

mgr Marlena Zawadzka

Promotor pracy: prof. Agnieszka E. Laudy
Zakład Mikrobiologii Farmaceutycznej i Bioanalizy

WSTĘP

Środki antyseptyczne to substancje zdolne do niszczenia mikroorganizmów na skórze, błonach śluzowych i powierzchniowych ranach. W obliczu narastającej oporności drobnoustrojów na antybiotyki, antyseptyki zyskują coraz większe znaczenie jako kluczowy element profilaktyki zakażeń. W ostatnich latach obserwuje się znaczny wzrost stosowania środków antyseptycznych, co w konsekwencji może prowadzić do narastania oporności bakterii na te substancje, jak również może prowadzić do zjawiska oporności krzyżowej wobec antybiotyków [1]. Jednym z drobnoustrojów alarmowych o dużym znaczeniu jest *Escherichia coli* wytwarzająca karbapenemazy typu KPC.

MATERIAŁY

Antyseptyki użyte w pracy: diglukonian chlorheksydyny (CXG), dichlorowodorek oktenidyny (OCT). Badania przeprowadzono na lekowrażliwych szczepach wzorcowych *E. coli* pochodzących z międzynarodowych kolekcji ATCC i NCTC oraz na lekoopornych szczepach klinicznych posiadających mechanizmy oporności na antybiotyki β -laktamowe (Tabela 1).

Tabela 1. Szczepy wykorzystane w badaniach.

Szczep	Numer nadany w pracy	Pochodzenie
<i>E. coli</i> ATCC 25922	1	Szczep referencyjny
<i>E. coli</i> NCTC 8196	25	Szczep referencyjny
<i>E. coli</i> NCTC 10538	26	Szczep referencyjny
<i>E. coli</i> DH5 α	43	Szczep laboratoryjny (referencyjny) w badaniach genetycznych
<i>E. coli</i> KPC-2	76	Szczep kliniczny
<i>E. coli</i> pAmpC CMY-2	77	Szczep kliniczny
<i>E. coli</i> ESBL	289	Szczep kliniczny

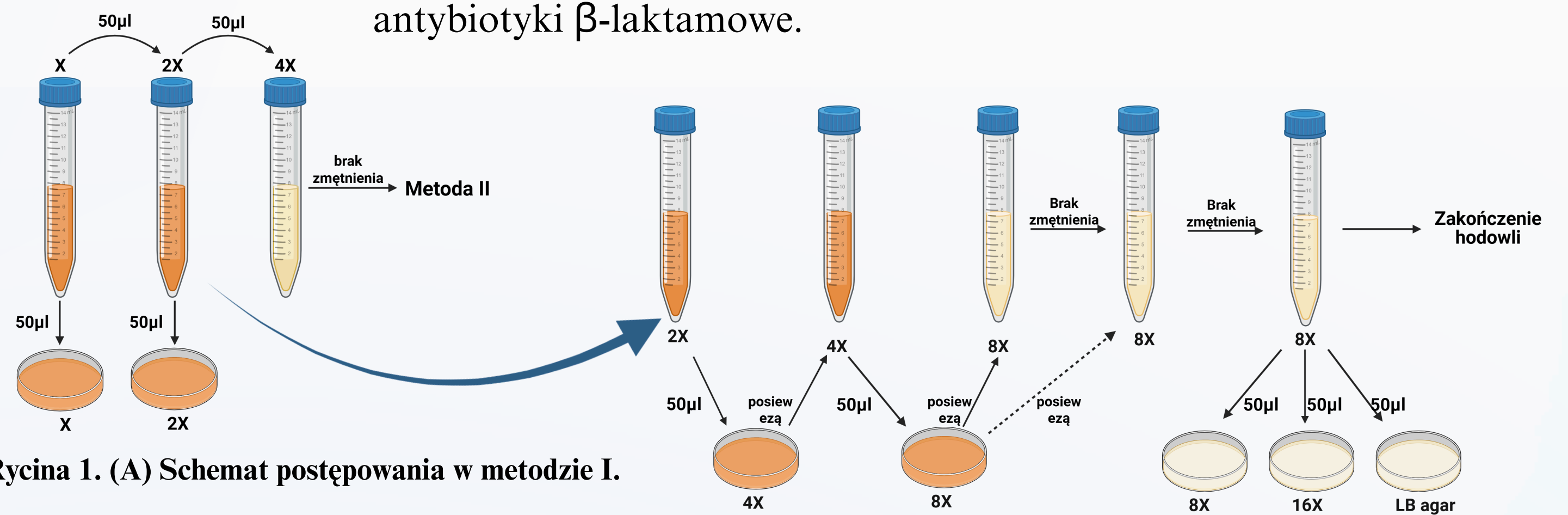
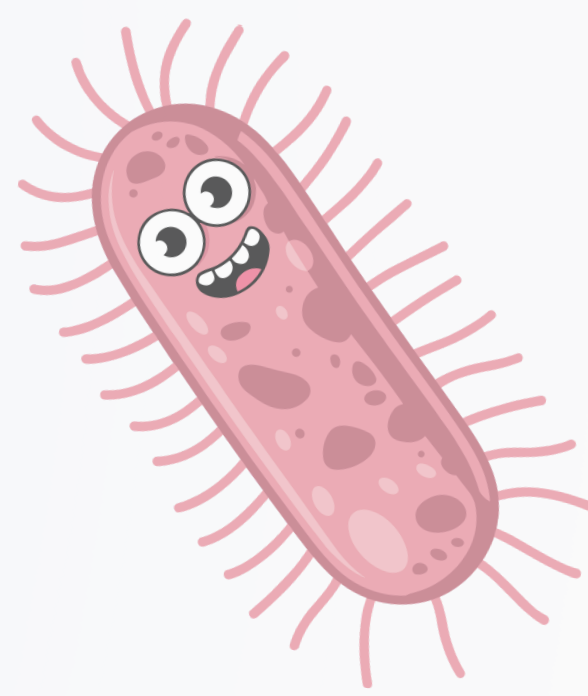
ATCC- American Type Culture Collection; NCTC- National Collection of Type Cultures

CEL PRACY

Celem pracy było zbadanie zdolności adaptacji szczepów *E. coli* do środków antyseptycznych, poprzez ekspozycję na stopniowo zwiększające się stężenia diglukonianu chlorheksydyny i dichlorowodoru oktenidyny, oraz ocena wpływu tej adaptacji na zmiany lekowrażliwości uzyskanych mutantów.

METODY

- Hodowle we wzrastających stężeniach środków antyseptycznych prowadzono metodą pierwszą (Rycina 1A) w probówkach typu Falcon w podłożu płynnym LB (Luria-Bretani Broth) i MH II (Mueller-Hinton II) rozpoczynając od stężenia środka antyseptycznego równego 1/8 wartości MIC (Minimal Inhibitory Concentration) antyseptyku. Wzrost bakterii oceniano na podstawie zmętnienia podłoża. W przypadku jego braku przy danym stężeniu, hodowlę kontynuowano metodą drugą (Rycina 1B).
- Oznaczenie wartości MIC antyseptyków wykonano zgodnie z wytycznymi CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) [2] dla szczepów rodzicielskich oraz mutantów uzyskanych w wyniku hodowli ciągłej.
- Oznaczenie lekowrażliwości przeprowadzono metodą dyfuzyjno-krażkową zgodnie z wytycznymi CLSI i EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing) [3].
- U klinicznych szczepów rodzicielskich i otrzymanych ich mutantów przeprowadzono fenotypowe wykrywanie mechanizmów oporności na antybiotyki β -laktamowe.

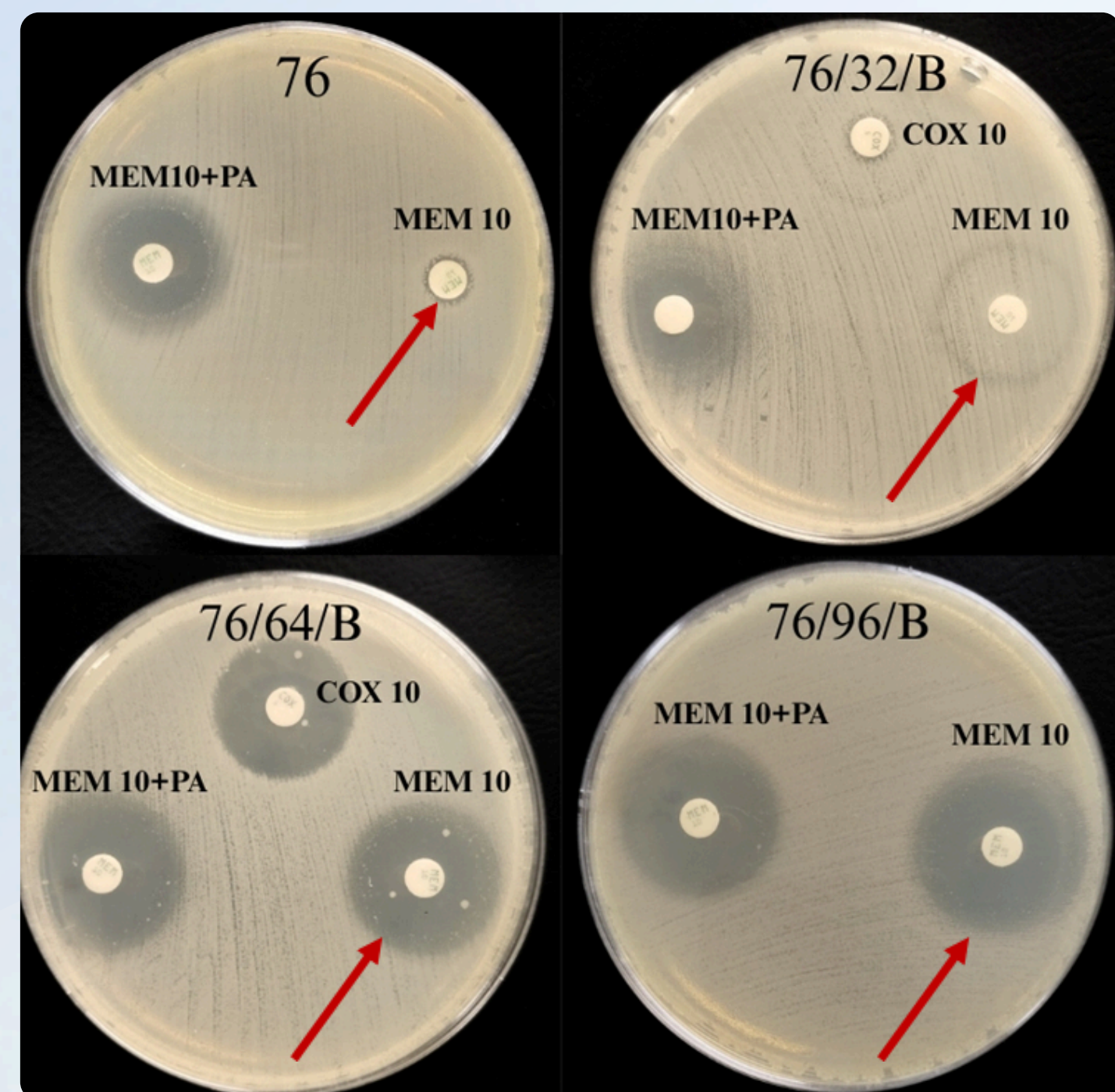


Rycina 1. (A) Schemat postępowania w metodzie I.

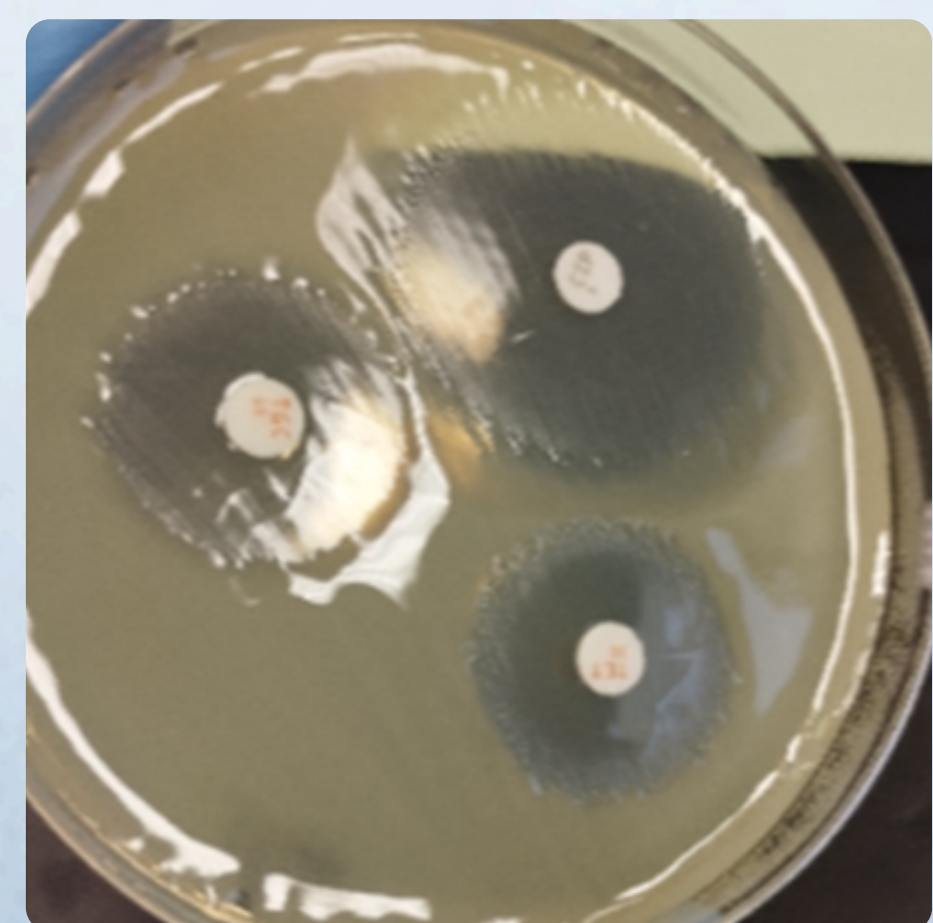
Rycina 1. (B) Schemat postępowania w metodzie II.

WYNIKI

- Badane szczepy *E. coli* wykazały większą zdolność adaptacji do wzrostu w obecności CXG niż OCT. W przypadku CXG obserwowano wzrost bakterii przy stężeniach sięgających 96 x MIC CXG, podczas gdy dla OCT maksymalnie 16 x MIC OCT. Jednocześnie u otrzymanych mutantów spadek wrażliwości na CXG był większy (32-krotny) niż na OCT (4-krotny).
- Ekspozycja na wzrastające stężenia antyseptyków spowodowała zmiany w profilach lekowrażliwości, przy czym większe zmiany zaobserwowano u mutantów uzyskanych w obecności CXG niż OCT. Najistotniejsze zmiany po adaptacji do CXG dotyczyły antybiotyków β -laktamowych (Rycina 2).
- Mutanty szczepu 76 po ekspozycji na CXG wykazały stopniowy zanik zdolności wytwarzania enzymu KPC-2 wraz ze wzrostem stężenia antyseptyku, w obecności którego były otrzymywane (Zdjęcie 1).
- Podczas hodowli ciągłej u mutantów szczepu nr 43, na podłożu LB agar zaobserwowano zmiany w morfologii kolonii. Od stężenia 8 μ g/ml CXG i OCT zaobserwowano wzrost licznych śluzowych kolonii (Zdjęcie 2), kolonie szczepu rodzicielskiego nie wykazywały takiej cechy (Zdjęcie 3).



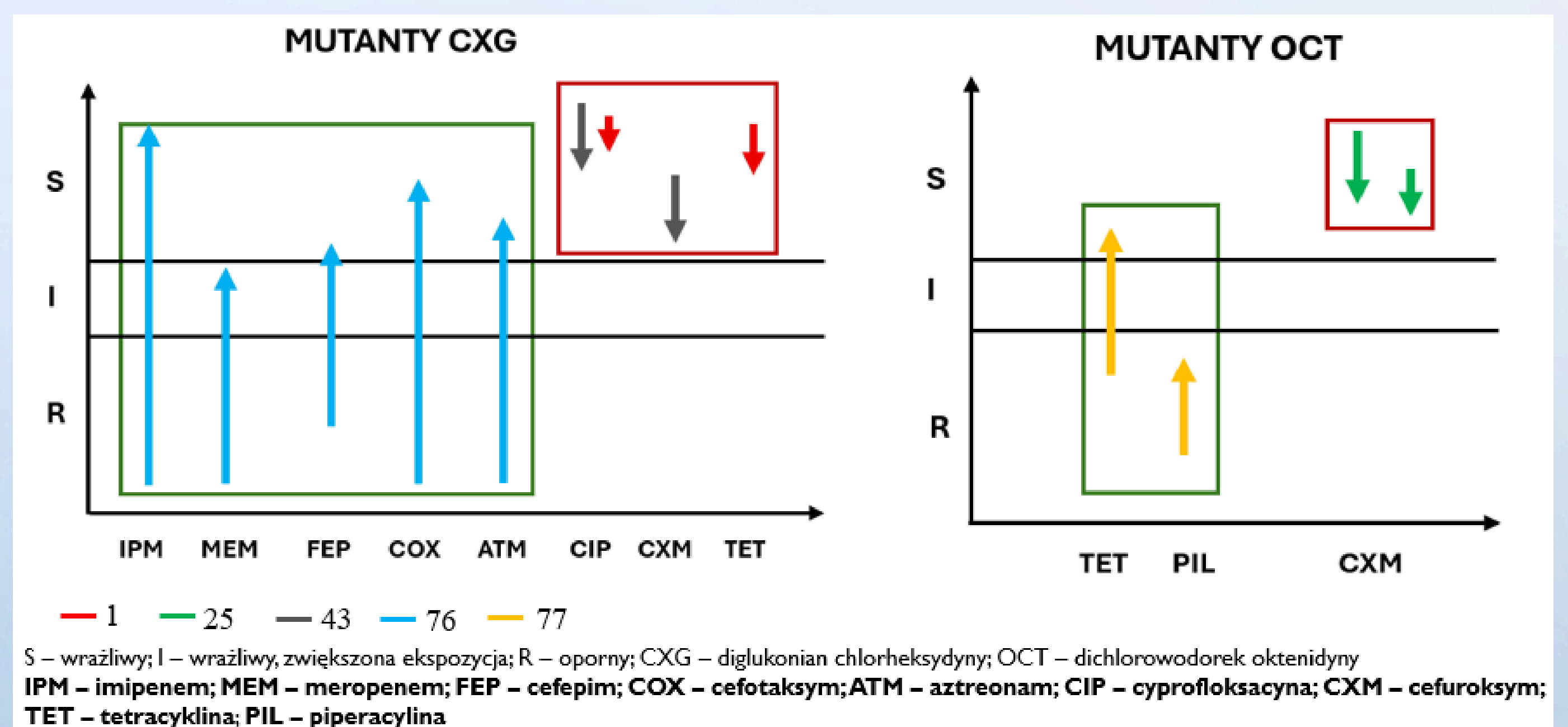
Zdjęcie 1. Obserwowane zmiany w fenotypowym teście wykrywania mechanizmu KPC u mutantów szczepu rodzicielskiego 76 uzyskanych po ekspozycji na wzrastające stężenia CXG (tj. 32, 64, 96 μ g/ml).



Zdjęcie 2. Mutant 43/8/A.



Zdjęcie 3. Szczep rodzicielski nr 43.



Rycina 2. Zmiany lekowrażliwości mutantów szczepów *E. coli* nr 1, 25, 43, 76, 77.

WNIOSEK

Uzyskane wyniki wskazują na zdolność adaptacji szczepów *E. coli* do wzrastających stężeń diglukonianu chlorheksydyny i dichlorowodoru oktenidyny, co skutkuje obniżeniem wrażliwości na te antyseptyki oraz powoduje zmiany w profilach lekowrażliwości bakterii.

Piśmiennictwo:

- Antiseptics: their characteristics, application and challenges in the 21st century resulting from the spread of antimicrobial resistance (AMR), Zawadzka M. and Laudy A.E., ADV MICROBIOL-NY, 2025, 64, 3, 112-140, <https://doi.org/10.2478/am-2025-0010>
- CLSI. 2012. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically, 9th ed. CLSI guideline M07-A9. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.
- EUCAST. 2025. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 15.0, 2025. <http://www.eucast.org>. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing, Växjö, Sweden