

od e.z.p.s. Jako dodatkową kontrolę zdrowia włącza się poubojowe badanie układu oddechowego świń.

Czechosłowaccy badacze Gois, Cerny i Mensik (1968) zastosowali następujący sposób uzdrowienia stada świń dotkniętego e.z.p. Ze stada podstawowego wybrano 10 starszych macior, o których wiadomo było, że dają zdrowe potomstwo. Od macior tych pobrano kilkakrotnie wymazy nosowe, które badano na obecność patogennych mikoplazm. Każdą maciorę przed zbliżającym się porodem umyto starannie 2% roztworem chloraminy po czym przeniesiono do uprzednio odkażonych boksów porodowych. Prosięta natychmiast po urodzeniu odłączono od macior i umieszczono w izolowanym pomieszczeniu, aby nie miały dostępu do macior. Noworodki w ciągu pierwszych 48 godzin życia przykładano co godzinę do dobrze ob-

mytych i odkażonych sutek, aby mogły wysać siarę, po czym natychmiast przenoszono je do izolatora. Po upływie 48 godzin prosięta w grupach po 3—4 sztuki umieszczono w specjalnych boksach, gdzie karmiono je 8—10 razy dziennie z dwugodzinnymi przerwami półsyntetycznym, wysoce kalorycznym poidłem. Prosięta te stanowiły zaczątek nowego stada, które ulokowano w oddzielnym pomieszczeniu w izolacji od pozostałych świń. Co 2—3 miesiące przeprowadzano kontrolę kliniczną i epizootiologiczną wyselekcjonowanego stada. Jednocześnie pobierano od świń wyrwykowo wymazy z nosa, które badano na obecność patogennych mikoplazm. Dalszą kontrolę stanowiło poubojowe badanie układu oddechowego z włączeniem mikrobiologicznego i histopatologicznego badania wycinków płuc.

Adres autora: prof. dr Abdon Stryszak, Warszawa, Pl. Konstytucji 1 m. 6.

ANTONI FUROWICZ

Aktualne poglądy na powstawanie antybiotykooporności u bakterii patogennych

Cz. I. Mechanizmy powstawania antybiotykooporności

Zakład Higieny Weterynaryjnej w Katowicach
Kierownik: dr hab. A. FUROWICZ

Od wielu już lat antybiotyki stanowią jedną z podstawowych grup chemioterapeutyków w leczeniu weterynaryjnym (6, 11, 19, 27, 28). Trudno dzisiaj wyobrazić sobie nowoczesną terapię bez tej grupy leków. Stąd też niewiele leków jest tak rozpowszechnionych jak antybiotyki, ale i w żadnej chyba dziedzinie leczenia nie popełnia się tylu błędów, co w stosowaniu tych środków. Zasadniczym warunkiem racjonalnej terapii jest ustalenie czynnika zakaźnego, znajomość jego właściwości oraz mechanizmu działania i wrażliwości danego szczepu na stosowany antybiotyk.

Rodzaje antybiotykooporności.

Bakterie odporne są najczęściej dzielone na tolerujące i niszczące antybiotyki (13, 19, 36, 50). Drobnoustroje tolerujące antybiotyki mogą rozmnażać się w obecności zwiększonych stężeń niezmiennego antybiotyku. Z tym rodzajem oporności spotykamy się w stosunku do wszystkich antybiotyków z wyjątkiem penicyliny. Drobnoustroje takie nie wykazują reakcji na antybiotyk; znaczy to, iż mogą rozmnażać się w jego obecności lub braku. Istnieją szczepy, które są zdolne do rozmnażania się w obecności antybiotyku, rozwijają się jednak bardziej intensywnie w środowisku pozbawionym tego chemioterapeutyku. Niekiedy szczep bakteryjny może ulec takiemu przystosowaniu do antybiotyku, że staje się antybiotykoozależny. Jeżeli

chodzi natomiast o bakterie niszczące antybiotyki, to w praktyce klinicznej najczęściej spotykanymi drobnoustrojami o tej właściwości są gronkowce produkujące enzym penicylinazę (13, 19). Trzeba tu z całym naciskiem podkreślić, iż oporność tych szczepów związana jest ze zdolnością wytwarzanej przez nie penicyliny do kompletnego rozkładu penicyliny, a nie z ich niewrażliwością na działanie tego leku. Stwierdzono, że niektóre szczepy pałeczek jelitowych, laseczek wąglika i laseczek rodz. *Clostridium* posiadają również właściwość produkowania enzymów inaktywujących penicylinę (13, 50).

Trwałość antybiotykooporności.

Jeżeli chodzi o szczepy bakteryjne tolerujące antybiotyki, to zanotowano, że okres lekooporności jest u nich bardzo zmienny (13, 36, 50). I tak szczepy tetracyklino- i chloramfenikoloo odporne są przeważnie stabilne, w szczególności szczepy wyizolowane z materiału szpitalnego. Zachowują one oporność nawet po licznych pasażach w nieobecności antybiotyku. Natomiast szczepy streptomycyconooporne są bardziej labilne i wiele z nich zatracą oporność podczas hodowli w nieobecności antybiotyku. Również szczepy gronkowców, przystosowane do tolerancji penicyliny *in vitro*, są wysoce nietrwałe i bardzo łatwo powracają do wyjściowej wrażliwości.

Oporność krzyżowa.

Znany jest fakt, że antybiotyki o podobnej budowie chemicznej mogą wywołać powstanie oporności krzyżowej (13, 19, 50). Uodpornienie w stosunku do jednego antybiotyku powoduje jednoczesny wzrost oporności w stosunku do antybiotyku o zbliżonej budowie. Na przykład drobnoustroje, które nabyły oporność w stosunku do jednego sulfonamidu, stają się odporne w stosunku do wszystkich sulfonamidów. Z podobną, prawie całkowitą opornością krzyżową spotykamy się u antybiotyków tetracyklinowych (terramycyna, aureomycyna, tetracyklina). Opisano jednakże bardziej złożone sytuacje, przykładem czego może być grupa makrolidów (erytromycyna, karbomycyna, leukomycyna, oleandomycyna, spiromicyna). I tak szczepy, które nabyły oporność poprzez seryjne pasażę *in vitro* w stosunku do jednego z antybiotyków makrolidowych, wykazują przeważnie równoległy wzrost oporności w stosunku do innych makrolidów („podwójna oporność”). Zanotowano jednak, że erytromycynooporne szczepy gronkowców, wyizolowane z materiału klinicznego, bywają czasami wrażliwe na działanie oleandomycyny i spiromicyny oraz *vice versa*. Garrod określił to zjawisko mianem „rozszerzonej oporności” (12, 13). Posiada ono duże znaczenie praktyczne przy rutynowym określaniu szczepów bakteryjnych. Na przykład — o ile stwierdzi się, że wyizolowany szczep gronkowca wykazuje oporność na erytromycynę, nie można definitywnie przesadzać, że terapia przy użyciu oleandomycyny lub spiromicyny nie przyniesie pozytywnych efektów, mimo, że antybiotyki te należą do jednej grupy — makrolidów. Wspomnieć trzeba, że czasami notowano również występowanie krzyżowej oporności pomiędzy antybiotykami odległymi chemicznie. Zjawisko to zostało opisane przez Pansv i wsp. dla chloramfenikolu i tetracyklin (38), oraz przez Barbera i wsp. dla chloramfenikolu i erytromycyny (7).

Powstawanie w komórce bakteryjnej oporności na antybiotyki.

Procesy, które prowadzą do powstania tego zjawiska są bardzo złożone. Szereg badaczy uważało, iż dla pojawienia się lekooporności konieczny jest bezpośredni kontakt pomiędzy zarazkiem a antybiotykiem. Powstała między innymi teoria adaptacji, której autorzy zakładali, że dana populacja wrażliwych bakterii w środowisku zawierającym określony antybiotyk uzyskuje stopniową tolerancję na ten lek (13, 36, 50). Proces ten miał być szczególnie widoczny tam, gdzie kontakt bakterii z antybiotykiem rozpoczął się od niskich stężeń chemioterapeutyku, po czym ilość jego ulegała zwiększeniu. Jest rzeczą jasną, że nie wszystkie komórki bakteryjne danej populacji uzyskiwały w ten sposób cechę antybiotykooporności. Mimo, że zjawisko adaptacji reprezentowane przez tak

wybitnych uczonych jak Hinshelwood, zostało uznane i jest w dalszym ciągu badane, wiadomo już dzisiaj, że do powstania antybiotykooporności wcale nie jest potrzebny bezpośredni kontakt między drobnoustrojem a antybiotykiem (59). Powstaje ona bez tego kontaktu i zjawisko to posiada poważne znaczenie praktyczne w terapii człowieka i zwierząt. Istnieją trzy zasadnicze procesy prowadzące do powstania takiej oporności. Są to: mutacje spontaniczne, selekcje oraz zakażna lekooporność, warunkowana przez epizomalny czynnik przenoszenia oporności — RTF.

Mutacje spontaniczne powstają w warunkach laboratoryjnych bez żadnej ingerencji ze strony eksperymentatora. W oparciu o materiał bakteryjny opracowano kilka metod doświadczalnie obrazujących to zjawisko. Do najbardziej znanych należy metoda replik („replica plating”) opracowana przez Lederberga (25). Dowiódł on, że do powstania streptomycynoopornego mutantu *E. coli* niepotrzebny był bezpośredni kontakt komórki z antybiotykiem. Streptomycyna spełnia tylko rolę czynnika selekcyjnego, hamując wzrost formy wyjściowej, wrażliwej na antybiotyk, a tym samym umożliwiając wykrycie nawet bardzo rzadko pojawiających się komórek zmutowanych. Spontaniczność oznacza jednak tylko brak ingerencji eksperymentatora, a nie bezprzyczynowość mutacji. Okazało się, iż przyczyną mutacji spontanicznych jest pojawienie się w DNA genoforu bakterii tautomerycznych odmian zasad purynowych i pirymidynowych, posiadających zmienioną konfigurację przestrzenną grup czynnych (25). W wyniku tego adenina, która normalnie łączy się z tyminą, będzie po takiej przemianie łączyć się z cytozyną. Analogicznie zmienia się właściwości łączenia się pomiędzy innymi zasadami. Jeżeli takiej tautomeryzacji będzie podlegała zasada nukleotydu wbudowanego w łańcuch polinukleotydowy, podczas replikacji DNA w nowo powstającą nić wbudowane zostaną „mylne” zasady np. gaunina zamiast tyminy. Wbudowanie „mylnych” zasad zmienia znaczenie szyfru genetycznego, co w konsekwencji jest przyczyną syntezy zmienionego białka enzymatycznego i może być ujawnione jako fenotypowo wykrywalna mutacja (22). Część mutacji spontanicznych jest przypuszczalnie indukowana przez czynniki endogenne, takie jak gromadzące się produkty naturalnego metabolizmu np. woda utleniona i jony azotynowe.

Mutacja indukowana w przeciwieństwie do mutacji spontanicznej jest wynikiem celowej ingerencji człowieka, a ściślej mówiąc rezultatem działania czynników mutagennych, takich jak: promienie pozafioletkowe (UV), promienie jonizujące (X, gamma), kwas azotowy, iperyt i inne (22). Jest rzeczą interesującą, że większość znanych mutantów działa bezpośrednio na DNA (62). W normalnej populacji pa-

lecunki okrężnicy pojawiają się z bardzo małą częstością mutanty streptomycyno-oporne. Jednakże po zadziałaniu na hodowlę tych bakterii promieniami ultra-fioletowymi, które stanowią czynnik mutagenny, można zaobserwować, iż część bakterii zginie. Wśród tych, które przeżyły, znajduje się bardzo dużo mutantów streptomycynoopornych. Stwierdzono mianowicie, że w naświetlonej populacji pojawiają się one około 100 razy częściej aniżeli w normalnej; a więc promienie UV zwiększają w znacznym stopniu częstość mutacji (22).

Selekcja.

Przedstawiono już wagę selekcji w zjawisku mutacji spontanicznej. Mówiąc o selekcji należy pamiętać, że w procesie tym nie dochodzi do jakichkolwiek zmian w komórkach bakteryjnych (19, 22). Zaobserwowano, że szerokie stosowanie antybiotyku w danym środowisku eliminuje wrażliwe szczepy, sprzyjając jednocześnie rozprzestrzenianiu się populacji antybiotykoopornych, występujących przed zastosowaniem danego leku w znikomej mniejszości. Można z dużym prawdopodobieństwem założyć, że w ten sposób doszło do sulfonamidooporności dwoinek rzeżączki już w kilka lat po wprowadzeniu do lecznictwa sulfonamidów. Innym przykładem analizowanego mechanizmu jest penicylinooporność gronkowców. Notowana początkowo bardzo niewielka liczba szczepów wytwarzających penicylinazę, urosła obecnie do znacznej większości w środowisku chorych ludzi i zwierząt (19). W wyniku badań przeprowadzonych zarówno *in vitro* jak i *in vivo* zanotowano, iż obecność antybiotyku wywiera silne działanie selekcyjne, faworyzujące nieliczne odporne mutanty kosztem komórek wrażliwych, niekiedy aż do uzyskania jednorodnej hodowli komórek antybiotykoopornych (59).

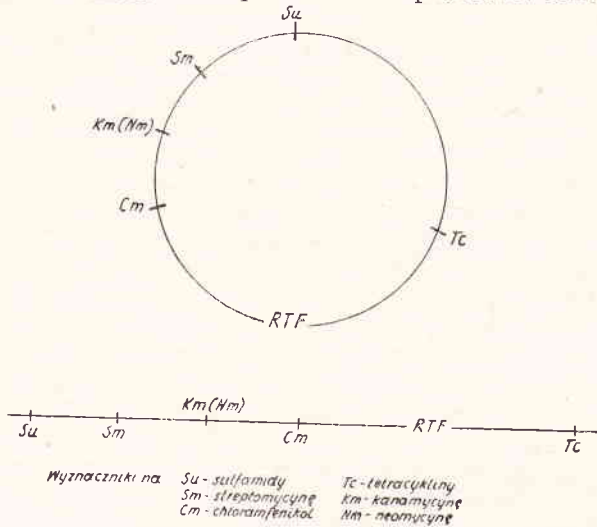
Zakaźna lekooporność u bakterii jelitowych, odgrywa coraz większą rolę w powstawaniu oporności na antybiotyki w znaczeniu kompleksowym. Zjawisko to po raz pierwszy zostało opisane w 1959 r. przez Watanabe (51). Już w 1956 r. Kitamoto i wsp. wyizolowali od pacjenta chorego na dezynтеріę szczep *Shigella*, odznaczający się „mnogą lekoopornością”. Omawiany drobnoustrój był odporny na sulfonamidy, streptomycynę, chloramfenikol i tetracykliny. W tym czasie nie wiedziano oczywiście jeszcze, że te „mnogie lekooporności” mogą być przenoszone z jednego drobnoustroju na drugi. Przed rokiem 1956, mimo wnikliwych badań nad wrażliwością bakterii na antybiotyki, nie notowano w Japonii szczepów *Shigella* z „mnogą lekoopornością”. Natomiast od roku 1957 obserwowano w tym kraju coraz większą liczbę szczepów z tą niezwykle cechą. I tak w 1966 r. zanotowano, że prawie 50% szczepów *Shigella* izolowanych w Japonii, posiadało oporność na 4 wspomniane leki (59). Wspomnieć trzeba, że szczepy pałeczki okrężnicy wyosabniane od zdrowych osób wykazywały również wysoką

kompleksową oporność na leki, jak szczepy *Shigella*. Było to jeszcze mocniej zaznaczone u szczepów pałeczki okrężnicy izolowanych z zakażeń układu moczowego (31). Jak to już przedstawiono drobnoustrój może stać się odporny na działanie antybiotyku w rezultacie spontanicznej mutacji i selekcji. Oporność bywa również wynikiem przenoszenia genetycznej informacji z bakterii wrażliwej na bakterię oporną. Przenoszenie genetycznej informacji odbywa się za pośrednictwem procesów transformacji (wymiana bardzo krótkich fragmentów DNA), transdukcji (bakteriofagi) i seksualnej rekombinacji (koniugacja, transfekcja) (13, 19, 25, 50, 62). Badacze japońscy, analizując zjawisko kompleksowej oporności na leki u pałeczek *Shigella*, stwierdzili szereg niezwykle cich znamienych, na podstawie których wysunęli sugestie co do obecności różnych mechanizmów genetycznych odpowiedzialnych za to zjawisko (1, 15, 29, 33, 51, 54, 56, 57, 59, 60). I tak zanotowano, że od różnych pacjentów w czasie tej samej epidemii izolowano zazwyczaj jednocześnie pałeczki *Shigella* lekowrażliwe i kompleksowooporne na leki. Zarówno jedne jak i drugie posiadały najczęściej tę samą budowę antygenową. Zanotowano również wypadki izolowania szczepów wrażliwych i opornych tego samego serotypu od jednego pacjenta. Pacjenci, u których notowano szczepy *Shigella* o mnogiej odporności na leki, byli zazwyczaj nosicielami pałeczek okrężnicy o tych samych właściwościach. Następnie zaobserwowano bardzo ciekawe zjawisko, a mianowicie — kiedy pacjenci, u których w kale stwierdzono wrażliwe pałeczki *Shigella* byli leczeni jednym tylko preparatem np. chloromycetyną, to zaczęto izolować od nich szczepy *Shigella* tego samego serotypu, ale o kompleksowej oporności na leki. Zjawiska tego nie zdołano uzyskać *in vitro*, działając na wyosobnioną populację pałeczek *Shigella* jednym tylko antybiotykiem (59). Przytoczone dane wskazują dobitnie na trudność wytłumaczenia zjawiska powstawania szczepów wielokrotnie opornych na bazie spontanicznej mutacji i selekcji oraz w oparciu o klasyczne metody przenoszenia genu. Ochai i Akiba podejrzewali, że rozwój kompleksowej lekooporności u pałeczek *Shigella* był spowodowany przenoszeniem tej oporności w przewodzie pokarmowym człowieka z pałeczek okrężnicy posiadających tzw. „pre-lekooporność” (37, 59). Następnie badacze ci próbowali przenieść kompleksową lekooporność *in vitro* przez zmieszanie hodowli bakteryjnej opornej na antybiotyki ze szczepami wrażliwymi (koniugacja). Eksperymenty ich uwieńczone zostały powodzeniem. Było to w roku 1960; w okresie tym rozpoczęto intensywne studia, poświęcone zakaźnej lekooporności. Nad zagadnieniem tym pracowali jako pierwsi badacze japońscy: Watanabe, Fukasawa, Arai, Nishida, Ogata, Sato i inni (1, 15, 29, 31, 33, 53, 59). Natomiast pionierskie prace nad molekularną

strukturą czynników R, wykonali badacze amerykańscy Falkow, Citarella i Wahlhietter (cyt. za 10, 59). Następnym stopniem było znalezienie mechanizmu pociągającego ze sobą przenoszenie kompleksowej lekooporności. Wiadomo było, że do powstawania tego zjawiska konieczny był bezpośredni kontakt komórek bakteryjnych a więc koniugacja, za wyjątkiem przypadków, gdy notowano transdukcję. Stwierdzono następnie, że kompleksowa leko-

oporność jest zazwyczaj przenoszona niezależnie od genoforu (chromosomu) komórki macierzystej wskazując, iż przenoszenie nie jest spowodowane przez seksualną rekombinację (33, 51).

W późniejszych badaniach wykazano, że czynnikiem odpowiedzialnym za przenoszenie kompleksowej lekooporności z komórki bakteryjnej do komórki bakteryjnej jest czynnik R (55, 56, 59, 60). R — jest skrótem słowa „resistance” — oporność. Czynnikiem ten bywa również często określane jako RTF („resistance transfer factor” — czynnik przenoszenia oporności). Umówiono się, aby określenie czynnik R — używać w sytuacji, gdy znajduje się on w komórce bakteryjnej i determinuje kompleksową lekooporność. Natomiast w momencie transferu tego czynnika z jednej komórki bakteryjnej do drugiej określa się go terminem RTF (59). Należy zawsze pamiętać, że to nie lekooporności są przenoszone z komórki do komórki, lecz ich genetyczne determinanty. Jest również rzeczą godną podkreślenia, że czynnik RTF, który podobnie jak czynnik F jest episomem, przenosi tylko geny lekooporności. Nie transferuje natomiast w odróżnieniu od czynnika F, innych wyznaczników genetycznych (ryc. 1).



Ryc. 1. Model mapy genetycznej czynnika R wg T. Katanabe

Adres autora: dr hab. Antoni Furowicz, Katowice, ul. Brynowska 25.

KRYSTYNA WAWRZKIEWICZ
Lublin

Antybiotyki przeciwgrzybicze.

II. Mechanizm działania i oporność polekowa

Mechanizm działania antybiotyków o budowie niepolienowej na grzyby chorobotwórcze nie jest dokładnie poznany. Banerjee i Bose (5) wiążą mechanizm działania mykobacyny na komórki *Candida albicans* ze zjawiskiem aglutynowania ich przez lek. Stwierdzili oni, że zaglutynowane komórki grzyba tracą zdolność rozmnażania się nawet po całkowitej dyspersji aglutynatu.

Mechanizm działania gryzeofulwiny wiąże się najprawdopodobniej z zaburzeniami w syntezie chitynowej ściany komórkowej (9). Preparat ten aktywny jest bowiem tylko w stosunku do grzybów, których ściana komórkowa zawiera jako zasadniczy składnik polimery N-acetylo-glukozaminy (chityna) (41). Natomiast Sternberg i Mc Nall (46) uważają gryzeofulwinę za konkurencyjny inhibitor biosyntezy kwasów nukleinowych.

Mechanizm działania antybiotyków o budowie polienowej na grzyby chorobotwórcze został dokładniej poznany i opracowany. Początkowo sugerowano, że szkodliwe działanie antybiotyków dotyczy ściany komórkowej grzyba. Okazało się jednak, że protoplasty drożdży są

w równym stopniu wrażliwe na działanie nystatyny jak całe komórki (24, 25). Marini i wsp. (33) oraz Sutton i wsp. (47) stwierdzili, że antybiotyki polienowe powodują utratę przez komórkę drożdży jonów potasu lub amonu.

Podobnie Zygmunt (51) donosi o przechodzeniu wewnątrzkomórkowego potasu z komórek *C. albicans* do podłoża, już po 15 min. inkubacji w obecności antybiotyków polienowych.

Sutton i wsp. (47) przeprowadzili systematyczne badania nad zachowaniem się komórek *Sacch. cerevisiae* przy różnych stężeniach nystatyny w środowisku. Okazało się, że przy stężeniu 1 mcg/ml komórki tracą jony potasu co z kolei doprowadza do obniżenia intensywności fermentacji. Przy wzroście stężenia do 6—10 mcg/ml następuje utrata przez komórkę jonów amonowych i fosforowych. Stężenie nystatyny powyżej 10 mcg/ml prowadzi do przechodzenia z komórek do środowiska nukleotydów, a przy koncentracji 30 mcg/ml pojawia się w środowisku białko.

Również Kinsky (23) wykazał spadek masy grzybni *Neurospora* o 25% w czasie 4-godzin-