

Beata Sobieszcząńska¹, Beata Kowalska-Krochmal¹, Krystyna Mowszet², Tomasz Pytrus²

WRAŻLIWOŚĆ NA ANTYBIOTYKI I CHEMIOTERAPEUTYKI
ENTEROAGREGACYJNYCH SZCZEPÓW *ESCHERICHIA COLI* (EAEC)
IZOLOWANYCH OD DZIECI Z BIEGUNKĄ

¹ Katedra i Zakład Mikrobiologii AM we Wrocławiu

Kierownik: Anna Przondo-Mordarska

² Dziecięcy Szpital Kliniczny AM we Wrocławiu

Kierownik: F Iwańczak

Enteroagregacyjne szczepy Escherichia coli (EAEC) uznane zostały za czynnik etiologiczny przewlekłych biegunek sekrecyjnych niemowląt. Długotrwałe biegunki, utrzymujące się miesiącami z uwagi na poważne następstwa niejednokrotnie zmuszają do leczenia. W pracy badano wrażliwość na antybiotyki i chemioterapeutyki 55 szczepów EAEC izolowanych od dzieci z biegunką.

Słowa kluczowe: enteroagregacyjne E. coli, wrażliwość na antybiotyki, ESBL

Key words: enteroaggregative E. coli, susceptibility to antibiotics, ESBL

WSTĘP

Enteroagregacyjne szczepy *Escherichia coli* (EAEC) związane są przede wszystkim z przewlekłymi biegunkami sekrecyjnymi u niemowląt (1, 2), ale mogą również wywoływać przewlekłe biegunki u osób dorosłych, szczególnie u pacjentów z AIDS, biegunki podróżnych oraz epidemie biegunek (3, 4, 5, 6, 7, 8, 9). EAEC różni od pozostałych szczepów *E. coli* odpowiedzialnych za biegunki u ludzi charakterystyczny, agregacyjny typ adhezji AA (*aggregative adherence*) do komórek nabłonka linii HEP-2 w teście adhezji *in vitro* (6, 10). Nie są znane wskazania do leczenia zakażeń o etiologii EAEC, ale przewlekły charakter biegunek u niemowląt, które mogą utrzymywać się nawet przez kilka miesięcy, niejednokrotnie zmusza do antybiotykoterapii. Izolowane w różnych częściach świata enteroagregacyjne *E. coli* wykazują zróżnicowaną wrażliwość na antybiotyki i chemioterapeutyki (3, 4, 11, 12, 13, 14). Większość szczepów EAEC jest wrażliwa na chinolony, z których ciprofloksacyna wykazuje *in vivo* dobrą aktywność w leczeniu przewlekłych biegunek podróżnych oraz utrzymujących się biegunek u pacjentów z zespołem AIDS (8, 11). *Vila i wsp.* (13) opisali jednak odporne na kwas nalidyksowy szczepy EAEC o zmutowanych genach *gyrA* i/lub *parC*. Wielooporne szczepy EAEC, niewrażliwe na penicyliny, tetracykliny, chloramfenikol, streptomycynę, kanamycynę, sulfametoksazol i trimetoprim opisali *Yamamoto i wsp.* (14). Oporność na antybiotyki i chemioterapeutyki była u badanych szczepów uwa-

runkowana obecnością plazmidu o wysokim ciężarze cząsteczkowym, niosącego geny lekooporności oraz kodującego czynnik agregacyjnej adhezji i mannozoopornej hemaglutynacji ludzkich erytrocytów.

Celem pracy było oznaczenie wrażliwości na antybiotyki i chemioterapeutyki enteroagregacyjnych szczepów *E. coli* izolowanych od dzieci z biegunką oraz zbadanie zdolności tych szczepów do syntezy β -laktamaz o rozszerzonym spektrum działania (ESBL).

MATERIAŁ I METODY

Badane 55 szczepów EAEC izolowano w latach 1999 – 2002 na podstawie testu adhezji *in vitro* od 55 dzieci z biegunką (średni wiek badanych dzieci 27 miesięcy), zamieszkujących miasto Wrocław i okolice. Szczepy przechowywano w bulionie Luria-Bertani (LB) z 15% glicerolem w -70°C . Do dalszych badań szczepy po rozmrożeniu pasażowano dwukrotnie na agarze zwykłym i powtarzano test adhezji wg *Cravioto i wsp.* (10) z 3- i 6-godziennym okresem inkubacji bakterii z komórkami nabłonka linii HEP-2.

Ponadto określono zdolność badanych szczepów do tworzenia kożucha na powierzchni bulionowej hodowli, co według *Albert i wsp.* (15) jest cechą charakterystyczną dla większości agregacyjnych szczepów *E. coli*. Zdolność do wytwarzania kożucha oceniano dla hodowli w LB oraz w bulionie tryptozowo-sojowym (TSB) po 24 godzinnej inkubacji w 37°C z wytrząsaniem i bez wytrząsania.

Dla wszystkich badanych szczepów wykonano serotypowanie z surowicami dla antygenów somatycznych enteropatogennych szczepów *E. coli* (EPEC).

Wrażliwość badanych szczepów na antybiotyki i chemioterapeutyki oznaczano metodą dyfuzyjno-krażkową (*diffuse disk method – DDM*). Do oznaczeń stosowano krążki firmy Becton Dickinson wysycone: ampicylina (10 μg), pieracylina (100 μg), amoksycylina z kwasem klawulanowym (20/10 μg), pieracylina z tazobaktamem (100/10 μg), ceftriaksonem (30 μg), ceftazydymem (30 μg), aztreonamem (30 μg), imipemenem (10 μg), meropenemem (10 μg), netylmycyna (30 μg), amikacyna (30 μg), ciprofloksacyna (5 μg), furazolidonem (100 μg), trimetoprimem/sulfametoksazolem (1,25/23,75 μg), trimetoprimem (5 μg), chloramfenikolem (30 μg). Interpretacji wyników dokonywano na podstawie pomiaru średnicy (mm) strefy zahamowania wzrostu bakterii wokół krążków według zaleceń NCCLS (16).

Zdolność do wytwarzania enzymów typu ESBL oznaczano z zastosowaniem testu dwóch krążków (*double disk synergy test – DDT*) wg *Jarlier i wsp.* (17). Na podłożu Müllera-Hintona nanoszono zawiesinę badanego szczepu (rozcieńczoną 0,5 w skali McFarlanda). Centralnie na płytce umieszczano krążek wysycony amoksycylina z kwasem klawulanowym (inhibitor β -laktamaz) a satelitarnie w odległości 20-30 mm krążki z aztreonamem, cefotaksymem, ceftazydymem i ceftriaksonem. Po 16–18 godzinach inkubacji w temp. 37°C obserwowano strefy zahamowania wzrostu bakterii. Dodatni wynik testu, świadczący o wytwarzaniu przez badany szczep ESBL polega na powstaniu i/lub asymetrycznym powiększeniu strefy zahamowania wzrostu wokół użytych krążków od strony krążka z inhibitorem β -laktamaz.

WYNIKI I OMÓWIENIE

Wśród przebadanych 55 szczepów EAEC izolowanych od dzieci z biegunką, 9 (16,4%) należało do serogrup EPEC: O18 – 2 szczepy, O86 – 2 szczepy, O25, O26, O125, O126, O127 – po jednym szczepie, 2 szczepy ulegały autoaglutynacji w 3% roztworze NaCl.

Wszystkie badane szczepy tworzyły na powierzchni LB i TSB kożuch o różnej grubości od 3 do 5 mm. Spośród 55 przebadanych enteroagregacyjnych szczepów *E. coli* większość była wrażliwa na analizowane antybiotyki i chemioterapeutyki, w tym w 100% na karbapenemy tj. imipenem i meropenem oraz na fluorochinolony – ciprofloksacynę, w 98–95% na furazolidon, chloramfenikol, ceftazydym, ceftriakson, aztreonam oraz netylmycynę i amikacynę, w 91–87% na amoksycylinę z kwasem kalwulanowym, trimetoprim/sulfametoksazol. Najwięcej szczepów opornych (29–35%) stwierdzono na ampicylinę i piperacylinę (tab. I). Trzy szczepy posiadały zdolność syntezy ESBL oraz wzór oporności charakterystyczny dla drobnoustrojów ESBL-dodatnich (tab. II).

Badania własne wykazały dużą lekowrażliwość szczepów EAEC powodujących przewlekłe biegunki u dzieci pochodzących z Wrocławia i okolic. Stosowanie jednak wielu z tych antybiotyków jest obciążone licznymi ograniczeniami; fluorochinolony nie powinny być stosowane u dzieci poniżej 15 roku życia z uwagi na powodowanie zmian w chrząstce stawowej, karbapenemy zalecane są jedynie w leczeniu zakażeń wywoływanych przez szczepy ESBL-dodatnie i w stanach zagrażających życiu. Aminoglikozydy również mają ograniczone

Tabela I. Wyniki oznaczania wrażliwości na antybiotyki i chemioterapeutyki badanych 55 enteroagregacyjnych szczepów *E. coli*

Table I. The results of susceptibility to antimicrobial agents of 55 enteroaggregative *E. coli* strains examined

Testowany czynnik antibakteryjny		Liczba (%) szczepów opornych
Ampicylina	AM	19 (34,5)
Piperacylina	PIP	16 (29)
Amoksycylina/kwas klawulanowy	AMC	5 (9)
Piperacylina/tazobactam	TZP	0
Ceftriakson	CRO	3 (5)
Ceftazydym	CAZ	3 (5)
Aztreonam	ATM	3 (5)
Imipenem	IPM	0
Meropenem	MEM	0
Netylmycyna	NET	3 (5)
Amikacyna	AN	3 (5)
Ciprofloksacyna	CIP	0
Furazolidon	F/X	1 (2)
Trimetoprim/sulfametoksazol	STX	6 (11)
Trimetoprim	TRIM	7 (13)
Chloramfenikol	C	3 (5)

Tabela II. Wrażliwość na antybiotyki i chemioterapeutyki ESBL – dodatnich szczepów EAEC

Table II. The susceptibility to antimicrobial agents of EAEC ESBL-producing strains

Szczep	AM	PIP	AMC	TZP	CRO	CAZ	ATM	IPM	MEM	NET	AN	CIP	F/X	STX	TRIM	C
1.	R	R	R	S	R	R	R	S	S	R	R	S	S	R	R	S
2.	R	R	I	S	R	R	R	S	S	R	R	S	S	R	R	R
3.	R	R	S	S	R	R	R	S	S	R	R	S	S	R	R	S

S – wrażliwy, R – oporny, I – zmniejszona wrażliwość

zastosowanie jedynie do szczepów bakteryjnych niewrażliwych na inne leki przeciwdrobnoustrojowe. Stosowanie cefalosporyn powinno być bardzo uważnie rozpatrywane z uwagi na udowodnioną rolę tych leków w selekcji szczepów wieloopornych. W przypadku pozostałych antybiotyków, aminopenicylin, penicylin z inhibitorami β -laktamaz, ko-trymoksazolu, trimetoprimu oraz furozolidonu, choć nie ma tylu ograniczeń, wykazana na nie oporność wśród badanych szczepów EAEC jednoznacznie wskazuje na konieczność oznaczania dla izolowanych enteroagregacyjnych szczepów *E. coli* lekowrażliwości *in vitro*.

B Sobieszcańska, B Kowalska-Krochmal, K Mowszet, T Pytrus

SUSCEPTIBILITY TO ANTIMICROBIAL AGENTS OF ENTEROAGGREGATIVE ESCHERICHIA COLI STRAINS ISOLATED FROM CHILDREN WITH DIARRHEA

SUMMARY

Enteroaggregative *Escherichia coli* (EAEC) are responsible for infant's persistent secretory diarrhea, traveler's diarrhea and outbreaks. Since isolated all over the world EAEC strains show a low to high level of resistance to antimicrobial agents, the aim of the study was to determine antimicrobial susceptibility and β -lactamases extended spectrum (ESBL) production *in vitro* among 55 enteroaggregative *E. coli* strains isolated from children with diarrhea.

Among the 17 antimicrobial agents tested, most of them showed good *in vitro* activity against EAEC isolates examined, apart from ampicilin and piperacylin (about 30% resistant EAEC strains). Three of 55 examined EAEC isolates were ESBL – producing strains.

Because of the presence of ESBL – producing as well as resistant to antimicrobial agents EAEC isolates among enteroaggregative *E. coli* strains examined, treatment with antibiotics should be undertaken according to antibiogram.

PIŚMIENNICTWO

1. Huppertz HI, Rutkowski S, Aleksic S, i in. Acute and chronic diarrhoea and abdominal colic associated with enteroaggregative *Escherichia coli* in young children living in Western Europe. *Lancet* 1997;349,1660–2.
2. Wanke CA, Schorling JB, Barret TJ, i in. Potential role of adherence traits of *Escherichia coli* in persistent diarrhea in an urban Brazilian slum. *Pediatr Infect Dis J* 1991;10,746–51.
3. Chan KN, Phillips AD, Knutton S, i in. Enteroaggregative *Escherichia coli*: another cause of acute and chronic diarrhoea in England? *J Pediatr Gastroenterol Nut* 1994;18:87–91.
4. Còbeljić M, Miljković-Selimović B, Paunović-Todosijević D, i in. Enteroaggregative *Escherichia coli* associated with an outbreak of diarrhoea in a neonatal nursery ward. *Epidemiol Infect* 1996; 117,11–6.
5. Itoh Y, Nagano I, Kunishima M, i in. Laboratory investigation of enteroaggregative *Escherichia coli* O untypeable: H10 associated with a massive outbreak of gastrointestinal illness. *J Clin Microbiol* 1997;35,2546–50.
6. Law D, Chart H. Enteroaggregative *Escherichia coli*. *J Appl Microbiol* 1998;84,685–97.
7. Mathewson JJ, Johnson PC, DuPont HL, i in. A newly recognized cause of traveler's diarrhea: enteroadherent *Escherichia coli*. *J Infect Dis* 1985;151,471–5.
8. Polotsky I, Nataro JP, Kotler D, i in. HEp-2 cell adherence patterns, serotyping, and DNA analysis of *Escherichia coli* isolates from eight patients with AIDS and chronic diarrhea. *J Clin Microbiol* 1997;35,1952–8.
9. Smith HR, Cheasty T, Rowe B. Enteroaggregative *Escherichia coli* and outbreaks of gastroenteritis in UK. *Lancet* 1997;350,814–5.

10. Cravioto A, Tello A, Navarro A, i in. Association of *Escherichia coli* HEp-2 adherence patterns with type and duration of diarrhoea. *Lancet* 1991;337,262–4.
11. Glandt M, Adachi JA, Mathewson JJ, i in. Enteroaggregative *Escherichia coli* as a cause of traveler's diarrhea: clinical response to ciprofloxacin. *Clin Infect Dis* 1999;29,335–8.
12. Sang WK, Oundo JO, Mwituria JK, i in. Multidrug – resistant enteroaggregative *Escherichia coli* associated with persistent diarrhea in Kenyan children. *Emerg Infect Dis* 1997;3,373–4.
13. Vila J, Vargas M, Ruiz J, i in. Susceptibility patterns of enteroaggregative *Escherichia coli* associated with traveler's diarrhoea: emergence of quinolone resistance. *J Med Microbiol* 2001; 50,996–1000.
14. Yamamoto T, Echeverria P, Yokota T. Drug resistance and adherence to human intestines of enteroaggregative *Escherichia coli*. *J Infect Dis* 1992;165,744–9.
15. Albert MJ, Quadri F, Haque A, i in. Bacterial clump formation at site of liquid culture as a rapid test for identification of enteroaggregative *Escherichia coli*. *J Clin Microbiol* 1993;31:1397–9.
16. Performance Standards for antimicrobial susceptibility testing. Ninth Informational Supplement, NCCLS M100-S8, M100-S9, January 1999.
17. Jarlier V, Nicolas M, Fournier G, i in. Extended broad – spectrum β -lactamases conferring transferable resistance to newer β -lactam agents in *Enterobacteriaceae*: hospital prevalence and susceptibility patterns. *Rev Infect Dis* 1988;10,867–78.

Adres autorów:

Beata Sobieszcańska
Katedra i Zakład Mikrobiologii AM
ul. Chalubińskiego 4, 50-368 Wrocław
Tel. (0-prefiks-71) 784-12-77 lub 78
e-mail: mapasobie@provider.pl