

Weronika Widomska

Promotor i opiekun naukowy: dr hab. Agnieszka Ewa Laudy

Praca wykonana w Zakładzie Mikrobiologii Farmaceutycznej i Bioanalizy

## WPROWADZENIE

Zakażenia grzybicze stanowią istotny problem w ochronie zdrowia. Wzrost oporności szczepów na stosowane związki przeciwgrzybicze sprawia, że poszukuje się nowych leków i rozwiązań do walki z tymi patogenami. Niezmiernie ważnym aspektem przyczyniającym się od zapobiegania zakażeniom jest właściwe stosowanie antyseptyków i środków dezynfekcyjnych. W 2022 r. WHO opublikowała listę gatunków grzybów najgroźniejszych dla człowieka. Na liście tej znalazły się grzyby drożdżopodobne z rodzaju *Candida*: *C. auris* i *C. albicans* - krytyczny stopień zagrożenia; *C. glabrata*, *C. tropicalis* i *C. parapsilosis* - grupa wysokiego ryzyka; *C. krusei* - średni poziom zagrożenia.

## CEL PRACY

Celem pracy było ustalenie zdolności adaptacji badanych szczepów *Candida* oraz drożdży *Saccharomyces cerevisiae* do wzrostu we wzrastającym gradiencie stężeń najbardziej popularnych w obszarze medycznym substancji antyseptycznych, tj. diglukonianu chlorheksydyny oraz dichlorowodorodku oktenidyny, a także określenie wpływu tych antyseptyków na wrażliwość na substancje przeciwgrzybicze otrzymanych mutantów.

## MATERIAŁY I METODY

Badania przeprowadzono na siedmiu szczepach z rodzaju *Candida* oraz na szczepie *Saccharomyces cerevisiae*. Szczepy rodzicielskie pozyskano z kolekcji międzynarodowej ATCC (American Type Culture Collection) oraz z kolekcji IBA (Instytut Biotechnologii i Antybiotyków).

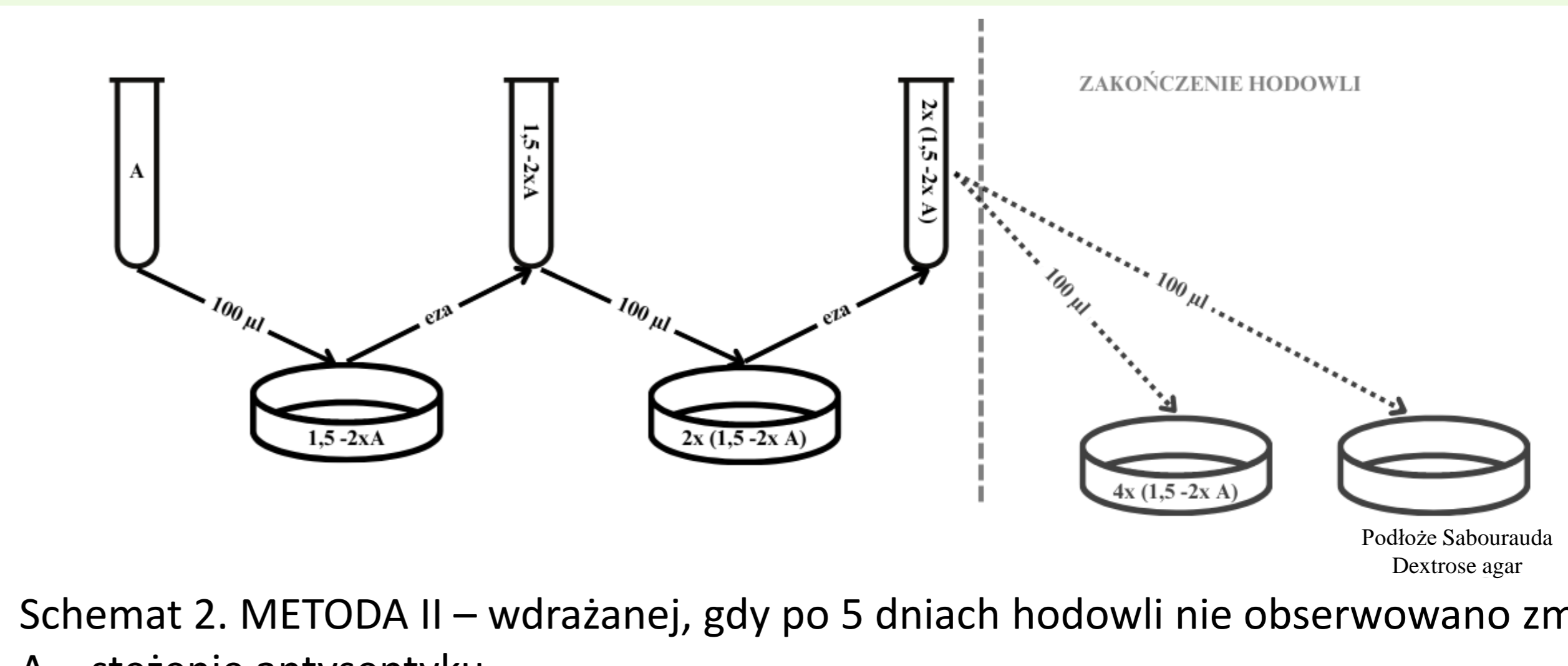
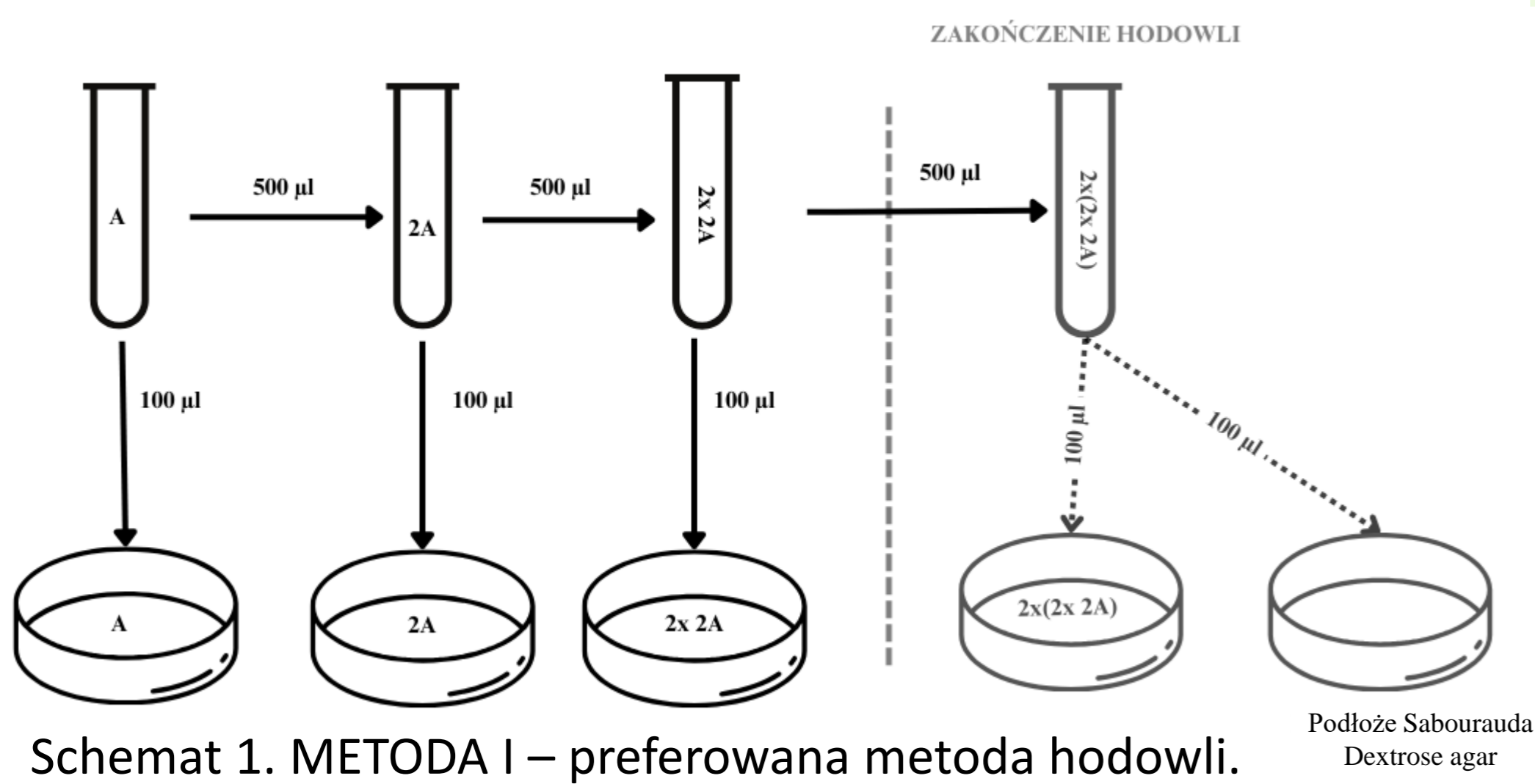
→ *Candida albicans* ATCC 90028 → *Candida parapsilosis* ATCC 22019 → *Candida guilliermondii* IBA 155 → *Candida auris* B11221 ATCC MYA-5002  
 → *Candida tropicalis* IBA 171 → *Candida tropicalis* Berkhout ATCC 750 → *Candida krusei* ATCC 6258 → *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 9763

Antyseptyki użyte w pracy: **diglukonian chlorheksydyny (CXG)**, **dichlorowodorek oktenidyny (OCT)**.

Wykorzystane substancje przeciwgrzybicze: **amfoterycyna B** i **nystatyna** (antybiotyki polienowe), **itakonazol** i **flukonazol** (z grupy azoli), **5-fluorocytozyna**, **kaspofungina** (echinokandyny).

Oznaczenie wartości **MIC** (Minimum Inhibitory Concentration) przeprowadzono zgodnie z wytycznymi **EUCAST** (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing) w płynnym podłożu RPMI 1640 z 2 % glukozą i buforem MOPS oraz w bulionie Sabourauda Dextrose. Oznaczenie wykonano dla szczepów rodzicielskich oraz ich mutantów uzyskanych w czasie prowadzenia hodowli ciągłych, z najwyższych stężeń antyseptyków w obecności których zaobserwowano wzrost grzybów.

Hodowlę ciągłą prowadzono w inkubatorze Innova® 42 w temperaturze 36 °C ze stałym wytrząsaniem 130 obrotów na minutę. Hodowlę tą prowadzono Metodą I (Schemat.1) w probówkach Falcon w 5 ml bulionu Sabourauda Dextrose z badanym antyseptykiem, a w przypadku braku wzrostu stosowano Metodę II (Schemat.2). Wyjściowe stężenie antyseptyku w hodowli ciągłej było równe wartości 1/8 MIC środka antyseptycznego. O wzroście badanego szczepu świadczyło wizualnie obserwowane zmętnienie podłoża płynnego. Otrzymywane mutanty przygotowano do zamrożenia w -80 °C.



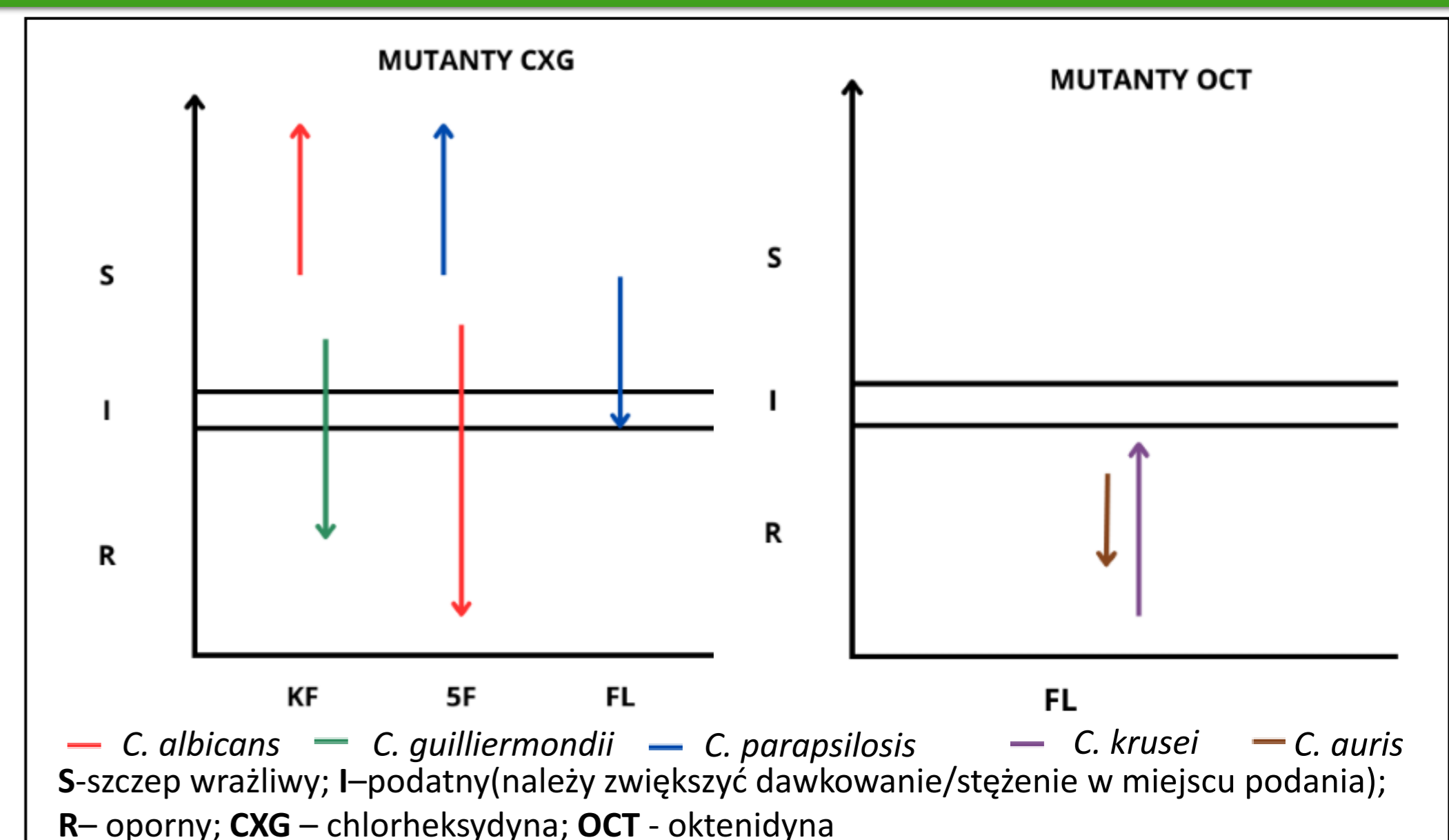
Schemat 2. METODA II – wdrażanej, gdy po 5 dniach hodowli nie obserwowano zmętnienia. A – stężenie antyseptyku.

## WYNIKI

Dla większości badanych szczepów, oprócz *C. tropicalis* i *C. guilliermondii*, wykazano większą wrażliwość na oktenidynę (MIC 0,25-1 mg/l) niż na chlorheksydynę (MIC 2-4 mg/l). Dla wszystkich szczepów zaobserwowano zdolność adaptacji do wzrastającego gradientu stężeń obydwu antyseptyków, tj. wykazano ich wzrost w obecności od 2- do 96-razy wyższym stężeniu oktenidyny i od 1,5- do 8-razy wyższym stężeniu chlorheksydyny. U niektórych otrzymanych w ten sposób wielostopniowych mutantów stwierdzono zmianę we wrażliwości na antyseptyki, tj.:

- > 4-krotny ↓ wrażliwości na chlorheksydynę mutantów *C. albicans*
- 4-krotny ↓ wrażliwości na oktenidynę mutantów *C. krusei*
- 8-krotny ↓ wrażliwości na oktenidynę mutantów *C. auris*

Ponadto, dla niektórych mutantów wykazano zmianę w profilach lekowrażliwości (Rycina 1). Więcej zmian obserwowano u mutantów otrzymanych w obecności chlorheksydyny, przede wszystkim nabycie oporności na 5-fluorocytozynę i kaspofunginę.



Rycina 1. Zmiany lekowrażliwości mutantów na kaspofunginę (KF), flukonazol (FL) i 5-fluorocytozynę (5F).

## WNIOSEK

Wyniki uzyskane podczas prowadzonych badań wskazują, że różne szczepy gatunków z rodzaju *Candida* posiadają zdolność adaptacji do bytowania w środowisku antyseptyków, co może indukować zmiany w profilu wrażliwości na substancje przeciwgrzybicze. Dlatego aby nie sprzyjać selekcji mutantów, która może skutkować utrudnioną eradykacją oraz niepowodzeniami terapeutycznymi, istotne jest stosowanie środków antyseptycznych w stężeniach rekomendowanych przez producenta.