

JAN KRZYŻANOWSKI, WOJCIECH STUDNICKI, TADEUSZ PELC, TADEUSZ BRZOZOWSKI

Badania doświadczalne nad wrażliwością dr obnoustrojów wyizolowanych z wydzieliny zapalnej gruczołu mlekowego krów na klej cyjanoakrylowy in vitro

Z Instytutu Chorób Niezakaźnych
Wydziału Weterynaryjnego AR w LublinieZ Instytutu Chemii Organicznej PAN
w Warszawie

Spośród licznych badań, jakie poświęcono klejom chirurgicznym pochodnym kwasu alfa cyjanoakrylowego, szereg prac dotyczy także ich działania bakteriostatycznego i bakteriobójczego wobec drobnoustrojów (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8). Badania takie przeprowadzono zarówno *in vitro* jak i na zwierzętach doświadczalnych. W eksperymentach klinicznych starano się ustalić działanie kleju użytego do zespalandia ran zakażonych, a w badaniach laboratoryjnych wrażliwość zarówno form wegetatywnych jak i przetrwalnikowych wielu rodzajów bakterii na różne pochodne kwasu alfa cyjanoakrylowego. Badania laboratoryjne miały także dać odpowiedź na pytanie, czy kleje używane do zespalandia tkanek posiadają właściwości samosterylizujące, co z praktycznego punktu widzenia posiada duże znaczenie. W eksperymencie klinicznym ustalono, że użycie kleju do zespalandia ran skóry zainfekowanych gronkowcami skutecznie hamowało ropienie rany, skracając tym samym czas gojenia (1, 2, 8). Rany takie goiły się przez rychłozrost, a w przebiegu ich gojenia nie stwierdzono różnic w porównaniu z ranami kontrolnymi. W badaniach laboratoryjnych udowodniono, że kleje chirurgiczne, o jakich mowa, nie posiadają właściwości samosterylizujących w odniesieniu do zarodników zarówno bakterii tlenowych jak i beztlenowych (5, 7). W odniesieniu zaś do wegetatywnych form bakterii jedni autorzy wykazali, że kleje chirurgiczne posiadają właściwości bakteriostatyczne, a nawet bakteriobójcze (1, 2), podczas gdy inni (5) twierdzą, że tylko niektóre kleje używane do zespalandia tkanek wykazują tę właściwość i to w stosunku do części drobnoustrojów chorobotwórczych.

Rozbieżne wyniki badań nad wrażliwością bakterii na kleje chirurgiczne produkowane na świecie, pozytywne wyniki doświadczeń własnych w leczeniu ran zakażonych (8) zespalandia estrem n-butylovym kwasu alfa cyjanoakrylowego otrzymanym w Polsce oraz brak doniesień w piśmiennictwie na temat jego działania na drobnoustroje skłoniły nas do podjęcia tego rodzaju badań.

Materiał i metody

Do badań użyto 100 szczepów gronkowców, 50 szczepów *E. coli* oraz 100 szczepów drożdżaków. Wszystkie użyte do badań szczepy zostały wyizolowane z wydzieliny zapalnej gruczołu mlekowego krów. Charakterystykę biochemiczną gronkowców zestawiono w tab. 1, a pałeczek *E. coli* w tab. 2.

Tab. 1. Właściwości biochemiczne badanych szczepów gronkowców

Wielkość	Liczba szczepów	Białka warstwowo	Wytwarzanie koagulatu		Wytwarzanie śluzowatych		Fermentacja cukrow									
			+	-	+	-	laktoza	gluktoza	sacharoz	glukoz	maltoza	+	-	+	-	
alfa	5	5	0	5	5	0	4	1	3	2	3	2	5	0	5	0
beta	57	57	3	54	57	0	46	11	48	9	52	5	55	2	49	8
brak	36	36	20	16	35	3	34	4	38	0	34	4	36	0	34	5
ogółem	100	100	23	77	97	3	64	16	69	11	68	11	76	2	68	12

Diagram wrażliwości gronkowców i pałeczek *E. coli* na penicylinę, streptomycynę, chloromycetynę, tetracyclinę i neomycynę oznaczono metodą płytkowo-dyfuzyjną przy użyciu krążków bibułowych produkcji Warszawskiej Wytwórni Surowic i Szczepionek. Do oznaczania wrażliwości gronkowców i pałeczek *E. coli* zarówno na antybiotyki jak i na klej używano 2% pożywki agarowej z dodatkiem 10% odwiłknionej krwi baraniej. Płytki Petriego z podłożem podsuszano przed użyciem w cieplarni, a następnie na powierzchni rozprawdzano po około 0,05 ml 18 godzinnej bulionowej hodowli danego szczepu po uprzednim rozcieńczeniu bulionem w stosunku 1:100.

Tab. 2. Właściwości biochemiczne badanych szczepów *E. coli*

Hemoliza	Liczba szczepów	Wytwarzanie inakty		Próba MR		Fermentacja cukrow											
		+	-	+	-	laktoza	sacharoz	mannitol	dulcitol	+	-	+	-				
alfa	40	41	1	42	0	42	0	20	22	42	0	27	15	25	17	42	0
beta	8	8	0	8	0	8	0	3	5	8	0	4	4	5	3	8	0
ogółem	50	49	1	50	0	50	0	23	27	50	0	31	19	30	20	50	0

Po nałożeniu na powierzchnię zakażonego podłoża krążków bibułowych nasyconych antybiotykami, lub kropli kleju (0,03 ml), płytki inkubowano w temperaturze 37°C przez okres 18 godzin. Po okresie inkubacji określano średnicę stref zahamowania wzrostu drobnoustrojów dla antybiotyków i kleju. Średnica spolimeryzowanej na powierzchni płytki kropli kleju wahała się w granicach 6–8 mm. Badanie kontrolne, mające na celu sprawdzenie aktywności antybiotyków zawartych w krążkach oraz jakości podłoża wykonywano przy użyciu szczepu wzorcowego *Staphylococcus aureus* 209P. Wrażliwość drożdżaków na klej określano także metodą płytkowo-dyfuzyjną. Na powierzchni płytek ze stałym podłożem Sabourauda rozprawdzano po około 0,05 ml zawiesiny komórek drożdżaków w płynie fizjologicznym, a następnie na-

noszono kroplę kleju (0,03 ml). Płytki inkubowano w temperaturze 37°C przez okres 24 godzin, po czym określano średnicę stref zahamowania wzrostu drożdżaków wokół spolimeryzowanej kropli kleju. Użyty do badań klej (monomer estru n-butyłowego kwasu alfa cyanoakrylowego) otrzymano laboratoryjnie w Instytucie Chemii Organicznej PAN. Badania laboratoryjne przeprowadzono z dwoma seriami tego kleju, które różniły się jedynie datą produkcji. Jedna seria została wyprodukowana 10 miesięcy przed rozpoczęciem badań, a druga bezpośrednio przed badaniami.

Tab. 3. Diagram wrażliwości szczepów gronkowców na antybiotyki i klej

Hemoliza	Liczba szczepów	Peni-cylina			Strepto-mycyna			Chlora-mycetyna			Terra-mycyna			Neo-mycyna			Klej						
		##	++	+	##	++	+	##	++	+	##	++	+	##	++	+	+°	-°					
alfa	5	5	0	0	3	2	0	0	5	0	0	4	1	0	0	3	2	0	0	5	0		
beta	57	34	7	5	11	29	13	3	12	37	2	7	11	11	12	5	29	22	13	5	17	57	0
Brak	38	29	2	2	5	22	8	1	7	29	1	4	4	18	0	2	18	25	5	1	7	38	0
Ogółem	100	68	9	7	16	54	23	4	19	71	3	11	13	33	13	7	47	50	20	6	24	100	0

Wyniki

Wrażliwość badanych szczepów gronkowców na wybrane antybiotyki i klej zestawiono w tab. 3. Z zawartych w niej danych wynika, że klej działał bakteriostatycznie na wszystkie gronkowce, podczas gdy znaczna liczba szczepów nie wykazywała wrażliwości na badane antybiotyki. Wrażliwość pałeczek *E. coli* na antybiotyki i klej zestawiono w tab. 4, z której

Tab. 4. Diagram wrażliwości szczepów *E. coli* na antybiotyki i klej

Hemoliza	Liczba szczepów	Peni-cylina			Strepto-mycyna			Chlora-mycetyna			Terra-mycyna			Neo-mycyna			Klej						
		##	++	+	##	++	+	##	++	+	##	++	+	##	++	+	+°	-°					
alfa	42	0	0	3	39	0	8	10	24	8	10	2	22	0	0	4	38	1	7	18	16	24	18
beta	8	0	0	0	8	3	1	1	3	5	1	1	2	1	1	4	0	2	3	3	7	7	1
Ogółem	50	0	0	3	47	3	9	11	27	13	11	3	23	2	1	5	42	1	9	21	19	31	19

Objaśnienia: +++ = wrażliwy (średnica strefy zahamowania wzrostu 30 mm lub więcej); ++ średnio wrażliwy (średnica strefy zahamowania wzrostu 29–25 mm); + = słabo wrażliwy (średnica strefy zahamowania wzrostu 24–20 mm); - = oporny (średnica strefy zahamowania wzrostu 19–13 mm); +° = wrażliwy (średnica strefy zahamowania wzrostu 19–10 mm); -° = oporny (średnica strefy zahamowania wzrostu poniżej 10 mm).

wynika, że aż 19 szczepów na 50 badanych nie wykazywało wrażliwości na klej, przy czym znacznie więcej było szczepów opornych wśród tych, które posiadały zdolność rozpuszczania czerwonych krwinek. Należy jednak podkreślić, że odsetek szczepów *E. coli* opornych na działanie kleju był niższy od odsetka szczepów niewrażliwych na działanie któregokolwiek z badanych antybiotyków. O wrażliwości drożdżaków na klej informują dane zawarte w tab. 5. Z danych tych wynika, że poszczególne szczepy wykazywały różną wrażliwość na działanie kleju, co znajdowało wyraz w różnych wielkościach średnicy stref zahamowania wzrostu. Z ogólnej liczby 100 badanych szczepów drożdżaków tylko 2 były odporne na działanie kleju. Przeprowadzone badania z klejami dwu

różnych serii, różniących się tylko datą produkcji, nie wykazały różnicy w sile ich bakteriostatycznego działania na badane drobnoustroje.

Tab. 5. Diagram wrażliwości drożdżaków na klej

Liczba szczepów	Średnica strefy zahamowania wzrostu w mm			
	40-30	29-20	19-10	oporny
100	9	31	58	2

Omówienie wyników

Przeprowadzone badania wrażliwości wybranych rodzajów bakterii oraz drożdżaków na klej i niektóre antybiotyki wykazały, że monomer estru n-butyłowego kwasu alfa cyanoakrylowego produkcji polskiej, podobnie jak badane antybiotyki, nie w każdym przypadku hamował wzrost badanych drobnoustrojów. Najwięcej szczepów niewrażliwych na działanie badanego kleju stwierdzono wśród pałeczek hemolizujących *E. coli*, bo aż 18 na 24. Wśród badanych szczepów *E. coli* nie posiadających zdolności rozpuszczania czerwonych krwinek stwierdzono wprawdzie tylko 1 oporny na działanie kleju, lecz mała ilość badanych szczepów nakazuje ostrożność w wyciąganiu wniosków. Z podobnych powodów trudno także wyciągać daleko idące wnioski co do zdolności hamującego wzrostu działania kleju wobec gronkowców, mimo iż nie stwierdzono szczepów opornych. Ostrożność w ocenie otrzymanych wyników badań podyktowana jest jeszcze i tym, że wszystkie badane drobnoustroje zostały wprawdzie wyosobnione z klinicznych przypadków zapaleń gruczołu mlekowego, ale tylko jednego gatunku zwierząt. Wśród badanych szczepów gronkowców i pałeczek *E. coli*, z których wszystkie posiadały cechy biochemiczne świadczące o ich patogenności, na odnotowanie zasługuje występowanie dużej ilości szczepów opornych na działanie każdego z badanych antybiotyków. Praktyczne znaczenie może mieć natomiast stwierdzenie wrażliwości drożdżaków na klej chirurgiczny. Drobnoustroje te bowiem, jak to wynika z wielu doniesień, są przyczyną schorzeń płuc, nerek, wątroby, śledziony a także wsierdza, a za tym narządów, na których zabiegi chirurgiczne z użyciem kleju wykonywane są coraz częściej. Będąca dopiero w trakcie opracowywania klasyfikacja użytych do niniejszych badań drożdżaków nie pozwala na ich bliższe określenie. Opublikowane wyniki badań własnych (9) jak również dane z piśmiennictwa wskazują, że drożdżaki wywołujące zapalenia gruczołu mlekowego u krów należą najczęściej do rodzaju *Candida* (*C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. pseudotropicalis*). Są to zatem te same drożdżaki, jakie w świetle danych z piśmiennictwa bywają przyczyną szeregu przewlekłych i wyniszczających schorzeń u ludzi.

Wnioski

1. Wśród 100 badanych szczepów gronkowców nie stwierdzono opornych na działanie kleju.

2. Spośród 50 badanych szczepów *E. coli* 19 było opornych na działanie kleju.

3. Na 100 badanych szczepów drożdżaków 2 nie wykazywały wrażliwości na klej.

4. Stwierdzono znaczne różnice w sile bakteriostatycznego działania kleju na poszczególne szczepy drożdżaków.

5. Nie stwierdzono różnic w sile bakteriostatycznego działania kleju o różnych datach produkcji.

Piśmiennictwo

1. Awe W. C., Roberts W., Braunwald N. S.: Surgery, 54, 332, 1963.
2. Hennessy R. C., Thompson R. K., Arnold J. G.: Surgery, 60, 744, 1966.
3. Kwietniak K., Orszulok J.: Pol. Tyg. lek. 23, 65, 1968.
4. Matsumoto T.: Arch. of Surgery, 96, 226, 1968.
5. Matsumoto T., Dobek A. S., Pani K. C., Kovaric J. J., Hamit H. T.: Arch. of Surgery, 97, 527, 1968.
6. Noszczyk W., Kulicki M.: Pol. Prz. Chir. 42, 4, 1970.
7. Page R. C., Borick P. M.: Arch. of Surgery, 94, 162, 1967.
8. Studnicki W., Rubaj B., Krzyżanowski J., Brzozowski T.: Medycyna Wet. 30, 16, 1974.
9. Wołoszyn S., Krzyżanowski J., Ziolo T.: Medycyna Wet. 20, 332, 1964.

Adres autora: dr Jan Krzyżanowski, 20-040 Lublin, ul. Sołwińskiego 7/23.

Кшижановский Я., Студницки В., Пэлыц Т., Бжозовский Т. — Экспериментальные исследования по чувствительности выделенных при мастите из секрета молочной железы микробов и цианоакрилового клею *in vitro*.

Целью работы было исследование хирургического клея (мономера эстра п-бутил альфа цианоакрило-

вой кислоты) на способность торможения роста микробов. Лабораторные исследования провели на 100 штаммах стафилококков, 50 штаммах палочек *E. coli* и 100 штаммах дрожжевидных грибов. Все взятые для исследования штаммы были изолированы из молока коров больных маститом. Чувствительность микробов определяли методом диффузии на чашках Петри. Чувствительными к действию клея оказались: все штаммы стафилококков, 31 штаммов (на 50) — *E. coli*, 98 штаммов (на 100) дрожжевидных грибов. У этих последних степень чувствительности отдельных штаммов была разная. Не обнаружили разниц в силе бактериостатического действия клеев разной даты продукции.

Krzyżanowski J., Studnicki W., Pelc T., Brzozowski T. — **Experimental studies of the sensitivity in vitro of bacteria isolated from cases of mastitis to the cyanacrylis surgical glue.**

The purpose of the work was to establish if a glue (monomer of n-buthylic ester of alpha cyanacrylic acid) obtained on laboratory scale in the Institute of Organic Chemistry of PAN, can inhibit bacterial growth. Laboratory studies were performed on 100 strains of staphylococci, 50 strains of *Escherichia coli* and 100 strains of yeasts. The strains studied were isolated from milk of cattle with clinical mastitis. The sensitivity pattern to surgical glue and certain antibiotics was performed by the plate diffusion method. All staphylococci under study were sensitive to the glue. Nineteen out of 50 *E. coli* strains were resistant to the glue, and out of 100 strains of yeasts only two were resistant. Besides, there were noted significant differences in bacteriostatic action of the glue on different strains of yeasts. There were not observed any differences in bacteriostatic action of different series of the glues examined.

TADEUSZ LIS, JERZY MIERZEJEWSKI
Puławy

Wpływ Foschloru na aktywność lizozymu surowicy krwi świnek morskich

Działanie związków fosforoorganicznych wydaje się rzutować na niektóre procesy immunochemiczne w skażonym organizmie. Stwierdzono m. in. wzrost aktywności komplementu pod wpływem subletalnych dawek estru izopropylowego kwasu metylofluorofosforowego — EIKMf (5, 6). Pod wpływem Terationu i Foschloru występowało zjawisko spadku aktywności tego przeciwciała poprzedzone krótkotrwałym okresem wzmożonej aktywności (4).

Dotychczas pozostaje nie wyjaśniony wpływ związków fosforoorganicznych na aktywność drugiego ważnego przeciwciała naturalnego, jakim jest lizozym.

W dostępnym piśmiennictwie odnotowano jedynie dane dotyczące wpływu niektórych związków cytotatycznych (iperyt azotowy) oraz promieniowania jonizującego na ten enzym (10).

Destrukcyjny wpływ lizozymu na błonę komórkową bakterii czyni je podatnymi na dzia-

łanie innych mechanizmów odpornościowych (9), w tym również na bakteriologiczne działanie komplementu (1). To synergiczne działanie obu przeciwciał odgrywa zasadniczą rolę w procesach bakteriocydyi. Wyjaśnienie zachowania się aktywności lizozymu pod wpływem związków fosforoorganicznych może więc rzucić nowe światło na procesy immunologiczne u organizmów skażonych.

Celem pracy było przebadanie zachowania się aktywności lizozymu w surowicy krwi świnek morskich traktowanych *in vitro* Foschlorrem, jak również w surowicy krwi zwierząt skażonych *in vivo*.

Materiał i metody

Do badań użyto:

1. Foschlor prod. Zakł. Chem. „Azot” w Jaworznie (substancja czynna 50% 0,0-dwuetylofosfonianu 2,2,2-trójchloro-1-hydroksyetylu).