

# Sub-inhibicyjne stężenia antybiotyków a wykrywalność pałeczek *Salmonella*

HANNA RÓŻAŃSKA, BOLESŁAW WOJTOŃ

Zakład Higieny Żywności Pochodzenia Zwierzęcego Państwowego Instytutu Weterynaryjnego,  
Al. Partyzantów 57, 24-100 Puławy

Różańska H., Wojtoń B.

## Sub-inhibitory levels of antibiotics and *Salmonella* spp. isolation

### Summary

The influence of the selected levels of streptomycin and neomycin (below Minimal Inhibitory Concentration – MIC) on the growth of *Salmonella enteritidis* and *Salmonella typhimurium* in nutrient broth and minced meat was evaluated. The results indicated that the sub-inhibitory levels of these antibiotics decreased the number of *Salmonella* both in nutrient broth and in minced meat, as well as the biochemical activity of *Salmonella* especially in regard to sugar utilisation, in addition weakening their motility on the Modified Semi-Solid Rappaport Vasiliadis Medium (MSRV). Further studies have showed that the treatment of chickens infected experimentally with *Salmonella enteritidis* make the possibility of isolating this pathogen from the carcasses difficult. The results confirmed the possibility of antibiotic residues in the tissues of treated animals influencing the results of microbiological examinations and the sanitary-veterinary evaluation of meat.

**Keywords:** antibiotics, *Salmonella*, detection of *Salmonella*.

Jednym z efektów obecności pozostałości antybiotyków w tkankach leczonych nimi zwierząt, mleku lub jajach może być, wg niektórych danych piśmiennictwa (1, 16, 22, 27, 28) i spostrzeżeń praktyków, hamujący wpływ na mikroflorę. W skrajnych przypadkach może to prowadzić do uzyskania negatywnego wyniku badania mikrobiologicznego, albo też wyniku lepszego, niż wynikałoby to z rzeczywistego stanu zanieczyszczenia bakteryjnego badanych prób. Z praktyki terenowej znane są przypadki celowego dodawania antybiotyków lub innych substancji o działaniu przeciwbakteryjnym do mleka dla przedłużenia jego świeżości przez zahamowanie wzrostu bakterii. Niektórzy autorzy wskazują również na możliwość blokowania rozwoju typowych dla określonych jednostek chorobowych zmian anatomo-patologicznych przez obecne w organizmach zwierząt antybiotyki, co może być przyczyną istotnych z punktu widzenia epidemiologii i epizootologii przeoczeń w badaniu poubojowym i w rezultacie niewłaściwej oceny sanitarno-weterynaryjnej badanych tusz (25, 29). Niewiele prac eksperymentalnych dotyczy tego problemu, szczególnie w odniesieniu do mechanizmów działania sub-inhibicyjnych poziomów antybiotyków na te cechy morfologiczne i biochemiczne drobnoustrojów, w tym patogennych, które mają istotne znaczenie w diagnostyce laboratoryjnej.

Pałeczki *Salmonella* pozostają najczęściej notowanym czynnikiem etiologicznym zatruc pokarmowych po spożyciu żywności zwierzęcego pochodzenia. Z tego powodu wymagania co do ich obecności w surowcach i produktach zwierzęcego pochodzenia są bardzo surowe (wymóg nieobecności w 25 g), a właściwe wykonywanie badań i ich interpretacja – szczególnie istotne. Stąd też celowe wydawało się podjęcie badań zmierzających do wyjaśnienia, czy i w jakim stopniu obecność sub-inhibicyjnych poziomów antybiotyków może wpływać na wykrywanie pałeczek *Salmonella* w żywności.

### Materiał i metody

W badaniach uwzględniono *Salmonella enteritidis* i *Salmonella typhimurium*, które uznawane są za główne czynniki etiologiczne zatruc pokarmowych w Polsce. Badane szczepy pochodziły z kolekcji muzealnej Zakładu Mikrobiologii PIWet. Do badań wybrano dwa powszechnie stosowane w lecznictwie weterynaryjnym antybiotyki, tj. streptomycynę i neomycynę, określając na wstępie wartość minimalnego stężenia hamującego (Minimal Inhibitory Concentration – MIC) dla badanych szczepów salmoneli. W odniesieniu do neomycyny wartość MIC ustalona metodą rozcieńczeń w bulionie wynosiła dla obu szczepów 2,0 µg/ml, natomiast streptomycyny: 7,5 µg/ml dla *S. enteritidis* i

10,0 µg/ml dla *S. typhimurium*. Doświadczenia miały na celu określenie wpływu wybranych, niższych od MIC poziomów streptomycyny i neomycyny na cechy morfologiczne salmoneli, ich wzrost w bulionie odżywczym (BHI) i w mięsie mielonym oraz zdolność ruchu i aktywność biochemiczną. W drugim etapie wykonano badania nad wpływem podawania streptomycyny na izolowanie *S. enteritidis* od doświadczalnie zakażonych kurcząt.

**Badania morfologiczne.** Dokonywano oceny mikro- (preparaty barwione metodą Grama) i makroskopowej (wielkość i charakter kolonii na agarze zwykłym i podłożu XLD) pałeczek *Salmonella* hodowanych w bulionie BHI bez i z dodatkiem wybranych poziomów neomycyny i streptomycyny.

**Badania hodowlane.** Wzrost *S. enteritidis* i *S. typhimurium* w bulionie BHI bez i z dodatkiem wybranych stężeń streptomycyny i neomycyny oceniano metodą pośrednią, przez pomiar zmętnienia 24-godzinnej hodowli bulionowej w porównaniu do czystego bulionu oraz metodą bezpośrednią, poprzez obliczanie liczby salmoneli w 1 ml takiej hodowli wg ogólnie przyjętych zasad. Badano również wpływ wybranych poziomów obu antybiotyków na liczbę *Salmonella* spp. w 1 g inokulowanego mięsa mielonego.

**Wpływ sub-inhibicyjnych poziomów streptomycyny i neomycyny na zdolność ruchu salmoneli.** Badano zdolność ruchu salmoneli z 24-godzinnej hodowli w bulionie BHI bez i z dodatkiem wybranych stężeń streptomycyny i neomycyny, wyrażoną wielkością stref rozlewnego wzrostu na półpłynnym podłożu MSRV (Modified Semi-Solid Rappaport Vasiliadis, Oxoid). W centrum płytki nanoszono po 20 µl 24-godzinnej hodowli bulionowej i po inkubacji mierzono średnice stref wzrostu.

**Badanie wpływu wybranych poziomów neomycyny i streptomycyny, na aktywność biochemiczną salmoneli.** Do badań biochemicznych z zastosowaniem komercyjnych zestawów diagnostycznych EPL (High TechLab) oraz API 20E (BioMerieux) użyto 24-godzinnych hodowli salmoneli w bulionie BHI bez i z dodatkiem wybranych poziomów antybiotyków. Badania wykonywano zgodnie z zaleceniami producentów.

**Izolowanie *S. enteritidis* od doświadczalnie zakażonych kurcząt otrzymujących streptomycynę.** Grupę doświadczalną stanowiło ogółem 40 kurcząt w wieku ok. 5 tygodni, o średniej masie ciała 1,10 kg. Po 7-dniowej kwarantannie badano wymazy z kloaki od wszystkich kurcząt dla wykluczenia zakażenia pałeczkami *Salmonella*. Kurczęta podzielono na 4 grupy wg następującego schematu:

- grupa I – 8 sztuk – nie zakażone, nie leczone;
- grupa II – 8 sztuk – zakażone, nie leczone;
- grupa III – 12 sztuk – zakażone, leczone jednorazowo;
- grupa IV – 12 sztuk – zakażone, leczone dwukrotnie.

Kurczęta zakażano *per os*, z wodą do picia, zawierającą *S. enteritidis* w koncentracji ok.  $10^6$  jtk/l. Następnie 12 kurczętom (grupa III) jednorazowo, po 24 godzinach, a 12 (grupa IV) dwukrotnie, tj. po 24 i 48 godzinach po zakażeniu podano streptomycynę, z wodą do picia, w ilości 5 g/l. Kurczęta poddano codziennej obserwacji. Po 4 dniach od zakażenia kurczęta poddano ubojowi, pobierając z zacho-

Tab. 1. Wzrost *S. enteritidis* i *S. typhimurium* w bulionie BHI z dodatkiem streptomycyny i neomycyny mierzony zmętnieniem bulionu\*

Poziomy antybiotyków (µg/ml)	<i>Salmonella enteritidis</i>	<i>Salmonella typhimurium</i>
<b>Streptomycyna</b>		
0	1,835	1,838
1,00	1,691	1,716
2,00	1,600	1,589**
3,00	1,417**	1,486**
4,00	1,236**	1,489**
5,00	0,277**	1,386**
<b>Neomycyna</b>		
0	1,826	1,720
0,25	1,692	1,589
0,50	1,732	1,543
1,00	1,404**	1,211**
1,50	0,028**	0,049**

Objaśnienia: \* średnia wartość ekstynkcji z 5 serii badań; \*\* różnice statystycznie istotne przy  $p \leq 0,05$ .

Tab. 2. Liczba *S. enteritidis* i *S. typhimurium* w bulionie BHI w zależności od poziomu streptomycyny i neomycyny\*

Poziomy antybiotyków (µg/ml)	<i>Salmonella enteritidis</i>	<i>Salmonella typhimurium</i>
<b>Streptomycyna</b>		
0	8,0531	8,2900
1,00	7,1673	7,4265
2,00	6,5132**	6,8797**
3,00	6,2175**	6,4232**
4,00	5,2553**	5,9638**
5,00	4,5065**	5,4116**
<b>Neomycyna</b>		
0	7,7959	7,7497
0,25	7,3715	6,8791**
0,50	5,9925**	6,3892**
1,00	5,7411**	5,7627**
1,50	4,3075**	4,6946**

Objaśnienia: \* średnia liczba jtk w 1 ml bulionu z 4 serii oznaczeń wyrażona w logarytmach dziesiętnych; \*\* różnice statystycznie istotne przy  $p \leq 0,05$ .

waniem zasad aseptyki wymazy z kloaki, wycinki mięśni piersiowych, wątrobę i nerki, które następnie badano na obecność pałeczek *Salmonella* wg ogólnie przyjętych zasad, tj. namnażając w zbuforowanej wodzie peptonowej, przesiewając do bulionu Rappaporta-Vasiliadis, a następnie na podłoże agarowe XLD. Po wybraniu charakterystycznych kolonii wykonywano aglutynację z surowicą poliwalentną, a następnie po przesiewie na bulion BHI – badania biochemiczne.

### Wyniki i omówienie

W tab. 1 i 2 przedstawiono wyniki badań nad wpływem sub-inhibicyjnych poziomów streptomycyny i neomycyny na wzrost *S. enteritidis* i *S. typhimurium* w bulionie BHI, mierzonych zarówno stopniem zmętnienia bulionu, jak i liczbą *Salmonella* spp. w 1 ml. W obu układach modelowych stwierdzono hamowanie wzrostu salmoneli pod wpływem wybranych poziomów streptomycyny i neomycyny, proporcjonalnie do wzrostu stężeń antybiotyków. Tę samą prawidłowość obserwowano w odniesieniu do sztucznie inokulowanego mielonego mięsa wieprzowego (tab. 3). Jak się wydaje, za zmniejszenie liczby salmoneli w warunkach doświadczenia odpowiadają podobne mechanizmy, jak podawane przez innych autorów (2, 7, 11, 19), tj. wydłużenie lag-fazy lub wszystkich faz wzrostu oraz zmniejszenie liczby w fazie stacjonarnej, a także zmiany degeneracyjne komórek, od wytwarzania sferoplastów, jako przejściowej formy ochronnej,

Tab. 3. Wzrost *S. enteritidis* i *S. typhimurium* w mięsie mielonym w obecności wybranych poziomów streptomycyny i neomycyny\*

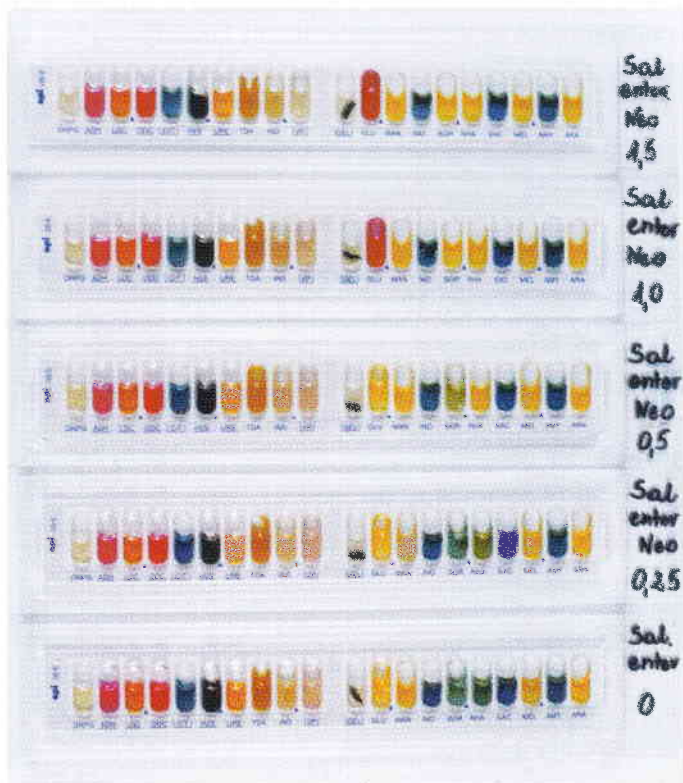
Poziomy antybiotyków (µg/ml)	<i>Salmonella enteritidis</i>	<i>Salmonella typhimurium</i>
<b>Streptomycyna</b>		
0	7,4639	6,9800
2,0	5,8209**	6,3560
5,0	4,3839**	5,1643**
<b>Neomycyna</b>		
0	7,4265	7,5366
0,5	6,1761**	6,8129
1,0	5,3652**	6,0000**
2,0	4,2718**	4,5391**

Objaśnienia: \* średnia liczba jtk w 1 g tkanki z 5 serii oznaczeń, wyrażona w logarytmach dziesiętnych; \*\* różnice statystycznie istotne przy  $p \leq 0,05$ .

aż do filamentacji i lizy komórek. Podobny efekt hamujący obserwowali m.in. Denys i wsp. (5) w odniesieniu do działania sub-inhibicyjnych poziomów tiamycyny, ciprofloksacyny i cefalosporyn na *Escherichia coli* oraz Periti i Nicoletti (19). Humbert i wsp. (13) wykazali redukcję liczebności *S. enteritidis* pod wpływem enrofloksacyny.

W badaniach własnych obserwowano tylko nieznaczne zmiany morfologii kolonii *Salmonella* na agarze zwykłym i podłożu XLD, wyrażające się nieco mniejszymi rozmiarami kolonii i ich opóźnionym wyczernianiem w stosunku do kultur kontrolnych, hodowanych bez antybiotyków. Podobnie w preparatach mikroskopowych obserwowano nierówne wybarwienie się komórek. Jak można sądzić, jest to spowodowane opisywanymi przez Al-Sama i wsp. (2) zaburzeniami w budowie ścian komórkowych i syntezie makromolekuł, a intensywność tych zmian pozostaje w związku z rodzajem i poziomem antybiotyku oraz czasem ekspozycji bakterii na te substancje.

Zdolność ruchu jest istotną cechą salmoneli, charakterystyczną dla wszystkich gatunków z wyjątkiem *S. pullorum-gallinarum*. W badaniach własnych, przy zastosowaniu półpłynnego podłoża MSR/V wykazano, że inkubowanie *S. enteritidis* i *S. typhimurium* w obecności wybranych stężeń streptomycyny i neomycyny zmniejszało zdolność ruchu salmoneli, mierzoną średnicą strefy wzrostu (ryc. 1). Strefy wzrostu były tym mniejsze, im wyższy był poziom antybiotyku. Wydaje się, że musi to pozostawać w związku z ogólnymi zaburzeniami budowy i metabolizmu komórek, opisanymi wyżej. Uszkodzenie bądź niewykształcenie się rzęsek może z kolei prowadzić do zmian aktywności antygenowej, istotnej w diagnostyce salmoneli.



Ryc. 1. Ograniczenie zdolności ruchu *Salmonella enteritidis* na podłożu MSR/V przez wybrane poziomy streptomycyny

Tab. 4. Wpływ podawania streptomycyny na izolowanie *S. enteritidis* od doświadczalnie zakażonych kurcząt

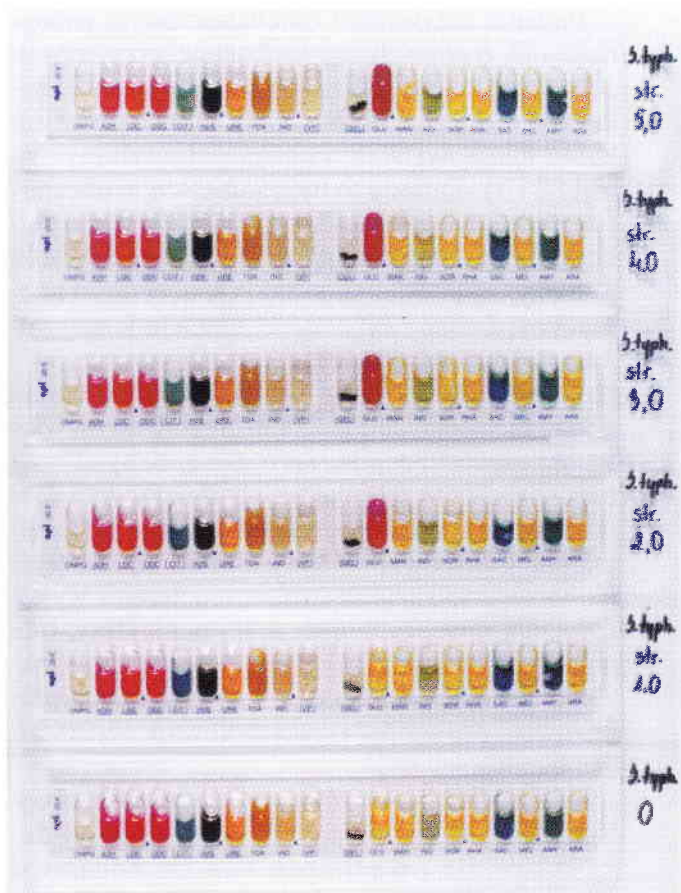
Grupa doświadczalna	Numer ptaka	Wyniki badań			
		wymazy z kloaki	mięśnie	wątroby	nerki
I Kontrola: nie zakażone, nie leczone	1	-	-	-	-
	2	-	-	-	-
	3	+	-	-	-
	4	-	-	-	-
	5	-	-	-	-
	6	-	-	-	-
	7	-	-	-	-
	8	-	-	-	-
II Zakażone, nie leczone	1	+	-	-	-
	2	+	-	-	-
	3	-	-	-	-
	4	-	-	-	-
	5	+	-	+	+
	6	+	-	+	-
	7	+	-	+	+
	8	+	-	+	+
III Zakażone, leczone jednorazowo	1	+	-	-	-
	2	-	-	-	-
	3	-	+	+	+
	4	+	-	+	-
	5	-	-	-	-
	6	+	-	-	-
	7	+	-	-	+
	8	-	-	-	-
	9	+	-	+	+
	10	+	-	+	-
	11	+	-	+	+
	12	+	-	+	-
IV Zakażone, leczone dwukrotnie	1	-	-	-	-
	2	-	-	-	-
	3	-	-	-	-
	4	-	-	-	-
	5	+	-	-	-
	6	+	-	-	-
	7	-	-	-	-
	8	-	-	-	-
	9	-	-	+	-
	10	-	-	-	-
	11	-	-	-	-
	12	-	-	-	-

Objaśnienia: + wynik pozytywny, - wynik negatywny.

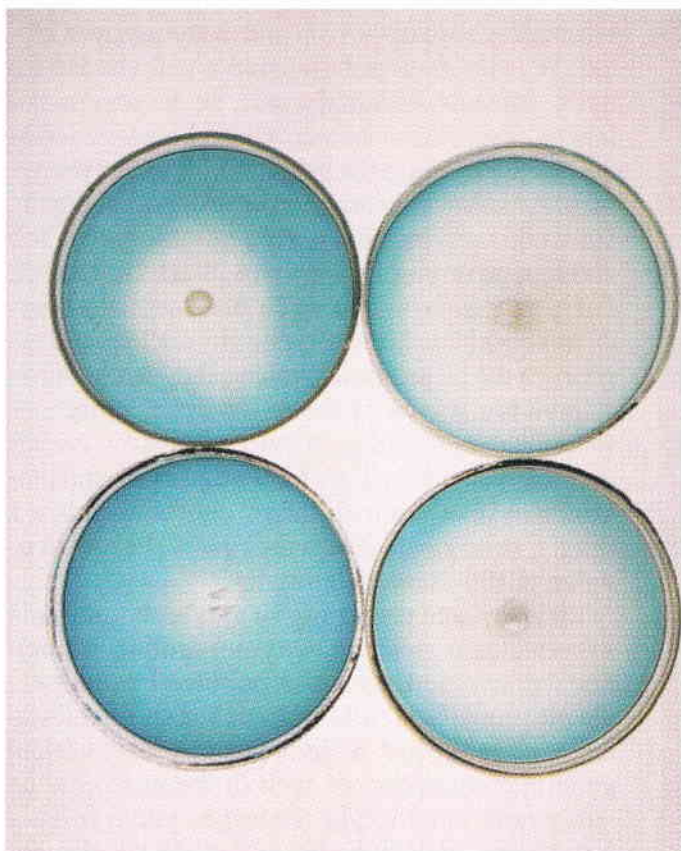
Badania aktywności biochemicznej *S. enteritidis* i *S. typhimurium*, wykonane przy użyciu zestawów diagnostycznych EPL i API 20E wykazały widoczne zmiany cech biochemicznych kultur inkubowanych w obecności antybiotyków (ryc. 2 i 3). Zmiany te były mniejsze w obecności streptomycyny i dotyczyły wykorzystania glukozy, natomiast istotniejsze, dotyczące rozkładu glukozy, sorbitolu i ramnozy – w obecności neomycyny. Zmiany aktywności biochemicznej salmoneli były tym wyraźniejsze, iż wyższe były poziomy antybiotyków i prowadziły do zmian „kodu biochemicznego”, a w efekcie do niewłaściwej identyfikacji bakterii. Na zmiany aktywności biochemicznej bakterii pod wpływem subinhibicyjnych poziomów antybiotyków wskazują m.in. Chen i wsp. (4), wg których np. *Listeria monocytogenes* wykazywała zmniejszenie wykorzystania glukozy w obecności penicyliny. Inni autorzy wskazują na zaburzenia wytwarzania toksyn przez drobnoustroje pod wpływem subinhibicyjnych poziomów antybiotyków (6, 12, 20, 21, 26, 27, 30).

Wyniki badań nad wpływem podawania streptomycyny na izolowanie *S. enteritidis* od doświadczalnie zakażonych kurcząt podano w tab. 4. Z przedstawionych danych wynika, że dwukrotne, a w mniejszym stopniu jednorazowe podanie streptomycyny w istotny sposób ograniczało możliwość izolowania salmoneli z mięśni i narządów wewnętrznych oraz z wymazów z kloaki. Wydaje się to potwierdzać wyniki badań innych autorów wskazujących, że w przypadku leczniczego stosowania antybiotyków u zwierząt można się liczyć z trudnościami diagnostycznymi przy izolowaniu drobnoustrojów patogennych, spowodowanymi obecnością antybiotyków lub efektem poantybiotykowym (3, 8-10, 14, 15, 18). Fakt, że u doświadczalnych ptaków nie stwierdzano objawów klinicznych salmonelozy ani typowych dla tej jednostki zmian sekcyjnych, mimo relatywnie wysokiej dawki zarazka, może potwierdzać usposabiającą rolę warunków zoohigienicznych hodowli i właściwego żywienia ptaków w wyzwoleniu objawów chorobowych, a z drugiej strony potwierdza możliwość bezobjawowego nosicielstwa salmoneli.

Liczne prace wskazują, że antybiotykoterapia salmoneloz u zwierząt, w tym u drobiu, zmniejsza wprawdzie liczebność populacji salmoneli, ale nie umożliwia całkowitej dekontaminacji stada, a ponadto jest niejednokrotnie czynnikiem generującym oporność tych drobnoustrojów na stosowane antybiotyki. Ponadto, jak wynika z innych prac, należy się liczyć z możliwością uaktywnienia się zakażeń oportunistycznych (8, 10, 13, 14, 17, 23, 24).



Ryc. 2. Zmiany aktywności biochemicznej *S. enteritidis* pod wpływem subinhibicyjnych stężeń neomycyny



Ryc. 3. Aktywność biochemiczna *S. typhimurium* w zależności od poziomu streptomycyny

Znaczenie epidemiologiczne i epizootologiczne salmoneloz pozostaje bez dyskusji. Na podstawie przedstawionych badań oraz danych piśmiennictwa można stwierdzić, że antybiotykoterapia może często utrudniać diagnostykę w zakresie tych patogenów, stąd też musi być prowadzona w sposób rozważny, z uwzględnieniem wszystkich możliwych efektów.

### Wnioski

1. Sub-inhibicyjne stężenia streptomycyny i neomycyny ograniczają wzrost *S. enteritidis* i *S. typhimurium* w bulionie i mięsie mielonym oraz zmniejszają ich aktywność biochemiczną i zdolność ruchu.

2. Podawanie streptomycyny kurczętom doświadczalnie zakażonym *S. enteritidis* utrudnia izolowanie tego drobnoustroju z tuszek.

### Piśmiennictwo

- Adams M.: Factor affecting growth and survival of microorganisms. Advanced Course in Food Microbiology. University of Surrey, 15 June – 5 July, 1997, Working paper.
- Al-Sam S., Linton A. H., Bennett P. M., Hinton M.: J. Appl. Bacteriol. 75, 108, 1993.
- Błaszczak B., Rzewuska M., Binek M.: Medycyna Wet. 52, 392, 1996.
- Chen L.-J., Wang J., Levin R. E.: Letters Appl. Bacteriol. 22, 13, 1996.
- Denys A., Kalisz J., Szczerba W., Kowalska M.: Medycyna Dośw. 46, 181, 1994.
- Doss S. A., Tillotson G. S., Amys S. G. B.: J. Appl. Bacteriol. 75, 23, 1993.
- Ene L., Tiron S.: Proc. 2<sup>nd</sup> World Congress Foodborne Infections and Intoxications, Berlin 1986, s. 743.
- Evangelisti D. G., English A. R., Girard A. E., Lynch J. E., Solomons I. A.: Antimicrobial Agents 8, 664, 1975.
- Gedek B.: Proc. Round Table Conference, Wien, 1981, s. 24.
- Girard A. E., English A. R., Evangelisti D. A., Lynch J. E.: Antimicrobial Agents 10, 89, 1976.
- Greenwood D., Eley A.: J. Infect. Dis. 145, 110, 1982.
- Hinton R. A., Orr J. H.: Antibiotics Chemotherapy 5, 865, 1960.
- Humbert F., Carramiñana J. J., Lalande F., Salvat G.: Vet. Rec. 141, 297, 1997.
- Jarolmen H., Shirk R. J., Langworth B. F.: J. Appl. Bacteriol. 40, 153, 1976.
- Korzeniewska-Rybicka I., Rewerski W.: Farmacja Pol. 52, 304, 1996.
- Kurek Cz.: Życie wet. 62, 37, 1987.
- Layton H. W., Langworth B. F., Jarolmen H., Simkins K. L.: Zbl. Vet. Med. B. 22, 461, 1975.
- McOrist S.: WHO Meeting on the Medical Impact of the Use of Antimicrobial Drugs in Food Animals. Berlin, Oct. 13-17, 1997. Working paper.
- Periti P., Nicoletti P.: Proc. Internat. Workshop.: Pharmacokinetics and Antibiotic Efficacy, Anacapri, 22 ottobre 1985, s. 59.
- Pliszka A.: Bakteryjne zatrucia pokarmowe. PZWL, Warszawa, 1976, s. 63.
- Rokosz A., Rouyan G. S., Meisel-Mikolajczyk F.: Med. Dośw. 49, 153, 1997.
- Różańska M., Kwiatek K.: Życie wet. 62, 37, 1987.
- Różańska M., Samorek-Dziewanowska E.: Medycyna Wet. 27, 337, 1971.
- Różańska M., Samorek-Dziewanowska E.: Medycyna Wet. 28, 599, 1972.
- Schaper J.: Hemmstoffnachweis (Antibiotika) bei normal- und krankengeschlachteten Rindern, Kälbern und Schweinen. Praca dokt., Tierärztliche Hochschule, Hannover, 1970.
- Schmit B.: Współczesne poglądy związane z oddziaływaniem antybiotyków na mechanizmy obronne organizmu: „Host defence concept”. Referat, PTNW, Puławy, 1986.
- Shibl A. M.: J. Infect. Dis. 5, 865, 1983.
- Skibniewska A. K., Smoczyński S. S.: Przegl. Mlecz. Nr 5, 4, 1989.
- Tropilo J.: Wpływ pozostałości antybiotyków w tkankach zwierzęcych na ocenę sanitarno-weterynaryjną mięsa. Praca hab., SGGW-AR, Warszawa, 1978.
- Yoh M., Frimpong E. K., Honda T.: FEMS Immunol. 19, 57, 1997.