

*Zygmunt Muszyński, Ilona Mirska, Katarzyna Matuska*

## PAŁECZKI Z RODZAJU *LACTOBACILLUS* - CZYNNIK ZAKAŻEŃ OPORTUNISTYCZNYCH U DZIECI

Katedra i Zakład Bakteriologii Farmaceutycznej  
Akademii Medycznej im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu  
Kierownik Katedry i Zakładu: Zygmunt Muszyński

*Pałeczki Gram-dodatnie z rodzaju Lactobacillus kolonizują pacjentów z obniżoną odpornością i mogą być źródłem poważnych zakażeń oportunistycznych. W pracy poddano analizie występowanie szczepów Lactobacillus spp. w materiałach diagnostycznych pobranych w klinicznym szpitalu pediatrycznym w oddziałach: onkologii, transplantacji szpiku kostnego i IOM.*

*Słowa kluczowe: Lactobacillus spp., patogeny oportunistyczne, diagnostyka laboratoryjna*

*Key words: Lactobacillus species, opportunistic pathogens, laboratory diagnostics*

### WSTĘP

Do rodzaju *Lactobacillus* należy liczna grupa Gram-dodatnich pałeczek (103 gatunki), spośród których gatunki: *acidophilus*, *casei*, *paracasei* i *rhamnosus* wchodzi w skład mikroflory jelitowej. Pałeczki te występują także w jamie ustnej i w układzie moczowo-płciowym, często kolonizują pochwę kobiet. Wykazują wysoką hydrofobowość powierzchni i prawdopodobnie wykorzystują te same mechanizmy kolonizacji powierzchni komórek nabłonka jelitowego i pochwowego co *Escherichia coli* i inne patogenne bakterie Gram-ujemne (1,2). Posiadają silne właściwości antagonistyczne wobec innych drobnoustrojów, w tym chorobotwórczych, które są mechanizmem obronnym przed mikroflorą konkurującą o receptory na nabłonku i o substancje odżywcze. Działanie antagonistyczne polega głównie na znacznym obniżeniu pH środowiska bytowania do wartości poniżej 4,5 wskutek wytwarzania kwasu mlekowego i innych kwasów organicznych, uwalniania amoniaku, nadtlenu wodoru oraz syntezy licznych bakteriocyn i enzymów. Zdolność do wytwarzania enzymu hydrolazy soli żółci chroni te bakterie przed szkodliwym działaniem soli żółciowych i ułatwia przeżywanie w układzie pokarmowym (3). Pałeczki *Lactobacillus spp.* to bakterie fakultatywnie chorobotwórcze. Uczestniczą w powstawaniu próchnicy zębów, a u osób z obniżoną odpornością, mogą być czynnikiem poważnych zakażeń oportunistycznych.

Celem pracy była ocena występowania szczepów *Lactobacillus spp.* w materiałach diagnostycznych pobranych w klinicznym szpitalu pediatrycznym a także ocena cech fenotypowych wyosobnionych szczepów i aktywności enzymu hydrolazy soli żółci.

#### MATERIAŁ I METODY

Badaniami objęto pałeczki z rodzaju *Lactobacillus* wyosobnione w okresie 01.2005 - 04.2006 z materiałów diagnostycznych pobranych od dzieci w oddziałach szpitala klinicznego. Materiał do badań stanowiły krew, płyn mózgowo-rdzeniowy, płyn otrzewnowy, wydzieliny ropne, wydzieliny i wymazy z dróg oddechowych, odbytu i dróg moczowo-płciowych. Izolaty hodowano w warunkach beztlenowych w temperaturze 37°C przez 48 godz. na podłożach bioMerieux stosowanych rutynowo w mikrobiologii klinicznej (TSA, Columbia + 5% krwi baraniej, D-coccosel) oraz na podłożu specyficznym (MRS) do izolacji bakterii z rodzaju *Lactobacillus*. Szczepy zidentyfikowano na podstawie profilu biochemicznego w teście API 50CH, stosując oprogramowanie komputerowe ATB i bazę danych (V5.0) (bioMerieux). Oznaczono podstawowe cechy fenotypowe (morfologia, zdolność ruchu, wytwarzanie katalazy, oporność na działanie kwasu taurodeoksycholowego (TDCA), wrażliwość na antybiotyki). Aktywność hydrolazy soli żółci (BSH) określono metodą płytkową (4).

#### WYNIKI I OMÓWIENIE

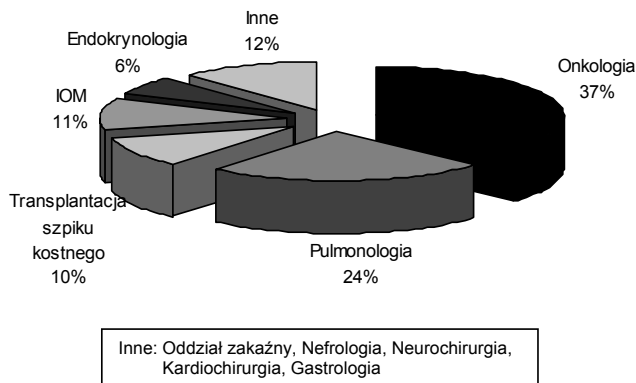
W okresie badań wyosobniono 107 szczepów z rodzaju *Lactobacillus*, głównie w oddziałach onkologii, pulmonologii, IOM i transplantacji szpiku kostnego (ryc. 1). Izolowano je z różnych materiałów (tab. I), w tym znamienych dla zakażenia (krew, płyn mózgowo-rdzeniowy, wysięk otrzewnowy, przetoka jelitowa). Występowanie pałeczek *Lactobacillus spp.* w kale jako składnika mikroflory jelitowej jest normalne, jednak dla dzieci oddziału

Tabela I. Liczba (Procent) pałeczek *Lactobacillus spp.* izolowanych z różnych materiałów klinicznych

Table I. Number (Percentage) of *Lactobacillus species* isolated from different clinical sites

Materiał	Szczepy <i>Lactobacillus spp.</i>	
	Liczba	Procent
krew	10	9,3%
płyn mózgowo-rdzeniowy	1	0,9%
ropa z przetoki jelitowej	1	0,9%
płyn otrzewnowy	1	0,9%
wymazy z nosa ,gardła, jamy ustnej	62	58,0%
plwocina	19	18,0%
wydzielina z oskrzeli	5	4,6%
kał	7	6,5%
mocz	1	0,9%
Razem	107	100%

Ryc. 1. Częstość izolacji pałeczek *Lactobacillus* spp. w różnych oddziałach szpitalnych  
 Fig. 1. Prevalence of *Lactobacillus* species depending on hospital ward



transplantacji szpiku kostnego, w przypadku gdy izolat jest monokulturą, może być czynnikiem ryzyka. Interpretując wyniki badań należy mieć także na uwadze, że częsta obecność pałeczek *Lactobacillus* w wymazach pobranych z błon śluzowych nosa, jamy ustnej i gardła może być efektem selekcyjnej presji antybiotyków o szerokim spektrum działania lub doustnego podawania dzieciom probiotyków, natomiast plwocina i wydzielina z oskrzeli mogą zostać zanieczyszczone tymi bakteriami. Podobnie próbka moczu mogła zostać zanieczyszczona pałeczkami *Lactobacillus* spp. z pochwy lub przewodu pokarmowego.

W tabeli II przedstawiono przypadki zakażeń, które w okresie badań wystąpiły w oddziałach IOM i onkologii. Zakażenia dotyczyły dzieci w wieku od 39 dni do 14 lat,

Tabela II. Przypadki zakażeń wywołanych przez pałeczki *Lactobacillus* spp. u dzieci  
 Table II. Infections caused by *Lactobacillus* spp. in children

Zakażenie / materiał kliniczny	Liczba przypadków	Choroba podstawowa pacjentów	Wiek pacjentów	Oddział	Wyosobniony gatunek <i>Lactobacillus</i> spp.
Bakteriemia/ krew pobrana z cewnika i osobnego wkłucia	10	białaczka szpikowa, guz mózgu wrodzona wada serca (zabieg chirurgiczny), mukowiscydoza, perforacja jelit	od 39 dni do 14 lat	IOM onkologia	<i>L. rhamnosus</i> <i>L. para paracasei</i>
Zakażenia wewnątrz- brzuszne/ płyn otrzewnowy przetoka jelitowa	1 1	ostre zapalenie wyrostka ro- baczkowego zespół Crohna	10 lat 13 lat	IOM IOM	<i>L. rhamnosus</i> <i>L. rhamnosus</i>
Zakażenie ośrodkowe- go układu nerwowego/ płyn mózgowo- rdzeniowy	1	wrodzona wada serca (zabieg chirurgiczny)	3 miesiące	IOM	<i>L. rhamnosus</i>

a najczęstszymi były bakterie u chorych z cewnikami naczyniowymi, wywołane przez *L. rhamnosus* i *L. para paracasei*.

Wśród wyosobnionych w pracy pałeczek dominował gatunek *L. rhamnosus*. Bakterie te rosły słabo na rutynowych podłożach, tworząc kolonie fenotypowo podobne do wielu bakterii, w tym enterokoków. Ich wzrost na podłożu selektywnym MRS był obfity, a charakterystyczne kolonie, okrągłe i wypukłe, można było łatwo odróżnić od kolonii innych drobnoustrojów. Wszystkie wyosobnione w pracy szczepy miały też inne cechy uważane za charakterystyczne dla enterokoków, na przykład rosły w obecności 6,5% NaCl, nie wykazywały ruchu, nie wytwarzały katalazy, rozkładały eskulinę na agarze z żółcią, rosły w obecności TDCA (0,6%). Aktywność hydrolazy soli żółci wykryto u 25% wyosobnionych z materiałów klinicznych szczepów *L. rhamnosus*, co może wskazywać na źródło ich pochodzenia. Ten wewnątrzkomórkowy enzym występuje u większości *Lactobacillus spp.* izolowanych z przewodu pokarmowego i jest szczególnie pożądanym dla szczepów probiotycznych, ponieważ chroni przed działaniem skoniugowanych soli żółci i mikroflorą konkurencyjną.

Badane w pracy szczepy *L. rhamnosus* i *L. para paracasei* były odporne na wankomycynę i wrażliwe na linezolid. Naturalna oporność na wankomycynę stanowi cechę, która odróżnia szczepy tych gatunków oraz *L. casei* i *L. paracasei* od wrażliwych na wankomycynę *L. acidophilus* (5). U niektórych szczepów z rodzaju *Lactobacillus*, podobnie jak u enterokoków, występuje tolerancja na antybiotyki  $\beta$ -laktamowe, co oznacza, że stężenia bakteriobójcze (MBC) są wielokrotnie wyższe niż bakteriostatyczne (MIC). Mackay i wsp. (5) opisali przypadek zapalenia wsierdza u 67 letniego pacjenta po zabiegu stomatologicznym, poprzedzonym profilaktycznym podaniem amoksycyliny. Zakażenie wywołał probiotyczny szczep *L. rhamnosus*, wykazujący tolerancję na podany antybiotyk.

Przegląd piśmiennictwa dostarcza dowodów na potencjalnie wzrastające znaczenie pałeczek z rodzaju *Lactobacillus* w wywoływaniu zakażeń. Pałeczki te mogą penetrować w głąb ustroju i wywoływać różnego rodzaju zakażenia u pacjentów w starszym wieku, o obniżonej odporności, szczególnie u leczonych antybiotykami o szerokim spektrum działania. Do najczęstszych zakażeń należą bakterie i zapalenie wsierdza, występujące często u pacjentów z chorobami serca i poddanych zabiegom kardiologicznym. Opisano przypadki zapalenia wsierdza po zabiegach dentystrycznych i zapalenia otrzewnej u chorych dializowanych (5,6,7). Brauncajs (8) analizując ponad 160 opisanych w piśmiennictwie przypadków zakażeń wywołanych przez pałeczki *Lactobacillus spp.* podkreśla, że sprzyjają im zabiegi chirurgiczne, urazy, zakażenia wirusowe, cukrzyca, przeszczepianie narządów, a także białaczka i inne choroby jak np. nowotworowe i związane z nimi sposoby leczenia: chemioterapia, radioterapia, doprowadzające do znacznego spadku liczby neutrofilów poniżej 1000/mm<sup>3</sup> lub mniej. Wiele z tych czynników występuje także u dzieci leczonych na oddziałach onkologii, transplantacji szpiku kostnego, IOM i jest przyczyną zakażeń endogennych.

Pałeczki *Lactobacillus spp.* są obecnie i będą ekstensywnie wykorzystywane w żywności i medycynie jako: probiotyki, suplementy diety, nowe generacje szczepów o modyfikowanych genetycznie cechach. Skuteczność i bezpieczeństwo wprowadzanych na rynek preparatów powinny podlegać kontroli, ponieważ teoretycznie istnieje ryzyko wystąpienia działań niepożądanych oraz przeniesienia oporności na inny drobnoustrój. Szczególnie dużej ostrożności wymaga zastosowanie tych preparatów u pacjentów z poważnym uszkodzeniem

przewodu pokarmowego lub wysokim ryzykiem zakażenia oportunistycznego (1,6,9). Wytyczne FAO/WHO zalecają wnikliwą ocenę szczepów probiotycznych w udokumentowanych badaniach laboratoryjnych i klinicznych, obejmującą wzorce ich wrażliwości na antybiotyki, wytwarzanie toksyn, działanie hemolityczne, właściwości metaboliczne, zakaźność na modelach zwierzęcych o upośledzonej odporności, działania uboczne i niepożądane u ludzi (10).

#### WNIOSKI

1. Pałeczki z rodzaju *Lactobacillus* kolonizują dzieci leczone w oddziałach onkologii, transplantacji szpiku kostnego i IOM i mogą być źródłem zakażeń oportunistycznych.
2. Gatunek *Lactobacillus rhamnosus* był najczęściej przyczyną zakażeń oportunistycznych u dzieci.
3. Cechy fenotypowe pałeczek *Lactobacillus spp.*, w tym wiele podobieństw do rodzaju *Enterococcus spp.*, utrudniają diagnostykę laboratoryjną tych bakterii.
4. Użycie podłoża MRS może ułatwić izolację pałeczek *Lactobacillus spp.* z materiałów klinicznych.

Z Muszyński, I Mirska, K Matuska

#### LACTOBACILLUS SPECIES AS OPPORTUNISTIC PATHOGENS IN CHILDREN

#### SUMMARY

The purpose of this research was the analysis of the *Lactobacillus spp.* strain occurrence in diagnostic materials obtained in the clinical pediatric hospital as well as to evaluate the phenotypic features of isolated strains and bile salts hydrolase (BSH) activity.

Isolated strains were grown both on media routinely used in clinical microbiology (TSA, Columbia + 5% sheep blood, D-coccosel) and on selective media (MRS) to isolate *Lactobacillus* bacteria. Strains were identified on the basis of biochemical profile in API 50CH test. Strains morphology and appearance of bile salts hydrolase activity were determined.

During the research 107 *Lactobacillus* strains were isolated in oncology ward (37%), pulmonology (24%), home marrow transplantation (10%), intensive care unit (11%), and others. The strains were isolated from blood (9%), cerebrospinal fluid (1%), peritoneal fluid (1%), intestinal fistula (1%), respiratory tract (81%) and others. *L. rhamnosus* species dominated. The isolates grew poorly on routine media while on selective (MRS) media they grew well. Bile salts hydrolase (BSH) activity was detected in 20% of the strains.

The results of the research show that *Lactobacillus* rods colonise patients with lowered immunity and may be the source of serious opportunistic infections in children. Phenotypic features, including many similar to *Enterococcus species*, make the diagnosis of these bacteria difficult. The use of MRS media can make it easier to isolate *Lactobacillus* rods from clinical materials.

#### PIŚMIENNICTWO

1. Apostolou E, Kirjavainen PV, Saxelin M, i in. Good adhesion properties of probiotics: a potential risk for bacteremia? FEMS Immun Med Microbiol 2001; 31: 35-39.

2. Strus M, Kukla G, Rurańska-Smutnicka D i in. Właściwości powierzchniowe bakterii z rodzaju *Lactobacillus*. II. Adherencja do linii komórkowych. *Med Dośw Mikrobiol* 2001; 53: 253-258.
3. Ziarno M. Znaczenie aktywności hydrolazy soli żółci u bakterii z rodzaju *Lactobacillus*. *Post Mikrobiol* 2004; 43 (3): 285-296.
4. Dashkevich MD, Feighner SD. Development of a differential medium for bile salt hydrolase-active *Lactobacillus* spp. *Appl Environ Microbiol* 1989; 55: 11-16.
5. Mackay AD, Taylor MB, Kibbler CC i in. *Lactobacillus* endocarditis caused by probiotic organism. *Clin Microbiol Infect* 1999; 5(5): 290-292.
6. Harty DWS, Oakey HJ, Patrikakis M, i in. Pathogenic potential of lactobacilli. *Int J Food Microbiol* 1994; 24: 179-189.
7. Klein G, Zill E, Schindler R, i in. Peritonitis associated with vancomycin-resistant *Lactobacillus rhamnosus* in a continuous ambulatory peritoneal dialysis patient: organism identification, antibiotics therapy, and case report. *J Clin Microbiol* 1998; 36 (6): 1781-1783.
8. Brauncajs M. Pałeczki kwasu mlekowego jako czynnik etiologiczny zakażeń oportunistycznych. *Mikrobiol Med* 2002; 1(30): 12-17.
9. Senok AC, Ismaeel AY, Botta GA. Probiotics: facts and myths. *Clin Microbiol Infect* 2005; 11: 958-966.
10. FAO/WHO. Evaluation of health and nutritional properties of powder milk and live lactic acid bacteria. Cordoba, Argentina: Food and Agriculture organization of the United Nations and World Health Organization Expert Consultation Report 2001.

Otrzymano: 30.10.2006 r.

**Adres autora:**

Prof. dr hab. med Zygmunt Muszyński  
Kierownik Katedry i Zakładu Bakteriologii Farmaceutycznej  
Akademii Medycznej, im. Karola Marcinkowskiego  
60-781 Poznań, ul. Świącickiego 4  
tel./fax 061-854 67 20  
e-mail: zmuszyn@amp.edu.pl