}$	0.30	0.49	0.15	0.26	0.35	0.20	0.26	0.54	0.12
$t_{1/2}^{\circ}$	h	2.18	4.70	1.49	2.59	3.49	1.96	2.88	5.40	1.47
Cl	$mL \cdot h^{-1} \cdot g^{-1}$	0.11	0.12	0.09	-	-	-	-	-	-
Vd	$mL \cdot g^{-1}$	0.41	0.84	0.20	-	-	-	-	-	-
$MRT_{(0-\infty)}$	h	2.66	4.89	1.72	4.18	6.49	3.26	4.56	2.73	8.14
$C_{maxD}$	$ng \cdot mL^{-1}$	-	-	-	84.63	188.33	39.00	30.73 <sup>b</sup>	209.5	6.65
$T_{max}^{\ddagger}$	h	-	-	-	0.50	3.00	0.50	0.50	3.00	0.25
F	%	-	-	-	5.00	12.00	1.00	1.50	5.00	0.50
MAT	h	-	-	-	1.52	4.80	1.10	1.88	6.19	0.51

Note:  $AUC_{(0-\infty)D}$ , area under the curve from 0 h to infinity normalized to 1 mg/kg of the administered dose;  $\lambda_z$ , terminal phase rate constant;  $t_{1/2}$ , terminal half-life; Cl, plasma clearance; Vd, volume of distribution;  $MRT_{(0-\infty)}$ , mean residence time from 0 h to infinity;  $C_{maxD}$ , peak plasma concentration normalized to 1 mg/kg;  $T_{max}$ , time of peak concentration; F, bioavailability; MAT, mean absorption time.

<sup>a</sup>, statistically different from IV; <sup>b</sup>, statistically different from single PO; <sup>§</sup>, median value; <sup>°</sup>, harmonic mean.



**Fig. 2.** Histogram of mean ( $\pm$  SD) tissue concentrations of colistin over time following the fifth day of multiple oral administrations (2.5 mg/kg) in geese (n = 16; 4 per time point). \* Indicates all the concentrations are below the MRL set for the corresponding tissues in food-producing animals.

administered to treat enteric infections, as it achieves high concentrations at the site of infection in the GI tract with minimal risk of antimicrobial residues in the meat, permitting a short or even no withdrawal period (Mead et al., 2021). This rationale might apply to geese as well, where colistin's primary use is for local treatment of GI infections without the need for systemic absorption. Although there are anecdotal reports of colistin being used for systemic indications as well, it is generally not recommended for treating systemic infections in poultry (Lin et al., 2005; Apostolakos and Piccirillo, 2018). The blood and tissue levels attained may be inadequate to address common infections (Apostolakos and Piccirillo, 2018; Kumar et al., 2020). Additionally, as seen in Table 2, the bioavailability and systemic exposure  $AUC_{(0-\infty)}$  of colistin varied widely and may be minimal in some geese, compromising treatment effectiveness on a population/flock level. Such variability should be anticipated with oral administration, and its impact on treatment outcomes is especially significant when the F% is low (Toutain and Bousquet-Mélou, 2004b). Other drugs, such as sulfonamides, tetracyclines, and penicillins, are certainly more appropriate choices (Löhren et al., 2008).

The Cl of colistin following IV administration was relatively slow at  $0.11 mL \cdot h^{-1} \cdot g^{-1}$ , and comparable to that found in poultry ( $0.13 mL \cdot h^{-1} \cdot g^{-1}$ ; Lashev and Haritova, 2003). Such comparable clearance rates suggest that the metabolic and excretory mechanisms involved in colistin elimination are likely similar across these avian

species (Fadel et al., 2023; Bourdo et al., 2024). The extraction ratio in geese, reported at a low 0.2 %, indicates minimal ability of clearing organs to eliminate colistin. Despite this, the combination of a short half-life and low plasma and tissue levels ensures effective drug elimination, supporting the safety of colistin use in geese without concern for drug accumulation, as explained later on.

The  $V_d$  in geese was low to moderate at  $0.41 mL \cdot g^{-1}$ , matching that found in broiler chickens ( $0.41 mL \cdot g^{-1}$ ; Lashev and Haritova, 2003). In cattle, values were slightly higher at  $1.3 mL \cdot g^{-1}$  (FAO, 2006), yet still indicating an extracellular distribution of the drug. Plasma protein binding was not evaluated in this study, but in other species, it varies widely: 40 % in cattle (FAO, 2006), 55 % in rats and dogs (Li et al., 2003a,b), 70 % in sheep (FAO, 2006), and 91 % in mice (Cheah et al., 2015). Notably, colistin is thought to predominantly bind to alpha-1-acid glycoprotein, levels of which can markedly rise during bacterial infections, potentially altering colistin kinetics in diseased states (Grégoire et al., 2017).

Regarding the terminal half-life, values found in geese (2.5 h) were consistent with those in broiler chickens (2.19 h; Lashev and Haritova, 2003) and ducks (2.33 h; Zeng et al., 2010). This suggests similar PK behaviors among these avian species, despite their physiological differences. This similarity may be associated to comparable metabolic rates,  $V_d$ , body size and composition, plasma protein binding, and clearance efficiencies (Fadel et al., 2023).

Regarding tissue residues, in the liver, muscles, and kidneys, colistin did not exceed the MRL set for food-producing animals, at any of the time points. This is a positive indicator, suggesting that the recommended treatment protocol for local enteric infections in geese is unlikely to compromise withdrawal times or pose public health risks. This was in consistence with data found in other species (Archimbault et al., 1980; Roudaut, 1989; Zeng et al., 2010). Colistin was undetectable in both serum and milk, following oral administration in cows (Archimbault et al., 1980). In ducks 20 mg per kg of feed of colistin for 10 consecutive days, colistin was undetectable in plasma and tissues, except in the intestines (Zeng et al., 2010). In laying hens, given the same oral dosage regimen as in the present study, no detectable residues of colistin were found in eggs (Roudaut, 1989). While this trend may extend to laying geese, further studies specifically examining colistin residues in geese eggs are necessary to validate this assumption. It is important to note that caution should be exercised when comparing the present results with older studies, as modern analytical methods offer significantly improved sensitivity, allowing for quantification at lower limits. Nonetheless, the overall findings highlight colistin's minimal systemic exposure and tissue penetration when administered orally, thereby reducing the risk of residues in consumable products. This characteristic might make colistin a practical choice for farmers, enabling effective treatment of GI infections without requiring prolonged withdrawal periods. However, it should only be used after sensitivity testing, as resistance may require alternative treatments despite its favorable PK profile.

Regarding the consumption of heart and lung tissues in some countries (Seong et al., 2015), the low residue levels found suggest minimal risk. Similar residue profiles to the commonly consumed tissues (see Fig. 2) may support using existing MRLs for liver, kidney, and muscle as preliminary limits for heart and lungs. In addition, daily intake and dietary exposure data indicate very low consumption of these organs, further minimizing exposure risks and supporting the safety of these preliminary MRLs.

Due to technical constraints, the intestinal content of colistin was not assessed in the present study, representing a limitation. Indeed, assessing the intestinal concentrations alongside the PK of colistin is pivotal for optimizing its therapeutic use and mitigating the risk of antimicrobial resistance. In poultry, the half-life of disappearance of colistin from the luminal intestinal content was 2.5 h after cessation of dosing via drinking water (75,000 IU/kg/day; Mead et al., 2021). Other studies in chickens reported transit times ranging from 3.82 to 5.65 h (Rougière and Carré, 2010; Ravindran, 2013). A further investigation of these parameters in geese is particularly important due to potential differences in intestinal transit times compared to chickens. Variations in GI physiology among avian species could influence colistin's elimination, and consequently affecting its therapeutic outcomes. In fact, considering colistin's primary activity in the intestines, it may be a practical and effective to base the frequency of administration and dosing regimen on its intestinal transit time and local antimicrobial activity, rather than solely on its plasma parameters (Davis et al., 1986). While the similar  $Cl$ ,  $V_d$ , and  $t_{1/2}$  between geese and chickens suggest that the same dosing regimen could be applicable, optimizing it should ideally focus on evaluating intestinal content and transit time.

The present study confirms that a substantial amount of colistin is retained in the GI tract of geese, given the minimal F %. Furthermore, while oral gavage was employed in this study, on-farm administration typically involves colistin via drinking water, which should result in even lower systemic exposure (Mead et al., 2021). Future steps should involve assessing intestinal colistin content following multiple administrations via drinking water to further refine therapeutic strategies in geese.

In conclusion, this study demonstrates that colistin has a short half-life and low systemic bioavailability in geese, with minimal tissue penetration and drug concentrations remaining below MRLs for food-producing animals. These findings support the use of colistin for local

GI treatment in geese, emphasizing its safety and practicality for farmers. Future research should focus on intestinal colistin content to optimize dosing regimens and minimize antimicrobial resistance. It is also important to consider colistin's position in the antibiotic armamentarium as a last-resort treatment. The careful use of colistin is crucial to preserve its effectiveness in combating multidrug-resistant bacterial infections.

### Conflict of Interest

None of the authors has any financial or personal relationships that could inappropriately influence or bias the content of the paper.

### CRediT authorship contribution statement

**Anna Gajda:** Validation, Resources, Methodology. **Mario Giorgi:** Writing – review & editing, Validation, Supervision, Conceptualization. **Charbel Fadel:** Writing – original draft, Software, Methodology, Investigation, Formal analysis, Conceptualization. **Krzysztof Bourdo:** Writing – original draft, Software, Methodology, Investigation, Formal analysis. **Annart Poapolathep:** Writing – review & editing, Data curation. **Magdalena Bilecka:** Resources, Methodology. **BEATA ŁEBKOWSKA-WIERUSZEWSKA:** Writing – review & editing, Supervision, Resources, Methodology, Conceptualization.

### Data Availability

The data sets used and/or analyzed during the current study are available from the corresponding author, upon reasonable request.

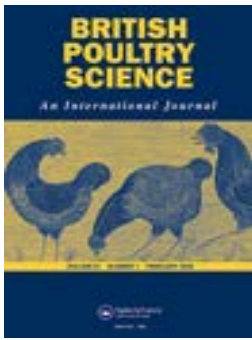
### Appendix A. Supporting information

Supplementary data associated with this article can be found in the online version at [doi:10.1016/j.tvjl.2024.106245](https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2024.106245).

### References

- Apostolakis, I., Piccirillo, A., 2018. A review on the current situation and challenges of colistin resistance in poultry production. *Avian Pathology: Journal of the WVP A 47* (6), 546–558. <https://doi.org/10.1080/03079457.2018.1524573>.
- Archimbault, P., Boutier, C., Fellous, R., Muscat, G., 1980. Pharmacokinetic study of colistin in cattle. *Recueil Délelött Medecine Veterinaire 156* (9), 621–626.
- Boison, J.O., Lee, S., Matus, J., 2015. A multi-residue method for the determination of seven polypeptide drug residues in chicken muscle tissues by LC-MS/MS. *Analytical and Bioanalytical Chemistry 407* (14), 4065–4078. <https://doi.org/10.1007/s00216-015-8644-z>.
- Bourdo, K., Fadel, C., Giorgi, M., Šitovs, A., Poapolathep, A., Łebkowska-Wieruszevska, B., 2024. Disposition kinetics and tissue residues of tilmosin following intravenous, subcutaneous, single and multiple oral dosing in geese (*Anser anser domesticus*). 10.1111/jvp.13461 *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*. Advance online publication. <https://doi.org/10.1111/jvp.13461>.
- Catry, B., Cavaleri, M., Baptiste, K., Grave, K., Grein, K., Holm, A., Jukes, H., Liebana, E., Lopez Navas, A., Mackay, D., Magiorakos, A.P., Moreno Romo, M.A., Moulin, G., Muñoz Madero, C., Matias Ferreira Pomba, M.C., Powell, M., Pyörälä, S., Rantala, M., Ruzauskas, M., Sanders, P., Torren Edo, J., 2015. Use of colistin-containing products within the European Union and European Economic Area (EU/EEA): development of resistance in animals and possible impact on human and animal health. *International Journal of Antimicrobial Agents 46* (3), 297–306. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2015.06.005>.
- Cheah, S.E., Wang, J., Nguyen, V.T., Turnidge, J.D., Li, J., Nation, R.L., 2015. New pharmacokinetic/pharmacodynamic studies of systemically administered colistin against *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* in mouse thigh and lung infection models: smaller response in lung infection. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy 70* (12), 3291–3297. <https://doi.org/10.1093/jac/dkv267>. Dec; PMID: 26318190.
- Commission Regulation (EU) No 37/2010. (2009, December 22). *On pharmacologically active substances and their classification regarding maximum residue limits in foodstuffs of animal origin* (Text with EEA relevance). Official Journal of the European Union, L 15/1. Available at: [https://health.ec.europa.eu/system/files/2016-11/reg\\_2010\\_37\\_en\\_0.pdf](https://health.ec.europa.eu/system/files/2016-11/reg_2010_37_en_0.pdf) Accessed 19 August 2024.
- Davis, S.S., Hardy, J.G., Fara, J.W., 1986. Transit of pharmaceutical dosage forms through the small intestine. *Gut 27* (8), 886–892. <https://doi.org/10.1136/gut.27.8.886>.
- Decolin, D., Leroy, P., Nicolas, A., Archimbault, P., 1997. HypHENATED liquid chromatographic method for the determination of colistin residues in bovine tissues.

- Journal of Chromatographic Science 35 (12), 557–564. <https://doi.org/10.1093/chromsci/35.12.557>.
- Elbadawy, M., Aboubakr, M., 2017. Efficacy of colimoxū (a new combination of amoxicillin and colistin) in the control of experimentally induced necrotic enteritis in broiler chickens. *International Journal of Pharmacology and Toxicology* 5, 51–56.
- EMA/CVMP. (2015). Opinion Following an Article 35 Referral for Veterinary Medicinal Products Containing Colistin to be Administered Orally (EMA/160340/2015). Available online at: [http://www.ema.europa.eu/docs/en\\_GB/document\\_library/Referrals\\_document/Colistin\\_oral\\_35/WC500185448.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Referrals_document/Colistin_oral_35/WC500185448.pdf) Last accessed on 5 June 2024.
- Fadel, C., Łebkowska-Wieruszewska, B., Lisowski, A., Laut, S., Poapolathep, A., Giorgi, M., 2023. Disposition kinetics of robenacoxib following intravenous and oral administration in geese (*Anser anser domesticus*). *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics* 46 (6), 413–420. <https://doi.org/10.1111/jvp.13398>.
- FAO. (2006). Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. Meeting. (2006). Residue Evaluation of Certain Veterinary Drugs: Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, 66th Meeting 2006 (Vol. 2). Food & Agriculture Org. Available at: <https://www.fao.org/4/a0652e/a0652e.pdf> Last accessed 19 August 2024.
- Grégoire, N., Aranzana-Climent, V., Magréault, S., Marchand, S., Couet, W., 2017. Clinical Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Colistin. *Clinical Pharmacokinetics* 56 (12), 1441–1460. <https://doi.org/10.1007/s40262-017-0561-1>.
- Guetiya Wadoun, R.E., Zambou, N.F., Anyangwe, F.F., Njimou, J.R., Coman, M.M., Verdenelli, M.C., Cecchini, C., Silvi, S., Orpianesi, C., Cresci, A., Colizzi, V., 2016. Abusive use of antibiotics in poultry farming in Cameroon and the public health implications. *British Poultry Science* 57 (4), 483–493. <https://doi.org/10.1080/00071668.2016.1180668>.
- Guyonnet, J., Manco, B., Baduel, L., Kaltsatos, V., Aliabadi, M.H., Lees, P., 2010. Determination of a dosage regimen of colistin by pharmacokinetic/pharmacodynamic integration and modeling for treatment of G.I.T. disease in pigs. *Research in Veterinary Science* 88 (2), 307–314. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2009.09.001>.
- Julious, S.A., Debnarot, C.A., 2000. Why are pharmacokinetic data summarized by arithmetic means? *Journal of Biopharmaceutical Statistics* 10 (1), 55–71. <https://doi.org/10.1081/BIP-100101013>.
- Kempf, I., Jouy, E., Chauvin, C., 2016. Colistin use and colistin resistance in bacteria from animals. *International Journal of Antimicrobial Agents* 48 (6), 598–606. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2016.09.016>.
- Kumar, H., Chen, B.H., Kuca, K., Nepovimova, E., Kaushal, A., Nagraik, R., Bhatia, S.K., Dhanjal, D.S., Kumar, V., Kumar, A., Upadhyay, N.K., Verma, R., Kumar, D., 2020. Understanding of colistin usage in food animals and available detection techniques: a review. *Animals: An Open Access Journal From MDPI* 10 (10), 1892. <https://doi.org/10.3390/ani10101892>.
- Kumar, H., Kumar, D., Nepovimova, E., Oulkar, D., Kumar, A., Azad, R.M.R., Budakoti, S.K., Upadhyay, N.K., Verma, R., Kuca, K., 2021. Determination of Colistin B in chicken muscle and egg using ultra-high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 18 (5), 2651. <https://doi.org/10.3390/ijerph18052651>.
- Lashev, L., Haritova, A., 2003. Pharmacokinetics of colistin in broiler chickens. *Bulgarian Journal of Veterinary Medicine* 6 (1), 21–26.
- Li, J., Coulthard, K., Milne, R., Nation, R.L., Conway, S., Peckham, D., Etherington, C., Turnidge, J., 2003. Steady-state pharmacokinetics of intravenous colistin methanesulphonate in patients with cystic fibrosis. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 52 (6), 987–992. <https://doi.org/10.1093/jac/dkg468>.
- Li, J., Milne, R.W., Nation, R.L., Turnidge, J.D., Smeaton, T.C., Coulthard, K., 2003. Use of high-performance liquid chromatography to study the pharmacokinetics of colistin sulfate in rats following intravenous administration. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 47 (5), 1766–1770. <https://doi.org/10.1128/AAC.47.5.1766-1770.2003>.
- Lima Barbieri, N., Nielsen, D.W., Wannemuehler, Y., Cavender, T., Hussein, A., Yan, S.G., Nolan, L.K., Logue, C.M., 2017. mcr-1 identified in Avian Pathogenic *Escherichia coli* (APEC). *PLoS One* 12 (3), e0172997. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0172997>.
- Lin, B., Zhang, C., Xiao, X., 2005. Toxicity, bioavailability and pharmacokinetics of a newly formulated colistin sulfate solution. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics* 28 (4), 349–354. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2885.2005.00666.x>.
- Liu, Y.Y., Wang, Y., Walsh, T.R., Yi, L.X., Zhang, R., Spencer, J., Doi, Y., Tian, G., Dong, B., Huang, X., Yu, L.F., Gu, D., Ren, H., Chen, X., Lv, L., He, D., Zhou, H., Liang, Z., Liu, J.H., Shen, J., 2016. Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study. *The Lancet Infectious Diseases* 16 (2), 161–168. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(15\)00424-7](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(15)00424-7).
- Löhren, U., Ricci, A., Cummings, T.S., 2008. Guidelines for antimicrobial use in poultry. *Guide to Antimicrobial Use in Animals* 126–142.
- Lutful Kabir, S.M., 2010. Avian colibacillosis and salmonellosis: a closer look at epidemiology, pathogenesis, diagnosis, control and public health concerns. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 7 (1), 89–114. <https://doi.org/10.3390/ijerph7010089>.
- Mead, A., Richez, P., Azzariti, S., Pelligand, L., 2021. Pharmacokinetics of colistin in the gastrointestinal tract of poultry following dosing via drinking water and its bactericidal impact on enteric *Escherichia coli*. *Frontiers in Veterinary Science* 8, 698135. <https://doi.org/10.3389/fvets.2021.698135>.
- Poirel, L., Jayol, A., Nordmann, P., 2017. Polymyxins: antibacterial activity, susceptibility testing, and resistance mechanisms encoded by plasmids or chromosomes. *Clinical Microbiology Reviews* 30 (2), 557–596. <https://doi.org/10.1128/CMR.00064-16>.
- Rhouma, M., Beaudry, F., Thériault, W., Bergeron, N., Beauchamp, G., Laurent-Lewandowski, S., Fairbrother, J.M., Letellier, A., 2016. In vivo therapeutic efficacy and pharmacokinetics of colistin sulfate in an experimental model of enterotoxigenic *Escherichia coli* infection in weaned pigs. *Veterinary Research* 47 (1), 58. <https://doi.org/10.1186/s13567-016-0344-y>.
- Roudaut, B., 1989. Depletion of colistin in eggs following medication of laying hens. *Veterinary Quarterly* 11 (3), 183–185.
- Seong, P.N., Cho, S.H., Park, K.M., Kang, G.H., Park, B.Y., Moon, S.S., Ba, H.V., 2015. Characterization of chicken by-products by mean of proximate and nutritional compositions. *Korean Journal for Food Science of Animal Resources* 35 (2), 179–188. <https://doi.org/10.5851/kosfa.2015.35.2.179>.
- Soliman, A.M., Elbestawy, A.R., Ibrahim, S., 2016. Pharmacokinetics, bio-equivalence and tissue residues of two oral colistin formulations in broiler chickens. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences* 166–170.
- Stefaniuk, E.M., Tyski, S., 2019. Colistin resistance in enterobacterales strains - a current view. *Polish Journal of Microbiology* 68 (4), 417–427. <https://doi.org/10.33073/pjm-2019-055>.
- Toutain, P.L., Bousquet-Mélou, A., 2004b. Bioavailability and its assessment. *Journal of veterinary pharmacology and therapeutics* 27 (6), 455–466. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2885.2004.00604.x>.
- Toutain, P.L., Bousquet-Mélou, A., 2004a. Plasma clearance. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics* 27 (6), 415–425. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2885.2004.00605.x>.
- Waxman, S., Prados, A.P., De Lucas, J.J., Wiemeyer, G., Torres-Bianchini, L., Andres, M.I. S., Rodríguez, C., 2019. Evaluation of allometric scaling as a tool for extrapolation of the enrofloxacin dose in American black vultures (*Coragyps atratus*). *American Journal of Veterinary Research* 80 (8), 727–735. <https://doi.org/10.2460/ajvr.80.8.727>.
- Wenzl, T., Haedrich, J., Schaechtele, A., Piotr, R., Stroka, J., Eppe, G., Scholl, G., 2016. Guidance document on the estimation of LOD and LOQ for measurements in the field of contaminants in food and feed. *European Union Reference Laboratory* 11–18.
- Zeng, Z., Wu, J., Yang, G., Chen, Z., Huang, X., Ding, H., 2010. Study of colistin depletion in duck tissues after intramuscular and oral administration. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics* 33 (4), 408–410. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2885.2009.01136.x>. PMID: 20646204.



## Disposition kinetics and tissue residues of Lincomycin following intravenous, intramuscular and single and multiple oral dosing in domestic geese (*Anser anser domesticus*)

K. Bourdo, C. Fadel, M. Giorgi, M. Gbylik-Sikorska, A. Matras, A. Poapolathep & B. Lebkowska-Wieruszewska

To cite this article: K. Bourdo, C. Fadel, M. Giorgi, M. Gbylik-Sikorska, A. Matras, A. Poapolathep & B. Lebkowska-Wieruszewska (2026) Disposition kinetics and tissue residues of Lincomycin following intravenous, intramuscular and single and multiple oral dosing in domestic geese (*Anser anser domesticus*), *British Poultry Science*, 67:1, 9-17, DOI: [10.1080/00071668.2025.2524711](https://doi.org/10.1080/00071668.2025.2524711)

To link to this article: <https://doi.org/10.1080/00071668.2025.2524711>



© 2025 The Author(s). Published by Informa UK Limited, trading as Taylor & Francis Group.



[View supplementary material](#)



Published online: 16 Jul 2025.



[Submit your article to this journal](#)



Article views: 777



[View related articles](#)



[View Crossmark data](#)

# Disposition kinetics and tissue residues of Lincomycin following intravenous, intramuscular and single and multiple oral dosing in domestic geese (*Anser anser domesticus*)

K. Bourdo<sup>a</sup>, C. Fadel<sup>b,c</sup>, M. Giorgi<sup>c</sup>, M. Gbylik-Sikorska<sup>d</sup>, A. Matras<sup>d</sup>, A. Poapolathep<sup>e</sup> and B. Lebkowska-Wieruszewska<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Department of Pharmacology, Toxicology and Environmental Protection, University of Life Sciences, Lublin, Poland; <sup>b</sup>Department of Veterinary Medicine, Lebanese University, Beirut, Lebanon; <sup>c</sup>Department of Veterinary Sciences, University of Pisa, Pisa, Italy; <sup>d</sup>Department of Pharmacology and Toxicology, National Veterinary Institute-National Research Institute in Puławy, Lublin, Poland; <sup>e</sup>Department of Veterinary Pharmacology, Kasetsart University, Bangkok, Thailand

## ABSTRACT

1. Lincomycin, a lincosamide antibiotic, is commonly used for treating necrotic enteritis and chronic respiratory disease caused by avian mycoplasmas. Given its similar use in other birds, it has the potential to be applied off-label in geese.  
2. This study examined the pharmacokinetics and tissue residues of Lincomycin in 16 healthy adult male geese. The study consisted of four phases, each separated by a one-month 'washout' period. Geese received Lincomycin *via* intravenous (IV, 1 mg/kg), single intramuscular (IM, 15 mg/kg), single oral (PO, 50 mg/kg) and multiple oral (SID, 5 mg/kg for 7 d consecutively) routes. Blood and tissue samples were collected at specific intervals for analysis using a validated UHPLC-MS/MS method.  
3. Following IV administration, the mean values  $t_{1/2}$ ,  $V_d$ , and CI were at 4.19 h, 2727.16 ml/kg, and 451.26 ml/h/kg, respectively. For both extravascular routes, Lincomycin displayed a high bioavailability (109% IM; 95% single PO) and rapid absorption (MAT 0.42 h IM; 2 h single PO) in geese. Multiple oral doses showed no plasma accumulation, but tissue data revealed quantifiable concentrations at 72 h. The calculated preliminary WT were determined as 1 d for the muscles, and 4 d for the kidneys and liver.  
4. Despite the promising PK profile, the administered doses were inadequate to sustain drug concentrations above the MIC<sub>90</sub> for certain target pathogens, indicating the need for further optimisation of treatment regimens, including combinations with spectinomycin, as practiced in other animal species.

## ARTICLE HISTORY

Received 21 November 2024  
Accepted 7 May 2025

## KEYWORDS

Antimicrobials; Lincomycin; pharmacokinetics; tissue residues; withdrawal period

## Introduction


Lincomycin, derived from *Streptomyces lincolnensis*, is a member of the lincosamide antibiotic class. It combats bacterial infections by binding to the 50S ribosomal subunit, thereby inhibiting the peptidyl transferase reaction and reducing protein synthesis (Mateusen et al. 2002; Spížek and Řezanka 2017). Lincomycin is primarily effective against Gram-positive bacteria, obligate anaerobes and mycoplasmas. Its ability to penetrate tissues with poor vascularity and maintain efficacy in the presence of pus has been demonstrated (Plenderleith 1988). Clinically, Lincomycin is indicated for a variety of infections, including acute and chronic respiratory tract infections, sinusitis, infections of the skin, soft tissues, bones and joints, as well as septicaemia and endocarditis (Gouri et al. 2014).

Lincomycin is indicated in various animal species. In sheep, goats and calves, it has been employed to treat respiratory tract infections (Riviere and Papich 2009). In cattle, it has been suggested for use in combination with other antibiotics for susceptible infections that may involve aerobes resistant to more commonly used medications or anaerobes, including *Bacteroides fragilis* (USPC 2008). In cats and dogs, Lincomycin is recommended as an alternative to other antibiotics (Collignon et al. 2008) for treating Gram-positive aerobic and anaerobic infections, particularly against penicillin-resistant strains of

*Staphylococcus* and *Streptococcus spp.* (Giguère 2013; Riviere and Papich 2009). In poultry, Lincomycin is utilised either alone or in combination with other medications for the oral treatment of necrotic enteritis and chronic respiratory disease associated with avian mycoplasmas (Shamakh et al. 2022). It is particularly effective against airsacculitis caused by *Mycoplasma synoviae* or *M. gallisepticum*, when susceptible to the Lincomycin - spectinomycin combination, and can be employed as a growth promoter (Shamakh et al. 2022). Due to the occurrence of similar infections in turkeys and waterfowl, Lincomycin is also used off-label in these species, often in combination with spectinomycin (Guo et al. 2021). Some brands specifically market it for use in waterfowl (<https://poultrydvm.com/drugs/Lincomycin>).

The pharmacokinetic (PK) profile of Lincomycin has been extensively studied in various animal species, including pigs, chickens, goats, cats, buffalo calves, sheep and dogs (Shamakh et al. 2022). The primary aim of the current study is to determine the PK profile of Lincomycin in geese, specifically following intramuscular (IM), intravenous (IV) and single and repeated administrations oral (PO) administrations. Additionally, a second aim of the study is to assess tissue residues of Lincomycin following multiple oral administrations and to determine a preliminary withdrawal time (WT) for the various tissues.

**CONTACT** B. Lebkowska-Wieruszewska  [lebkowska.wieruszewska@up.lublin.pl](mailto:lebkowska.wieruszewska@up.lublin.pl) 

 Supplemental data for this article can be accessed online at <https://doi.org/10.1080/00071668.2025.2524711>

© 2025 The Author(s). Published by Informa UK Limited, trading as Taylor & Francis Group.

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivatives License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>), which permits non-commercial re-use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited, and is not altered, transformed, or built upon in any way. The terms on which this article has been published allow the posting of the Accepted Manuscript in a repository by the author(s) or with their consent.

## Materials and methods

### Ethical statement

The animal experiment was carried out in accordance with European law (2010/63/UE) and approved (nr. 18/2023) by the Institutional Animal Care and Use Committee of the University of Lublin (Poland).

### Chemicals and reagents

Acetonitrile and methanol were obtained in LC-MS grade (J. T. Baker, Deventer, the Netherlands), and formic acid was obtained from Sigma – Aldrich, (St. Louis, MO, USA). Syringe hydrophilic polyvinylidene fluoride (PVDF) membrane filters 0.22 µm were from Restek (Bellefonte, PA, USA). Milli-Q water was prepared using a Milli-Q Gradient Water System (Millipore, Molsheim, France). The analytical reference standard of Lincomycin was purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) and Lincomycin-d<sub>3</sub> was obtained from TRC Standards (20 Martin Ross Ave, North York, Canada). Stock solutions of Lincomycin and Lincomycin -d<sub>3</sub>, the latter being used as the internal standard (IS), were prepared at a concentration of 1000 µg/ml and 100 µg/ml in methanol, respectively, and were stored at -18°C. The working stock solutions of Lincomycin (2 and 10 µg/ml) and the IS (10 µg/ml) were prepared by dilution in ultra-pure water and stored at 4°C for 11 months.

### Animals

The trial used 16 healthy adult male Bilgorajska geese, aged two years, with weights ranging from 2.65 to 4.2 kg, which were sourced from a local farm (Majątek Rutka, Puchaczów, Poland). They did not receive any prior antibiotic treatment and were individually distinguished by rings on their left legs. A thorough evaluation by the supervising veterinarians who confirmed their health status through physical examination, serum chemistry and haematological analyses. The geese underwent a week-long acclimatisation period in their environment, which included daily monitoring of their behaviour and appetite. They were housed in a 60 m<sup>2</sup> enclosed area with an indoor shelter measuring 8 m<sup>2</sup> and had unrestricted access to feed and water. The study design involved a series of longitudinal, open studies. Each phase was separated by a one-month washout period.

In the initial phase, geese received an IV dose of Lincomycin at 15 mg/kg (Lincocin®, solution for injection and infusion; 300 mg/ml, Pfizer), administered through a sterile 20 gauge 3.75 cm needle in the left-wing vein. In the second phase, a single intramuscular administration, of the same dose (Lincocin®, solution for injection and infusion; 300 mg/ml, Pfizer) was administered into the right breast muscle. In the third phase, *per os* single administration, 50 mg/kg of Lincomycin solution (Lincofort 400®, 400 mg/g, powder for oral solution for pigs and chickens) was administered *via* crop gavage, with the cannula being flushed promptly afterwards with 3 ml of water, to ensure delivery. The last phase involved a multiple oral administration of Lincomycin solution (Lincofort 400®, 400 mg/g, powder for oral solution for pigs and chickens) *via* crop gavage. Geese received multiple SID administrations of Lincomycin solution (5 mg/kg d) for 7 d consecutively at 0800.

Blood samples, approximately 1 ml each, were drawn from the right-wing vein at specific time intervals during all phases: 0, 0.085 (for IV administration only), 0.25, 0.5, 0.75, 1, 1.5, 2, 4, 6, 8, 10, 24 and 48 h (except for multiple PO for 72 h). For the multiple PO administrations, blood sampling occurred on d 7 following the same aforementioned pattern. The blood was collected in heparinised tubes and then centrifuged at 1500 × g. Subsequently, the plasma was harvested and stored at -20°C. All samples were analysed simultaneously within 10 d of the collection of the last phase. Following the last multiple PO dose, four geese were euthanised at specific time points; 10, 24, 48 and 72 h. Tissue samples, including approximately 20 g of muscle, liver, kidney, lungs and heart, were collected and stored at -20°C for subsequent analysis.

### Lincomycin quantification in plasma and tissues

Plasma (200 µl) was directly transferred into a micro-centrifuge tube. Then, 10 µl of IS (10 µg/ml) was added and the mixture was stored at room temperature for 5 min. Next, 1 ml of an extraction mixture (acetonitrile: 0.1% formic acid, 1:1, v/v) was added, followed by 100 µl of ultra-pure water. The mixture was vortexed for 1 min and centrifuged at 9500 × g for 5 min at 4°C. Then, 200 µl of the supernatant was transferred into chromatographic vials with a glass insert. For tissue samples, half a gram of tissue was weighed into a 15 ml centrifuge tube. Then, 10 µl of IS (10 µg/ml) was added, vortexed and stored at room temperature for 5 min. Afterwards, 7 ml of an extraction mixture (acetonitrile: 0.1% formic acid, 65:35, v/v) was added, followed by 50 µl of ultra-pure water. The mixture was vortexed for 1 min and mixed on a rotary stirrer for 5 min at room temperature. Subsequently, the sample was centrifuged at 3060 × g for 5 min at 4°C. Five hundred µl of the supernatant was filtered using 0.22 µm PVDF membrane syringe filters, and 200 µl of the filtrate was transferred into chromatographic vials with a glass insert.

### UHPLC-MS/MS conditions

The UHPLC-MS/MS analysis was performed using a Sciex ultra-high-performance liquid chromatography (UHPLC) ExionLC AC PUMP 2.11 system connected to the QTRAP® 5500 mass spectrometer (Sciex, Framingham, MA, USA). Separation was achieved using a Poroshell 120 EC-C18 column (1.9 µm, 50 × 2.1 mm, Agilent, Santa Clara, CA, USA) integrated with a guard column of the same type. The column was placed in an oven at 35°C with an operating flow rate of 0.5 ml/min. The mobile phase consisted of 0.1% formic acid (A) and acetonitrile (B). The gradient started with 99% mobile phase A and 1% mobile phase B, held for 30 s, then decreased to 90% (A) within 2.30 min, and further decreased to 10% (A) within the next min. It then increased to 98% (A) and was held for 1.30 min. The entire separation was completed within 5.30 min with an injection volume of 2 µl. Detection was conducted in positive electrospray ionisation (ESI+) mode with the following variables: IonSpray voltage: 5500 V, source temperature: 450°C, curtain gas: 30 psi, ion source gas 1:45 psi, ion source gas 2:40 psi. Fragmentation of the analytes was performed under multiple reaction monitoring (MRM) mode. Two transitions were monitored for Lincomycin: m/z 407.0 > 359.4 and 407.0 >

126.3, and one for Lincomycin-d3 (IS): m/z 409.8 > 129. The Lincomycin parameters were as follows: declustering potential (DP): 60 V; collision energy (CE): 32 and 24 V. For Lincomycin-d3, DP was 70 V and CE was 35 V. Instrument control and data processing were managed using Analyst Software version 1.7.2.

### Validation of the analytical method for plasma and tissues

The developed method was validated according to the Commission Implementing Regulation (EU) 2021/808 of 22 March 2021 document (EU 2021/808) regarding the terms of linearity, precision (repeatability and within-laboratory reproducibility), selectivity, recovery and matrix effect (ME). The lower limit of quantification (LLOQ) and limit of detection (LOD) were measured based on the Guidance Document on the Estimation of LOD and LOQ for Measurements in the Field of Contaminants in Feed and Food EUR 28 099 EN (Wenzl et al. 2016). Linearity was evaluated by performing two different matrix-matched calibration curves prepared by spiking Lincomycin-free plasma samples, using seven concentrations for each curve: (1, 50, 100, 250, 500, 750 and 1000 µg/l) and (1000, 2500, 5000, 10 000, 20000, 30000, 40000 and 50 000 µg/l). In the case of tissues, the authors prepared one matrix-matched calibration curve by spiking Lincomycin-free (kidney, muscles, heart, lungs and liver) samples, using 10 concentrations (5, 10, 50, 100, 250, 500, 1000, 5000, 7500 and 10000 µg/kg). Repeatability was evaluated by fortifying six blank plasma and tissue samples at three concentrations (MRL-maximum residue limits or VL-validation level): 0.1 MLP/VL, 1 MLP/VL and 1.5 MLP/VL depending on matrices, by the same operator, on the same day, with the same instrument. The within-laboratory reproducibility was established by analysing two additional series of blank plasma and tissue samples at the same concentrations for repeatability, which was analysed by different operators with the same instrument on two different days and the coefficients of variation (CVs; %) were calculated. Recovery was evaluated in the same experiment as repeatability by dividing the mean measured concentration by a particular fortification level. Selectivity was established by analysing six different blank plasma and tissue samples to test for potential interference with endogenous substances. The matrix effect (ME, %) was investigated by comparing six spiked samples with standards in solvent (water) at the corresponding concentration of 100 µg/l; 100, 500 and 1500 µg/kg, of each of the matrices. It was considered that, for values of ME (%) = 100 ± 15%, this effect was not observed. The LLOQ of the method was set as the lowest point of the calibration curve for which the coefficient of variation (CV) was acceptable. The LOD was calculated as the signal-to-noise ratio (S/N) ≈ 3 (Wenzl et al. 2016).

### Pharmacokinetic and statistical analysis

The PK analyses were performed using PKanalix™ software (R1, 2023) employing a non-compartmental approach. Concentration–time curves were utilised to directly determine the maximum plasma concentration ( $C_{max}$ ) and the corresponding time ( $T_{max}$ ). The elimination half-life ( $t_{1/2}$ ) was calculated by analysing the concentration–time curve using least-squares regression. The area under the curve

(AUC) was computed using the linear log trapezoidal rule for the IV administration and the linear-up log-down rule for the extravascular administrations. The accumulation index was calculated as the ratio of  $AUC_{(0-\infty) D}$  after the final dose in the multiple dose regimen to  $AUC_{(0-\infty) D}$  after the single dose (Toutain and Bousquet-Mélou 2004a). A value approaching 1 suggests minimal accumulation occurred. The PO bioavailability (F) was calculated using the following equation:

$$F\% = 100 \times \frac{AUC(PO) \times Dose(IV)}{AUC(IV) \times Dose(PO)}$$

The mean absorption time (MAT) was calculated using the following equation:

$$MAT_{(PO)} = MRT_{(PO)} - MRT_{(IV)}$$

The body extraction ratio ( $E_{body}$ ) for Lincomycin after IV administration was calculated using  $Cl/CO$  (Toutain and Bousquet-Mélou 2004b), where CO is the cardiac output calculated according to the allometric equation (Waxman et al. 2019) in birds:

$$CO = 290.7 \times \text{body weight}(in)^{0.69}$$

Statistical analysis of PK variables among the treatment groups was conducted using repeated-measures ANOVA. Due to the non-parametric nature of the data, the Friedman test was employed. Afterwards, Dunn's multiple-comparison test was used as a post-hoc analysis to compare all the groups. Normality was assessed for each parameter using the Shapiro test, and since the data were non-normally distributed, values were represented using min-max ranges instead of the standard deviation. When  $p < 0.05$  differences were considered statistically significant and GraphPad InStat (version 5.3) was utilised for all statistical analyses.

### Residue analysis

Withdrawal times (WT) for Lincomycin in the goose tissues were calculated using the EMA-developed software WT 1.4 (Anonymous 2018). The WT was determined as the point at which the upper one-sided tolerance limit (99%) with a 95% confidence interval fell below the MRL. For this study, the MRL values specified for Lincomycin in chicken tissues, 500 µg/kg for liver, 500 µg/kg for kidneys and 200 µg/kg for muscles, were employed, as outlined in the Codex Alimentarius Commission (CAC 2015).

## Results

### Analytical method validation

The method validation was performed according to the Commission Implementing Regulation (EU) 2021/808 of 22 March 2021 document (EU 2021/808) but without a decision limit ( $CC\alpha$ ), detection capability ( $CC\beta$ ) and ruggedness. The matrix-matched calibration curve showed good linearity, and coefficient of determination was  $R^2 \geq 0.995$  for all matrices. The precision (within-laboratory reproducibility and repeatability) was satisfactory; the CV for repeatability and the within-laboratory reproducibility were lower than 15% (Table 1). There

**Table 1.** Validation results for Lincomycin quantification in plasma and different tissues in geese.

Validation parameter	Matrix					
	Plasma	Kidney	Muscle	Heart	Lungs	Liver
MLP/VL [µg/kg;µg/l]	1000	1500	100	100	100	500
Repeatability* (n = 6), (CV, %)	9.8 ± 2.1	12.7 ± 1.7	8.6 ± 2.4	11.8 ± 2.6	10.4 ± 3.2	12.7 ± 1.9
Within-Lab Reproducibility*, (n = 18), (CV, %)	8.6 ± 2.4	14.7 ± 1.8	11.6 ± 2.1	15.1 ± 1.6	14.4 ± 1.2	16.3 ± 2.1
LLOQ [µg/kg; µg/l]	1	5	5	5	5	5
LOD [µg/kg;µg/l]	0.05	0.5	0.1	0.5	0.7	0.5
Recovery* (n = 18) [%]	97.1 ± 3.2	112 ± 4.5	89.4 ± 5.1	106 ± 3.8	109 ± 3.6	97 ± 5.5
Matrix effect, ME %	96.4 ± 1.7	84.9 ± 3.2	96.6 ± 2.8	114.7 ± 2.1	105.1 ± 3.2	114.5 ± 3.4

\*- average of 3 MLP/VL.

were no significant interfering peaks in the blank plasma and tissue samples at the corresponding retention time of target analytes and IS. The selectivity of the presented method is suitable for the quantitation of Lincomycin in plasma, kidney, muscles, heart, lungs and liver. The average recovery was in the range of 89–112%, depending on matrices. The ME were in the range of 85–115%, depending on the matrix (Table 1). The matrix matches calibration curves and IS were used to minimise and avoid the ME. The LODs were calculated in the range of 0.05 to 0.7 µg/kg, depending on the matrices; the LLOQs were 1 µg/l in plasma, and 5.0 µg/kg in tissues. The LLOQ and LOD values are presented in Table 1.

### Animals

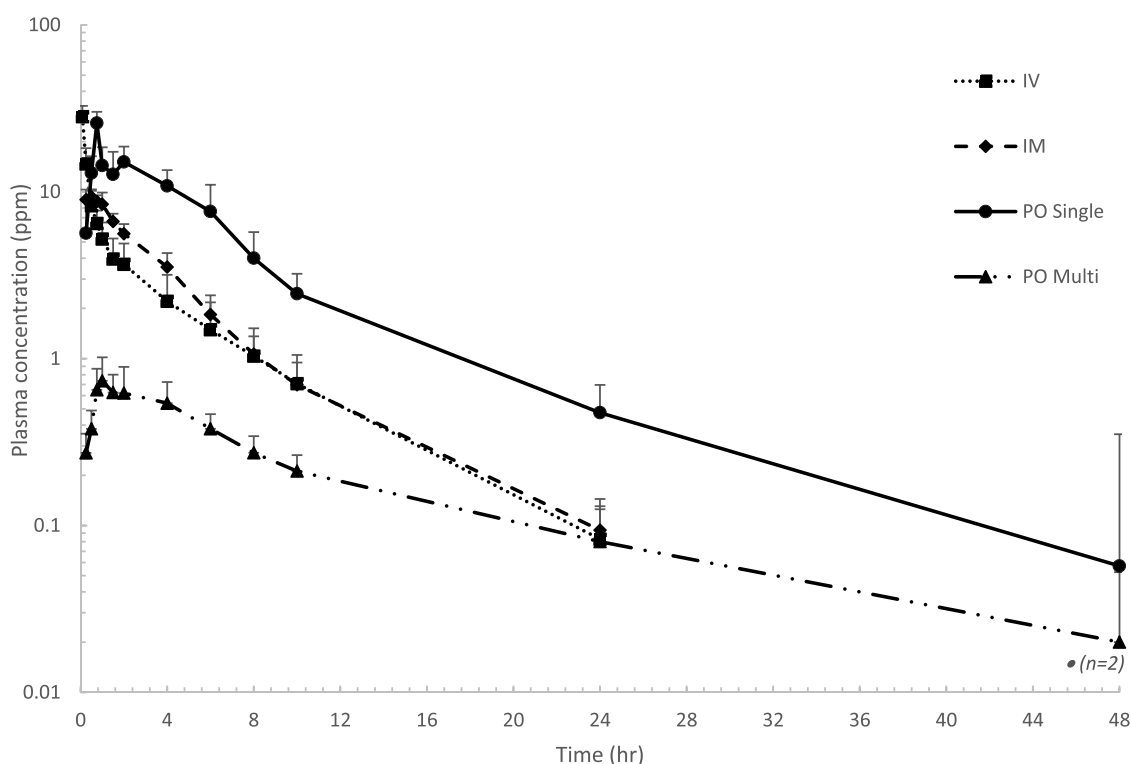
Throughout the entire study period, the geese did not exhibit any noticeable immediate or delayed (up to 7 d) adverse effects, either locally or systemically.

### Pharmacokinetics

Figure 1 depicts the semi-logarithmic plot of the mean (± SD) plasma Lincomycin concentrations over time following IV, IM, single and multiple PO administrations.

Table 2 displays the mean PK parameters based on non-compartmental analysis. With the exception of  $T_{max}$ , which is presented as a categorical variable with its median value and range, and the terminal half-life expressed as the harmonic mean, the PK parameters of Lincomycin have been displayed as geometric means along with their respective ranges (Julius and Debarnot 2000).

The  $AUC_{extrapolated}$  values for each individual were less than 10% of  $AUC_{(0-\infty)}$ , and the  $R^2$  for the terminal-phase regression line exceeded 95%. Samples below the LLOQ were excluded from the PK analysis. A relatively short to moderate terminal half-life, fast clearance and high volume of distribution were observed following IV administration. The body extraction rate was low at 1% (±0.3). The absolute bioavailability was almost complete following single PO and



**Figure 1.** Semi logarithmic mean plasma concentration – time curves (± SD) of Lincomycin following intravenous (15 mg/kg), intramuscular (15 mg/kg), single (50 mg/kg) and multiple (SID, 5 mg/kg) oral administrations in geese (n = 16).

**Table 2.** Pharmacokinetic parameters of Lincomycin in geese ( $n = 16$ ) after intravenous (15 mg/kg), intramuscular (15 mg/kg), single (50 mg/kg) and multiple (50 mg/kg for 7 d) oral administrations.

Parameter	Unit	IV			IM			Single PO			Multi PO		
		Mean	Max	Min	Mean	Max	Min	Mean	Max	Min	Mean	Max	Min
$AUC_{(0-\infty)}$ D	hr* $\mu$ g/ml	2.31	3.31	1.79	2.39	2.89	1.98	2.12	2.81	1.59	1.75 <sup>b</sup>	2.72	1.41
$\lambda_z$	1/h	0.17	0.28	0.13	0.16	0.19	0.12	0.14	0.21	0.08	0.07 <sup>ab</sup>	0.12	0.05
$t_{1/2}^h$	h	4.19	5.50	2.50	4.37	5.90	3.70	5.07	8.66	3.35	9.89 <sup>ab</sup>	14.76	5.63
Cl	ml/h/kg	451.26	666.19	302.81	—	—	—	—	—	—	—	—	—
$V_d$	ml/kg	2727.16	4683.58	1806.26	—	—	—	—	—	—	—	—	—
$MRT_{(0-\infty)}$	h	4.24	5.48	3.21	4.66	6.53	3.79	6.75 <sup>a</sup>	9.08	5.23	14.15 <sup>ab</sup>	19.64	8.55
$C_{max,D}$	$\mu$ g/ml	—	—	—	0.64	0.74	0.58	0.50	1.27	0.39	0.15 <sup>b,c</sup>	1.00	0.09
$T_{max,S}$	h	—	—	—	0.50	1.00	0.50	0.75	0.75	0.75	1.00	2.00	1.00
F	%	—	—	—	109.32	65.15	135.84	95.02	60.41	129.78	80.09 <sup>b</sup>	50.67	106.00
MAT	h	—	—	—	0.42	1.74	0.00	2.00	0.15	3.46	8.65 <sup>b,c</sup>	2.09	16.61

NB:  $AUC_{(0-\infty)}$  D, area under the curve from 0 h to infinity normalised to 1 mg/kg of the administered dose;  $\lambda_z$ , terminal phase rate constant;  $t_{1/2}$ , terminal half-life; Cl, plasma clearance;  $V_d$ , volume of distribution;  $MRT_{(0-\infty)}$ , mean residence time from 0 h to infinity;  $C_{max,D}$ , peak plasma concentration normalised to 1 mg/kg of the administered dose;  $T_{max,S}$ , time of peak concentration; F, bioavailability; MAT, mean absorption time. <sup>a</sup>statistically different from IV; <sup>b</sup>statistically different from IM; <sup>c</sup>statistically different from single PO; <sup>h</sup>harmonic mean; <sup>S</sup>Median value.

IM administrations. In the multiple PO administrations, there was no observed accumulation (<1) of Lincomycin in plasma by the seventh day of administration.

### Tissue residues

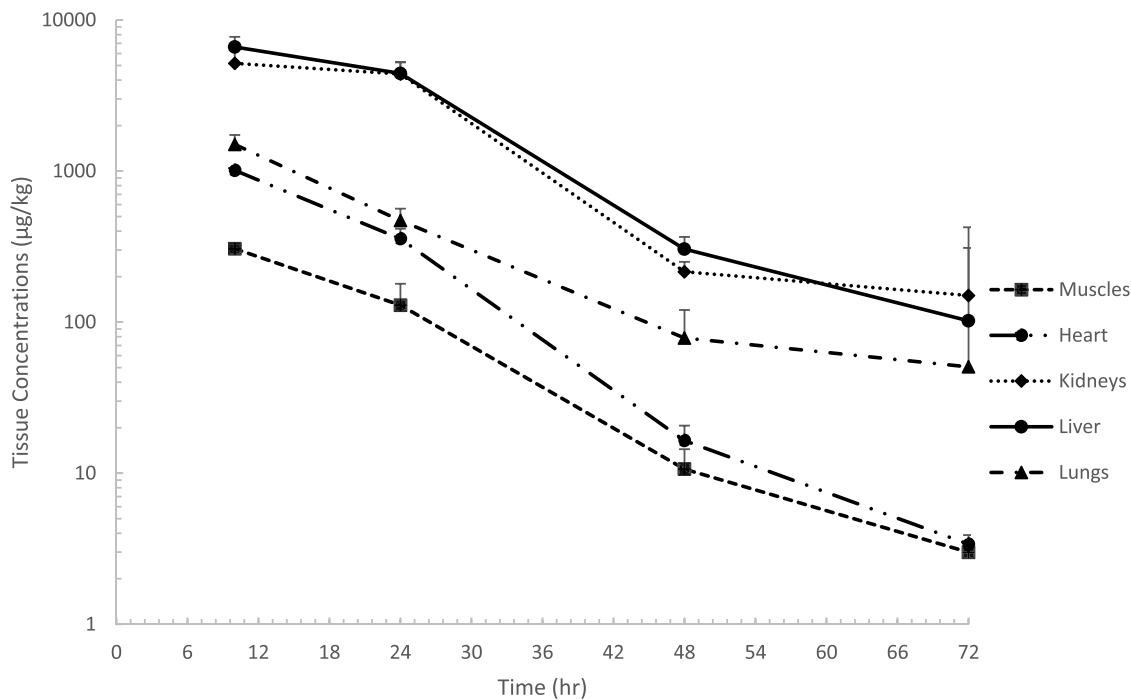
Figure 2 depicts the semi-logarithmic plot of the mean ( $\pm$  SD) tissues' concentrations of Lincomycin over time after day 7 of multiple PO administration.

Lincomycin was detected in all tissues at every sampled time point. The liver and kidneys exhibited the highest drug residue concentrations, substantially exceeding the LLOQ at 72 h. For the given multiple PO administration, the calculated preliminary WT were determined as 1 d for muscles, and 4 d for the kidneys and liver (supplementary material). Assuming a similar conservative MRL for hearts and lungs at 500  $\mu$ g/kg, a WT of 2 d for the heart and 3 d for the lungs should be considered.

### Discussion

Understanding the PK of antimicrobials in geese is crucial for optimising therapeutic strategies. This knowledge helps to increase the efficacy of drug treatments and reduce the risk of antibiotic resistance. Furthermore, it addresses public health concerns by ensuring safe drug residues in edible products, which is vital when data for drugs are scarce in minor species (Fadel et al. 2024). Even though the use of Lincomycin is not recommended in species other than cats, dogs and pigs, due to the risk of fatal enterocolitis in horses, rabbits and rodents, as well as diarrhoea and reduced milk production in cattle, it is safe to use in poultry (USPC 2008). In the present study as well, geese showed no immediate or delayed adverse effects at the employed doses. Indeed, the use of Lincomycin in avian species is widespread, and it is typically administered in drinking water or feed. In the present study, the authors deliberately used oral gavage for precise dosing and reduced variability.

Lincomycin is rapidly but incompletely absorbed orally, with reported bioavailability varying across species (Papich and Riviere 2001). For instance, in pigs, F% ranged between 40% and 75% (Nielsen and Gyrd-Hansen 1998), while in rats, it ranged from 40% to 60% (Hornish et al. 1987). A recent study in chickens found that the bioavailability (F) of Lincomycin was only 3% after oral gavage (Kim et al. 2024). In contrast, the present study observed nearly complete bioavailability in geese, with F averaging 95% after a single oral gavage and 80% after multiple doses. This notable discrepancy suggested that the bioavailability of Lincomycin may be influenced by several factors, including differences in first-pass metabolism, GI physiology and gut transit time, the impact of the microbiome, feeding state (with chickens being fasted in the previous study) and species-specific active drug transporters (Gao et al. 2016; Kim et al. 2024; Ouyang et al. 2022; Sartini et al. 2023). However, the reasons for the substantially higher bioavailability of Lincomycin in geese compared to chickens were intriguing but remain unclear. The physico-chemical properties of Lincomycin, including its lipophilicity and formulation characteristics, contributed to its complete intramuscular F%. Its high lipid solubility at physiological pH (USPC 2008) ensures rapid absorption, as evidenced by the swift mean absorption time of 0.42 h and time to peak



**Figure 2.** Mean tissue concentrations ( $\pm$  SD) in liver, kidney, muscle, lungs and heart of Lincomycin following day 7 of multiple oral administration (5 mg/kg) to geese ( $n = 4$  per time point).

concentration of 0.50 h. Although detailed information on Lincomycin IM administration is limited, the results of the present study aligned with those reported in goats ( $T_{max} = 0.53$  h,  $MAT = 0.24$  h and  $F = 91.72\%$ ; Abo el-Sooud et al. 2004) and cats ( $T_{max} = 0.12$  h,  $MAT = 0.66$  h and  $F = 82.55\%$ ; Albarellos et al. 2011). This route, offers a fast onset of action and complete systemic availability, may be a viable option in acute scenarios.

Regarding the  $V_d$  of Lincomycin, it displayed a relatively high mean value (2727.16 ml/kg) in geese. This was in accordance with a relatively high  $V_d$  as in poultry (2363 ml/kg; Kim et al. 2024), although higher than the 1100 ml/kg in pigs (Nielsen and Gyrd-Hansen 1998), 1150 ml/kg in buffalo calves (Gouri et al. 2014), 1300 ml/kg in cattle (Burrows et al. 1986), 1400 ml/kg in cats (Albarellos et al. 2011) or 1780 ml/kg in goats (Sharma et al. 2019). The increased  $V_d$  in geese compared to mammals can be attributed to several factors related to their unique physiology, including higher fat content, different metabolic and cardiovascular dynamics and potentially varied plasma protein binding (Yu et al. 2020). While serum protein binding was not assessed in the present study, it is generally low to moderate in cats (11.24–17.68%), sheep (30–40%), chickens (23%) and goats (43.7–55.6%) (Abo el-Sooud et al. 2004; Soback et al. 1987; Ziv and Sulman 1973). Moreover, Lincomycin is primarily bound to  $\alpha 1$ -acid glycoprotein (Son et al. 1998) which can significantly increase during bacterial infections and potentially alter drug PK in diseased states (Grégoire et al. 2017).

The Cl mean value for Lincomycin in geese was relatively high, at 451 ml/h/kg, which is somewhat higher compared to other species, being 278 ml/h/kg in laying hens (Kim et al. 2024), 245 ml/h/kg in buffalo calves (Gouri et al. 2014), 310 ml/h/kg in goats (Sharma et al. 2019), 400 ml/h/kg in pigs (Nielsen and Gyrd-Hansen 1998) and 280 ml/h/kg in cats (Albarellos et al. 2011). However, these values need to be interpreted with caution due to the complexity introduced by accounting for cardiac output. The  $E_{body}$  was low at 1%

( $\pm 0.3$ ) in the present study, indicating a minimal ability of clearing organs to actively eliminate Lincomycin (Toutain and Bousquet-Mélou 2004b). In humans, Lincomycin is primarily eliminated *via* biliary excretion, with poorly defined metabolic pathways. The predominant excreted form is unchanged (Ema 1998). In poultry, approximately 80% of excreted Lincomycin is unchanged, with 10% as Lincomycin sulphoxide and 5% as N-dimethyl Lincomycin (Hornish et al. 1987; Papich and Riviere 2001). These findings supported the minimal  $E_{body}$  observed in this study (Toutain and Bousquet-Mélou 2004b).

Regarding the terminal half-life, there were no significant differences between the various routes of administration, except for multiple PO, which was significantly longer. This can be attributed to enzyme inhibition with time, renal excretion saturation, protein-binding alteration, non-linear PK with various doses and/or multiple dosing, outliers and potential analytical errors (Bourdo et al. 2024; Sharma et al. 2016). However, the exceptionally high MAT observed with multiple PO highlights GI concerns rather than systemic ones, and the apparently long  $t_{1/2}$  is due to the ‘flip-flop’ phenomenon rather than slower elimination. This did not occur with single PO. Repeated dosing may saturate absorption sites, slow gastrointestinal motility and alter the gastric environment, while increased GI mucus and changes in transport protein expression due to adaptation may further delay absorption (Vinarov et al. 2021). Furthermore, GI stress from multiple samplings could contribute to the prolonged MAT (Konturek et al. 2011). The  $t_{1/2}$  values observed for geese are consistent with those reported for other species, including cats (3.56 h IV; 3.67 h IM), buffalo calves (3.30 h IV), goats (3.99 h IV), chickens (2.48 h IV; 3.04 h PO) and humans (4 h IV) (Bellamy et al. 1966; Albarellos et al. 2011; Gouri et al. 2014; Kim et al. 2024). The  $V_d$  and Cl values were comparable across species, and their mean values in geese specifically aligned with

those reported for poultry, where Cl values were approximately 278 ml/h/kg and  $V_d$  values are around 2362 ml/kg (Kim et al. 2024).

Figure 2 shows the quantifiable concentrations of Lincomycin in all tissues, persisting up to 72 h. Provisional WT were determined as 1 d for muscle tissues and 4 d for liver and kidneys. In pigs, a dosing regimen of 10 mg/kg Lincomycin for 21 d consecutively results in a WT of only 1 d, due to minimal accumulation and concentrations remaining below the MRL (FAO 2004). In chickens, for the same multiple PO dosing regimen employed in the present study, the WT can be set at 5 d (FAO 2004). The relative similarity in WT values across species suggested comparable Lincomycin tissue behaviour in chickens and geese under the specified dosing conditions. Further research is warranted to determine the withdrawal time following IM dosing of Lincomycin. Considering the consumption of heart and lung tissues in certain regions (Seong et al. 2015), the residue profiles in these less commonly-consumed organs were similar to those in commonly-consumed tissues, but at lower concentrations (Figure 2). This suggested that existing MRL may be used as preliminary thresholds for heart and lung tissues. Furthermore, data on daily intake and dietary exposure indicated low consumption for these organs, which further reduces exposure risks and supports the safety of these preliminary MRL.

Lincomycin acts as a time-dependent bacteriostatic drug. The critical pharmacodynamic/pharmacokinetic (PK/PD) parameter for this type of drug is the duration the drug concentration remains above the  $MIC_{90}$  value (Gouri et al. 2014). It is generally recommended that  $T > MIC$  should be at least 50% of the dosage interval to ensure an optimal bactericidal effect (Toutain and Lees 2004). The  $MIC_{90}$  for some *Mycoplasma* spp. isolated from geese, when treated with Lincomycin, is typically around 8 µg/ml (Gróznier et al. 2016). Experimental data indicated that the Lincomycin all doses administered in the present study and their respective routes of administration were insufficient to maintain  $T > MIC$  above 50% for bacteria with  $MIC_{90} > 8$  µg/ml. From a PK/PD perspective, the administered doses may not have been completely efficacious. This limitation was observed with other strains of target pathogens, such as *Clostridium perfringens*, *M. gallisepticum* and *M. synoviae*, which are increasingly resistant to Lincomycin (Bottinelli et al. 2022; Gróznier et al. 2016; Slavić et al. 2011). Similar findings prompted the need to optimise treatment strategies in poultry as well, leading to the adoption of combining Lincomycin with Spectinomycin (Gróznier et al. 2016). This combination, in particular at a 1:2 ratio, gave significantly lower  $MIC_{90}$  in geese (Gróznier et al. 2016).

## Conclusions

This study underscored the importance of understanding the PK and tissue residues of Lincomycin in geese. Despite the promising bioavailability and safety profile observed with oral and intramuscular administration, its effectiveness may be compromised by insufficient duration above  $MIC_{90}$ . The recent rise in resistance among target pathogens to Lincomycin underscores the need for optimised treatment strategies in geese. Combining Lincomycin with

Spectinomycin, an approach already employed in poultry, should enhance treatment effectiveness. Pharmaceutical companies should consider including specific data for geese in drug prescriptions, based on studies tailored to this species, rather than relying solely on poultry data, to reduce resistance, mitigate public health risks and improve treatment efficacy.

## Acknowledgments

Authors are grateful to Mr. Zbigniew Kołodziej (Majątek Rutka, Puchaczów, Poland) for assistance conducting animal experiment and for supplying animals and facilities.

## Authors' contributions

Krzysztof Bourdo: Methodology, investigation, software, writing of original draft. Charbel Fadel: Supervision, methodology, software, investigation. Mario Giorgi: Project administration, supervision, validation. Małgorzata Gbylik-Sikorska: Methodology, validation, resources. Aneta Matras: Methodology, resources. Amnart Poapolathep: Data curation. Beata Łebkowska-Wieruszewska: Project administration, supervision, methodology, investigation, resources, writing – original draft.

## Disclosure statement

No potential conflict of interest was reported by the author(s).

## Funding

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial or not-for-profit sectors.

## Data availability statement

The data sets used and/or analysed during the current study are available from the corresponding author, upon request.

## References

- ABO EL-SOUD, K., A. GOUDAH, and A. M. ABD EL-ATY. 2004. "Lack of Pharmacokinetic Interaction Between Lincomycin and Aspirin in Healthy Goats." *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics* 27 (5): 389–392. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2885.2004.00611.x>.
- ALBARELLOS, G. A., L. MONTOYA, G. A. DENAMIEL, M. C. VELO, and M. F. LANDONI. 2011. "Pharmacokinetics and Bone Tissue Concentrations of Lincomycin Following Intravenous and Intramuscular Administrations to Cats." *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics* 35 (6): 534–540. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2885.2011.01355.x>.
- Anonymous. 2018. "Guideline on Determination of Withdrawal Periods for Edible Tissues." *European Medicines Agency*, London, UK. Accessed November 20, 2024. [https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-determination-withdrawal-periods-edible-tissues-revision-1\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-determination-withdrawal-periods-edible-tissues-revision-1_en.pdf).
- BELLAMY, H. M., JR, B. B. BATES, and J. A. REINARZ. 1966. "Lincomycin Metabolism in Patients with Hepatic Insufficiency: Effect of Liver Disease on Lincomycin Serum Concentrations." *Antimicrobial Agents & Chemotherapy* 6:36–41.
- BOTTINELLI, M., M. GASTALDELLI, M. PICCHI, A. DALL'ORA, L. CRISTOVAO BORGES, A. S. RAMÍREZ, A. MATUCCI, and S. CATANIA. 2022. "The Monitoring of *Mycoplasma Gallisepticum* Minimum Inhibitory Concentrations During the Last Decade (2010–2020) Seems to Reveal a Comeback of Susceptibility to Macrolides, tiamulin, and Lincomycin." *Antibiotics (Basel, Switzerland)* 11 (8): 1021. <https://doi.org/10.3390/antibiotics11081021>.

- BOURDO, K., C. FADEL, M. GIORGI, A. ŠITOVŠ, A. POAPOLATHEP, and B. ŁEBKOWSKA-WIERUSZEWSKA. 2024. "Disposition Kinetics and Tissue Residues of Tilmicosin Following Intravenous, Subcutaneous, Single and Multiple Oral Dosing in Geese (anser Anser Domesticus)." *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics* 47 (5): 416–426. <https://doi.org/10.1111/jvp.13461>.
- BURROWS, G. E., P. B. BARTO, and B. R. WEEKS. 1986. "Chloramphenicol, Lincomycin and Oxytetracycline Disposition in Calves with Experimental Pneumonic Pasteurellosis." *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics* 9 (2): 213–222. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2885.1986.tb00032.x>.
- Cac, Codex Alimentarius Commission. 2015. "Maximum Residue Limits (MRLs) and Risk Management Recommendations (RMRs) for Residues of Veterinary Drugs in Foods (CAC/MRL 2-2015)." *Updated as at the 38th Session of the Codex Alimentarius Commission (July 2015)*, Food and Agriculture Organization of the United Nations. [https://www.fao.org/fileadmin/user\\_upload/vet\\_drug/docs/41-13-Lincomycin.pdf](https://www.fao.org/fileadmin/user_upload/vet_drug/docs/41-13-Lincomycin.pdf).
- COLLIGNON, P., P. COURVALIN, and A. AIDARA-KANE. 2008. "Clinical Importance of Antimicrobial Drugs in Human Health." *Guide to Antimicrobial Use in Animals*: 44–58. <https://doi.org/10.1002/9781444302639.ch4>.
- EMA, E. M. A. 1998. Lincomycin: Summary Report (EMA/MRL/497/98-FINAL-Corr 1). Accessed November 20, 2024. <https://www.ema.europa.eu/en/documents/mrl-report/Lincomycin-summary-report-1-committee-veterinary-medicinal-productsen.pdf>.
- FADEL, C., B. ŁEBKOWSKA-WIERUSZEWSKA, K. BOURDO, A. POAPOLATHEP, G. HASSOUN, and M. GIORGI. 2024. "Metronidazole Pharmacokinetics in Geese (anser Anser Domesticus) After Intravenous and Oral Administrations." *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics* 47 (3): 208–214. <https://doi.org/10.1111/jvp.13421>.
- FAO, Expert Committee on Food Additives. 2004. "Residues of Some Veterinary Drugs in Animals and Foods: FAO Food and Nutrition Paper." Accessed November 20, 2024. [https://www.fao.org/fileadmin/user\\_upload/vetdrug/docs/41-13-Lincomycin.pdf](https://www.fao.org/fileadmin/user_upload/vetdrug/docs/41-13-Lincomycin.pdf).
- GAO, G., X. ZHAO, Q. LI, C. HE, W. ZHAO, S. LIU, J. DING, et al. 2016. "Genome and Metagenome Analyses Reveal Adaptive Evolution of the Host and Interaction with the Gut Microbiota in the Goose." *Scientific Reports* 6 (1): 32961. <https://doi.org/10.1038/srep32961>.
- GIGUERE, S. 2013. "Lincosamides, Pleuromutilins, and Streptogramins." In *Antimicrobial Therapy in Veterinary Medicine*, edited by S. Giguere, J. F. Prescott and P. M. Dowling, 199–210. 5th ed. Ames, USA: John Wiley. <https://doi.org/10.1002/9781118675014>.
- GOURI, S. S., D. VENKATACHALAM, and V. K. DUMKA. 2014. "Pharmacokinetics of Lincomycin Following Single Intravenous Administration in Buffalo Calves." *Tropical Animal Health and Production* 46 (6): 1099–1102. <https://doi.org/10.1007/s11250-014-0595-4>.
- GRÉGOIRE, N., V. ARANZANA-CLIMENT, S. MAGRÉAULT, S. MARCHAND, and W. COUET. 2017. "Clinical Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Colistin." *Clinical Pharmacokinetics* 56 (12): 1441–1460. <https://doi.org/10.1007/s40262-017-0561-1>.
- GRÓZNER, D., Z. KREIZINGER, K. M. SULYOK, Z. RÓNAL, V. HRIVNÁK, I. TURCSÁNYI, S. JÁNOSI, and M. GYURANECZ. 2016. "Antibiotic Susceptibility Profiles of Mycoplasma sp. 1220 Strains Isolated from Geese in Hungary." *BMC Veterinary Research* 12 (1): 170. <https://doi.org/10.1186/s12917-016-0799-0>.
- GUO, Y., X. XIE, Z. DIAO, Y. WANG, B. WANG, K. XIE, X. WANG, and P. ZHANG. 2021. "Detection and Determination of Spectinomycin and Lincomycin in Poultry Muscles and Pork by ase-SPE-Gc-ms/lms." *Journal of Food Composition and Analysis* 101:103979. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2021.103979>.
- HORNISH, R. E., R. E. GOSLINE, and J. M. NAPIER. 1987. "Comparative Metabolism of Lincomycin in the Swine Chicken, and Cat." *Drug Metabolism Reviews* 18 (2–3): 177–214. <https://doi.org/10.3109/03602538708998305>.
- JULIOUS, S. A., and C. A. M. DEBARNOT. 2000. "Why are Pharmacokinetic Data Summarized by Arithmetic Means?" *Journal of Biopharmaceutical Statistics* 10 (1): 55–71. <https://doi.org/10.1081/BIP-100101013>.
- KIM, J. H., J. W. KO, J. W. KIM, J. S. JEONG, C. Y. KIM, I. S. SHIN, and T. W. KIM. 2024. "Oral Bioavailability and Egg Drug Residue of Lincomycin in Laying Hens After Different Treatment." *Poultry Science* 103 (1): 103147. <https://doi.org/10.1016/j.psj.2023.103147>.
- KONTUREK, P. C., T. BRZOWSKI, and S. J. KONTUREK. 2011. "Stress and the Gut: Pathophysiology, Clinical Consequences, Diagnostic Approach and Treatment Options." *Journal of Physiology and Pharmacology: An Official Journal of the Polish Physiological Society* 62 (6): 591–599.
- MATEUSON, B., D. MAES, M. VAN GOUBERGEN, M. VERDONCK, and A. DE KRUIF. 2002. "Effectiveness of Treatment with Lincomycin Hydrochloride And/Or Vaccination Against Mycoplasma Hypopneumoniae for Controlling Chronic Respiratory Disease in a Herd of Pigs." *The Veterinary Record* 151 (5): 135–140. <https://doi.org/10.1136/vr.151.5.135>.
- NIELSEN, P., and N. GYRD-HANSEN. 1998. "Bioavailability of Spiramycin and Lincomycin After Oral Administration to Fed and Fasted Pigs." *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics* 21 (4): 251–256. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2885.1998.00131.x>.
- OUYANG, Q., S. HU, B. TANG, B. HU, J. HU, H. HE, L. LI, and J. WANG. 2022. "Comparative Transcriptome Analysis Provides Novel Insights into the Effect of Lipid Metabolism on Laying of Geese." *Animals* 12 (14): 1775. <https://doi.org/10.3390/ani12141775>.
- PAPICH, M. G., and J. E. RIVIERE. 2001. "Chloramphenicol and Derivatives, Macrolides, Lincosamides and Miscellaneous Antimicrobials." In *Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, edited by H. R. Adams, 868–897. Ames, IA: Iowa State University Press.
- PLENDERLEITH, R. W. 1988. "Treatment of Cattle, Sheep and Horses with Lincomycin: Case Studies." *The Veterinary Record* 122 (5): 112–113. <https://doi.org/10.1136/vr.122.5.112>.
- RIVIERE, J. E., and M. G. PAPICH. 2009. *Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 9th Edition Hoboken: Wiley-Blackwell.
- SARTINI, I., C. VERCELLI, B. ŁEBKOWSKA-WIERUSZEWSKA, A. LISOWSKI, C. FADEL, A. POAPOLATHEP, F. DESSI, and M. GIORGI. 2023. "Pharmacokinetics and Antibacterial Activity of Tiamulin After Single and Multiple Oral Administrations in Geese." *Veterinary and Animal Science* 22:100317. <https://doi.org/10.1016/j.vas.2023.100317>.
- SEONG, P. N., S. H. CHO, K. M. PARK, G. H. KANG, B. Y. PARK, S. S. MOON, and H. V. BA. 2015. "Characterization of Chicken by-Products by Mean of Proximate and Nutritional Compositions." *Korean Journal for Food Science of Animal Resources* 35 (2): 179–188. <https://doi.org/10.5851/kosfa.2015.35.2.179>.
- SHAMAKH, M. H., H. AZOZ, and T. ATTIA. 2022. "Kinetic Disposition of Lincomycin After Oral Administration in Broiler Chickens." *Journal of Current Veterinary Research* 4 (1): 13–17. <https://doi.org/10.21608/jcvr.2022.239549>.
- SHARMA, M., V. K. DUMKA, S. SINGLA, R. KAUR, and R. K. SINGH. 2019. "Disposition Kinetics of Lincomycin Following Intravenous Administration in Hypothyroid Goats." *Indian Journal of Animal Research* 53 (12): 1675–1678. <https://doi.org/10.18805/ijar.B-3717>.
- SHARMA, M., R. SHARMA, and D. K. JAIN. 2016. "Nanotechnology Based Approaches for Enhancing Oral Bioavailability of Poorly Water Soluble Antihypertensive Drugs." *Scientifica* 2016:1–11. <https://doi.org/10.1155/2016/8525679>.
- SLAVIĆ, D., P. BOERLIN, M. FABRI, K. C. KLOTINS, J. K. ZOETHOUT, P. E. WEIR, and D. BATEMAN. 2011. "Antimicrobial Susceptibility of Clostridium Perfringens Isolates of Bovine, Chicken, Porcine, and Turkey Origin from Ontario." *Canadian Journal of Veterinary Research = Revue Canadienne de Recherche Veterinaire* 75 (2): 89–97.
- SOBACK, S., G. ZIV, E. BOGIN, Z. COHEN, and Y. EARON. 1987. "Pharmacokinetic Changes of Several Antibiotics in Chickens During Induced Fatty Liver." *Research in Veterinary Science* 43 (1): 49–54. [https://doi.org/10.1016/S0034-5288\(18\)30740-9](https://doi.org/10.1016/S0034-5288(18)30740-9).
- SON, D. S., M. OSABE, M. SHIMODA, and E. KOKUE. 1998. "Contribution of Alpha 1-Acid Glycoprotein to Species Difference in Lincosamides-Plasma Protein Binding Kinetics." *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics* 21 (1): 34–40. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2885.1998.00111.x>.
- SPÍZEK, J., and T. ŘEZANKA. 2017. "Lincosamides: Chemical Structure, biosynthesis, Mechanism of action, Resistance, and Applications." *Biochemical Pharmacology* 133:20–28. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2016.12.001>.
- TOUTAIN, P. L., and A. BOUSQUET-MÉLOU. 2004a. "Plasma Terminal half-Life." *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics* 27 (6): 427–439. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2885.2004.00600.x>.
- TOUTAIN, P. L., and A. BOUSQUET-MÉLOU. 2004b. "Plasma Clearance." *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics* 27 (6): 415–425. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2885.2004.00605.x>.

- TOUTAIN, P. L., and P. LEES. 2004. "Integration and Modelling of Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Data to Optimize Dosage Regimens in Veterinary Medicine." *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics* 27 (6): 467–477. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2885.2004.00613.x>.
- USPC. 2008. "United States Pharmacopeial convention, Lincosamides (veterinary—Systemic)." *Clindamycin; Lincomycin*. Accessed November 20, 2024. <https://cdn.ymaws.com/www.aavpt.org/resource/resmgr/imported/lincosamides.pdf>.
- VINAROV, Z., M. ABDALLAH, J. A. G. AGUNDEZ, K. ALLEGAERT, A. W. BASIT, M. BRAECKMANS, J. CEULEMANS, et al. 2021. "Impact of Gastrointestinal Tract Variability on Oral Drug Absorption and Pharmacokinetics: An UNGAP Review." *European Journal of Pharmaceutical Sciences: Official Journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences* 162:105812. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2021.105812>.
- WAXMAN, K. T., F. BOWLER, S. G. FORNERIS, S. KARDONG-EDGREN, and M. A. RIZZOLO. 2019. "Simulation as a Nursing Education Disrupter." *Nursing Administration Quarterly* 43 (4): 300–305. <https://doi.org/10.1097/naq.0000000000000369>.
- WENZL, T., J. HAEDRICH, A. SCHAECHTELE, R. PIOTR, J. STROKA, G. EPPE, and G. SCHOLL. 2016. "Guidance Document on the Estimation of LOD and LOQ for Measurements in the Field of Contaminants in Food and Feed." *Publications Office of the European Union*. <https://doi.org/10.2787/8931>.
- YU, J., H. M. YANG, Y. Y. LAI, X. L. WAN, and Z. Y. WANG. 2020. "The Body Fat Distribution and Fatty Acid Composition of Muscles and Adipose Tissues in Geese." *Poultry Science* 99 (9): 4634–4641. <https://doi.org/10.1016/j.psj.2020.05.052>.
- ZIV, G., and F. G. SULMAN. 1973. "Penetration of Lincomycin and Clindamycin into Milk in ewes." *the*. *British Veterinary Journal* 129 (1): 83–91. [https://doi.org/10.1016/s0007-1935\(17\)36593-4](https://doi.org/10.1016/s0007-1935(17)36593-4).

## **XII. OŚWIADCZENIA**

**Załącznik nr 7 – Oświadczenie o współautorstwie**

*Lublin, 28.04.2016.*  
Miejsce, data

Lek. wet. Krzysztof Bourdo

Katedra Farmakologii, Toksykologii i Ochrony Środowiska

WYDZIAŁ MEDYCyny WETERYNARYJNEJ

Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie

ul. Akademicka 12 20-033 LUBLIN

tel: 509105187

email: krzysztof.bourdo@gmail.com

**Rada Dyscypliny Weterynaria**

**Uniwersytetu Przyrodniczego**

**w Lublinie**

**Oświadczenie o współautorstwie**

Niniejszym oświadczam, że w pracy Bourdo K., Fadel C., Giorgi M., Šitovs A., Poapolathep A., Łebkowska-Wieruszewska B. Disposition kinetics and tissue residues of tilmicosin following intravenous, subcutaneous, single and multiple oral dosing in geese (*Anser anser domesticus*). *J Vet Pharmacol Ther.* 2024 Sep;47(5):416-426. doi: 10.1111/jvp.13461 mój udział (80%) polegał na opracowaniu koncepcji badania, przeprowadzeniu wszystkich etapów doświadczenia w tym opracowaniu metodologii oraz przeprowadzeniu analiz farmakokinetycznych i statystycznych a także redagowaniu manuskryptu w tym zatwierdzeniu wersji ostatecznej.

  
Podpis

Załącznik nr 7 – Oświadczenie o współautorstwie

Zahlé, Lebanon

Place, date

26-03-2026

Fadel Charbel

Corresponding address MLFAV, Lebanese University, Faculty of Agriculture,  
Beirut, Lebanon

Nr Phone +961 81 301 345

E-mail Charbel.fadel@gmail.com  
C.fadel@studenti.uniss.it

Scientific Council for Veterinary  
University of Life Sciences in  
Lublin

Declaration of co-authorship

I hereby declare that I am aware that the work: Bourdo K, Fadel C, Giorgi M, Šitovs A, Poapolathep A, Łebkowska-Wieruszewska B. Disposition kinetics and tissue residues of tilmicosin following intravenous, subcutaneous, single and multiple oral dosing in geese (*Anser anser domesticus*). *J Vet Pharmacol Ther.* 2024 Sep;47(5):416-426. doi: 10.1111/jvp.13461 of which I am a co-author, has been included in the doctoral thesis of Krzysztof Bourdo.

I contributed in 5% to carry out the experiment; discussion the results, contribution to the manuscript, and approving the final version.



Signature

## Załącznik nr 7 – Oświadczenie o współautorstwie

Pisa 10/03/2026

Mario Giorgi, ChemD certPharmacol PhD (hon)

Dept of Veterinary Science (clinical venue)

University of Pisa

Via Livornese (lato monte) nnc

56122 San Piero a Grado, Pisa, Italy

Phone 0039502210154

E-mail mario.giorgi@unipi.it

**Scientific Council for Veterinary**

**University of Life Sciences in**

**Lublin**

### Declaration of co-authorship

I hereby declare that I am aware that the work: Bourdo K, Fadel C, Giorgi M, Šitovs A, Poapolathep A, Łebkowska-Wieruszewska B. Disposition kinetics and tissue residues of tilmicosin following intravenous, subcutaneous, single and multiple oral dosing in geese (*Anser anser domesticus*). J Vet Pharmacol Ther. 2024 Sep;47(5):416-426. doi: 10.1111/jvp.13461 of which I am a co-author, has been included in the doctoral thesis of Krzysztof Bourdo.

I contributed in 4% to supervision the study; discussion the results, contribution to the manuscript, and approving the final version.



Signature and stamp of the representative of the host unit

**Załącznik nr 7 – Oświadczenie o współautorstwie**

Rīga, 11.3.2026.

**Andrejs Šitovs (PhD)**

Department of Pharmacology and Pharmacotherapy

Rīga Stradiņš University

Dzirčiema iela 16, Kurzemes rajons, Rīga,

LV-1007, Latvia

+371 25986415

E-mail: Andrejs.Sitovs@rsu.lv

**Scientific Council for Veterinary  
University of Life Sciences in  
Lublin**

**Declaration of co-authorship**

I hereby declare that I am aware that the work: Bourdo K, Fadel C, Giorgi M, Šitovs A, Poapolathep A, Łebkowska-Wieruszewska B. Disposition kinetics and tissue residues of tilmicosin following intravenous, subcutaneous, single and multiple oral dosing in geese (*Anser anser domesticus*). *J Vet Pharmacol Ther.* 2024 Sep;47(5):416-426. doi: 10.1111/jvp.13461 of which I am a co-author, has been included in the doctoral thesis of Krzysztof Bourdo.

I contributed in 3% to carry out the experiment; discussion the results, contribution to the manuscript, and approving the final version

✓  
Andrejs Šitovs

A. Šitovs

11.03.2026.

**Załącznik nr 7 – Oświadczenie o współautorstwie**

11.03.2026  
Bangkok, Thailand

Prof. Amnart Poapolathep (D.V.M., Ph.D.)  
Department of Pharmacology,  
Faculty of Veterinary Medicine,  
Kasetsart University,  
Bangkok 10900, Thailand  
E-mail [fvetamp@hotmail.com](mailto:fvetamp@hotmail.com), [fvetamp@ku.ac.th](mailto:fvetamp@ku.ac.th)

**Scientific Council for Veterinary  
University of Life Sciences in  
Lublin**

**Declaration of co-authorship**

I hereby declare that I am aware that the work: Bourdo K, Fadel C, Giorgi M, Šitovs A, Poapolathep A, Łebkowska-Wieruszewska B. Disposition kinetics and tissue residues of tilmicosin following intravenous, subcutaneous, single and multiple oral dosing in geese (*Anser anser domesticus*). *J Vet Pharmacol Ther.* 2024 Sep;47(5):416-426. doi: 10.1111/jvp.13461 of which I am a co-author, has been included in the doctoral thesis of Krzysztof Bourdo.

I contributed in 2% to supervision the study, discussion the results, contribution to the manuscript, and approving the final version.

  
(Prof.Dr.Amnart Poapolathep)



**Załącznik nr 7 – Oświadczenie o współautorstwie**

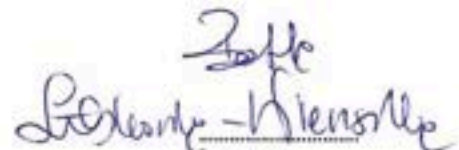
Lublin, 15.04.2026  
Miejsce, data

Dr hab. Łebkowska-Wieruszewska Beata, prof. uczelni  
Katedra Farmakologii, Toksykologii i Ochrony Środowiska  
WYDZIAŁ MEDYCYNY WETERYNARYJNEJ  
Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie  
ul. Akademicka 12 20-033 LUBLIN  
tel: 81 445 60 56 tel. kom: 509 915 541  
email: [lebkowska.wieruszewska@up.lublin.pl](mailto:lebkowska.wieruszewska@up.lublin.pl)

**Rada Dyscypliny Weterynaria  
Uniwersytetu Przyrodniczego  
w Lublinie**

**Oświadczenie o współautorstwie**

Niniejszym oświadczam, że w pracy Bourdo K., Fadel C., Giorgi M., Šitovs A., Poapolathep A., Łebkowska-Wieruszewska B. Disposition kinetics and tissue residues of tilmicosin following intravenous, subcutaneous, single and multiple oral dosing in geese (*Anser anser domesticus*). J Vet Pharmacol Ther. 2024 Sep;47(5):416-426. doi: 10.1111/jvp.13461 mój udział (6%) polegał na opracowaniu koncepcji badań, nadzorowaniu pracy, uczestnictwie we wszystkich etapach doświadczenia, przedyskutowaniu wyników oraz redagowaniu manuskryptu w tym zatwierdzeniu wersji ostatecznej.



Podpis

**Załącznik nr 7 – Oświadczenie o współautorstwie**

*Lublin, 28.04.2024.* -  
Miejsce, data

Lek. wet. Krzysztof Bourdo

Katedra Farmakologii, Toksykologii i Ochrony Środowiska

WYDZIAŁ MEDYCINY WETERYNARYJNEJ

Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie

ul. Akademicka 12 20-033 LUBLIN

tel: 509105187

email: [krzysztof.bourdo@gmail.com](mailto:krzysztof.bourdo@gmail.com)

**Rada Dyscypliny Weterynaria**

**Uniwersytetu Przyrodniczego**

**w Lublinie**

**Oświadczenie o współautorstwie**

Niniejszym oświadczam, że w pracy Bourdo K, Fadel C, Giorgi M, Gajda A, Bilecka M, Poapolathep A, Łebkowska-Wieruszewska B. Pharmacokinetics and tissue residues of colistin following intravenous, and single and repeated oral dosing in domestic geese (*Anser anser domesticus*). Vet J. 2024 Dec;308:106245. doi: 10.1016/j.tvjl.2024.106245 mój udział (80%) polegał na opracowaniu koncepcji badania, opracowaniu metodologii analiz, przeprowadzeniu wszystkich etapów doświadczenia, przeprowadzeniu analiz farmakokinetycznych i statystycznych oraz redagowaniu manuskryptu w tym zatwierdzeniu wersji ostatecznej.

  
Podpis

Załącznik nr 7 – Oświadczenie o współautorstwie

Zahlé, Lebanon

Place, date

26-03-2026

Fadel Charbel (DVM, PhD)

Corresponding address Nr

Phone

E-mail

ULFAV, Lebanese University, Faculty of Agriculture,  
Beirut, Lebanon

+961 81 301 365

Charbel.fadel@gmail.com

C.fadel@studenti.unlps.it

Scientific Council for Veterinary

University of Life Sciences in

Lublin

**Declaration of co-authorship**

I hereby declare that I am aware that the work: Bourdo K, Fadel C, Giorgi M, Gajda A, Bilecka M, Poapolathep A, Łebkowska-Wieruszewska B. Pharmacokinetics and tissue residues of colistin following intravenous, and single and repeated oral dosing in domestic geese (*Anser anser domesticus*). Vet J. 2024 Dec;308:106245. doi: 10.1016/j.tvjl.2024.106245. of which I am a co-author, has been included in the doctoral thesis of Krzysztof Bourdo.

I contributed in 4% to conceptualization, methodology, software, investigation, helping in formal analysis, help in writing the first draft and approving the final version of the manuscript.



## Załącznik nr 7 – Oświadczenie o współautorstwie

Pisa 10/03/2026

Mario Giorgi, ChemD certPharmacol PhD (hon)

Dept of Veterinary Science (clinical venue)

University of Pisa

Via Livornese (lato monte) nnc

56122 San Piero a Grado, Pisa, Italy

Phone 0039502210154

E-mail mario.giorgi@unipi.it

**Scientific Council for Veterinary**

**University of Life Sciences in**

**Lublin**

### Declaration of co-authorship

I hereby declare that I am aware that the work: Bourdo K, Fadel C, Giorgi M, Gajda A, Bilecka M, Poapolathep A, Łebkowska-Wieruszewska B. Pharmacokinetics and tissue residues of colistin following intravenous, and single and repeated oral dosing in domestic geese (*Anser anser domesticus*). Vet J. 2024 Dec;308:106245. doi: 10.1016/j.tvjl.2024.106245 of which I am a co-author, has been included in the doctoral thesis of Krzysztof Bourdo.

I contributed in 3% to conceptualization, supervision, validation, reviewing and approving the final version of the manuscript.



Signature and stamp of the representative of the host unit

**Załącznik nr 7 – Oświadczenie o współautorstwie**

*Puławy, 11.03.2026*  
Miejsce, data

Dr hab. Anna Gajda, prof. instytutu  
Dział Badań Chemicznych Żywności i Pasz  
Państwowy Instytut Weterynaryjny - Państwowy Instytut Badawczy  
Al. Partyzantów 57, 24 - 100 Puławy  
tel.: 81 889 3240  
Email: anna.gajda@piwet.pulawy.pl

**Rada Dyscypliny Weterynaria  
Uniwersytetu Przyrodniczego  
w Lublinie**

**Oświadczenie o współautorstwie**

Niniejszym oświadczam, że w pracy Bourdo K, Fadel C, Giorgi M, Gajda A, Bilecka M, Poapolathep A, Łebkowska-Wieruszewska B. Pharmacokinetics and tissue residues of colistin following intravenous, and single and repeated oral dosing in domestic geese (*Anser anser domesticus*) Vet J. 2024 Dec;308:106245. doi: 10.1016/j.tvjl.2024.106245 mój udział (3%) polegał na pomocy w opracowaniu metodologii i procesie walidacji metody LC-MS/MS oraz zapewnieniu warsztatu badawczego.

*Anna Gajda*  
Podpis

**Załącznik nr 7 – Oświadczenie o współautorstwie**

Puławy, 2026.03.11

Miejsce, data

Mgr inż. Magdalena Bilecka

Dział Badań Chemicznych Żywności i Pasz

Państwowy Instytut Weterynaryjny- Państwowy Instytut Badawczy

Al. Partyzantów 57, 24-100 Puławy

tel.: 81 889 3166

Email: magdalena.bilecka@piwet.pulawy.pl

**Oświadczenie o współautorstwie**

Niniejszym oświadczam, że w pracy Bourdo K, Fadel C, Giorgi M, Gajda A, Bilecka M, Poapolathep A, Łebkowska-Wieruszewska B. Pharmacokinetics and tissue residues of colistin following intravenous, and single and repeated oral dosing in domestic geese (*Anser anser domesticus*). Vet J. 2024 Dec;308:106245. doi: 10.1016/j.tvjl.2024.106245. mój udział (3%) polegał na pomocy w opracowaniu metodologii analiz LC-MS/MS oraz zapewnieniu warsztatu badawczego.



Podpis

Załącznik nr 7 – Oświadczenie o współautorstwie

11.03.2026  
Bangkok, Thailand

Prof. Amnart Poapolathep (D.V.M., Ph.D.)  
Department of Pharmacology,  
Faculty of Veterinary Medicine,  
Kasetsart University,  
Bangkok 10900, Thailand  
E-mail [fvetamp@hotmail.com](mailto:fvetamp@hotmail.com), [fvetamp@ku.ac.th](mailto:fvetamp@ku.ac.th)

**Scientific Council for Veterinary  
University of Life Sciences in  
Lublin**

**Declaration of co-authorship**

I hereby declare that I am aware that the work: Bourdo K, Fadel C, Giorgi M, Gajda A, Bilecka M, Poapolathep A, Łebkowska-Wieruszewska B. Pharmacokinetics and tissue residues of colistin following intravenous, and single and repeated oral dosing in domestic geese (*Anser anser domesticus*). Vet J. 2024 Dec;308:106245. doi: 10.1016/j.tvjl.2024.106245. of which I am a co-author, has been included in the doctoral thesis of Krzysztof Bourdo.

I contributed in 2% to data curation, reviewing and approving the final version of the manuscript.

  
(Prof.Dr.Amnart Poapolathep)

Załącznik nr 7 – Oświadczenie o współautorstwie

Lublin, 15.06.2026r.

Miejsce, data

Dr hab. Łebkowska-Wieruszewska Beata, prof. uczelni  
Katedra Farmakologii, Toksykologii i Ochrony Środowiska  
WYDZIAŁ MEDYCYN Y WETERYNARYJNEJ  
Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie  
ul. Akademicka 12 20-033 LUBLIN  
tel: 81 445 60 56 tel. kom: 509 915 541  
email: lebkowska.wieruszewska@up.lublin.pl

Rada Dyscypliny Weterynaria  
Uniwersytetu Przyrodniczego  
w Lublinie

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy Bourdo K, Fadel C, Giorgi M, Gajda A, Bilecka M, Poapolathep A, Łebkowska-Wieruszewska B. Pharmacokinetics and tissue residues of colistin following intravenous, and single and repeated oral dosing in domestic geese (*Anser anser domesticus*). Vet J. 2024 Dec;308:106245. doi: 10.1016/j.tvjl.2024.106245 mój udział (5%) polegał na pomocy w opracowaniu koncepcji badań, nadzorowaniu pracy, pomocy w opracowaniu metodologii analiz, zapewnieniu warsztatu badawczego oraz redagowaniu manuskryptu w tym zatwierdzeniu wersji ostatecznej.



Podpis

## Załącznik nr 7 – Oświadczenie o współautorstwie


*Lublin, 28.01.2026.*  
Miejsce, data

Lek.wet. Bourdo Krzysztof  
Katedra Farmakologii, Toksykologii i Ochrony Środowiska  
WYDZIAŁ MEDYCYNY WETERYNARYJNEJ  
Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie  
ul. Akademicka 12 20-033 LUBLIN  
tel: 509105187  
email: krzysztof.bourdo@gmail.com

Rada Dyscypliny Weterynaria  
Uniwersytetu Przyrodniczego  
w Lublinie

### Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy Disposition kinetics and tissue residues of Lincomycin following intravenous, intramuscular and single and multiple oral dosing in domestic geese (*Anser anser domesticus*). Bourdo Krzysztof, Fadel Charbel, Giorgi Mario, Gbylik-Sikorska Małgorzata, Matras Anna, Poapolathep Amnart, Łebkowska-Wieruszewska Beata. Br. Poult. Sci. 2026, Feb. Vol. 67 Iss. 1 s. 9-17, DOI: 10.1080/00071668.2025.2524711 mój udział (80%) polegał na opracowaniu koncepcji badania, opracowaniu metodologii analiz, przeprowadzeniu wszystkich etapów doświadczenia, przeprowadzeniu analiz farmakokinetycznych i statystycznych, sformułowaniu wniosków oraz redagowaniu manuskryptu w tym zatwierdzeniu wersji ostatecznej.

  
Podpis

25-04-2026

Place, date

Fadel Charbel

Corresponding address

ULFAV, Lebanese University, Faculty of Agriculture,  
Beirut, Lebanon

Nr Phone +961 81 301 345

E-mail charbell.fadel@gmail.com

C. fadel@studenci.uniss.it

Scientific Council for Veterinary  
University of Life Sciences in  
Lublin

#### Declaration of co-authorship

I hereby declare that I am aware that the work: Disposition kinetics and tissue residues of Lincomycin following intravenous, intramuscular and single and multiple oral dosing in domestic geese (*Anser anser domesticus*). Bourdo Krzysztof, Fadel Charbel, Giorgi Mario, Gbylik-Sikorska Małgorzata, Matras Anna, Poapolathep Amnart, Łebkowska-Wieruszewska Beata. Br. Poult. Sci. 2026, Feb. Vol. 67 Iss. 1 s. 9-17, DOI: 10.1080/00071668.2025.2524711 of which I am a co-author, has been included in the doctoral thesis of Krzysztof Bourdo.

I contributed in 4% to supervision, methodology, software, investigation and approving the final version of the manuscript.



Signature

**Załącznik nr 7 – Oświadczenie o współautorstwie**

Pisa 10/03/2026

Mario Giorgi, ChemD certPharmacol PhD (hon)

Dept of Veterinary Science (clinical venue)

University of Pisa

Via Livornese (lato monte) nnc

56122 San Piero a Grado, Pisa, Italy

Phone 0039502210154

E-mail mario.giorgi@unipi.it

**Scientific Council for Veterinary  
University of Life Sciences in  
Lublin**

**Declaration of co-authorship**

I hereby declare that I am aware that the work: Disposition kinetics and tissue residues of Lincomycin following intravenous, intramuscular and single and multiple oral dosing in domestic geese (*Anser anser domesticus*). Bourdo Krzysztof, Fadel Charbel, Giorgi Mario, Gbylik-Sikorska Małgorzata, Matras Anna, Poapolathep Amnart, Łebkowska-Wieruszewska Beata. Br. Poult. Sci. 2026, Feb. Vol. 67 Iss. 1 s. 9-17, DOI: 10.1080/00071668.2025.2524711 of which I am a co-author, has been included in the doctoral thesis of Krzysztof Bourdo.

I contributed in 3% to project administration, supervision, validation and approving the final version of the manuscript.



Signature and stamp of the representative of the host unit

## Załącznik nr 7 – Oświadczenie o współautorstwie

Puławy, 12.03.2026.

dr hab. inż. Małgorzata Gbylik-Sikorska, prof. instytutu

Dział Badań Chemicznych Żywności i Pasz  
Państwowy Instytut Weterynaryjny - Państwowy Instytut Badawczy  
Al. Partyzantów 57, 24 - 100 Puławy  
email: malgorzata.gbylik@piwet.pulawy.pl

**Rada Dyscypliny Weterynaria  
Uniwersytetu Przyrodniczego  
w Lublinie**

### Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy Disposition kinetics and tissue residues of Lincomycin following intravenous, intramuscular and single and multiple oral dosing in domestic geese (*Anser anser domesticus*). Bourdo Krzysztof, Fadel Charbel, Giorgi Mario, Gbylik-Sikorska Małgorzata, Matras Anna, Poapolathep Amnart, Łebkowska-Wieruszewska Beata. Br. Poult. Sci. 2026, Feb. Vol. 67 Iss. 1 s. 9-17, DOI: 10.1080/00071668.2025.2524711 mój udział (3%) polegał na pomocy w opracowaniu metodologii analiz i walidacji metody HPLC, zapewnieniu warsztatu badawczego oraz zaakceptowaniu wersji ostatecznej manuskryptu.



Podpis

## Załącznik nr 7 – Oświadczenie o współautorstwie

Puławy, 12.03.2026.

dr hab. inż. Małgorzata Gbylik-Sikorska, prof. instytutu

Dział Badań Chemicznych Żywności i Pasz  
Państwowy Instytut Weterynaryjny - Państwowy Instytut Badawczy  
Al. Partyzantów 57, 24 - 100 Puławy  
email: malgorzata.gbylik@piwet.pulawy.pl

**Rada Dyscypliny Weterynaria**

**Uniwersytetu Przyrodniczego**

**w Lublinie**

### Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy Disposition kinetics and tissue residues of Lincomycin following intravenous, intramuscular and single and multiple oral dosing in domestic geese (*Anser anser domesticus*). Bourdo Krzysztof, Fadel Charbel, Giorgi Mario, Gbylik-Sikorska Małgorzata, Matras Aneta, Poapolathep Amnart, Łebkowska-Wieruszewska Beata. Br. Poult. Sci. 2026, Feb. Vol. 67 Iss. 1 s. 9-17, DOI: 10.1080/00071668.2025.2524711 mój udział (3%) polegał na pomocy w opracowaniu metodologii analiz i walidacji metody HPLC, zapewnieniu warsztatu badawczego oraz zaakceptowaniu wersji ostatecznej manuskryptu.

Aneta Matras

Podpis

Załącznik nr 7 – Oświadczenie o współautorstwie

11.03.2026  
Bangkok, Thailand

Prof. Amnart Poapolathep (D.V.M., Ph.D.)  
Department of Pharmacology,  
Faculty of Veterinary Medicine,  
Kasetsart University,  
Bangkok 10900, Thailand  
E-mail [fvetamp@hotmail.com](mailto:fvetamp@hotmail.com), [fvetamp@ku.ac.th](mailto:fvetamp@ku.ac.th)

**Scientific Council for Veterinary  
University of Life Sciences in  
Lublin**

**Declaration of co-authorship**

I hereby declare that I am aware that the work: Disposition kinetics and tissue residues of Lincomycin following intravenous, intramuscular and single and multiple oral dosing in domestic geese (*Anser anser domesticus*). Bourdo Krzysztof, Fadel Charbel, Giorgi Mario, Gbylik-Sikorska Małgorzata, Matras Anna, Poapolathep Amnart, Łebkowska-Wieruszewska Beata. Br. Poult. Sci. 2026, Feb. Vol. 67 Iss. 1 s. 9-17, DOI: 10.1080/00071668.2025.2524711 of which I am a co-author, has been included in the doctoral thesis of Krzysztof Bourdo.

I contributed in 2% to data curation and approving the final version of the manuscript.

  
(Prof. Dr. Amnart Poapolathep)

**Załącznik nr 7 – Oświadczenie o współautorstwie**

*Lublin, 15.06.2026.*

Miejsce, data

Dr hab. Łebkowska-Wieruszewska Beata, prof. uczelni  
Katedra Farmakologii, Toksykologii i Ochrony Środowiska  
WYDZIAŁ MEDYCYN Y WETERYNARYJNEJ  
Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie  
ul. Akademicka 12 20-033 LUBLIN  
tel: 81 445 60 56 tel. kom: 509 915 541  
email: [lebkowska.wieruszewska@up.lublin.pl](mailto:lebkowska.wieruszewska@up.lublin.pl)

**Rada Dyscypliny Weterynaria  
Uniwersytetu Przyrodniczego  
w Lublinie**

**Oświadczenie o współautorstwie**

Niniejszym oświadczam, że w pracy Disposition kinetics and tissue residues of Lincomycin following intravenous, intramuscular and single and multiple oral dosing in domestic geese (*Anser anser domesticus*). Bourdo Krzysztof, Fadel Charbel, Giorgi Mario, Gbylik-Sikorska Małgorzata, Matras Anna, Poapolathep Amnart, Łebkowska-Wieruszewska Beata. Br. Poult. Sci. 2026, Feb. Vol. 67 Iss. 1 s. 9-17, DOI: 10.1080/00071668.2025.2524711 mój udział (5%) polegał na opracowaniu koncepcji badań, nadzorowaniu pracy, opracowaniu metodologii analiz, uczestnictwie we wszystkich etapach doświadczenia, zapewnieniu warsztatu badawczego oraz redagowaniu manuskryptu w tym zatwierdzeniu wersji ostatecznej.

*Beata*  
*Łebkowska-Wieruszewska*

Podpis