

ZDZISŁAW STARONIEWICZ, MARIUSZ BIRGER

Charakterystyka gronkowców izolowanych z przypadków otitis externa u psów

Katedra Mikrobiologii Weterynaryjnej Wydziału Weterynaryjnego AR,
ul. Norwida 31, 50-375 Wrocław

Summary

Properties of staphylococci isolated from canine otitis externa

The purpose of the work was to identify staphylococci isolated from the cases of otitis externa in dogs. The material was taken from the external auditory canal of 59 dogs with clinical signs of otitis externa. Of 47 dogs 41 strains of *Staphylococcus* spp. were isolated, which appeared to be a dominant infectious factor. Out of the strains most of them were classified as *Staph. intermedius* (46.3%) and *Staph. aureus* (22.0%). All the strains produced a positive coagulase reaction. In contrast, the coagulase negative strains, i.e. *Staph. hominis*, *Staph. hyicus*, *Staph. cohnii*, *Staph. haemolyticus*, *Staph. xylosus* occurred rare. The isolated coagulase-positive strains were sensitive to gentamycin and neomycin and had a considerable resistance to penicillin, ampicillin and oxytetracycline. A vaccine made of the isolated coagulase positive strains proved to be effective in the treatment of chronic otitis externa caused by staphylococci.

Zapalenie ucha zewnętrznego (*otitis externa*) jest dość częstym schorzeniem psów i może stanowić 11–23% przypadków klinicznych (3, 4). Na występowanie *otitis externa* wpływają niewątpliwie: rasa psa, swoista budowa anatomiczna zewnętrznego przewodu słuchowego, uszkodzenia mechaniczne, czynniki biologiczne (bakterie, grzyby, pasożyty), chemiczne, termiczne i inne (3, 4, 7). Należy podkreślić, że w praktyce czynniki te często nakładają się na siebie, dając obraz schorzenia o złożonej etiologii. Na podstawie licznych obserwacji (3, 10, 19) stwierdzono, że istotną rolę w *otitis externa* odgrywają drobnoustroje, które mogą być zarówno pierwotną, jak i wtórną przyczyną schorzenia. Do najczęściej występujących bakterii należą: *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Escherichia coli* oraz z grzybów: *Pityrosporum*, *Candida*, *Mucor*, *Aspergillus*. Spośród wymienionych bakterii największą uwagę zwraca się na gronkowce, szczególnie z gatunku *S. aureus*.

Dzisiejsza diagnostyka gronkowców w swej praktyce nie ogranicza się wyłącznie do wykazania obecności *S. aureus* w posiewach, ponieważ bakterie te mogą być także komensalami, bytującymi na skórze i błonach śluzowych zwierząt stałocieplnych lub niezależnymi od gospodarza saprofitami. Wobec tego przy próbach ścisłego określenia właściwości odróżniających szczepy saprofityczne od ropotwórczych przyjęto jako kryterium patogenności aktywność niektórych enzymów, jak np.: koagulazy, hemolizyny, hialuronidazy, fosfatazy i innych (2). Dalsza klasyfikacja jest możliwa dzięki szeregowi właściwości fermentacyjnych oraz dzięki fagotypizacji. Badania przeprowadzone według powyższych kryteriów pozwoliły na wyłonienie w obrębie gatunku *S. aureus* szczepów pochodzących od ludzi, psów, bydła, które według Meyera (14) należałoby uważać za podgatunki. Z kolei Baird-Parker i inni członkowie „Subcommittee on the Taxonomy of Staphylococci and Micrococci” (1) na III Międzynarodowym Sympozjum w Warszawie w 1975 r. opowiedzieli się za podziałem gronkowców na 3 gatunki, a mianowicie: *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis*, *S. saprophyticus*. W 1975 roku

Hąjek i Marsalek (cyt. 17) wyróżnili 6 biotypów *Staphylococcus aureus* i przypisali człowiekowi — biotyp A oraz kilku gatunkom zwierząt: biotyp B — świnia, drób; biotyp C — bydło, owca; biotyp D — zając; biotyp E — koń, pies, norka; biotyp F — gołąb, lis. Dalsze badania Hąjka (11) wykazały, że biotyp E i F różnią się od pozostałych biotypów od A do D strukturą ściany komórkowej. Zaproponował zatem dla biotypów E i F nazwę gatunkową *S. intermedius*.

Jako samodzielne gatunki opisano *S. sciuri* oraz *S. hyicus* (cyt. 17). Ten ostatni, jako gronkowiec koagulazoujemny okazał się patogeny dla świń. W 1983 roku zostały określone 2 nowe gatunki gronkowców: *S. gallinarum*, izolowany od kurcząt i bażantów oraz *S. caprae*, wyisobniony z mleka koziego (6). Obecna klasyfikacja gronkowców według Devriese i Kocura (cyt. 17) obejmuje następujące gatunki: *S. aureus*, *S. intermedius*, *S. hyicus*, *S. epidermidis*, *S. hominis*, *S. haemolyticus*, *S. warneri*, *S. simulans*, *S. sciuri*, *S. capitis*, *S. saprophyticus*, *S. cohnii*, *S. xylosus*, *S. gallinarum*, *S. caprae*.

Opierając się na wymienionych danych przeprowadzono badania w celu ustalenia dokładnej identyfikacji gronkowców wyisobnionych z przypadków *otitis externa* u psów.

Materiał i metody

Materiał do badań bakteriologicznych stanowiły wymazy z zewnętrznego przewodu słuchowego pobrane od 59 psów wykazujących kliniczne objawy zapalenia ucha zewnętrznego (*otitis externa*). Badania przeprowadzono według klasycznych metod postępowania w diagnostyce bakteriologicznej. Identyfikację wyizolowanych szczepów gronkowców oparto na badaniach właściwości morfologicznych, hodowlanych i biochemicznych, takich jak: zdolność wytwarzania hemolizyny, katalazy, dezoksyrybonukleazy, koagulazy, clumping factor (CF), acetoiny oraz zdolności rozkładu: galaktozy, ksylozy, mannozy, sacharozy, arabinazy, maltozy, laktozy, glukozy i mannitolu.

Wyisobnione szczepy gronkowców koagulazododatnich określano pod względem wrażliwości na antybiotyki, takie jak: ampicylina, chloramfenikol, erytromycyna, gentamycyna, kloksacylina, kolistyna, neomycyna, oksytetracyklina, penicylina, streptomycyna. Antybiotykooporność oznaczano metodą dyfuzji z użyciem krążków bibułowych nasączonych określonymi antybiotykami produkcji BIOMED-Warszawa.

W celach terapeutycznych z wyizolowanych szczepów gronkowców koagulazododatnich sporządzono szczepionkę. Bakterie użyte do produkcji szczepionki zawieszono w płynie fizjologicznym z 0,5% dodatkiem fenolu i inaktywowano w temperaturze 60°C przez okres 1 godziny. Zawiesinę bakteriyną ampułkowano po 1 cm³ we wzrastających gęstościach 3×10^7 , 9×10^7 , $1,8 \times 10^8$, $3,6 \times 10^8$, 6×10^8 , $1,2 \times 10^9$ komórek w 1 cm³. Badanie jałowości szczepionki przeprowadzono wysiewając zawiesinę bakterii na podłoże agarowe z krwią i bulion tryptozowy, inkubując posiewy w warunkach tlenowych i beztlenowych. Do badania na toksyczność użyto 18 myszy BALB/c, którym podawano podskórnie i domięśniowo różne dawki szczepionki. Wszystkie myszy pozostały zdrowe, nie wykazując żadnych odchyśleń od normy. U 10 psów z *otitis externa*, nie leczonych antybiotykami, gdzie czynnikiem etiologicznym były koagulazododatnie szczepy gronkowców, zastosowano szczepionkę. Szczepionkę podawano domięśniowo 6-krotnie co 4 dni, w dawkach o wzrastających gęstościach od 3×10^7 do $1,2 \times 10^9$ bakterii w 1 cm³. Efekt działania szczepionki kontrolowano badaniem klinicznym i bakteriologicznym.

Wyniki i omówienie

Wyniki badań bakteriologicznych wymazów z zewnętrznego przewodu słuchowego od psów z klinicznymi objawami, otitis externa przedstawia tabela 1. Od 47 psów (75,5%) wyosobniono szczepy z rodzaju *Staphylococcus* (64,1%), *Streptococcus* (12,5%), *Proteus* (10,9%), *Pseudomonas* (6,2%), *Escherichia* (6,2%). Największy odsetek stanowiły szczepy *Staphylococcus*, które okazały się dominującym czynnikiem infekcyjnym. Spośród 41 szczepów poddanych analizie 19 zidentyfikowano jako *S. intermedius*, 9 jako *S. aureus*, 2 jako *S. hominis* i po jednym szczepie jako: *S. hyicus*, *S. cohnii*, *S. xylosus* i *S. haemolyticus* (tab. 2). Z powodu nietypowych reakcji biochemicznych nie udało się określić przynależności gatunkowej 7 szczepów.

Również Wnuck (19) w swoich badaniach izolował z różnych postaci otitis externa dość dużą liczbę szczepów gronkowcowych. Od 102 psów wyosobnił 91-krotnie *Micrococcus pyogenes aureus*, 37-krotnie *Proteus vulgaris*, 28-krotnie *Pseudomonas aeruginosa* oraz dużą liczbę grzybów. Zbliżone wyniki badań bakteriologicznych uzyskał także Korte (12). Stwierdził, że spośród wszystkich 45 izolatów od 34 psów z otitis externa największą liczbę stanowiły gronkowce (21 izolatów) i *Pseudomonas* (9 izolatów). Natomiast Scupin i wsp. (16) wyosobnili od 180 psów z otitis externa tylko 55 szczepów, wśród których wyróżnili *Pseudomonas* sp. (41,8%), *Micrococcus* (36,4%), *E. coli* (5,5%), *Proteus* (1,8%), *Streptococcus* (1,8%) i inne. Zupełnie odmienne wyniki uzyskali Grono i wsp. (10), którzy notowali istotny statystycznie wzrost tylko takich bakterii, jak *Pseudomonas* i *Proteus*.

Z przeglądu piśmiennictwa wynika, że częstość występowania poszczególnych bakterii przy otitis externa jest zróżnicowana. Do najczęściej spotykanych drobnoustrojów należą jednak gronkowce, które również we własnych badaniach okazały się dominującą florą bakteryjną.

Jednym z ważniejszych czynników, na które zwraca się uwagę przy otitis externa, jest stan zdrowotny skóry. Według Fräsera (7), aż w 38% stan kliniczny skóry miał wpływ na wystąpienie stanu zapalnego ucha zewnętrznego. Obecnie uważa się, że wśród drobnoustrojów związanych ze schorzeniami skóry ważne miejsce zajmują: *S. intermedius* i *S. aureus* (13, 17). Ponadto u psów na skórze stwierdza się obecność gronkowców koagulazododatnich, takich jak: *S. xylosus*, *S. hominis*, *S. saprophyticus* i innych (17). Występowanie tak różnych gatunków gronkowców u psów tłumaczy się tym, że psy mogą się kontaktować z człowiekiem oraz z różnymi gatunkami zwierząt. W wyniku ciągłości skóry, stanowiącej również wyściółkę zewnętrznego przewodu słuchowego, nie można wykluczyć udziału tych gronkowców w infekcji ucha. W przeprowadzonych badaniach własnych stwierdzono również, że największy odsetek stanowiły koagulazododatnie szczepy *S. intermedius* i *S. aureus*, a więc podobnie jak w schorzeniach skóry. Natomiast pozostałe gatunki koagulazoujemne, takie jak: *S. hominis*, *S. hyicus*, *S. cohnii*, *S. xylosus*, *S. haemolyticus* występowały nielicznie jedynie w pojedynczych przypadkach. Można więc sądzić, że nie odgrywają one większej roli w etiologii zapalenia ucha zewnętrznego u psów.

Wyzolowane szczepy gronkowców koagulazododatnich zbadano pod względem wrażliwości na antybiotyki (tab. 3). Uzyskane wyniki wskazują, że najczęściej szczepów wykazuje oporność na penicylinę (89,3%), ampicylinę (75%), oksytetracyklinę (78,6%), natomiast najbar-

Tab. 1. Wyniki badań bakteriologicznych wymazów z zewnętrznego przewodu słuchowego od psów z otitis externa

Rodzaj bakterii	Liczba szczepów	% n=64
<i>Staphylococcus</i>	41	64,1
<i>Streptococcus</i>	8	12,5
<i>Proteus</i>	7	10,9
<i>Pseudomonas</i>	4	6,2
<i>Escherichia</i>	4	6,2

Tab. 2. Gatunki gronkowców wyosobnionych od psów z otitis externa

Gatunek	Liczba	% n=41
<i>S. intermedius</i>	19	46,3
<i>S. aureus</i>	9	22,0
<i>S. hominis</i>	2	4,9
<i>S. hyicus</i>	1	2,4
<i>S. cohnii</i>	1	2,4
<i>S. xylosus</i>	1	2,4
<i>S. haemolyticus</i>	1	2,4
nie określony	7	17,1

Tab. 3. Wrażliwość na antybiotyki koagulazododatnich szczepów *Staphylococcus* wyizolowanych od psów z otitis externa

Antybiotyki	Stopień wrażliwości					
	wrażliwy		słabo wrażliwy		oporny	
	liczba	% n=28	liczba	% n=28	liczba	% n=28
Gentamycyna	22	78,6	3	10,7	3	10,7
Neomycyna	17	60,7	8	28,6	3	10,7
Erytromycyna	13	46,4	5	17,8	10	35,7
Chloramfenikol	12	42,8	6	21,4	10	35,7
Streptomycyna	12	42,8	2	7,1	14	50,0
Kloksacylina	10	35,7	2	7,1	16	57,1
Oksytetracyklina	3	10,7	3	10,7	22	78,6
Kolistyna	2	7,1	7	25,0	19	67,8
Ampicylina	2	7,1	5	17,8	21	75,0
Penicylina	2	7,1	1	3,6	25	89,3

dziej wrażliwe okazały się na gentamycynę (78,6%) i neomycynę (60,7%). Zaobserwowano dużą liczbę szczepów opornych równocześnie na kilka antybiotyków. Nie stwierdzono jednak żadnego szczepu, który byłby oporny jednocześnie na wszystkie badane antybiotyki.

Na uwagę zasługuje fakt, że podobne wyniki uzyskali Tkaczowa i wsp. (18) badając wrażliwość na 22 antybiotyki koagulazododatnich gronkowców złocistych, ale pobranych od chorych ludzi leczonych w klinikach Akademii Medycznej we Wrocławiu. Najwięcej szczepów wykazywało oporność na penicylinę, oksytetracyklinę i sulfatiazol, a najbardziej wrażliwe były między innymi na gentamycynę. Również przy leczeniu ropnego zapalenia skóry u psów wywołanego przez gronkowce jako najskuteczniejsze okazały się gentamycyna i neomycyna, a dużą oporność stwierdzono na penicylinę (13). Odmienne natomiast wyniki uzyskali Scupin i wsp. (16) oraz Korte (12) oznaczając antybiotykowrażliwość gronkowców wyosobnionych z otitis externa. Scupin i wsp. spośród 20 badanych szczepów stwierdzili, że wszystkie były wrażliwe na erytromycynę, 17 na streptomycynę, a na penicylinę aż 16. Korte (12) nie notował już tak wysokiej wrażliwości wyizolowanych gronkowców. I tak

wśród 21 izolatów 8 było wrażliwych na chloromycetynę, 7 na aureomycynę, 6 na streptomycynę, a tylko 2 na penicylinę.

Jak wynika z powyższych danych, trudno wskazać, który z dostępnych antybiotyków może być skuteczny, w każdym bowiem przypadku lek powinien być dobrany na podstawie określenia stopnia wrażliwości drobnoustroju. Z własnych obserwacji można wnioskować, że najbardziej skuteczne w leczeniu *otitis externa* u psów winny być gentamycyna i neomycyna.

Powszechnie uważa się, że problem zakażeń gronkowcowych w aspekcie terapii nabiera coraz większego znaczenia, a stale wzrastający asortyment antybiotyków i chemioterapeutyków nie wpływa na zahamowanie tempa narastania oporności drobnoustrojów (5, 15, 18). Dlatego niekiedy do celów terapeutycznych, szczególnie przy zakażeniach ropnych skóry, zatok, uszu itp., używane są szczepionki lub autoszczepionki (8, 9, 13). Z uwagi na fakt, iż gronkowce koagulazododatnie w badaniach własnych okazały się dominującą florą bakteryjną, zakażenia przez nie wywołane przebiegały najczęściej przewlekłe i były trudne do wyleczenia przy pomocy dostępnych antybiotyków, w celach terapeutycznych sporządzono szczepionkę. Wyniki uzyskane po zastosowaniu szczepionki u 10 psów z klinicznymi objawami *otitis externa*, potwierdzonymi badaniem bakteriologicznym na obecność gronkowców były zadowalające. Terapia okazała się jednak nieskuteczna w 2 przypadkach, a u 1 psa nastąpił nawrót choroby. Na ogół nie stwierdzono u leczonych zwierząt reakcji poszczepiennych, za wyjątkiem jednego przypadku, w którym zaobserwowano u psa nieznaczne podwyższenie tem-

peratury ciała, apatię, utratę apetytu, a które ustąpiły po 2 dniach od chwili iniekcji. Badania przeprowadzone przez nas wykazują pozytywne efekty lecznicze szczepionki i przemawiają za celowością jej stosowania u psów w niektórych przewlekłych stanach zapalnych ucha zewnętrznego, wywoływanych przez gronkowce.

Piśmiennictwo

1. Baird-Parker A. C., Hill L. R., Kloos W. E., Kocur M., Oeding P., Schleifer K. H.: Int. J. Syst. Bacteriol. 26, 333, 1976.
2. Biobel H., Brückler J., Kitzorov D., Schaeg W.: Tierärztl. Umsch. 32, 350, 1977.
3. Christoph H. J., Freudiger U.: Ohren, w: Klinik der Hundekrankheiten, red. U. Freudiger, E. G. Grünbaum, E. Schinke: t. 1, VEB Gustav Fischer Verlag, Jena 1986.
4. Chwojnowski A.: Medycyna Wet. 7, 678, 1951.
5. Cybulski Z., Gostyński M.: Mat. XVIII Zjazdu PTM, Lublin, 42, 1975.
6. Devriese L. A., Poutrel B., Kilpper-Bälz R., Schleifer K. H.: Int. J. Syst. Bacteriol. 33, 480, 1983.
7. Fraser G.: Vet. Rec. 73, 55, 1961.
8. Giedrys-Galant S.: Med. dośw. 39, 65, 1987.
9. Giedrys-Galant S.: Med. dośw. 39, 83, 1987.
10. Grono L. R., Frost A. J.: Austr. vet. J. 45, 420, 1969.
11. Hájek V.: Int. J. Syst. Bacteriol. 26, 401, 1976.
12. Korte G.: Gleintier-Prax. 7, 209, 1962.
13. Mayr A., Selmair J., Schels H.: Tierärztl. Umsch. 42, 112, 1987.
14. Meyer W.: Zentbl. Bakt. Abt. 1 Orig. 201, 465, 1966.
15. Samet A., Nieradko J., Nowicki B.: Mat. XVIII Zjazdu PTM, Lublin, 40, 1975.
16. Scupin E., Scupin E.: Kleintier-Prax. 16, 4, 1971.
17. Schwennicke J.: Inaugural-Dissertation, Tierärztliche Hochschule Hannover 1985.
18. Tkaczowa A., Orłowska B., Szyba K., Wiczorek B., Jaworska-Błach B.: Mat. XVIII Zjazdu PTM, Lublin, 38, 1975.
19. Wnuck E.: Praca dokt., Tierärztliche Hochschule, Hannover 1965.

Adres autora: dr Zdzisław Staroniewicz, ul. Sopocka 21 m 6, 50-344 Wrocław

CHOROBY ZAKAŻNE I INWAZYJNE

JANUSZ A. MADEJ
Wrocław

Białaczka jako efekt kaskady zmian molekularnych

Białaczka jest przykładem nieodwracalnych zmian patologicznych o charakterze autonomicznym, przekraczających granice kompensacji fizjologicznej. Uważana jest za zespół immunopatyczny powodowany nabytymi zaburzeniami limfocytów.

Leukozogeneza jest złożonym, wieloetapowym procesem nowotworowym, którego mechanizm, mimo wielu badań, nie został jeszcze w pełni poznany.

W klasycznym ujęciu onkogenezy rozróżnia się trzy etapy:

- 1 — etap inicjacji, w którym czynnik kancerogeny po przedostaniu się do wnętrza komórki uszkadza jej DNA. Okres ten nosi nazwę fiksacji kancerogenu i może być jeszcze odwracalny.
- 2 — etap promocji, w którym zmiany dotyczą już genotypu, a większość czynników inicjujących rozwój nowotworu przekształca się w związki elektro- i nukleofilne, łatwo łączące się z makrocząsteczkami komórkowymi (37). Z czasem komórka ulega pełnej transformacji nowotworowej.
- 3 — etap progresji, w którym następuje wzrost zmienionych nowotworowo komórek. W tym okresie dopiero nowotwór może być rozpoznany klinicznie, gdyż zazwyczaj osiąga on pewną masę i objętość, a popu-

lacja guza liczy ok 1×10^9 komórek (5). Przeważnie wzrost nowotworu przebiega niepowstrzymanie i podwaja on swoją masę przeciętnie co 90 dni (33). Należy jednakże zaznaczyć, że przejście kolejnych etapów onkogenezy nie jest automatyczną konsekwencją procesów inicjacji (3, 7).

Celem niniejszego opracowania jest potrzeba przedstawienia aktualnych poglądów na wieloetapowość leukozogenezy z uwzględnieniem efektów kaskady zmian molekularnych zachodzących w komórce.

I Etap — zaburzenia biofizyczne

Zaburzenia biofizyczne w komórce mogą być spowodowane różnymi kancerogennymi czynnikami fizycznymi (21). Zaburzenia te wyraża się wzorami matematycznymi (22) i są one pierwszymi bardzo trudnymi do prześledzenia etapami zmian patologicznych komórki, prowadzącymi do zróżnicowania biofizycznego (ryc. 1). Procesy biofizyczne obejmują takie zjawiska, jak: entropia i entalpia, nadprzewodnictwo, pole magnetyczne i inne (23, 24), a więc znajdujące się na poziomie elektronowo-fotonowo-fononowym (bioplazmy), czyli na etapie opisanym przez mechanikę kwantową (34). Przykła-