

BOGNA BORKOWSKA-OPACKA, MARIAN TRUSZCZYŃSKI

Ilościowe określanie *in vitro* oporności na preparaty nitrofuranowe szczepów *Salmonella* izolowanych od zwierząt

Zakład Mikrobiologii Instytutu Weterynarii w Puławach
Kierownik prof. dr M. TRUSZCZYŃSKI

Wśród chorobotwórczych dla zwierząt szczepów rodzaju *Salmonella* stwierdzono dużą zmienność we wrażliwości na różne antybiotyki (1, 16, 19). Wykazano też zjawisko oporności na kilka antybiotyków równocześnie oraz możliwość przekazywania tej cechy szczepom wrażliwym zarówno *in vitro* (1, 18) jak też *in vivo* (10). Spadek skuteczności szeregu antybiotyków w leczeniu salmoneloz zwierząt, w znacznym stopniu skorelowany ze wzrostem oporności salmonel na nie *in vitro*, stał się przyczyną poszukiwania nowych chemioterapeutyków. Wśród nich szczególnie przydatne okazały się związki nitrofuranowe (5, 8, 9, 20, 21). Istnieje jednak obawa, iż również na te leki może wystąpić z czasem wzrost oporności u salmonel. Przyczynić się może do tego stosowanie w niektórych państwach (4) preparatów tych jako dodatków do mieszanek paszowych oraz wykazana zdolność przenoszenia oporności na nitrofurany na drodze koniugacji (6).

Biorąc powyższe pod uwagę postanowiono w stosunku do kolekcji szczepów *Salmonella*, izolowanych od zwierząt w Polsce, sprawdzić *in vitro* aktywność kilku preparatów nitrofuranowych. W wyborze uwzględniono dwa dotąd używane w terapii związki nitrofuranowe — furazolidon i nitrofurazon. Badano też aktywność nitrofurantoiny, która dotąd nie była w lecznictwie weterynaryjnym szerzej stosowana.

Materiał i metody

Do badań użyto 159 szczepów rodzaju *Salmonella*, które wyizolowano od padłych cieląt, prosiąt i drobiu oraz innych gatunków zwierząt na terenie kraju (19). Szczepy te należały do następujących serotypów: *S. dublin*, *S. typhimurium*, *S. choleraesuis*, *S. pullorum-gallinarum* i *S. enteritidis*. Liczby ich podano w tab. 1. Wymienione drobnoustroje stanowiły formę *S. enteritidis*. Liczby ich podano w tab. 1. Szczepy *S. pullorum* i *S. gallinarum* różnicowano na podstawie zawartości antygenów 12₂ i 12₃ oraz prób biochemicznych (15).

Preparaty nitrofuranowe — furazolidon, nitrofurazon i nitrofurantoinę otrzymano z Zakładów Przemysłu Bioweterynaryjnego w Drwalewie.

Badania oporności szczepów *Salmonella in vitro* wykonano metodą seryjnych rozcieńczeń przy współczynniku 2, wymienionych leków w podłożu agarowym. Dla każdego szczepu przygotowywano po 6 płytek agarowych, zawierających kolejne stężenia preparatu. Wynosiły one w przypadku furazolidonu od 0,3 do 10 mcg, nitrofurazonu — od 1,25 do 40 mcg oraz nitrofurantoiny — od 2,5 do 80 mcg na ml podłoża. Do posiewu używano 0,05 ml 20-godzinnej hodowli bulionowej badanych pałeczek w rozcieńczeniu 1:100. Wyniki odczytywano po 24 i 48 godzinach inkubacji w temperaturze 37°C. Szczep *S. typhimurium*, nr 140, pochodzący z kolekcji Muzeum Szczepów Instytutu

Weterynarii w Puławach był stosowany jako kontrolny. Za minimalne stężenie hamujące (MIC) uznawano taką koncentrację leku w pożywce agarowej, która powodowała całkowite zahamowanie wzrostu drobnoustrojów.

Wyniki

Uzyskane wyniki zestawiono w tabelach 1, 2 i 3.

Tab. 1. Minimalne stężenia furazolidonu powodujące zahamowanie wzrostu szczepów *Salmonella* w podłożu agarowym

Serotyp	Liczba szczepów	Czas hod. w godz.	Furazolidon					
			0,3*	0,6	1,25	2,5	5	10
<i>S. dublin</i>	63	24	—	15**	31	14	3	—
		48	—	4	31	15	11	2
<i>S. typhimurium</i>	31	24	—	2	22	6	1	—
		48	—	1	17	9	2	2
<i>S. pullorum-gallinarum</i>	26	24	5	10	8	3	—	—
		48	1	7	14	4	—	—
<i>S. choleraesuis</i>	26	24	—	2	22	2	—	—
		48	—	—	16	9	1	—
<i>S. enteritidis</i>	13	24	—	—	12	—	1	—
		48	—	—	9	3	1	—
Razem	159	24	5	29	95	25	5	—
		48	1	12	87	40	15	4

Objaśnienia:

* — stężenia furazolidonu w mcg/ml podłoża;
** — liczba szczepów, których wzrost uległ zahamowaniu.

Wykazano, że wszystkie badane szczepy były najbardziej odporne na nitrofurantoinę (MIC wynosiło 2,5 do 80 mcg/ml). Najaktywniejszym preparatem okazał się furazolidon, który hamował wzrost w granicach stężeń od 0,3—10 mcg/ml. Pośrednie miejsce pod względem aktywności zajmował nitrofurazon.

Różnice we wrażliwości szczepów poszczególnych serotypów na działanie związków nitrofuranowych były stosunkowo niewielkie. Największa liczba szczepów nie wykazywała wzrostu przy stężeniach wynoszących dla furazolidonu 1,25 i 2,5 mcg/ml, nitrofurazonu — 10 mcg i nitrofurantoiny 20 i 40 mcg/ml podłoża. Wymienione stężenia leków wpływały hamująco na wzrost prawie wszystkich szczepów *S. enteritidis* i *S. choleraesuis*.

Szczepy odporne na wyższe stężenia nitrofuranów należały przede wszystkim do serotypów

Tab. 2. Minimalne stężenia nitrofurazonu powodujące zahamowanie wzrostu szczepów *Salmonella* w podłożu agarowym

Serotyp	Liczba szczepów	Czas hod. w godz.	Nitrofurazon					
			1,25*	2,5	5	10	20	40
<i>S. dublin</i>	63	24	—	—	22**	37	4	—
		48	—	—	9	46	8	—
<i>S. typhimurium</i>	31	24	—	—	3	25	3	—
		48	—	—	1	21	9	—
<i>S. pullorum-gallinarum</i>	26	24	2	1	15	8	—	—
		48	1	1	8	16	—	—
<i>S. choleraesuis</i>	26	24	—	—	7	18	—	1
		48	—	—	1	23	1	1
<i>S. enteritidis</i>	13	24	—	—	—	13	—	—
		48	—	—	—	12	1	—
Razem	159	24	2	1	47	101	7	1
		48	1	1	19	118	19	1

Objaśnienia:

* — stężenia nitrofurazonu w mcg/ml podłoża;
** — liczba szczepów, których wzrost ulegał zahamowaniu.

S. typhimurium i *S. dublin*. Okazało się bowiem, że 40% szczepów *S. typhimurium* nie wykazywało wzrostu po 48-godzinnej inkubacji dopiero przy koncentracji 80 mcg/ml nitrofurantoiny, zaś 30% — przy stężeniu wynoszącym 20 mcg/ml nitrofurazonu, a 12% przy 5 i 10 mcg/ml furazolidonu. Wśród przedstawicieli

Tab. 3. Minimalne stężenia nitrofurantoiny powodujące zahamowanie wzrostu szczepów *Salmonella* w podłożu agarowym

Serotyp	Liczba szczepów	Czas hod. w godz.	Nitrofurantoina					
			2,5*	5	10	20	40	80
<i>S. dublin</i>	63	24	—	—	3**	30	30	—
		48	—	—	2	8	49	4
<i>S. typhimurium</i>	31	24	—	—	—	6	23	2
		48	—	—	—	2	16	13
<i>S. pullorum-gallinarum</i>	26	24	1	4	9	10	2	—
		48	1	1	8	10	5	1
<i>S. choleraesuis</i>	26	24	—	—	2	21	3	—
		48	—	—	—	10	14	2
<i>S. enteritidis</i>	13	24	—	—	—	3	10	—
		48	—	—	—	1	10	2
Razem	159	24	1	4	14	70	68	2
		48	1	1	10	31	94	22

Objaśnienia:

* — stężenia nitrofurantoiny w mcg/ml podłoża;
** — liczba szczepów, których wzrost ulegał zahamowaniu.

serotypu *S. dublin* procent szczepów, których wzrost ulegał zahamowaniu przez wyżej wymienione stężenia leków były niższe. Najbardziej wrażliwe szczepy (MIC = 0,3 i 0,6 mcg/ml furazolidonu, 1,25 i 2,5 mcg/ml nitrofurazonu oraz 2,5 i 5 mcg/ml nitrofurantoiny) stwierdzono w obrębie serotypu *S. pullorum-gallinarum*.

Nie wykazano różnic we wrażliwości na preparaty nitrofuranowe między szczepami *S. pullorum* i *S. gallinarum*.

Kolejno zestawiono wyniki badań uprzednich, dotyczących antybiotykooporności szczepów *Salmonella* (19), z ich opornością na związki nitrofuranowe. Okazało się, że szczepy wykazujące wieloraką oporność na antybiotyki nie były bardziej odporne na nitrofurany niż szczepy antybiotyko-wrażliwe.

Omówienie i wnioski

W większości prac, w których badano *in vitro* wrażliwość drobnoustrojów na związki nitrofuranowe posługiwano się metodą krążkową (2, 3, 13, 17, 19). Badania własne wykonano natomiast, mając na celu bardziej dokładne ilościowe określenie wrażliwości salmonel na wymienione preparaty, metodą seryjnych rozcieńczeń substancji hamującej w podłożu agarowym. W nielicznych pracach porównywano równocześnie w stosunku do kilku nitrofuranów większą liczbę szczepów *Salmonella*, jak to miało miejsce w badaniach własnych.

Konfrontując wyniki uzyskane za pomocą analogicznej metodyki wykazano, podobnie jak inni autorzy (7, 11) większą aktywność furazolidonu w porównaniu z innymi preparatami nitrofuranowymi.

Uzyskano też podobne rezultaty jak np. Zjuban (22) w przypadku wrażliwości *S. gallinarum* na działanie furazolidonu (MIC = 0,3—2,5 mcg/ml) lub Kolesnikowa (12) na działanie tego leku na szczepy *S. choleraesuis* (MIC = 1,6—3,1 mcg/ml). Stwierdzona w badaniach własnych większa wrażliwość *S. pullorum* i *S. gallinarum* niż innych serotypów *Salmonella* na nitrofurany była obserwowana również przez Rogersa i wsp. (14).

Zgodnie z poglądem Smitha (16) za odporne na działanie furazolidonu uważa się szczepy o MIC powyżej 16 mcg/ml. W związku z powyższym wszystkie badane szczepy *Salmonella* można uznać za wrażliwe na furazolidon. Wynik ten tłumaczy dobre rezultaty uzyskiwane w leczeniu salmoneloz przy użyciu tego preparatu.

Piśmiennictwo

1. Anderson E. S., Lewis M. J.: Nature, Lond. 208, 843, 1965.
2. Anusz Z.: Bull. XV Zjazdu Pol. Tow. Mikrobiologów, Wrocław 1963.
3. Anusz Z.: Prz. epid. 20, 279, 1966.
4. Bartoś J.: Vet. Med. Praga 13, 463, 1968.
5. Battelli C., Lo Muzio F., Pacilli C.: Vet. ital. 10, 865, 1959.
6. Belski V. V.: Antibiotiki 14, 1022, 1969.
7. Butikova S. N.: Veterinarija, Moskwa 36, 360, 1960.

8. Chomenko V. S.: Veterinarija, Moskwa 42, 58, 1966.
9. Freedmann R., Johnson C., O'Connor J.: Poul. Sci. 44, 561, 1965.
10. Jarolmen H., Kemp G.: J. Bact. 99, 487, 1969.
11. Juszkiewicz T., Żorawski C.: Medycyna Wet. 14, 280, 1958.
12. Kolesnikova A. C.: Veterinarija, Moskwa 42, 102, 1965.
13. Pohl P., Thomas J.: Annls. Méd. vét. 4, 235, 1967.
14. Rogers G. S., Belloff G. B., Paul M. F., Yurchenko J. A., Gever G.: Antibiotica Chemother. 6, 231, 1956.
15. Szużewska M.: Medycyna Wet. 21, 414, 1965.
16. Smith H. W.: Vet. Rec. 80, 464, 1967.
17. Tereszczuk S., Gronek W., Moncik M.: Medycyna Wet. 25, 478, 1969.
18. Truszczyński M., Borkowska-Opacka B.: Med. dośw. 22, 111, 1970.
19. Truszczyński M., Szużewska M.: Medycyna Wet. 24, 520, 1968.
20. Wilson J. E.: Vet. Rec. 67, 849, 1955.
21. Wilson J. E.: Vet. Rec. 68, 743, 1956.
22. Zjuban V. I.: Veterinarija, Moskwa 39, 48, 1962.

Adres autora: dr Bogna Borkowska-Opacka, Puławy, Al. Partyzantów 55, Instytut Weterynarii.

Борковская-Опацка Б., Трущинский М. — Количественное определение in vitro нитрофураночувствительности выделенных из животных штаммов Salmonella.

Исследовали нитрофурановые препараты: фуразолидон, нитрофуразон и нитрофурантоин в отношении к 159 штаммом *Salmonella* принадлежащим к 5 серотипам. Применяли метод серийных разведений выше названных препаратов в агаровой среде. Установили, что все исследованные штаммы были резистентны больше всего к нитрофурантоину (MIC = 2,5—80 мкг/мл). Самым активным препаратом оказался фуразолидон, который задерживал рост бактерий уже в разведениях 0,3—10 мкг/мл. Резистентными к более высоким концентрациям пре-

паратов были чаще всего штаммы *S. typhimurium* и *S. dublin*. Самые чувствительные штаммы встречали в группе серотипа *S. pullorum-gallinarum*. На основании литературных критериев резистентности микробов к фуразолидону все исследованные штаммы *Salmonella* надо считать фуразолидоночувствительными. Полученные результаты указывают на высокую целесообразность применения фуразолидона в лечении салмонеллезов.

Borkowska-Opacka B., Truszczyński M. — In vitro quantitative determination of the sensitivity of salmonella strains, isolated from animals, against nitro-furan preparations.

The purpose of the work was to determine the antibacterial activity of three nitrofurane preparations: furazolidon, nitrofurazon and nitrofurantoin against 159 strains of *Salmonella* belonging to 5 serotypes occurring in animals. The antibacterial activity was performed by the method of serial dilution of the above drugs in agar plates. The findings indicated that the tested strains possessed the highest resistance against nitrofurantoin (MIC from 2.5 to 80.0 mcg/ml). The most active proved to be furazolidon which inhibited bacterial growth at the concentrations from 0.3 to 10 mcg/ml. Most strains resistant to the higher concentrations of the tested drugs belonged to *S. typhimurium* and *S. dublin* serotypes. The most sensitive strains were found among *S. pullorum-gallinarum* serotype. The examined strains of *Salmonella* may be considered as sensitive to furazolidon on the basis of criterion of bacterial resistance cited in literature. This points to the usefulness of furazolidon for the treatment of salmonellosis in birds.

KAZIMIERZ GOLISZEWSKI, STANISŁAW MEUSZYŃSKI, EWA NIKODEMSKA, HENRYK ZIELONKA
Katowice

Badania porównawcze działania bakteriobójczego chloraminy, ługu sodowego i Sterinolu na niektóre serotypy pałeczek *Salmonella*

Jednym z ważnych ogniw sanitarno-weterynaryjnych zabiegów profilaktycznych jest odkażanie. Ma ono podstawowe znaczenie w zapobieganiu chorobom zakaźnym jak również w higienie środków spożywczych zwierzęcego pochodzenia.

Spśród licznej grupy zarazków chorobotwórczych szczególne znaczenie dla epizootiologii i epidemiologii przedstawiają pałeczki *Salmonella*. Dochodzenia epidemiologiczne wykazują, że mięso i jego przetwory, będące przyczyną zatruć pokarmowych ulegają zakażeniu salmonelami najczęściej wtórnie, co może mieć miejsce w przypadkach nie przestrzegania reżimu sanitarnego w zakładach produkcyjnych.

Obecność pałeczek *Salmonella* w pewnym środowisku można uważać jako swojego rodzaju wskaźnik złego stanu sanitarnego podobnie jak w odniesieniu do wody jest obecność w niej *E. coli*.

W tym ujęciu szczególne znaczenie posiada dobór odpowiednich środków dezynfekcyjnych w celu skutecznego niszczenia salmonel w środowisku zewnętrznym.

Badania własne miały na celu sprawdzenie skuteczności bakteriobójczego działania środków odkażających powszechnie stosowanych w praktyce weterynaryjnej oraz w zakładach przemysłu mięsnego, w stosunku do serotypów *Salmonella*, które najczęściej izoluje się od zwierząt w kraju. Użycie do badań różnych serotypów było uzasadnione występowaniem pewnych różnic oporności na działanie środka dezynfekcyjnego nawet między bakteriami tej samej grupy (3).

Materiał i metody

a) Środki badane: chloramina-T o zawartości aktywnego chloru 27% (przygotowana *ex tempore* i przechowywana w ciemnym miejscu), ług sodowy ch. cz. oraz Sterinol „Polfa” zawierający 10% czynnej substancji bromku dwumetylolaurylobenzylomonoowego. Roztwory wymienionych środków przygotowywano na wodzie destylowanej, przy czym stosowano stężenia: dla chloraminy i ługu sodowego 0,1 i 0,2% dla Sterinolu 0,5%, 1,0%, 1,5% i 2,0%.

b) Bakterie testowe: do badań użyto 7 szczepów pałeczek *Salmonella*, w tym 3 szczepy terenowe — *S. heidelberg*, *S. derby*, *S. anatum* wyizolowane ze środowiska rzeźni oraz 4 szczepy muzealne, otrzymane z ZHW — *S. typhimurium*, *S. choleraesuis*, *S. enteritidis*, *S. dublin*.