

ZBIGNIEW ANUSZ

Warszawa

Kliniczna przydatność metod badania wrażliwości drobnoustrojów chorobotwórczych na antybiotyki i sulfonamidy

W chwili obecnej badanie wrażliwości drobnoustrojów chorobotwórczych wywołujących proces chorobowy jest jednym z podstawowych działań bakteriologii klinicznej i odgrywa niezwykle ważną rolę w doborze odpowiedniego środka leczniczego. Dla klinicysty istotne znaczenie ma nie tylko wstępna ocena wrażliwości, ale również śledzenie jej zmian w czasie przeprowadzonego leczenia. Pozwala to na ewentualną zmianę w dawkowaniu lub dobór właściwszego leku.

Wśród podstawowych metod badania wrażliwości drobnoustrojów należy wymienić: 1) metodę seryjnych rozcieńczeń w podłożu płynnym, 2) metodę seryjnych rozcieńczeń w podłożu agarowym, 3) metodę dyfuzji w podłożu stałym i jej odmiany: a) metodę cylinderkową, b) metodę krążkowo-bibułową, 4) przyspieszone metody badania wrażliwości. Najdokładniejszą z w/w metod jest metoda seryjnych rozcieńczeń w podłożu płynnym. Ze względu jednak na swą pracochłonność, kosztowność oraz konieczność posługiwania się w badaniach czystą hodowlą bakteryjną obecnie jest rzadko wykonywana. Stosuje się ją zwykle wtedy, kiedy zachodzi konieczność dokładnego oznaczenia siły działania leku w mcg/ml; rutynowo jest wykonywana jedynie przy określaniu wrażliwości prątka gruźliczego na streptomycynę, hydrazyd, PAS. Wrażliwość drobnoustrojów oznaczamy badając ich wzrost w obecności różnych rozcieńczeń chemoterapeutyków, przy czym zakres używanych rozcieńczeń winien mieścić się w granicach między najwyższym stężeniem leku we krwi, a znanym stężeniem hamujących szczep kontrolny. W wypadku kiedy drobnoustrój został wycielowany z moczu, zakres stężenia należy zwiększyć do poziomu jaki znajduje się w moczu. Podłoże używane do w/w badań winno mieć skład następujący: 60 ml bulionu odżywczego, 15 ml 10 proc. glukozy w wodzie destylowanej, 10 ml nasyconego roztworu czerwieni fenolowej, 25 ml jałowej surowicy końskiej (Florey, 1951).

Sposobem badania wrażliwości, który w znacznym stopniu przewyższa trudności i wady metody seryjnych rozcieńczeń jest metoda krążkowo-bibułowa z dyfuzją w agarze (Vincent, Vincent, 1949) opracowana i wprowadzona w Polsce po raz pierwszy przez Gawenda-Dzierżyńską (1955). Polega ona na określaniu wielkości stref zahamowania wzrostu badanego drobnoustroju na podłożu stałym. Strefy te powstają na agarze dookoła krążków bibułowych nasyconych różnymi antybiotykami, które dyfundują do podłoża; strefa zahamowania

jest tym większa im wrażliwszy jest drobnoustrój. Ponadto istnieje cały szereg czynników, które mogą również wywierać wpływ na wielkość strefy zahamowania wzrostu takich jak pH, skład podłoża, wielkość i rodzaj inoculum, stężenie agaru. Wpływ w/w czynników w odniesieniu do badań wrażliwości pałeczek czerwonkowych wykazuje bardzo wyraźnie praca Anusza (1962). I tak przy ocenie wpływu pH na wielkość strefy zahamowania wzrostu stwierdzono, że każdy antybiotyk posiada działanie optymalne w odpowiednim pH (np. aureomycyna pH 5, streptomycyna pH 7—8). Interesujące wyniki otrzymano również przy określaniu wpływu rodzaju podłoża na wynik badania wrażliwości. Otrzymane dane wskazywały na brak różnic w wielkości stref zahamowania na agarze z krwią oraz na agarze zwykłym z dodatkiem glukozy. Natomiast w porównaniu z tymi podłożami na podłożu SS i Levina strefy zahamowania były bardzo wyraźnie powiększone, a różnice dochodziły do 14 mm. Zauważono przy tym, że podłoże Levina nie nadaje się do badań wrażliwości na sulfonamidy (brak strefy zahamowania wzrostu), co można wytłumaczyć obecnością w podłożu błękitu metylenowego, inhibitora sulfonamidów. Podłożem nie nadającym się do badania wrażliwości sulfonamidów jest również 2 proc. agar z glikozą. Wprawdzie strefa zahamowania jest tu widoczna, ale w jej obrębie obserwuje się wzrost drobnoustrojów wrażliwych, co utrudnia właściwą ocenę wrażliwości. Wytłumaczenie tego faktu należy szukać między innymi w hamującym wpływie glukozy na działanie sulfonamidu (Gerudo, 1949). Okazało się też, że wielkość stref zahamowania wzrostu jest odwrotnie proporcjonalna do koncentracji agaru w podłożu, przy czym jest rzeczą interesującą, że już przy stężeniu 4 proc. różnice w wielkości stref zahamowania dochodzą do 7 mm. Śledząc wpływ ilości drobnoustrojów na wielkość strefy zahamowania wzrostu wykazano, że im większe inoculum tym większa tendencja do zmniejszenia strefy zahamowania. Zagadnieniem bardzo istotnym jest również szybkość wzrostu badanego drobnoustroju. Jest rzeczą oczywistą, że im szybszy będzie wzrost bakterii tym mniejsza będzie strefa zahamowania. Ilustracją tego zjawiska może być spostrzeżenie, że w przypadku nie wstawienia do ciepłarki płytek z badanymi drobnoustrojami bezpośrednio po posiewie, a tym samym uniemożliwienia drobnoustrojom normalnego wzrostu dochodzi do powiększenia strefy zahamowania wzrostu. Potwierdzają to również obserwacje własne, które wskazują, że użycie podłoża hamujących

wzrost drobnoustrojów (podłoże SS i Levina) prowadzi do bardzo wyraźnego powiększenia stref zahamowania wzrostu. Dlatego też w ocenie wrażliwości należy uwzględnić różne rozcieńczenia, w zależności od tego czy używamy do badań hodowli 2-, czy 24-godzinne.

Krażki produkowane przez Warszawską Wytwórnę Surowic i Szczepionek zawierają następujące ilości antybiotyków: krażki z penicyliną — 10 j., ze streptomycyną — 100 mcg, z chloromycetyną — 50 mcg, z aureomycyną — 20 mcg, z terramycyną — 30 mcg, z erytromycyną — 10 mcg, z neomycyną — 30 mcg, z tetracykliną — 30 mcg. Wyniki odczytuje się mierząc średnice stref zahamowania (wraz z krażkiem) wg następującego schematu: wrażliwy — 30 mm i więcej, średnio-wrażliwy — 29 — 25 mm, słabo-wrażliwy — 24 — 20 mm, oporny — 19 — 13 mm.

Oznaczanie wrażliwości na sulfonamidy jest połączone z pewnymi trudnościami, ponieważ podłoże używane do badań, jak i hodowle bakteryjne mogą zawierać substancje hamujące działanie sulfonamidów. W/w trudności usunęli Harper i Causton (1945), którzy stwierdzili, że substancje hamujące działanie sulfonamidów są neutralizowane przez czynnik zawarty w czerwonych krwinkach. W związku z czym w badaniach należy posługiwać się podłożem z dodatkiem krwi. Piśmiennictwo dotyczące badań wrażliwości drobnoustrojów na sulfonamidy jest skąpe, a wyniki badań często rozbieżne. Wydaje się, że rozbieżności w/w badań mają swoje największe źródło w nieujednoliconej i niewłaściwej metodyce badań. Bliższe dane dotyczące oznaczania wrażliwości drobnoustrojów przedstawia wyczerpująco praca: „Krażkowo-bibułowa metoda badania wrażliwości pałeczek czerwonych na sulfonamidy w modyfikacji własnej i jej zastosowanie do badań rutynowych” (Anusz, 1961). W oparciu o tę metodę Warszawska Wytwórnia Surowic i Szczepionek podejmuje w br. produkcję sulfonamidowych krażków bibułowych.

Cenną zaletą metody krażkowo-bibułowej jest dokładna zgodność z metodą seryjnych rozcieńczeń (od 90 do 100 proc.) i szybka ocena wrażliwości badanych drobnoustrojów dzięki możliwości zastosowania badania bezpośredniego. Ważne jest przy tym, aby badania bezpośrednie były zawsze poprzedzane mikroskopowymi badaniami patologicznego materiału. Pozwoli to bowiem na stwierdzenie jakości (hodowla jednorodna czy mieszana) oraz ilości badanych drobnoustrojów. Uzyskane dane pozwolą na uwzględnienie w badaniu właściwym możliwie niskich rozcieńczeń badanych hodowli. Badanie bezpośrednie jest metodą zasługującą na szersze, niż dotychczas stosowanie i to nie tylko ze względu na znaczne skrócenie czasu badań, lecz również ze względu na możliwość jednoczesnej oceny wrażliwości wielu różnych drobnoustrojów znajdujących się w badanym

środoisku. Wiadomo bowiem, że w skupisku drobnoustrojów chorobotwórczych spotkać możemy szczepy tego samego gatunku ale o różnym stopniu wrażliwości zarówno wrażliwe jak i odporne. W takim przypadku badanie wrażliwości jednego tylko szczepu, a nie całej populacji może zatrzeć nam właściwy obraz i nie pozwoli na wyjaśnienie braku działania chemoterapeutyku. Nic więc dziwnego, że badanie wrażliwości metodą bezpośrednią nie tylko skraca czas badań, ale jest równocześnie metodą dającą najbardziej prawidłowe wyniki, a w związku z tym i mniejsze możliwości błędu ze względu na większą zbieżność między badaniami wrażliwości a wynikami w leczeniu (Lesińska, Nowosielska-Zgórnjak, 1960; jak również obserwacje własne w odniesieniu do badań wrażliwości pał. czerwonej na podłożu SS). Stosując tę metodę, należy uwzględnić i jej ujemne cechy np. możliwość zahamowania wzrostu drobnoustrojów wrażliwych przez bakterie odporne oraz niemożność dokładnego określenia wielkości inoculum. Istnieje tu zatem potrzeba wykonania dodatkowych badań kontrolnych, które wskazywałyby czy wszystkie drobnoustroje w czasie badania diagnostycznego są wrażliwe na zastosowany lek.

W ostatnich latach prace nad metodami badania wrażliwości poszły w kierunku maksymalnego skrócenia czasu ich wykonania. Szczególnie interesujące wyniki otrzymali autorzy (Rogers i wsp. 1955; Pital i wsp. 1956; Bass i wsp. 1957; Sorensen, 1959), używający przy pomiarze wzrostu badanych drobnoustrojów wskaźników redukujących. (Hb krwi, rezazuryna, chlorek trójfenylotetrazolowy). Czas potrzebny do odczytania wyników badań wrażliwości przy zastosowaniu tych metod został skrócony do 2—5 godzin.

Pomimo niewątpliwiej roli jaką w chwili obecnej spełnia oznaczanie wrażliwości drobnoustrojów wobec antybiotyków i sulfonamidów, nie wolno zapominać o stosunkowo często występującej niezgodności między wynikami leczenia a laboratoryjnym oznaczaniem wrażliwości. Zagadnienie to wymaga szerszego omówienia, ze względu na panujące wśród klinicystów, często wręcz przeciwstawne poglądy, co do przydatności w/w badań w klinice. Właściwa ocena tych nieuniknionych zresztą rozbieżności jest trudna i wymaga uwzględnienia całego szeregu różnych czynników. Jako przykład mogą posłużyć wyniki badań Rybakowej i Stapińskiej (1961) dotyczące niezgodności między badaniami *in vitro* a *in vivo*, w zależności od postaci schorzenia. Odnośne badania wykonane w II Klinice Chorób Zakaźnych AM u chorych na czerwonkę wykazały, że wyniki leczenia sulfaguanidyną i chloromycetyną były w zdecydowanej większości przypadków zgodne z antybiogramami szczepów (Anusz i wsp. 1960). Jako przykład niepełnej korelacji między wrażliwością na antybiotyki z wynikami

leczenia może posłużyć zakażenie *S. typhi*. Pałeczki te wykazują *in vitro* szerokie spectrum wrażliwości na wiele znanych antybiotyków (chloromycetyna, terramycyna, aureomycyna, neomycyna, streptomycyna), gdy w leczeniu duru brzuszego najskuteczniejszym lekiem, a więc lekiem z wyboru jest chloromycetyna.

Istotnym momentem wymagającym uwzględnienia przy analizie korelacji między badaniami wrażliwości drobnoustrojów na antybiotyki a ich skutecznością w leczeniu jest trudna do usunięcia możliwość błędnej interpretacji, co do narastania oporności drobnoustrojów w czasie leczenia. Załóżmy, że doszło do zakażenia drobnoustrojami wrażliwymi i opornymi na stosowany antybiotyk z przewagą jednak drobnoustrojów wrażliwych. U chorego takiego w początkowym okresie leczenia niewątpliwie zaobserwujemy wyraźną poprawę. W miarę jednak coraz silniejszego narastania drobnoustrojów opornych, a znikania drobnoustrojów wrażliwych, dojdzie do pogorszenia się stanu chorobowego. Podobny przebieg choroby możemy zaobserwować jednak i wtedy, gdy jej przyczyną są tylko drobnoustroje wrażliwe na stosowany antybiotyk i reagujące w sposób zgodny z oceną badania wrażliwości. Zdarzyć się to może w wypadku reinfekcji drobnoustrojami tego samego gatunku opornymi na stosowany antybiotyk a pochodzącymi od innych chorych lub osób z otoczenia, zwłaszcza od personelu opiekującego się chorym. Taki przebieg choroby może stworzyć fałszywy pogląd, że mamy do czynienia ze zjawiskiem nabywania oporności pod wpływem leczenia. W niektórych przypadkach udaje się wykazać zmianę wrażliwości badanego szczepu w trakcie przeprowadzania jego izolacji. Np. obserwuje się nieraz, jak szczep *Streptococcus pyogenes* oporny na antybiotyki *in vitro* staje się wrażliwy w trakcie przesiewów podczas izolacji, co znowu może być przyczyną poważnego w następstwie błędu.

W ocenie zgodności wyników badań *in vitro* a *in vivo* uwzględnić należy również rodzaj stosowanego antybiotyku. Narastanie bowiem oporności drobnoustrojów nie występuje z jednakową siłą w stosunku do wszystkich antybiotyków. Na przykład w stosunku do chloromycetyny oporność narasta bardzo powoli, a w stosunku do streptomycyny bardzo szybko. Inny jest rytm nabywania oporności wobec penicyliny, gdzie procent szczepów opornych podlega ustawicznemu dużym wahaniom. Skojarzone stosowanie antybiotyków może w dużym stopniu osłabić i opóźnić występowanie oporności.

Poważny wpływ na wynik leczenia antybiotykami ma również proces zapalny. Wiadomo na przykład, że stężenie penicyliny w płynie tkankowym w ognisku zapalnym jest zwykle wyższe niż w danej chwili we krwi. Sugeruje się nawet, że w takich stanach chorobowych,

jak zapalenie opon mózgowo-rdzeniowych wzmożone przechodzenie penicyliny do płynu mózgowo-rdzeniowego może posłużyć jako wczesny objaw rozpoznawczy. Inne antybiotyki (chloromycetyna, w mniejszym stopniu tetracykliny) nie posiadają takiej łatwości przenikania do przestrzeni podoponowych, jak penicylina i streptomycyna. Niemniej poziom chloromycetyny wprowadzonej *per os* jest również wysoki w płynie mózgowo-rdzeniowym jak w krwi, i w razie oporności drobnoustrojów wywołujących zapalenie opon mózgowo-rdzeniowych antybiotyki te można z powodzeniem zastąpić chloromycetyną (McCrum i wsp. 1954; Seelemann i wsp. 1955; Kassur i wsp. 1959). Wynik leczenia antybiotykami uzależniony jest również od charakteru zmian anatomo-patologicznych w miejscu zapalenia. Znane są bowiem przypadki (np. *endocarditis ulcerosa*), w których, mimo stwierdzonej wrażliwości czynnika etiologicznego, a nawet uzyskania przejściowej poprawy klinicznej, dochodzi do zejścia śmiertelnego z powodu utrudnionego dostępu antybiotyku do martwiczego ogniska (Kędrowa, 1957; Daikos i wsp. 1960; Lindheimer i wsp. 1961).

Krytyczne uwagi co do korelacji wyników badań wrażliwości *in vitro* i *in vivo* nie dyskwalifikują omówionych uprzednio badań wrażliwości. Wskazują one jedynie, że w ich interpretacji konieczny jest pewien krytycyzm ze strony klinicysty. Stanowią one bardzo cenną wskazówkę wytyczającą właściwy kierunek leczenia i zasługują na szersze niż dotychczas wykorzystanie w medycynie weterynaryjnej.

Piśmiennictwo

1. Anusz Z.: Med. Dośw. i Mikrob. 1961, 12, 407.
2. Anusz Z.: Wiad. Lek. 1962 (w druku).
3. Anusz Z., Grabiński A., Narębski J.: Przegl. Epid. 1960, 14, 267.
4. Bass A., Engly B., Mitchell B., Blocker G.: Antibiotics Chemother. 1957, 7, 166; 1957, 7, 160.
5. Brown J., Besk W., Woodward M., Porter P.: Amer. J. Clin. Path., 1961, 30, 10.
6. Daikos G., Weinstein L.: Klin. Wschr. 1960, 11, 521.
7. Florey W.: Antibiotics, 1951, London cyt. wg Stokes.
8. Gawenda-Dzierżyńska J., Polak T.: Pol. Tyg. Lek. 1955, 10, 1361.
9. Gawenda-Dzierżyńska J., Wasiewicz J.: Med. Dośw. i Mikrob. 1956, 8, 879.
10. Gerudo J.: Texas Rep. Biol. Med. 1949, 7, 409.
11. Hanbery W.: Neurology 1954, 4, 301.
12. Kassur B., Migdalska-Kassurova B., Hornik J.: Antybiotyki w chorobach zakaźnych, 1959, Warszawa.
13. Kędrowa S.: Pol. Tyg. Lek., 12, 1622.
14. Lesińska B., Zgórnjak-Nowosielska L.: Pol. Tyg. Lek. 1960, 15, 134.
15. Lindheimer W., Schoop W., Kossling F.: Dtsch. med. Wschr. 1961, 86, 1960.
16. McCrum B. F., Hall E., Imburg J., Meridith A.: J. A.M.A. 1951, 162, 469.
17. Pital A., Designe T., Leise M.: Antibiotics Chemother. 1956, 6, 351.
18. Rogers M., Ryan W., Sevens J.: Antibiotics Chemother. 1955, 5, 382.
19. Rybakowa S., Stapińska J.: Przegl. Epid. 1961, 15, 115.
20. Seelemann K., Kornatz-Stagman B.: Dtsch. med. Wschr. 1955, 80, 1088.
21. Sorensen R.: Medical Techn. Bull. 1950, 10, 144.
22. Stokes E.: Clinical Bacteriology 1960, London.
23. Vincent G., Vincent W.: Proc. Soc. Exptl. Med. 1944, 55, 162.

Adres autora: Zbigniew Anusz, Warszawa, Baboszeńska 6 m. 72.