

mgr farm. Beata Kobus

Zakład Mikrobiologii Farmaceutycznej

Promotor pracy: dr hab. Agnieszka E. Laudy

Opiekunowie naukowo pracy: dr hab. Agnieszka E. Laudy, prof. dr hab. Stefan Tyski

## WSTĘP

Środki antyseptyczne są to substancje, które niszczą drobnoustroje na skórze, błonach śluzowych, a także w miejscach przerwania ciągłości tkanek. Znalazły one zastosowanie w profilaktyce i leczeniu wszystkich rodzajów ran. Stosowane są również w celu dekolonizacji skóry pacjenta przed zabiegami operacyjnymi oraz dekolonizacji ran ograniczając tym samym tworzenie biofilmu przez bakterie odporne na wiele leków [1,2]. Powszechność stosowania antyseptyków wiąże się z możliwością powstawania na nie oporności [3]. Ostatnio opisano spadek lekowrażliwości bakterii u których wykazano uprzednio obniżenie wrażliwości na niektóre biocydy [4].

## CEL PRACY

- Badanie zdolności adaptacji szczepów bakterii do wzrostu w obecności zwiększających się stężeń:
  - ⇒ diglukonianu chlorheksydyny,
  - ⇒ dichlorowodorku oktenidyny,
  - ⇒ mieszaniny diglukonianu chlorheksydyny z chlorkiem didecyldimetyloamoniowym w stosunku 1:1.
- Oznaczenie lekowrażliwości szczepów bakterii oraz ich mutantów zaadaptowanych do zwiększonych stężeń biocydów.

## METERIAŁY

Badanie przeprowadzono na ośmiu szczepach wzorcowych z kolekcji międzynarodowych ATCC i NCTC.

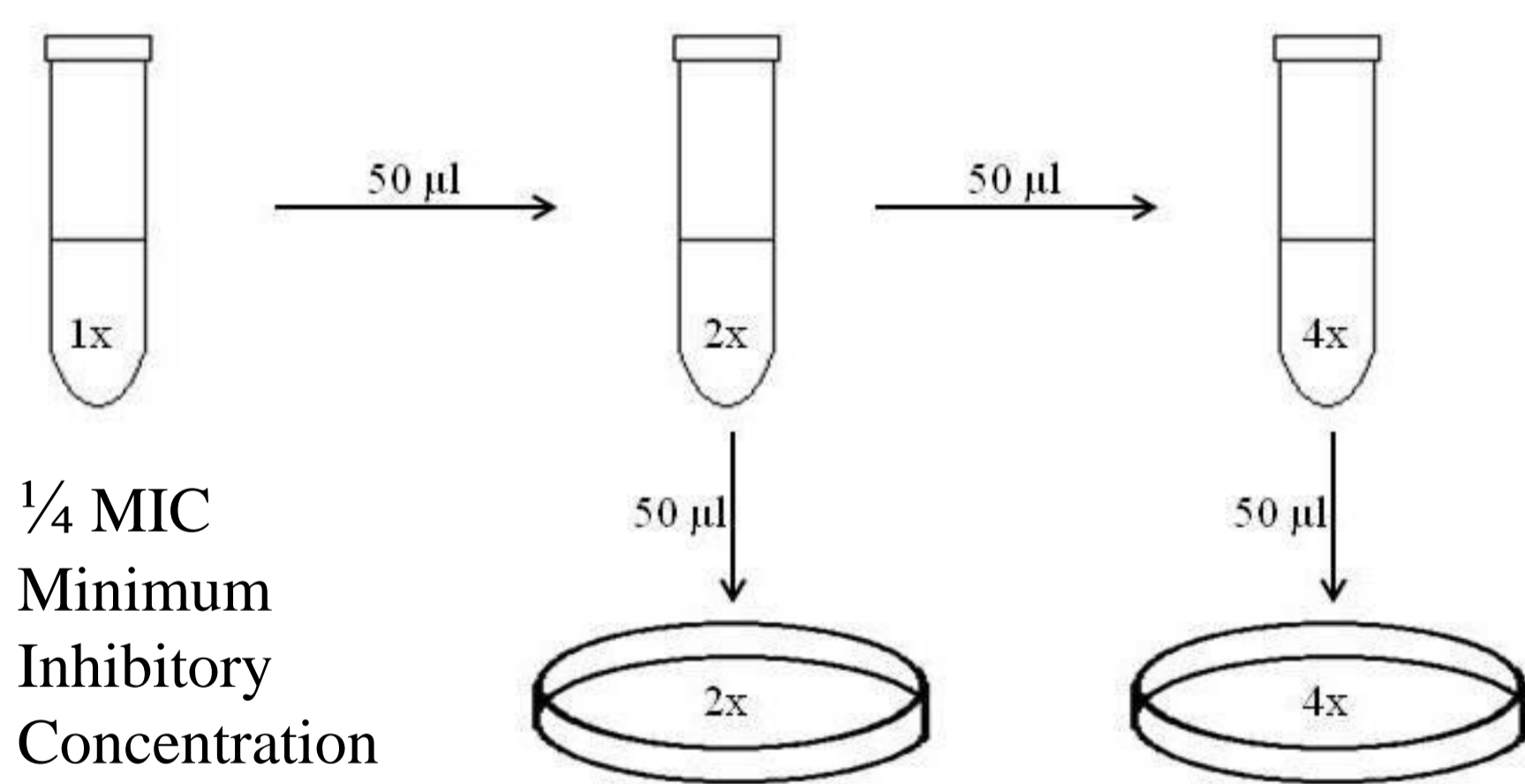
Tabela 1. Szczepy bakterii wykorzystane w badaniach.

Bakterie	Gatunek	Numer kolekcji międzynarodowej	Numer nadany w pracy
Gram-dodatnie	<i>Enterococcus faecalis</i>	ATCC 29212	4
	<i>Enterococcus hirae</i>	ATCC 6057	42
	<i>Enterococcus faecium</i>	ATCC 10541	56
	<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 6538	70
Gram-ujemne	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	ATCC 13883	11
	<i>Escherichia coli</i>	NCTC 10538	43
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 15442	45
	<i>Acinetobacter baumannii</i>	ATCC 19606	9

W badaniu użyto substancje czynne antyseptyków:

- diglukonian chlorheksydyny (**CHG**), LGC GmbH,
- dichlorowodorek oktenidyny (**OCT**), LGC GmbH,
- chlorek didecyldimetyloamoniowy (**DDAC**), Sigma-Aldrich.

## METODY

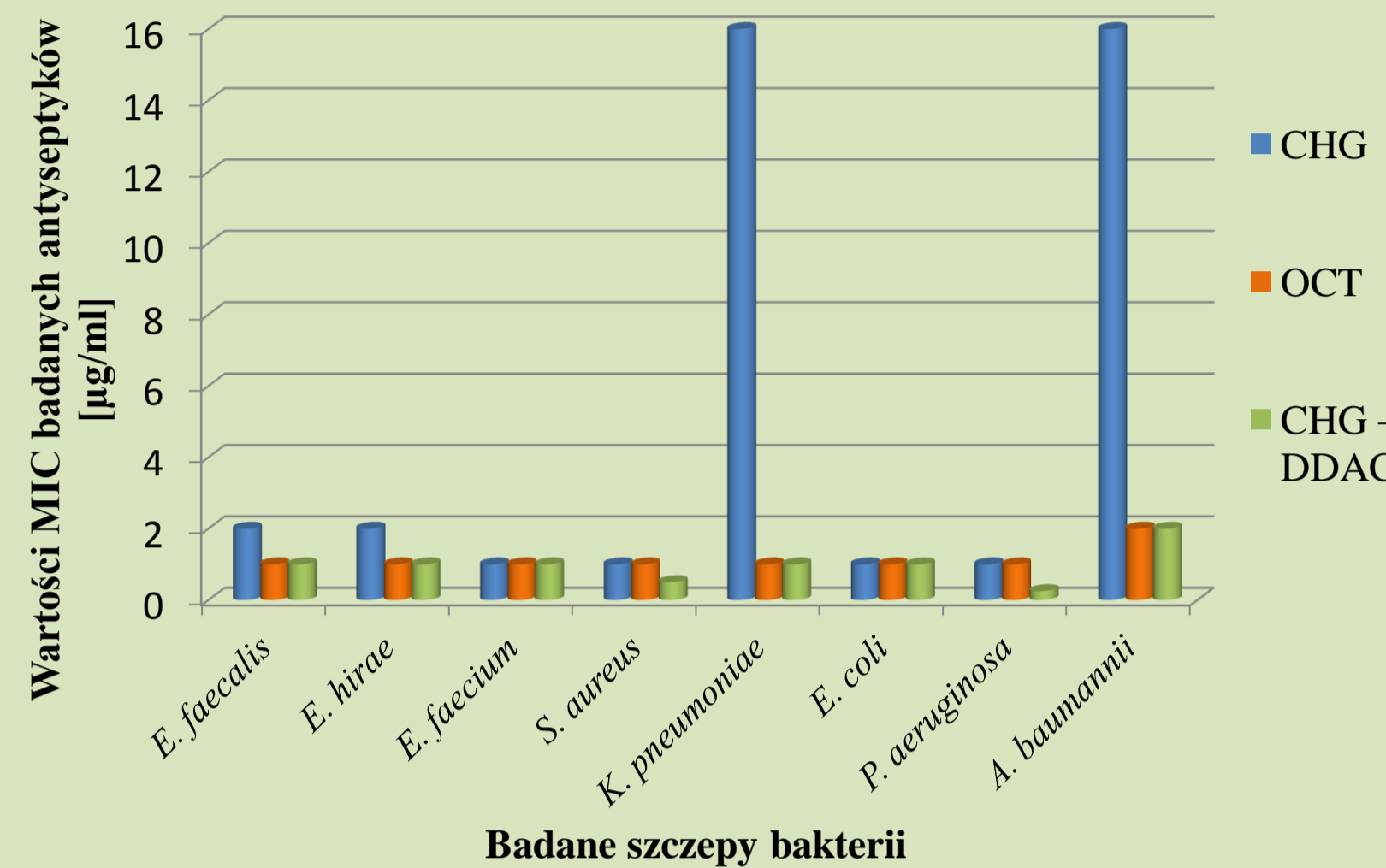


Schemat przedstawiający podstawową metodę hodowli.

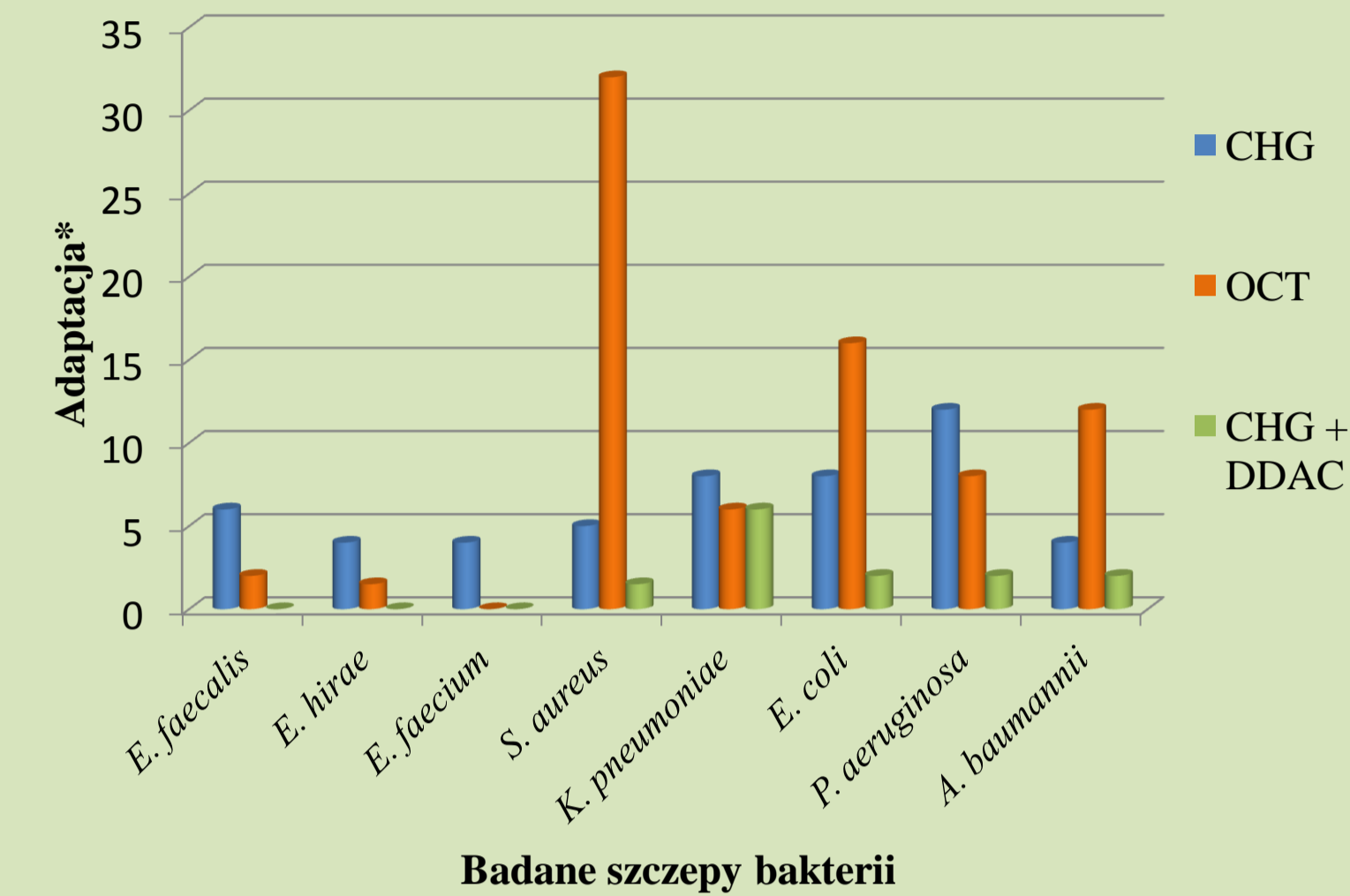
Hodowlę szczepów prowadzono w podłożu płynnym **LB** (temp. **36 °C**, wytrząsanie **130 obr/min**), we wzrastającym gradiencie stężeń antyseptyków. Uzyskaną hodowlę mutantów szczepów wyjściowych przesiewano na podłoże **LB Agar** z takim samym stężeniem antyseptyku.

Wrażliwość na środki antyseptyczne oznaczono przez wyznaczenie wartości **MIC** według **CLSI**. Wrażliwość na antybiotyki i chemioterapeutyki oznaczono metodą krążkowo-dyfuzyjną według zaleceń **EUCAST** dla wyjściowych szczepów wzorcowych oraz wybranych mutantów szczepów uzyskanych podczas hodowli w wzrastającym gradiencie stężeń antyseptyku.

## WYNIKI



Wykres 1. Aktywność badanych antyseptyków wobec wzorcowych szczepów bakteryjnych.



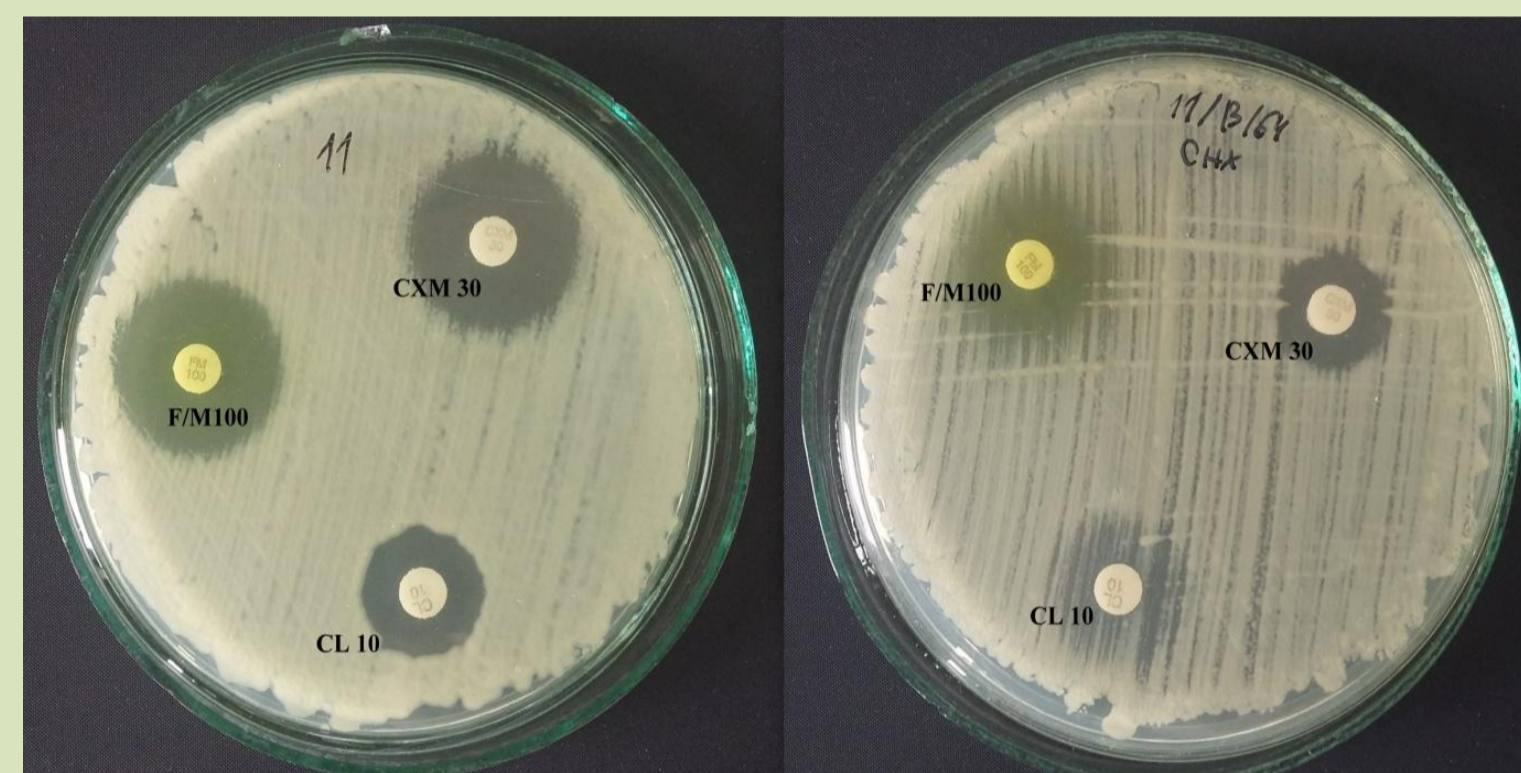
Wykres 2. Zdolność adaptacji bakterii do wzrostu w zwiększającym się stężeniu antyseptyku.

Adaptacja – wyrażona jako współczynnik najwyższego stężenia, przy którym zaobserwowano wzrost szczepu bakterii, w stosunku do wartości MIC dla danego szczepu.

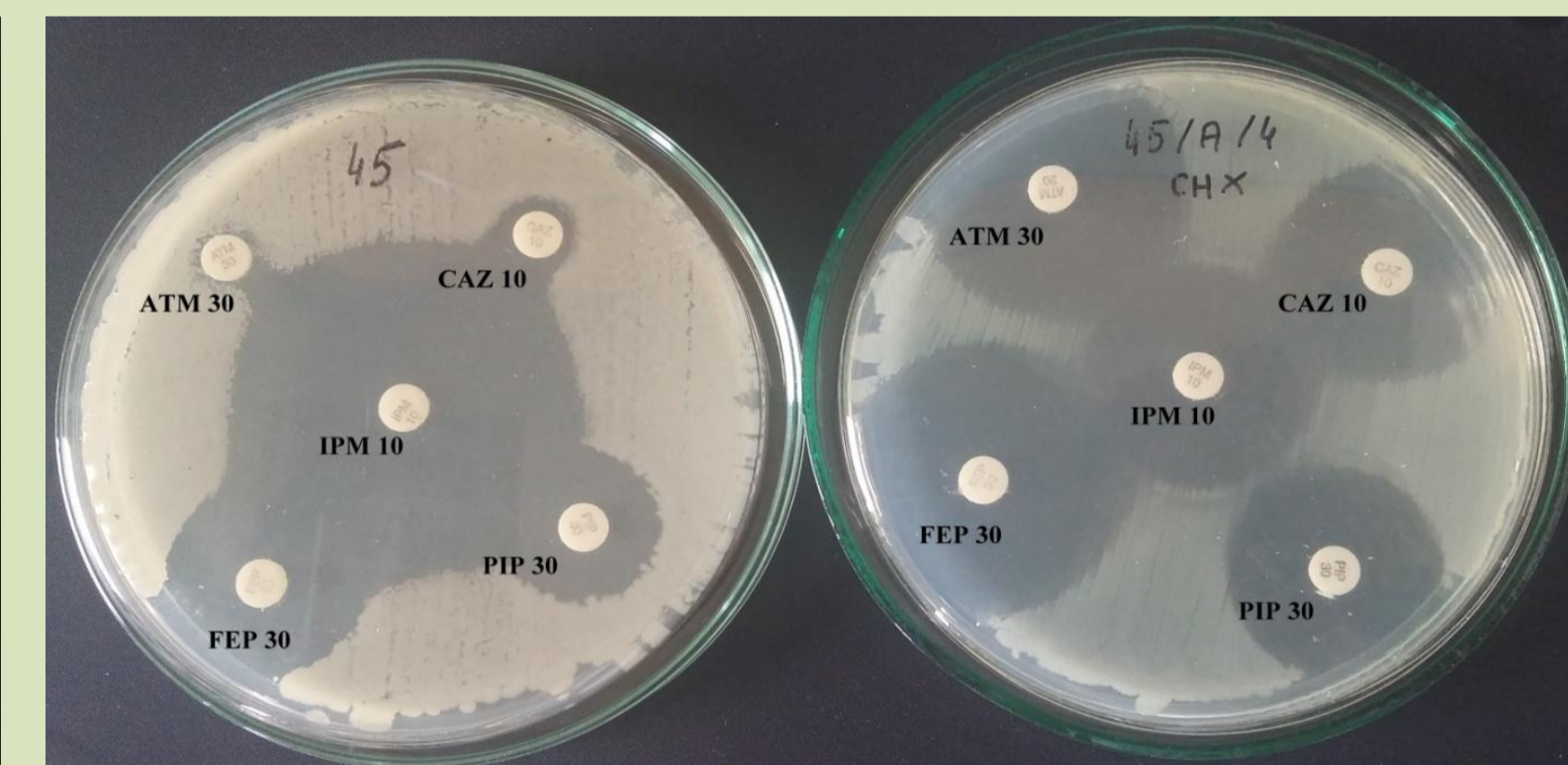
Wrażliwość na antyseptyki i zdolność adaptacji do wzrostu szczepów bakteryjnych w obecności zwiększającego się gradientu stężeń środków antyseptycznych z różnych grup chemicznych (**CHG**, **OCT** oraz mieszaniny **CHG** i **DDAC**) przedstawiono na wykresach 1 i 2.

W pracy zaobserwowano zmiany wrażliwości na antybiotyki i chemioterapeutyki mutantów otrzymanych z hodowli:

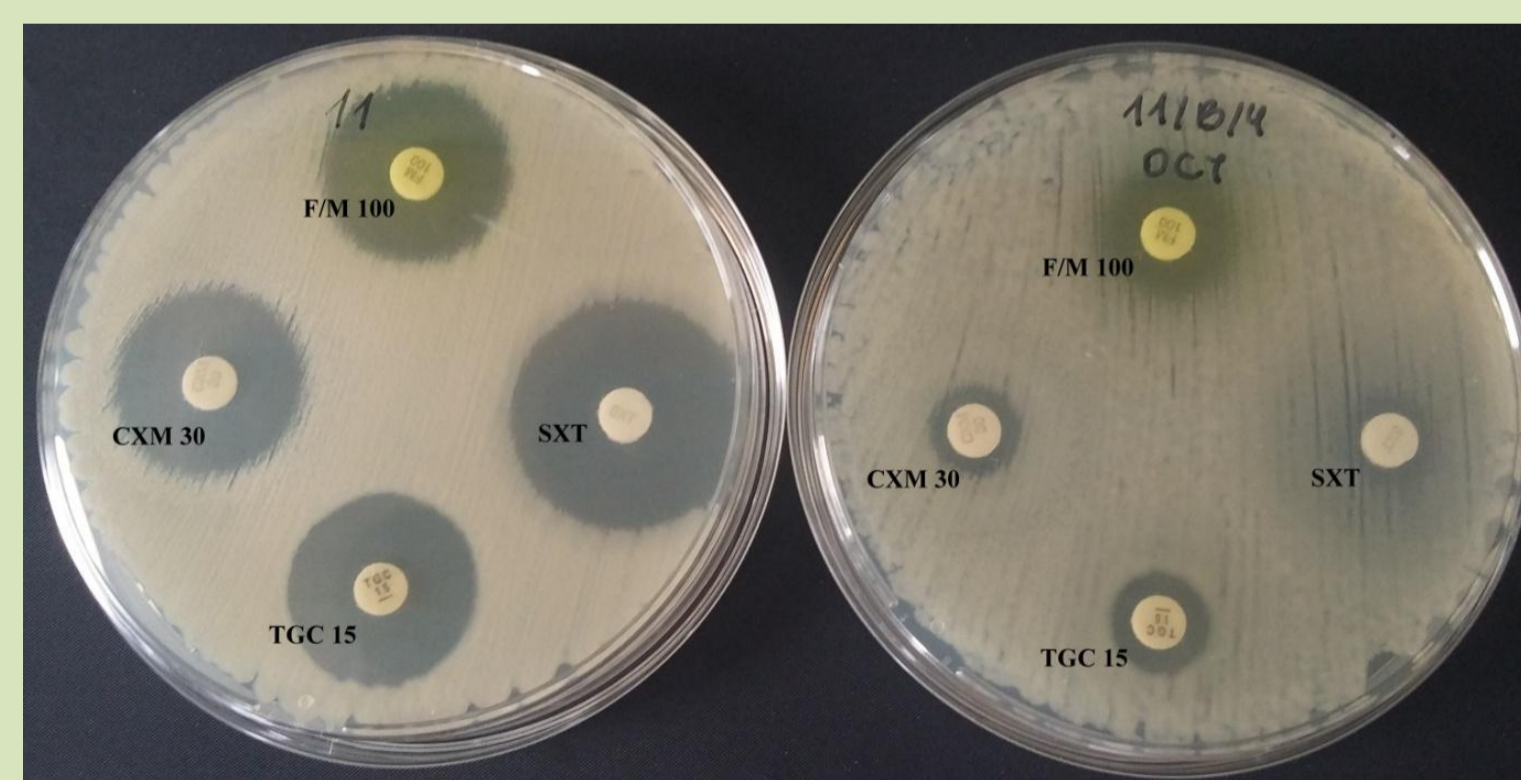
- ⇒ w obecności diglukonianu chlorheksydyny (zdjęcie 1 i 2),
- ⇒ w obecności dichlorowodorku oktenidyny (zdjęcie 3),
- ⇒ w obecności mieszaniny **CHG** + **DDAC** (zdjęcie 4).



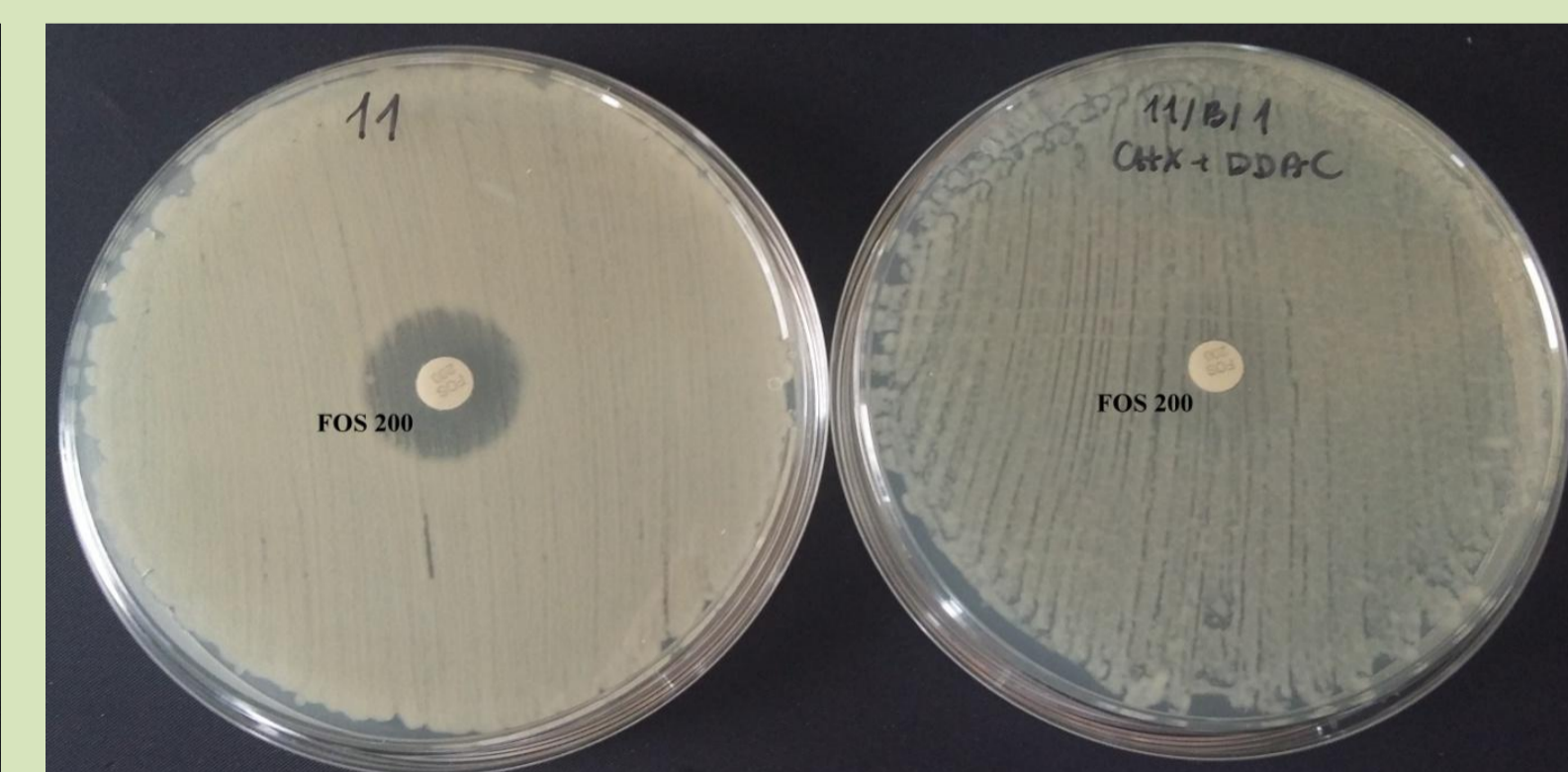
Zdjęcie 1. Zmiana wrażliwości na cefuroksym (CXM 30), kolistynę (CL 10) oraz nitrofurantoinę (F/M 100) pomiędzy szczepem wyjściowym *K. pneumoniae* (11), a otrzymanym mutantem szczepu (11/B/64).



Zdjęcie 2. Zmiana wrażliwości na piperacylinę (PIP 30), ceftazydym (CAZ 30), cefepim (FEP 30), imipenem (IPM 10) oraz aztreonam (ATM 30) pomiędzy szczepem wyjściowym *P. aeruginosa* (45), a otrzymanym mutantem szczepu (45/A/4).



Zdjęcie 3. Zmiana wrażliwości na cefuroksym (CXM 30), tygecyklinę (TGC 15), sulfametoksazol (FOS 200) pomiędzy szczepem wyjściowym *K. pneumoniae* (11), a otrzymanym mutantem szczepu (11/B/1).



Zdjęcie 4. Zmiana wrażliwości na fosfomicynę (FOS 200) pomiędzy szczepem wyjściowym *K. pneumoniae* (11), a otrzymanym mutantem szczepu (11/B/4).

## WNIOSKI

- Jednostukładowe preparaty z diglukonianem chlorheksydyny mogą powodować selekcję mutantów o obniżonej wrażliwości na niektóre antybiotyki / chemioterapeutyki wśród szczepów bakterii Gram-ujemnych.
- *K. pneumoniae* jest jednym z drobnoustrojów o największej zdolności adaptacji do wzrostu w obecności środków antyseptycznych, a otrzymane mutanty charakteryzują się obniżoną wrażliwością na największą liczbę antybiotyków i chemioterapeutyków.

## PIŚMIENNICTWO

1. McDonnell, G., A.D. Russell. Clin Microbiol Rev, 1999. 12(1): 147-79.
2. Kramer, A., et al. Skin Pharmacol Physiol, 2018. 31(1): 28-58.
3. Brooks, S.E., et al. Infect Control Hosp Epidemiol, 2002. 23(11): 692-5.
4. Wand, M.E., et al. Antimicrob Agents Chemother, 2017. 61 (1).