

Biologicky aktivní látky Stanovení citlivosti k antibiotikům Stanovení koncentrace antibiotik



Cíle cvičení:

1. Stanovit citlivost mikroorganismů k antibiotikům.
2. Porovnat citlivost různých bakterií k různým antibiotikům.
3. Stanovit minimální inhibiční koncentraci dilučním testem

Teoretická část:

Antibiotika jsou v prostředí přirozeně a široce produkována jakožto sekundární metabolity různými mikroorganismy, aby potlačila růst konkurenčních druhů a získávala tak pro produkční druh výhodu při soutěži o substrát. V přirozeném prostředí patří mezi největší producenty antibiotik **houby**. Extracelulární produkcí sekundárních metabolitů ovlivňují ostatní mikroorganismy ve svém bezprostředním okolí. Mezi nejproduktivnější rody patří *Penicillium*, *Aspergillus*, *Acremonium*, *Cephalosporium*, *Paecilomyces*, *Scopulariopsis*. Vzhledem ke schopnosti působit na růst mikrobů, tedy i možných patogenů, je malá část těchto produktů využívána jako chemoterapeutické látky.

Použití **antimikrobiální látky** patří spolu s desinfekčními prostředky mezi chemické metody kontroly mikrobiálního růstu. Antimikrobiální látky, které se užívají k léčbě nemocí a aplikují se vnitřně se nazývají **chemoterapeutická činidla**. Vzájemně se liší **chemickou strukturou, spektrem účinnosti a mechanismem účinku**. (Prvním nalezeným antibiotikem (Fleming 1928) byl penicilin produkový plísní *Penicillium chrysogenum*, následoval streptomycin produkový aktinomycetou rodu *Streptomyces*. Aktinomycety zůstávají důležitým zdrojem antibiotik.)

Na gramnegativní bakterie působí antibiotika tak, že inhibují jejich proteosyntézu a syntézu DNA a RNA; u grampozitivních bakterií působí na syntézu buněčné stěny, kyseliny listové. Důležitými kritérii pro zhodnocení účinku antimikrobiálního činidla je jeho **koncentrace**, doba kontaktu a je-li pro bakterii letální (**baktericidní**) nebo způsobují-li přechodnou inhibici růstu (**bakteriostatické**). Z hlediska aplikace v humánní nebo veterinární medicíně je důležité určit citlivost mikroorganismu k aplikované látce.

U všech mikrobiologických metod je nutno zachovávat stejnou dobu a teplotu kultivace pro daný mikroorganismus a testovanou látku. Antimikrobiální činidla musejí být použita s ohledem na bakteriální druh, na pH, rozpustnost, toxicitu, přítomnost organického materiálu a cenu.

Podle způsobu nanášení testované látky rozlišujeme **difúzní metody stanovení citlivosti k antibiotikům**:

a/ kapková - kdy se látka kape na povrch tuhého média (je nepřesná, využívá se spíše pro kvalitativní stanovení – zda je bakterie vůbec citlivá)

b/ disková - testovanou látkou jsou v tomto případě nasyceny disky filtračního papíru, které se kladou na agarové plotny (rozsáhlé využití při rutinním testování citlivosti patogenních mikroorganismů na antibiotika, komerčně vyráběné disky)

c/ komínková - do agarové vrstvy se vtlačují komínky ze skla, porcelánu nebo nerezavějící oceli (ne až na dno a všechny stejně hluboko) a do nich se pipetují roztoky testovaných látek a konečně

d/ jamková - u které se testované látky pipetují do jamek vyhloubených korkovrtem přímo do agarové vrstvy.

Metoda stanovení koncentrace antibiotika se nazývá difúzní jamková metoda. Z hodnot průměrů zón standardních roztoků se sestrojí kalibrační přímka (závislost průměru zóny v mm na logaritmu koncentrace) pro oxacilin. Z kalibrační přímky se stanoví neznámá koncentrace pipetovaných vzorků antibiotika.

Metoda určení **minimální inhibiční koncentrace** antibiotika se nazývá **metoda zřed'ovací** a provádí se buď ve zkumavce nebo na mikrotitrační destičce. Látka se obvykle ředí faktorem 2. Pomocí této kvantitativní metody lze stanovit tzv. **minimální inhibiční koncentraci (MIC)**, což je nejnižší koncentrace antimikrobiální látky, při které ještě nepozorujeme bakteriální růst.

Protože citlivost difúzních metod je závislá především na difúzi testované látky v agarové vrstvě, je nutno při její přípravě dodržet některé podmínky: **konstantní hustotu a vlhkost agaru, stejnou tloušťku agaru** (všeobecně se doporučuje 5 mm, ale výhodné je stanovení na tenkých vrstvách - **3 mm**) a přípravu na **absolutně rovném povrchu**. Při přípravě vzorků je rovněž nutno přesně dodržovat stanovené podmínky týkající se hlavně extrakce a pH roztoku.

Materiál

- Petriho misky s Mueller-Hintonovým agarem (M 12)
- Sterilní vatová tyčinka
- Antimikrobiální disky
- Standardy a vzorky oxacilinu
- Sterilní pinzeta, korkovrty, skalpely
- Automatická pipeta
- Sterilní špičky
- Pravítko
- **Bakteriální kultury:**
 - a) pro diskovou metodu: každý uvede svůj kmen
 - b) pro metodu stanovení koncentrace oxacilinu: *Staphylococcus aureus* NCTC 8511

A. Postup stanovení citlivosti k antibiotikům difúzním testem – disková metoda

Stanovení citlivosti se nejčastěji provádí pomocí kvalitativního **difusního testu** v agarovém médiu. Testovaný organismus rovnoměrně rozetře po povrchu agaru a potom se na roztěr aplikují papírové **disky** napuštěné antimikrobiální látkou (komerčně dodávané, napuštěné definovaným množstvím látky). **Důležitou informací je rovněž koncentrace antibiotika uvedená na každém disku.**

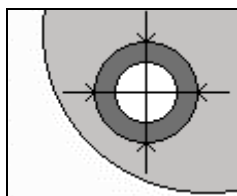
Během kultivace **difunduje látka z disku** horizontálně do okolního agaru v **koncentračním gradientu**. Účinná látka se projeví vytvořením kruhové, tzv. **inhibiční zóny** kolem disku. Citlivost mikroorganismu k testované látce se určí z **velikosti inhibiční zóny**. Velikost zóny je ovlivněna schopností antimikrobiální látky difundovat agarem a rychlostí růstu mikroorganismu. V klinických laboratořích se proto používá standardizovaný Kirby-Bauerův test. Správnost testu je kontrolována za pomoci **standardních bakteriálních kmenů**. Test využívá ke kultivaci Mueller-Hintonův agar, v němž látka volně difundují.

- Na povrch agarové plotny předem předsušené (60°C, 10 - 20 minut) pipetujeme po 0,2 ml bujonové kultury, rozetřeme sterilní hokejkou a necháme asi 5 minut stát. V případě, že použijeme kulturu na pevném mediu, očkujeme sterilním vatovým

tamponem navlhčeným sterilní vodou. Tímto tamponem otřeme povrch nárůstu kultury na šikmém agaru a vytvoříme hustý nátěr po celé ploše nové misky.

- Na zaočkovanou plotnu sterilně rozložíme testovací disky s antibiotiky
- Inkubujeme 24 -36 hodin při 37°C.
- Sledujeme velikost zón vytvořených kolem disků

Hodnocení:



Výřez Petriho misky s naznačením měření průměru zóny v obou na sebe kolmých směrech

Pozorujeme růst mikroorganismu v jednotlivých sektorech. Velikost inhibičních zón je závislá na koncentraci antibiotika; měříme ve dvou na sebe kolmých směrech, vypočteme aritmetický průměr a stanovíme citlivost – podle tabulek.

Bez zóny = organismus **není citlivý** na zkoušenou látku

Zóna 5 - 11 mm = citlivý mikroorganismus

Zóna nad 12 mm = velmi citlivý organismus

Metodu lze použít pouze pro antibiotika, která dobře difundují agarem. U látek špatně difundujících použijeme zkumavkovou zředovací metodu. Výsledky testů jsou závislé na síle agarové vrstvy, je třeba pečlivě dbát na rovnoměrné nalití ploten.

Poznámka k hodnocení:

Zmíněné rozsahy (5-11 mm) pro určení „citlivý, necitlivý“ kmen jsou pouze orientační. Ve skutečnosti je potřeba odečítat za pomoci stále aktualizovaných tabulek, které uvádí velikost zón citlivosti na ATB pro ten který druh. Proč se nemůže jednat o stabilní údaj? Důvodem aktualizací těchto tabulek je vzrůstající rezistence na antibiotika – bakterie si vyměňují genetickou informaci kódující geny rezistence (na přídatných nositelích informace – plazmidech).

Příkladem je následující tabulka pro druh *Acinetobacter baumannii*, která uvádí citlivost na jmenovaná antibiotika – povšimněte si, že důležitým údajem je rovněž koncentrace antibiotika.

Stanovení citlivosti *A. baumannii* k antibiotikům:

<i>antibiotikum</i>	<i>inhibiční zóna pro citlivé kmeny</i>	<i>změřená velikost inhibiční zóny</i>	<i>citlivost</i>
Vankomycin – 30 µg	≥ 15 mm	5 mm	NE
Erytromycin – 15 µg	≥ 21 mm	18 mm	ANO
Penicilin – 10 m. j.	≥ 29 mm	5 mm	NE
Ampicilin – 10 µg	≥ 17 mm	5 mm	NE
Nitrofurantion – 100 µg	≥ 17 mm	5 mm	NE
Cefalotin – 30 µg	≥ 18 mm	5 mm	NE

Příklad podrobnější interpretace inhibičních zón
Průměr inhibiční zóny (mm)

Symbol Antimikrobiální látka Obsah na disku Rezistentní Střední Citlivý

Bacitracin 10 jednotek <8 9-12 >13

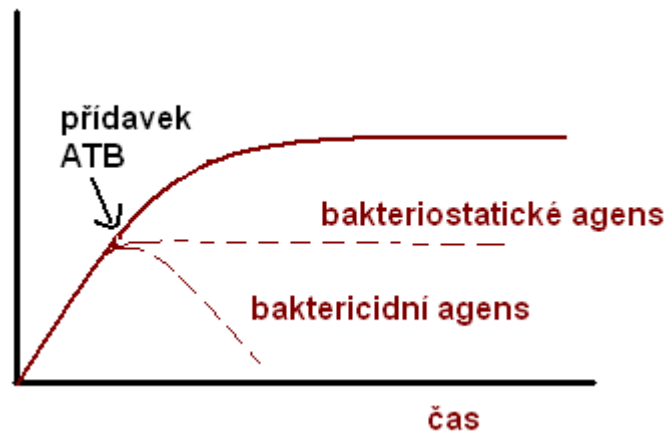
Penicilin G, *Staphylococcus* 10 jednotek <28 - >29

Penicilin G, *ostatní bakterie* 10 jednotek <14 - >15

Kanamycin 30 mcg <13 14-17 >18

Působení přidaného ATB na rostoucí bakteriální kulturu:

Log CFU
životaschopných
buněk



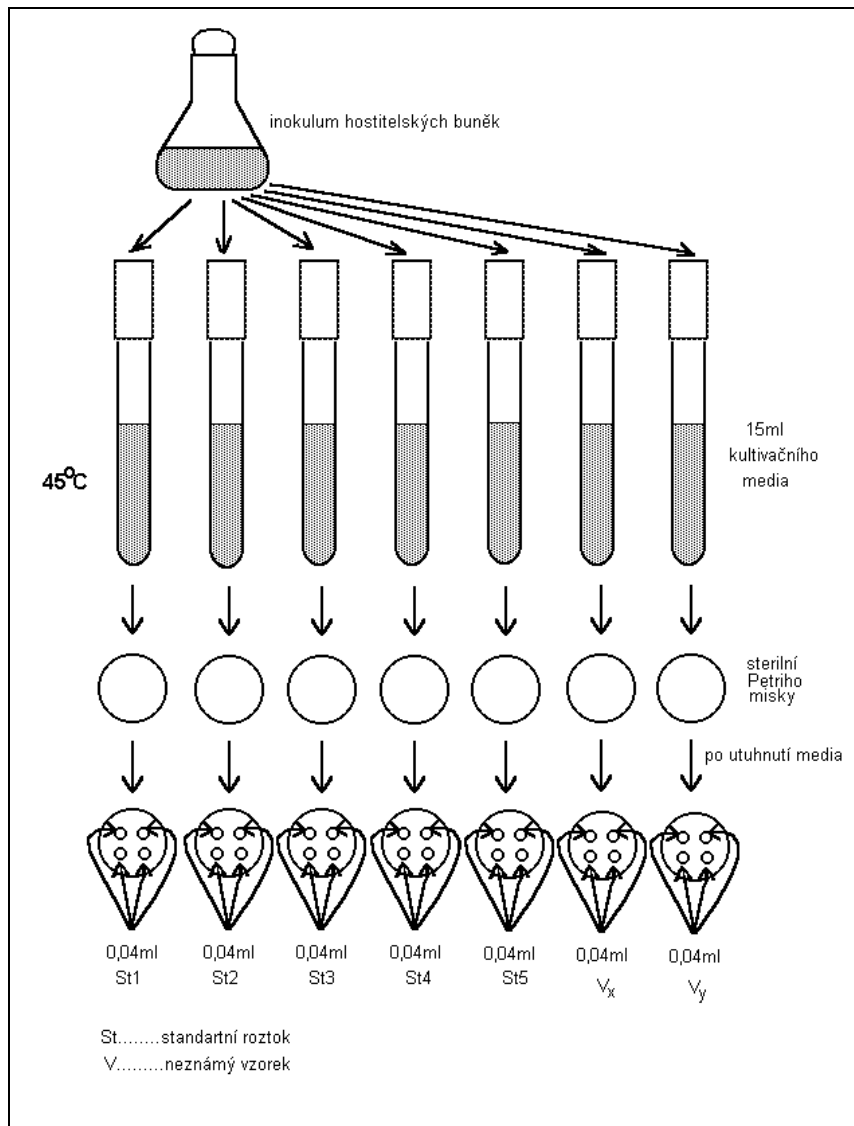
B. Stanovení koncentrace oxacilinu difúzní jamkovou metodou

Výhodou jamkové metody je, že nemusí být dodržovány sterilní podmínky při práci s testovanou látkou, difúze účinné látky není podstatně ovlivňována ostatními látkami a metoda je dostatečně rychlá a citlivá. Nevýhodou je pracná příprava jamek a nebezpečí vylití testované látky při manipulaci s miskami.

Postup:

- Rozvaří se média a vytemperují na 45 °C.
- Média se rozpipetují po 15ml do sterilních zkumavek a dále temperují na vodní lázni. Do zkumavek se naočkují testovací mikroorganismy - po 0,5ml inokula *S. aureus* NCTC 8511 do MPA.
- Obsah zkumavek se opatrně promíchá a vylije na sterilní misky, kruživým pohybem se rozlije po povrchu misky a nechá utuhnout na rovné podložce. Před naléváním je třeba osušit zkumavky, aby na misku nestékala voda z vodní lázně.
- Připravíme standardní řadu ředění, ředíme v destilované vodě na koncentrace: 250; 125; 62,5; 31,25; 15,625; 7,81 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$.
- Po utužení agarů vyhloubíme korkovrtem a skalpelem na miskách jamky - 4 na každé misce. Korkovrt a skalpel sterilizujeme ožhnutím po namočení v ethanolu. Vyhloubené kousky agarů odkládáme do Petriho misky - je s nimi nutno pracovat jako s infekčním materiálem. Korkovrt a skalpel se musí po skončení práce sterilizovat.
- Misky se pečlivě popíšu - vždy na 1 misce 1 standardní koncentrace nebo 1 vzorek. Do každé jamky se kape 0,04 ml roztoku, vždy roztok jedné koncentrace na 1 misku, na misky s MPA (*S. aureus*). Je třeba pipetovat i přemísťovat misky opatrně, aby roztoky nepřetékaly přes okraje jamek.
- Inkubace trvá 24 hodin, *S. aureus* (OXA) při 37°C

Nákres:



Obr. Stanovení koncentrace oxacilinu difusní jamkovou metodou

Hodnocení:

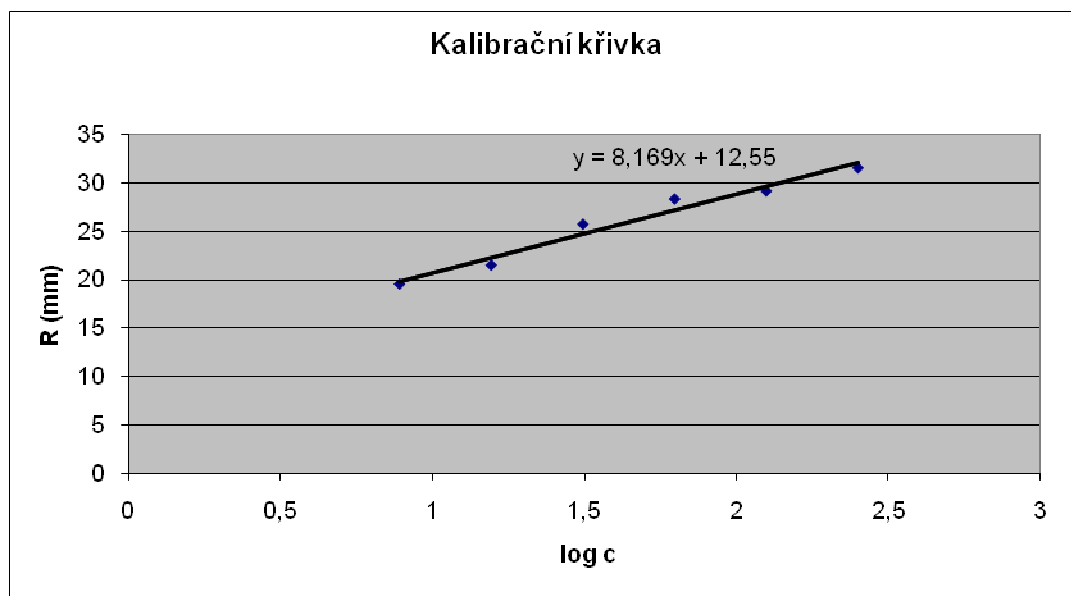
Po 24 hodinách inkubace (nutno dodržet - dostavit se druhý den k odečtení) odečítáme výsledky - změříme průměry zón (inhibičních u oxacilinu) ve dvou na sebe kolmých směrech. Pro každou zónu vypočítáme průměrnou hodnotu a ze čtyř zón na misce pak průměrnou hodnotu pro danou koncentraci. Z hodnot standardních roztoků se sestrojí kalibrační přímka (závislost průměru zóny v mm **na logaritmu koncentrace**) pro oxacilin. Z kalibrační přímky se stanoví koncentrace neznámých vzorků (v $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$). V protokolu bude přesně uvedeno označení vzorku a jeho koncentrace.

Příklad hodnocení: osa x vyjadřuje logaritmus koncentrace antibiotika, nikoli jen koncentraci!

Tabulka naměřených hodnot:

koncentrace c ($\mu\text{g/ml}$)	log c	průměr (mm)
7,81	0,892651	19,53
15,625	1,19382	21,5
31,25	1,49485	25,75
62,5	1,79588	28,375
125	2,09691	29,2
250	2,39794	31,6

Tyto hodnoty vyneseme do grafu:



Z regresní rovnice potom můžeme spočítat koncentraci oxacilinu neznámého vzorku:

Vzorek 3: průměr inhibiční zóny 25.38 mm

$$25.38 = 8.169x + 12.55$$

$$X = (25.38 - 12.55) / 8.169$$

$$X = 1.5706$$

Koncentrace = 10^x

$$C = 10^{1.5706}$$

$$C = 37.205 \mu\text{g/ml}$$

Zajímavosti:

Existence bakterií rezistentních na všechna dostupná antibiotika zrodila zdravotnický problém rozsahu celosvětové krize (Americká lékařská společnost, 1995). Je získáváno příliš málo nových antimikrobiálních léků k náhradě těch, které ztratily svoji účinnost: v závodě o prvenství jsou mikroorganizmy před námi (Zpráva WHO, 1996).

Rezistence se šíří celosvětově, a velmi rychle. Podílí se na tom např. krmení zvířat antibiotiky pro urychlení růstu, prevence infekcí u zvířat a léčba infikovaných zvířat. Uvažuje se i o přenosu rezistentních bakterií na člověka infikovanými potravinami.

*Zdroj bývá spatřován i v genetických studiích: Jednou z metod „značkování“ geneticky pozměněného *B. subtilis* je vnesení genu rezistence na kanamycin (který už není téměř užíván). Brzy se ovšem zjistilo, že přítomnost tohoto genu podmiňuje i rezistenci na další významné aminoglykosidy (amikacin, tobramycin) a na ampicilin. Totéž bylo zjištěno při „značkování“ geneticky modifikovaných potravin.*

Boj proti bakteriální rezistenci probíhá v mnoha oblastech. Patří sem zpřísnění hygienických a epidemiologických opatření, omezení podávání ATB u zvířat pouze na závažné infekce, a dohled nad podáváním a užíváním ATB. Podstatně zlepšit je třeba evidenci a kontrolu nozokomiálních infekcí a informovanost lékařů i nemocných.

ATB V NEMOCNICI – nozokomiální infekce vyvolané rezistentními mikroorganismy.

Rezistence na antibiotika vzniká na principu enzymatického (tvorba β -laktamázy) nebo neenzymatického (jde hlavně o aktivní eflux, vypuzování antibiotika z bakteriálních buněk) mechanismu. Při rozhodování o nejvhodnější kombinaci ATB by měl lékař přihlížet k místním poměrům (v různých oblastech jsou různá ATB různě používána, díky čemuž je jiný i podíl rezistentních bakteriálních kmenů) a k anamnéze pacienta (jakými ATB byl kdy léčen). Vysoké riziko rezistence dnes jednoznačně opravňuje lékaře k použití kombinace antibiotik.

Průměrně 25 až 35 % hospitalizovaných nemocných dostává z léčebných nebo preventivních důvodů ATB. To představuje nesmírný selektivní tlak na vznik a šíření rezistentních bakterií. Nozokomiální infekce stojí např. v USA ročně 4 1/2 miliardy dolarů a usmrtí 90 000 lidí (11. místo v tabulce úmrtnosti). Hlavními vysoce rezistentními bakteriemi jsou na meticilin rezistentní *S. aureus* a na vankomycin rezistentní enterokoky (uplatňují se hlavně u urogenitálních a ranných infekcí). **Ohroženi jsou hlavně** nedonošené a malé děti, jedinci s imunodeficiencí (vrozené defekty, AIDS, a zhoubnými nádory, staří lidé, sociálně nepřízpůsobiví atd.

Mechanismy rezistence k antibiotikům:

- Enzymy modifikující antibiotikum
- Snížení permeability bakteriálních obalů
- Zvýšené vylučování z bakteriálních buněk
- Modifikace cílové struktury se snížením avidity k antibiotiku
- Přemostěním cíle pomocí nového metabolitu

Postupně se podařilo objasňovat faktory, které vedly k nežádoucímu obratu v dosud příznivých zdravotnických trendech. Paradoxně se při tom ukázalo, že hlavním faktorem návratu infekčních chorob je **nesprávné používání samotných ATB.**

Všichni jedinci v populaci bakterií nejsou zcela totožní. Jeden z rozdílů podmiňuje schopnost nejodolnějších jedinců odolat působení ATB. Takové rezistentní bakterie mají potom mnoho životního prostoru a nadbytek výživy a vzhledem k rychlé reprodukci brzy nahradí v těle člověka oblasti obsazené předtím vůči ATB citlivými jedinci a dobývají oblasti nové.

Nevhodné užívání ATB může mít i další nežádoucí efekt: **destrukci fyziologické bakteriální střevní flóry**.

*V normálním střevním traktu je de norma přítomno zhruba 100 000 trilionů bakterií, desetkrát více než je buněk v lidském těle. Je obecně známo, že tyto bakterie plní důležité funkce při štěpení potravy a vstřebávání minerálů a vitaminů. Nejdůležitější je ovšem **funkce bariéry**, bránící implantaci a kolonizaci střeva nebezpečnými infekčními organismy. Jen s pomocí *L. acidophilus*, *B. bifidum*, *S. thermophilus* a dalších bakterií mohou být plně zajištěny fyziologické funkce tlustého střeva. Jejich deplece ATB usnadňuje vstup patogenů do organismu.*

Mnoha patogenním mikroorganismům může usnadnit invazi do střeva i **narušení silně kyselého prostředí žaludku**. Tento velmi důležitý nástroj přirozené imunity těla je přitom často nevhodně potlačován alkalizéry či inhibitory sekrece kyseliny solné.

Množí se nálezy dokazující, že potlačení žaludeční kyseliny stupňuje i riziko výskytu karcinomu, nemocničních pneumonií a dokonce i fatálních šoků. Pneumonie a septikémie vznikají hlavně u jedinců se zavedenou žaludeční sondou, patogeny nezřídka pocházejí z úst, kde se nijak neprojevují.

Problémy boje s rezistencí bakterií na antibiotika

Po Flemingově objevu penicilinu (PNC) (1928) trvalo deset let, než se tento lék dostal do širokého užívání. A sám Fleming byl prvním, kdo varoval před nesprávným užíváním penicilinu: postupným zvyšováním koncentrací PNC se mu totiž podařilo získat značně odolné bakterie. Jeho obavy se splnily už v roce 1945, kdy byly pozorovány pneumonie a šoky vyvolané na PNC rezistentními zlatými stafylokoky. V roce 1966 pak bylo už 35 % zlatých stafylokoků plně odolných na meticilin. V roce 1967 vystoupila rezistence pneumokoků, vyvolávajících vedle pneumonií i záněty středního ucha a další. V našich oblastech je dnes odolných zhruba 50 % pneumokokových kmenů. V polovině 70. let zjistili Japonci, že 62 % streptokoků skupiny A získalo rezistenci na erytromycin. Fluorochinolony zavedené v r. 1980 zabíjely zprvu 95 % na meticilin rezistentních stafylokoků, ale za pouhý rok se karta obrátila: 80 % stafylokoků na ně získalo rezistenci.

V roce 1996 proběhl v tokijské Juntendo univerzitě dramatický boj a záchranu života malého chlapce infikovaného stafylokoky odolnými na všechna běžná antibiotika a dokonce i na do té doby spolehlivě působící vankomycin. Teprve po opakovaných kúrách toxickými kombinacemi vysokých dávek vankomycinu s japonským arbekacinem a dalšími antibiotiky se podařilo dítě (snad trvale?) polyrezistentních stafylokoků zbavit. Už o rok později zabíjel nebezpečný stafylokok i v USA.

V posledním desetiletí se objevily rezistentní kmeny *Escherichia coli* (kmen O157:H7 napadl r. 1993 v USA více než 600 lidí, u 56 došlo k selhání ledvin a 4 zemřeli), klebsií, enterokoků, *Proteus mirabilis*, mykobakterií, salmonel a dalších bakterií a jejich výskyt se trvale prudce

zvyšuje. Lékaři musejí při mnoha infekcích zkoušet řadu antibiotik, než najdou účinné. Dnes existují bakteriální kmeny odolné na více než 100 antibiotik.

Tuto situaci si ovšem lidstvo připravilo samo: Podle odhadů **jsou ATB podávána často zbytečně nebo chybně**, např. při virových infekcích (respiračních, ušních aj.), při léčbě „neinfekčních“ chorob (minocyklin je ověřován u revmatoidní artritidy), při neracionálním střídání i řady ATB, při předčasném podávání „poslední generace“ ATB, při ustupování požadavkům pacientů a tehdy, když pacienti ukončí užívání ATB předčasně.