MED. DOŚW. MIKROBIOL., 2012, 64: 109 - 114

Ocena antagonistycznego działania w warunkach *in vitro* szczepów z rodzaju *Lactobacillus* wobec toksynotwórczych szczepów *Clostridium difficile* wyhodowanych z przewodu pokarmowego pacjentów leczonych w szpitalach na terenie województwa mazowieckiego

Assessment of antagonistic activity *in vitro Lactobacillus* spp. strains againts *Clostridum difficile* strains isolated from gastrointestinal tract of patients hospitalized in three hospitals in region Mazovia

Ewa Skopińska[1], *Dominika Lachowicz*[1],*Dorota Wultańska*[1], *Jolanta Pawłowska*[2], *Anna Jędrzejewska*[2], *Piotr Obuch-Woszczatyński*[1], *Hanna Pituch*[1]

[1] Katedra i Zakład Mikrobiologii Lekarskiej
Warszawski Uniwersytet Medyczny
[2] Wojewódzki Szpital Zespolony im. M. Kacprzaka w Płocku

Zbadano wpływ *in vitro* pałeczek z rodzaju *Lactobacillus* należących do gatunków *L. plantarum*, *L. fermentum*, *L. acidophilus* i *L. rhamnosus* na wzrost 61 toksynotwórczych szczepów *Clostridium difficile*, wyhodowanych z próbek kału chorych z rozpoznaniem biegunki poantybiotykowej hospitalizowanych w trzech szpitalach województwa mazowieckiego. Wszystkie badane szczepy należące do rodzaju *Lactobacillus* wykazały w warunkach *in vitro* antagonistyczną aktywność wobec badanych klinicznych szczepów *C. difficile*.

ABSTRACT

Introduction: The aim of this study was to evaluate the antagonistic activity of *Lactobacillus* strains against clinical *C. difficile* strains isolated from faecal samples of adults patients with diarrhea. A total 61 strains of *C. difficile* randomly selected isolated in the period 2007-2008 from the gastrointestinal tract of hospitalized patients in three hospitals province Mazovia, Poland. To determination of antagonistic activity of probiotic *Lactobacillus* spp. strains used four reference strains: *Lactobacillus plantarum* 2017405, *Lactobacillus fermentum* 353, *Lactobacillus acidophilus* DSM 21007 and *Lactobacillus rhamnosus* GG.
Methods: Isolation of *C. difficile* was performed on selective Columbia agar supplemented with cycloserine/cefoxitine and amphothericin B (CLO medium, bioMérieux, France). The plates were incubated in an anaerobic chamber for 48 h at 37°C. Isolates were identified as *C. difficile* by the characteristic morphology of the colonies and horse-like odour, green

yellow fluorescence under UV. Toxigenicity of of *C. difficile* strains was determined in PCR to detection of fragments of genes encoding toxin A (*tcdA*), toxin B (*tcdB*) and binary toxin (*cdtA* and *cdtB*). The study of antagonistic activity four *Lactobacillus spp.* strains against 61 clinical *C. difficile* strains was performed according to standard methods. *Lactobacillus* strains were inoculated on MRS medium and incubated in oxygen-free atmosphere and cut the bars of MRS agar and applied to the plate with cultures of *C. difficile* strains.
Results: Assessment of antagonist activity of *Lactobacillus* spp. strains was performed by measuring the zone of inhibition of grown of *C. difficile* strains. The study shows that of probiotic *Lactobacillus* spp. strains interacted antagonistically *in vitro* against all toxigenic (A+B+CDT- and A+B+CDT+) of *C. difficile* strains.
Conclusions: The differences in the antagonistic activity of *Lactobacillus* spp. strains against different toxigenic clinical *C. difficile* strains were not observed.

WSTĘP

Clostridium difficile jest Gram-dodatnią, beztlenową, przetrwalnikującą laseczką, która powoduje biegunki poantybiotykowe u 10 do 30% hospitalizowanych pacjentów. Drobnoustrój ten jest ponadto praktycznie jedynym czynnikiem etiologicznym rzekomobłoniastego zapalenia okrężnicy (1, 2, 12).

Do rozwoju zakażenia *C. difficile* w przewodzie pokarmowym człowieka dochodzi najczęściej na skutek osłabienia obronnych funkcji naturalnej mikroflory przewodu pokarmowego w wyniku stosowanej antybiotykoterapii.

Jedną z metod stosowanych w zapobieganiu rozwojowi zakażenia *C. difficile* jest podanie pacjentowi preparatów zawierających bakterie probiotyczne (3, 4, 9, 11). Do drobnoustrojów wykazujących właściwości probiotyczne zalicza się szczepy należące do gatunków: *Lactobacillus rhamnosus* GG, *L. acidophilus*, *L. plantarum*, *L. johnsonii*, *L. fermentum*, *Bifidobacterium bifidum*, *B. lactis*, *Enterococcus faecium*, *Streptococcus thermophilus* oraz drożdże *Saccharomyces boulardii* (4).

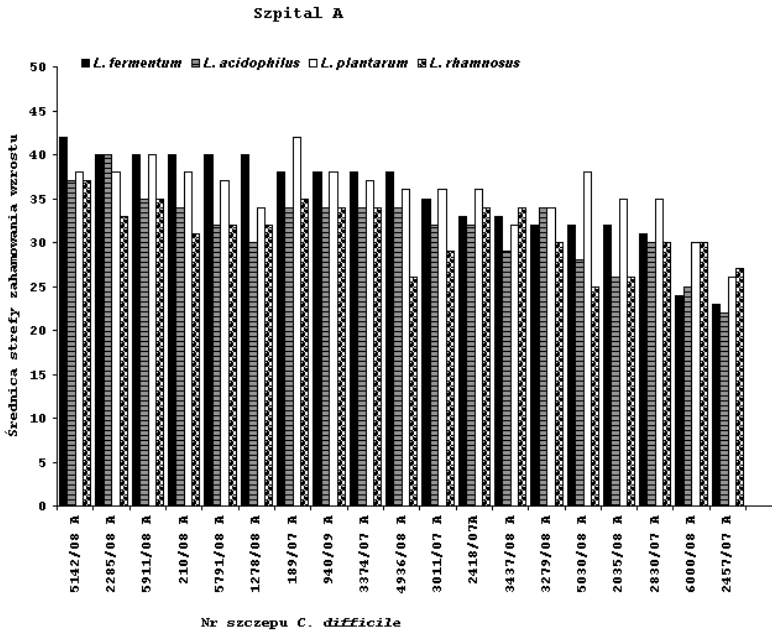
Probiotyki działają na makroorganizm poprzez różne mechanizmy, takie jak hamowanie wzrostu innych bakterii jelitowych w wyniku działania różnych związków wytwarzanych na przykład przez pałeczki z rodzaju *Lactobacillus sp*. (nadtlenek wodoru, kwas piroglutaminowy), współzawodniczenie o składniki odżywcze, konkurowanie o receptory komórek nabłonkowych jelita, modyfikowanie receptorów dla toksyn wytwarzanych przez bakterie chorobotwórcze czy aktywowanie odpowiedzi immunologicznej gospodarza (13). W wyniku działania mikroorganizmów probiotycznych utrzymana jest względna równowaga między bakteriami wchodzącymi w skład naturalnej mikroflory przewodu pokarmowego, a tym samym nie dochodzi do nadmiernej kolonizacji przez bakterie chorobotwórcze.

Celem pracy była ocena antagonistycznej aktywności w warunkach *in vitro* szczepów z rodzaju *Lactobacillus* wobec toksynotwórczych szczepów *C. difficile* wyhodowanych z przewodu pokarmowego pacjentów z biegunką poantybiotykową leczonych w 3 szpitalach w województwie mazowieckim.

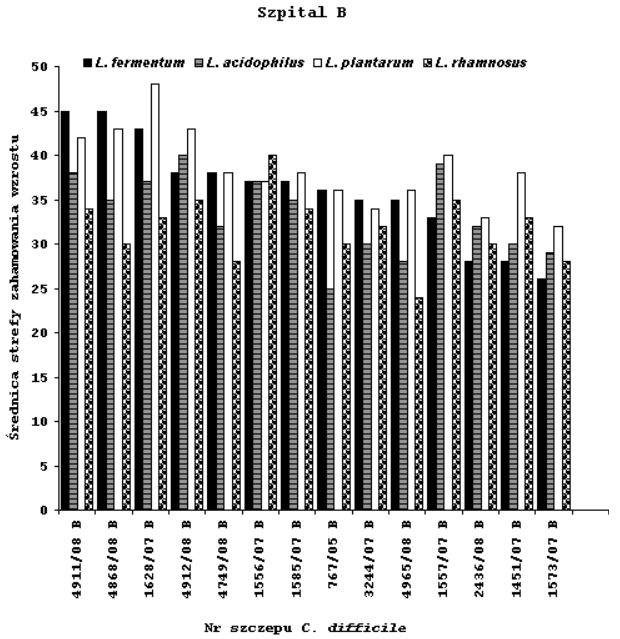
MATERIAŁ I METODY

Szczepy bakteryjne. Do badań użyto losowo wybranych 61 szczepów *C. difficile* wyhodowanych w latach 2007-2008 z próbek kału pacjentów hospitalizowanych w trzech szpitalach w województwie mazowieckim: Szpitalu Klinicznym Dzieciątka Jezus – Centrum Leczenia Obrażeń w Warszawie (szpital A), Centralnym Szpitalu Klinicznym w Warszawie (szpital B) oraz w Wojewódzkim Szpitalu Zespolonym im. M. Kacprzaka w Płocku (szpital C). Do badań antagonistycznej aktywności szczepów o działaniu probiotycznym użyto 4 szczepów wzorcowych: *Lactobacillus plantarum* 2017405, *Lactobacillus fermentum* 353, *Lactobacillus acidophilus* DSM 21007 i *Lactobacillus rhamnosus* GG, które otrzymano z Katedry Mikrobiologii Lekarskiej Collegium Medicum w Krakowie dzięki uprzejmości Profesora dr hab. n. med. Piotra B. Heczko.

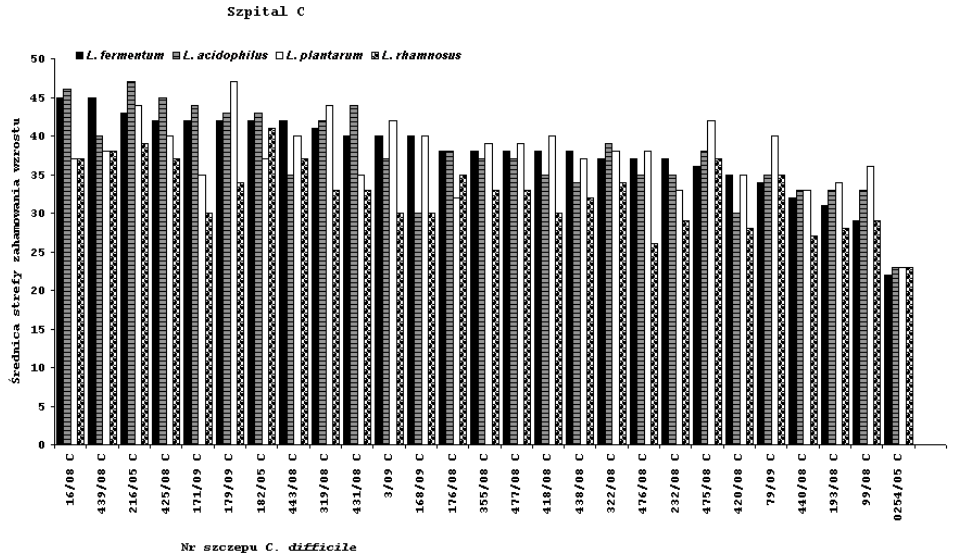
Hodowla i identyfikacja szczepów *C. difficile*. Szczepy *C. difficile* uzyskano z próbek kału biegunkowego, które posiano na płytki zawierające podłoże selektywne do izolacji *C. difficile* tj. podłoże CLO (bioMérieux, Marcy-l'Etoile, Francja). Podłoże zawierało Columbia agar z dodatkiem 5% krwi baraniej i antybiotyków: cefoksytyny, cykloseryny oraz amfoterycyny B. Posiewy inkubowano w warunkach beztlenowych w temperaturze 37°C przez 48 godz. Po tym czasie dokonano identyfikacji *C. difficile* na podstawie morfologii kolonii, żółto-zielonej fluorescencji kolonii w świetle lampy Wood'a przy długości fali 365 nm, charakterystycznego zapachu para-krezolu oraz właściwości biochemicznych oznaczonych testem API 20A (bioMérieux, Marcy-l'Etoile, Francja) (6).



Ryc. 1. Wpływ szczepów *Lactobacillus sp*. na szczepy *C. difficile* izolowane z przewodu pokarmowego pacjentów hospitalizowanych w szpitalu A



Ryc. 2. Wpływ szczepów *Lactobacillus sp*. na szczepy *C. difficile* izolowane z przewodu pokarmowego pacjentów hospitalizowanych w szpitalu B



Ryc. 3. Wpływ szczepów *Lactobacillus sp*. na szczepy *C. difficile* izolowane z przewodu pokarmowego pacjentów hospitalizowanych w szpitalu C

Wykrywanie genów toksyn *C. difficile*. Toksynotwórczość szczepów *C. difficile* ustalono na podstawie badania obecności genów kodujących toksynę A (*tcdA*), toksynę B (*tcdB*) oraz toksynę binarną (*cdtA* i *cdtB*) stosując metodę PCR, którą opisano wcześniej (6). W celu wykrycia fragmentu genu toksyny *tcdA* użyto swoistych starterów YT28/YT29 natomiast do wykrycia fragmentu genu *tcdB* użyto starterów YT17/YT18 (6). Fragmenty genów toksyny binarnej *cdtA* i *cdtB* wykryto stosując startery opisane przez *Stubbsa* wsp. (8).

Badanie wpływu pałeczek *Lactobacillus sp*. na szczepy *C.difficile* (7). Zakładano hodowlę szczepów *Lactobacillus sp*., które należały do gatunków: *L. plantarum*, *L. fermentum*, *L. acidophilus* i *L. rhamnosus* na podłożu MRS o grubości agaru 40 mm. Posiewy inkubowano w warunkach beztlenowych przez 18 godz. w temp. 37°C. Po uzyskaniu wzrostu szczepów *Lactobacillus sp*., w podłożu MRS wycięto okrągłe słupki, posługując się jałowym „korkoborem" o średnicy 9 mm (7). Szczepy *C. difficile* posiano przy użyciu jałowego wacika na płytki z agarem z krwią. Na tak przygotowane płytki nakładano słupki agarowe ze szczepami *Lactobacillus sp*. Na każdą płytkę nałożono po 4 słupki agarowe z czterema szczepami *Lactobacillus*. Płytki inkubowano w warunkach beztlenowych w anaerostatach w temp. 37°C przez 48 godz. Po okresie inkubacji dokonano pomiaru strefy zahamowania wzrostu *C. difficile* wokół słupków agarowych.

WYNIKI

Zbadano antagonistyczne działanie *in vitro* czterech wzorcowych szczepów probiotycznych należących do gatunków *L. plantarum*, *L.fermentum*, *L. acidophilus* i *L. rhamnosus* wobec 61 klinicznych szczepów *C. difficile* wyhodowanych w latach 2007-2008 z próbek kału chorych leczonych w 3 szpitalach województwa mazowieckiego. Wśród 61 badanych szczepów 51 należało do typu toksynotwórczości A+B+CDT-, ponieważ w metodzie PCR wykryto w materiale genetycznym pochodzącym z tych szczepów fragmenty genów toksyny A (*tcdA*) i toksyny B (*tcdB*) natomiast nie wykryto genów toksyny binarnej CDT (geny *cdtA* i *cdtB*). Pozostałe 10 szczepów *C. difficile* należało do typu A+B+CDT+ i posiadało zarówno geny *tcdA* i *tcdB* jak też geny toksyny binarnej. Wyniki przeprowadzonych badań przedstawiono na rycinach 1, 2 i 3. Średnia wielkość strefy zahamowania wzrostu szczepów *C. difficile* przez *L. plantarum* wyniosła 37,3 mm, *L. fermentum* 36,6 mm, *L. acidophilus* wynosiła 34,7 mm i *L. rhamnosus* 32,0 mm. Wszystkie badane szczepy *C. difficile* były wrażliwe na działanie bakterii *Lactobacillus sp*. Nie zaobserwowano różnic w działaniu szczepów probiotycznych w zależności od typu toksynotwórczości szczepów *C. difficile*.

DYSKUSJA

Zakażenia wywołane przez *C. difficile* stanowią jeden z ważniejszych problemów współczesnej diagnostyki i lecznictwa szpitalnego. Powodem takiego stanu są zmiany jakie dokonały się w obrębie samego gatunku, których skutkiem jest zwiększająca się wirulencja szczepów *C. difficile* (5). W ostatnich kilkunastu latach obserwuje się znaczny wzrost zużycia antybiotyków w lecznictwie szpitalnym. Niesie to za sobą poważne ryzyko zwiększania się liczby szczepów opornych na leki stosowane w leczeniu zakażeń *C. difficile* (CDI – Clostridium Difficile Infections). Niesłychanie istotne jest poszukiwanie alternatywnych metod leczenia tego schorzenia (6, 10).

Badania nad wpływem bakterii probiotycznych w leczeniu zakażeń przewodu pokarmowego prowadzono już w latach 90-tych XX wieku. *Gorbach* i wsp. (3) podawali przez kilkanaście dni pacjentom z objawami rzekomobłoniastego zapalenia jelita grubego (PMC – PseudoMembranous Colitis) bakterie probiotyczne *L. rhamnosus* GG. Po tym czasie zaobserwowano złagodzenie objawów choroby oraz zmniejszenie ilości toksyn w kale pacjentów.

Z przeprowadzonych badań wynika, że szczepy o właściwościach probiotycznych z rodzaju *Lactobacillus sp*. oddziaływały antagonistycznie w warunkach *in vitro* wobec toksynotwórczych laseczek *C. difficile*, wyhodowanych z kału pacjentów leczonych w trzech szpitalach Mazowsza. Najbardziej aktywny był szczep należący do gatunku *L. plantarum*. Dla porównania w badaniu *Wultańskiej* i wsp. (14) wzrost szczepów klinicznych *C. difficile* najbardziej hamował szczep *L. rhamnosus* GG. Ze względu na wzrost częstości występowania zakażeń *C. difficile* w Polsce oraz obniżoną skuteczność leczenia farmakologicznego wskazane jest kontynuowanie badań nad wpływem szczepów probiotycznych na laseczki *C. difficile*, w celu stosowania skutecznych preparatów probiotycznych w leczeniu i zapobieganiu CDI.

PIŚMIENNICTWO

1. *Bartlett JG*. Antibiotic-Associated Diarrhea. N Engl J Med 2002; 346: 334-9.
2. *Borriello SP*. Pathogenesis of *Clostridium diffcile* infection. J Antimicrob Chemother 1998; 41: 13-9.
3. *Gorbach SL*. Lactic acid bacteria and human health. Ann Med 1990; 22: 37-41.
4. *Heczko PB*, *Strus M*, *Jawień M*, *Szymański H*. Medyczne zastosowanie probiotyków. Wiadomości lekarskie 2005; 11-12: 640-6.
5. *McFarland LV*. Update on the changing epidemiology of *Clostridium difficile*-associated disease. Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol 2008; 5: 40-8.
6. *Pituch H*. Zakażenia *Clostridium difficile* w Polsce – nowa epidemiologia. Rozprawa habilitacyjna. Oficyna Wydawnicza Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego 2008.
7. *Strus M*, *Pakosz K*, *Gościniak H* i inni. Antagonistic activity of *Lactobacillus* bacteria strains against anaerobic gastrointestinal tract pathogens (*Helicobacter pylori*, *Campylobacter coli*, *Campylobacter jejuni*, *Clostridium difficile*). Med Dośw Mikrobiol 2001; 53: 133-42.
8. *Stubbs S*, *Rupnik M*, *Gilbert M* i inni. Production of an actin-specific ADP-ribosyltransferase (binary toxin) by strains of *Clostridium difficile*. FEMS Microbiol Lett 2000; 186: 307-12.
9. *Szajewska H*. Rola probiotyków w zapobieganiu i leczeniu chorób przewodu pokarmowego. Pediatria współczesna. Gastroenterologia, Hepatologia i Żywienie dziecka 2005; 7: 53-60.
10. *Venuto C*, *Butler M*, *Ashley ED*, *Brown J*. Alternative therapies for *Clostridium difficile* infections. Pharmacotherapy 2010; 30:1266-127.
11. *Verna EC*, *Lucak S*. Use of probiotics in gastrointestinal disorders: what to recommend? Therap Adv Gastroenterol 2010; 3: 307-19.
12. *Viswanathan VK*, *Mallozzi MJ*, *Vedantam G*. *Clostridium difficile* infection: An overview of the disease and its pathogenesis, epidemiology and interventions. Gut Microbes 2010; X: 234-42.
13. *Weichselbaum E*. Potential benefits of probiotics--main findings of an in-depth review. Br J Community Nurs 2010; 15: 110, 112, 114.
14. *Wultańska D*, *Pituch H*, *Obuch-Woszczatyński P* i inni. Wpływ wybranych gatunków pałeczek *Lactobacillus* sp. na szczepy *Clostridium difficile* o różnym profilu toksynotwórczości. Med Dośw Mikrobiol 2006; 58: 127-33.

Otrzymano: 19 IV 2012 r.
Adres Autora: 02-004 Warszawa, ul. Chałubińskiego 5,
Katedra i Zakład Mikrobiologii Lekarskiej WUM