

DANUTA DZIERŻANOWSKA, MIKOŁAJ WILCZYŃSKI, HENRYK LINDA

Wpływ oksytetracyliny jako dodatku do paszy na częstość izolacji lekoopornych pałeczek *E. coli* u kurcząt

Z Zakładu Mikrobiologii AM w Białymstoku

Z Wojewódzkiego Zakładu Higieny Weterynaryjnej
w Białymstoku

Istotnym problemem ostatnich kilkunastu lat jest stale wzrastające zapotrzebowanie na pełnowartościowe białko pochodzenia zwierzęcego. Wśród całego szeregu sposobów zmierzających do osiągnięcia jak największej wydajności hodowlanej zwierząt, szeroko stosowane jest wzbogacanie paszy biologicznymi stymulatorami wzrostu. Do takich stymulatorów, obok witamin i hormonów należy zaliczyć również antybiotyki (2, 4). Wachlarz antybiotyków wykorzystywanych do wzbogacania pasz jest bardzo szeroki; na pierwszym miejscu należy wymienić tu tetracykliny (3). Obok niewątpliwiej roli stymulującej wzrost, antybiotyki mają zmniejszać zapadalność zwierząt na szereg chorób zakaźnych, które są przyczyną poważnych strat hodowlanych (5).

Istnieją jednak ujemne aspekty tego zagadnienia. Pozostawianie resztek antybiotyków w spożywanym mięsie może odgrywać rolę w rozwoju zjawisk nadwrażliwości. Z drugiej zaś strony śladowe ilości np. penicyliny w mleku lub mięsie spożytym przez osoby nadwrażliwe, mogą być przyczyną groźnej nieraz w skutkach reakcji alergicznej (2).

Innym ryzykiem związanym ze spożywaniem produktów żywnościowych zawierających reszki antybiotyków jest fakt selekcyjnego działania antybiotyków na odporne szczepy bakteryjne, będące nośnikami plazmidu zwanego czynnikiem zakaźnej lekooporności R (1, 5).

Należy zwrócić uwagę, że selekcja szczepów lekoopornych może odbywać się w przewodzie pokarmowym zwierząt karmionych paszą wzbogaconą antybiotykami. Znany jest fakt, że zwierzęta będące nosicielami drobnoustrojów lekoopornych, niejednokrotnie są źródłem zakażeń tymi drobnoustrojami dla ludzi. Stanowią potencjalne zagrożenie, zwłaszcza dla osób bezpośrednio związanych z obsługą ferm hodowlanych, czy też dla personelu służby weterynaryjnej (6).

Celem przedstawionej pracy było określenie wpływu oksytetracyliny stanowiącej dodatek do paszy, na częstość izolacji opornych na ten antybiotyk pałeczek *E. coli* z przewodu pokarmowego kurcząt.

Ponadto starano się wyjaśnić czy oporność na tetracykliny u wyodrębnionych z kału kurcząt pałeczek *E. coli* determinowana była plazmidem R.

Materiał i metody

Doświadczenia przeprowadzono na 278 dziesięciotygodniowych brojlerach pochodzących z prywatnej fermy drobiu w Olecku. Użyte w doświadczeniu kurczęta podzielono na dwie grupy. Grupa I obejmowała 213 sztuk drobiu, które otrzymywały przez cały okres tuczu jako karmę, mieszaną przemysłową zawierającą w 1 kg 30 mg oksytetracyliny. Grupa II zawierała 65 sztuk, które otrzymywały również mieszaną przemysłową, lecz bez dodatku antybiotyku.

Z otworów kloacalnych kurcząt pobierano wymazy, które posiewano techniką izolacji na podłoże Endo, co umożliwiło izolację pałeczek *E. coli*.

Stosując technikę seryjnych rozcieńczeń antybiotyków w podłożu stałym, oznaczono u wszystkich wyodrębnionych szczepów *E. coli* wartość MIC dla ampicyliny, streptomycyny, chloromycetyny i oksytetracyliny.

Doświadczenia nad przekazywaniem czynnika oporności R.

Hodowle bulionowe szczepów dawców *E. coli* i biorcę *Klebsiella pneumoniae* 93, mieszano w równych objętościach po 0,5 ml i uzupełniano do 5 ml świeżym bulionem. Tak przygotowane mieszaniny inkubowano przez 18 godzin, po czym pobierano próbki i rozcieńczano w stosunku objętościowym od 10⁻¹ do 10⁻⁶. Hodowle wyjściowe jak również kolejne rozcieńczenia posiewano na podłoża:

a. Simmons — na podłożu tym wzrastały tylko komórki szczepu biorcy.

b. Simmons z dodatkiem oksytetracyliny — 50 µg/ml — wzrastały komórki pałeczek *Klebsiella*, które nabyły cechę oporności na oksytetracynę.

c. Endo — wzrastały komórki *E. coli* i *Klebsiella*. Posiew na podłoże Endo umożliwiał obliczenie stosunku ilościowego komórek dawcy i biorcy w mieszaninie koniugującej.

Badania nad eliminacją cech oporności na oksytetracynę u koniugantów *Klebsiella pneumoniae* — przy wykorzystaniu oranżu akrydyny.

Do doświadczeń stosowano oranż akrydyny w stężeniu 100, 50, 25 µg/ml, co odpowiadało wartościom 1/4, 1/8, 1/16 MIC w stosunku do koniugantów *Klebsiella*.

Hodowle bulionowe z zawartością oranżu akrydyny, badanych szczepów koniugantów po odpowiednim rozcieńczeniu posiewano na podłoże agarowe. Po inkubacji wyrosłe kolonie stosując technikę replik Ledberga przenoszono na podłoże agarowe z zawartością oksytetracyliny — 50 µg/ml podłoża. Postępowanie takie umożliwiło obliczenie liczby kolonii, które utraciły cechę oporności na oksytetracynę. Jednocześnie każdorazowo wykonywano ten sam cykl badań z hodowlą badanego szczepu bez dodatku oranżu akrydyny celem obliczenia odsetka kolonii, które oporność na oksytetracynę traciły spontanicznie.

Wyniki i omówienie

Z wszystkich badanych wymazów pobranych od kurcząt, wyodrębniono szczepy *E. coli*. Wrażliwość szczepów *E. coli* na oksytetracynę przedstawiono w tab. 1.

Tab. 1. Wrażliwość szczepów *E. coli* wyizolowanych z kału kurcząt

Grupa Liczba szczepów	Stężenie oksyterracyliny w µg/ml hamujące wzrost <i>E. coli</i>									
	400	200	100	50	25	12,5	6,25	3,1	1,6	0,8
I-213	14,2	42,2	19,2	10,8	2,81	2,81	0,93	0	0	6,57
II-65	9,23	3,07	3,07	4,6	6,1	1,4	6,1	6,1	7,6	52,3

Objaśnienia: I — kurczęta karmione paszą fabryczną wzbogaconą 30 mg oksyterracyliny/kg; II — kurczęta karmione paszą bez dodatku antybiotyku.

Należy nadmienić, że wszystkie badane drobnoustroje były wrażliwe na pozostałe antybiotyki, tj. ampicylinę, streptomycynę i chloromycetynę.

Dane zawarte w tab. 1 wskazują, że 82,6% pałeczek *E. coli* wyosobnionych od kurcząt karmionych paszą wzbogaconą, było opornych na oksyterracynę. W grupie nie karmionych antybiotykiem odsetek ten sięgał 20 ($X^2=108$). Z przedstawionych danych wynika, że stosowanie oksyterracyliny jako czynnika stymulującego wzrost kurcząt, niewątpliwie wpływa na selekcję szczepów opornych na ten antybiotyk.

Tab. 2. Częstość przekazywania oporności na oksyterracynę szczepów *E. coli* na lekowrażliwy szczep *Klebsiella pneumoniae* 93

Szczepy	Liczba szczepów	Częstość przekazywania oporności na oksyterracynę
Wyosobnione od kurcząt, które otrzymywały paszę z oksyterracyną	3	10^{-5}
	6	10^{-4}
	8	10^{-3}
	7	10^{-2}
	6	—
Z grupy kurcząt kontr.	2	10^{-4}
	1	10^{-3}
	3	—

Wyniki zilustrowane w tab. 2 wskazują, że z grupy 30 szczepów *E. coli* opornych na oksyterracynę, gdzie wartość MIC była rzędu 400 µg/ml, 24 co stanowi 80%, przekazywało w procesie koniugacji cechę oporności na oksyterracynę na wrażliwy szczep *Klebsiella pneumoniae* 93. Zwraca uwagę dość wysoka częstość przekazywania cech oporności w warunkach doświadczalnych *in vitro*. Częstość przekazywania wahała się w granicach od 2×10^{-2} do 1×10^{-5} na komórce dawcy.

Należy podkreślić, że również oksyterracynooporne szczepy *E. coli* wyodrębnione z kału kurcząt karmionych paszą bez dodatku antybiotyku, przekazywały tę cechę w drodze koniugacji na pałeczkę *Klebsiella*. Wśród sześciu badanych szczepów, tylko trzy przekazywały cechę oporności na oksyterracynę. Do doświadczeń nad zjawiskiem przekazywania oporności wybrano tylko te szczepy *E. coli*, które charakteryzowały się wysokim stopniem oporności na oksyterracynę (MIC = 400 µg/ml).

Celem stwierdzenia, że oporność na oksyterracynę rzeczywiście jest determinowana prze-

kazywalnym plazmidem R, wykonano doświadczenia polegające na eliminacji cechy oporności przy użyciu oranżu akrydyny.

Wyniki eliminacji plazmidu R u trzech koniugantów *Klebsiella pneumoniae*, wskazują że utrata oporności na oksyterracynę pod wpływem działania oranżu akrydyny wynosiła kolejno 22, 36, 38%. Należy zaznaczyć, że spontaniczna utrata cechy oporności u 3 badanych koniugantów dotyczyły 2, 4 i 6% badanych komórek. Zjawisko wyższej częstości utraty plazmidów przez komórki bezpośrednio po nabyciu czynnika R jest znane.

Uzyskane wyniki doświadczeń wskazują, że rola oksyterracyliny jako czynnika selekcyjnego szczepów opornych na ten antybiotyk jest sprawą bezdyskusyjną. Wykazano ponadto, że oporność na oksyterracynę wyodrębnionych pałeczek *E. coli* jest determinowana obecnością w komórkach przekazywalnych plazmidów R.

Poczynione obserwacje, jak również cały szereg danych zawartych w piśmiennictwie wskazują, że celowym wydaje się wzbogacanie pasz dodatkami antybiotyków nie stosowanych w chemioterapii zakażeń u ludzi. Fakt ten, miałby duże znaczenie w ograniczeniu selekcji szczepów opornych na antybiotyki i chemioterapeutyki będące w powszechnym zastosowaniu.

Wnioski

1. Wyosobnione z kału kurcząt karmionych paszą wzbogaconą oksyterracyną pałeczki *E. coli*, były w 80% oporne na ten antybiotyk.
2. Oporność pałeczek *E. coli* na oksyterracynę determinowana była przekazywalnym plazmidem R.
3. Stosowanie antybiotyków jako biologicznych stymulatorów wzrostu zwierząt hodowlanych wpływa na selekcję szczepów bakteryjnych opornych na antybiotyki.

Piśmiennictwo

1. Gutnee P. A. M.: Bacterial Plasmids and Antibiotic Resistance. Avicenum. Prague. 95, 1972.
2. Von Houweling C. D.: Ann. N. Y. Sci. 182, 411, 1971.
3. Jukes T. H.: Ann. N. Y. Sci. 180, 362, 1971.
4. Walton J. R.: Bacterial Plasmids and Antibiotic Resistance. Avicenum. Prague. 91, 1972.
5. Watanabe T., Aoki T., Yada Ch., Ogata Y., Sugawara K., Saito T., Egusa S.: Bacterial Plasmids and Antibiotic Resistance. Avicenum. Prague. 131, 1972.
6. Wiedemann B., Knothe H.: Ann. N. Y. Sci. 182, 380, 1972.

Adres autora: dr Danuta Dzierżanowska, ul. Marchlewskiego 4 m. 56, 15-064 Białystok.

Держановска Д., Вильчиньски М., Линда Х. — Влияние добавленного к кормам окситетрацина на частоту выделения из цыплят антибиотикостойчивых штаммов *Escherichia coli*.

Установили, что штаммы *E. coli* выделенные из цыплят, которым скармливали в кормах окситетрацин, оказались в 80% устойчивые к действию этого антибиотика. Устойчивость была связана с передаваемым плазмидом R. Авторы приходят к выводу, что добавление к кормам окситетрацина в качестве биологического фактора роста вызвало повышение частоты выделения из желудочно-кишечного аппарата цыплят антибиотикостойчивых штаммов *E. coli*.

Dzierżanowska D., Wilczyński M., Linda H. — The influence of oxytetracin as a fodder additive on the frequency of the isolation of resistant strains of *Escherichia coli* from chickens.

The authors showed that the strains of *E. coli* isolated from chickens fed with fodder with the addition of oxytetracin appeared in 80% resistant to the antibiotic. The resistance to the antibiotic was determined by transmissible plasmide R. Oxytetracin added to the food, as a biological stimulator of growth, influenced the frequency of isolation of resistant strains of *E. coli* from the alimentary tract of chickens.

JAN STYPUŁA, STEFAN WIECZOROWSKI, DANUTA ZDRODOWSKA

Gasterofiloza koni woj. białostockiego

Z Zakładu Higieny Weterynaryjnej w Białymstoku

W Polsce w okresie powojennym ukazało się ogółem 5 prac na temat gasterofilozy. Dotyczą one głównie ekstensywności inwazji poszczególnych gatunków. Według Kroczakowej (4) ekstensywność inwazji *Gasterophilus intestinalis* u koni pochodzących z różnych rejonów Polski wynosiła 80%. Wojtatowicz (7) opierając się na wynikach sekcji przeprowadzonych w Rzeźni Warszawskiej na 280 koniach, ocenia ekstensywność inwazji na 33%. Zieliński (8, 9), a następnie Kroczakowa (4) badali nadto przydatność odczynów śródskórnego i śródskórno-powiekowego do przyżyciowego diagnozowania gasterofilozy. Wreszcie Draber-Mońko (2), która w Rzeźni Warszawskiej przeprowadzała swe badania na dużym materiale liczącym 852 konie pochodzące z terenu woj. warszawskiego, stwierdziła larwy gza przeciętnie u 67,6% koni badanych. Z obserwacji autorki wynika między innymi, że najwyższy wskaźnik ekstensywności przypada na grudzień (90,7%) przy czym wysoka ekstensywność utrzymuje się w okresie od października do maja.

W ostatnich latach badania nad gasterofilozą przeprowadzano w kilku krajach. Niestety tylko część opublikowanych prac była dostępna do wglądu. Wydaje się, iż zwłaszcza w Stanach Zjednoczonych zwalczanie tej inwazji przeprowadza się w szerokim zakresie i w sposób zorganizowany. Wiąże się to ze znacznym nasileniem gasterofilozy wśród tamtejszych koni. Według ostatnich badań (5) przeprowadzonych w 7 stanach gasterofilozę stwierdzono u 100% badanych koni przy wysokiej średniej rocznej intensywności wynoszącej 182 larwy na konia. Najwyższą średnią intensywność notowano w lutym (415 larw na konia), najniższą — w październiku i listopadzie (56 i 84). Autorzy pracy zalecają stosowanie zabiegów terapeutycznych

poczynając od lutego i powtarzanie ich przez cały rok w odstępach dwumiesięcznych. Zalecenie to opiera się na obserwacjach z których wynikałoby, że migracja larw z jamy gębowej do żołądka trwa przez cały rok.

Badania przeprowadzane w Szwajcarii (3) wykazały, że gasterofiloza nie jest w tym kraju problemem z punktu widzenia klinicznego. Stosunkowo często stwierdza się ją u koni importowanych zwłaszcza z Europy Wschodniej i z Normandii. U koni miejscowych ekstensywność inwazji jest niska i nie przekracza 10%.

Jeśli chodzi o leczenie, to z nowych środków terapeutycznych wypróbowywano preparat pod nazwą Butonat (6). Preparat ten dobrze znoszony przez konie, zadawany sondą nosowo-przelykową w ilości 28 mg/kg wagi okazał się skuteczny usuwając 81% larw gza. Dużą skuteczność wykazał również w stosunku do *Parascaris equorum* i nicieni żołądkowo jelitowych.

Jeszcze wyższą skuteczność obserwowano przy stosowaniu Neguvonu (1) zadawanego *per os* lub domięśniowo w dawce 30 mg/kg wagi. Zdaniem autorów Neguvon usuwa larwy gza prawie w 100%. W stosunku do III stadium larwalnego większą skuteczność stwierdzono przy podawaniu domięśniowym. Obserwowane często u koni objawy uboczne są nieznaczne i szybko mijają.

Celem niniejszej pracy było prześledzenie na możliwie dużym materiale przebiegu inwazji w poszczególnych miesiącach oraz ustalenie pełnego stopnia ekstensywności i intensywności. Pod pojęciem „pełen stopień” należy rozumieć te wskaźniki ekstensywności i intensywności, które są niezależne od sezonowych wahań związanych z biologicznym zjawiskiem migracji larw.