

Biologicky aktivní látky Stanovení citlivosti k antibiotikům Stanovení koncentrace antibiotik



Použití **antimikrobiální látky** patří spolu s desinfekčními prostředky mezi chemické metody kontroly mikrobiálního růstu. Antibiotika jsou v prostředí přirozeně a široce produkována 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. 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**.

Cíle cvičení:

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

Materiál

- Petriho miska s Mueller-Hintonovým agarem
- Sterilní vatová tyčinka
- Antimikrobiální disky
- Sterilní pinzeta
- Automatická pipeta
- Sterilní špičky
- Pravítka
- Bakteriální kultury:....

A. Postup stanovení citlivosti k antibiotikům difúzním testem

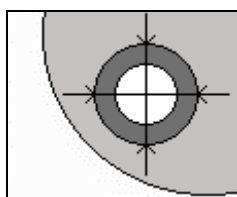
Stanovení citlivosti se nejčastěji provádí pomocí kvalitativního **difusního testu** v agarovém médiu. Testovaný organismus rovnoměrně rozetře po povrchu agarů a potom se na rozetř aplikují papírové **disky** napuštěné antimikrobiální látkou (komerčně dodávané, napuštěné definovaným množstvím látky).

Během kultivace **difunduje látka z disku** horizontálně do okolního agarů 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. Druhou metodou určení citlivosti mikroorganismu k antimikrobiální látce je **metoda zřed'ovací** a to buď ve zkumavce nebo 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.

- 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

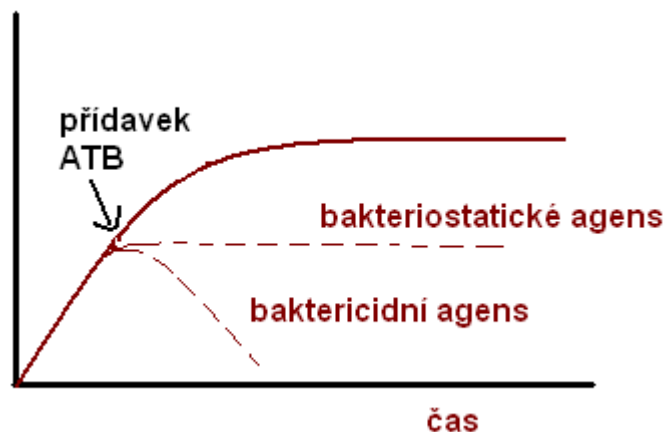
Zóna 5 - 10 mm = citlivý mikroorganismus

Zóna nad 12 mm = velmi citlivý organismus

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

Nákres působení přidaného ATB na rostoucí bakteriální kulturu:

Log CFU
životaschopných
buněk



B. Stanovení koncentrace oxacilinu difúzní jamkovou metodou

Výhodou difúzní 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.

Pomůcky:

- sterilní Petriho misky
- pipety, zkumavky
- MPA (M 2)
- standardy a vzorky oxacilinu
- korkovrty a skalpely
- ethanol
- vodní lázeň
- **Organismy:**
 - Staphylococcus aureus* NCTC 8511 (stanovení oxacilinu)

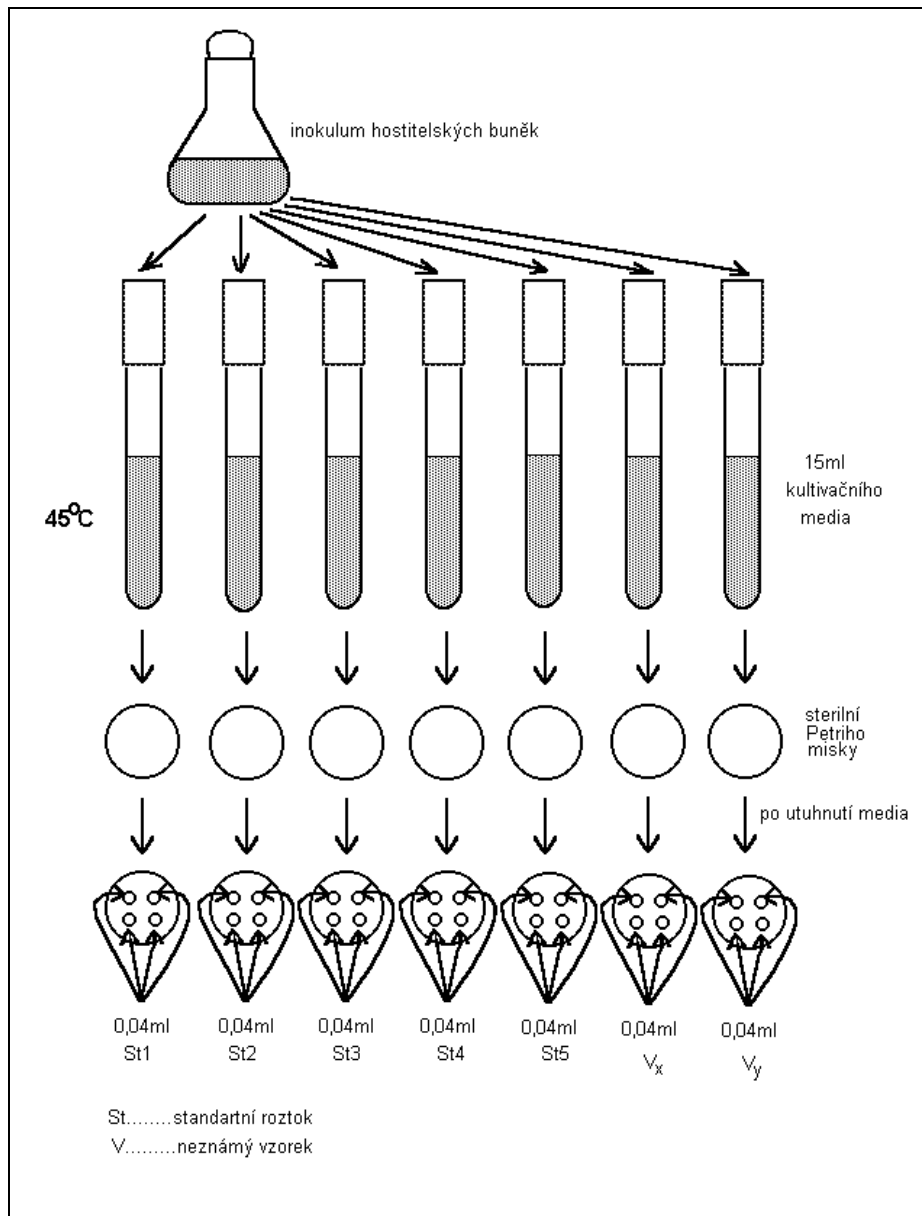
Postup:

- 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, krouživým 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 µg.ml⁻¹.
 - Po utužení agarů vyhloubíme korkovrtem a skalpelem na miskách jamky - 4 na každé misce. Korkovrt a skalpel sterilizujeme ožihnutím 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 přemisťovat misky opatrně, aby roztoky nepřetékal přes okraje jamek.
 - Inkubace trvá 24 hodin, *S. aureus* (OXA) při 37°C

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 µg.ml⁻¹). V protokolu bude přesně uvedeno označení vzorku a jeho koncentrace.

Nákres:



Obr. Stanovení koncentrace oxacilinu difusní jamkovou metodou

Teoretická část

Látky, které jsou nejčastěji stanovovány mikrobiologickými metodami, jsou antibiotika a vitamíny.

Mikrobiologické metody užívané k jejich stanovení se podle charakteru dělí na:

- 1. zřed'ovací** - v řadě ředění zkoumané látky stanovujeme minimální koncentraci účinnou pro daný organismus, v případě antibiotika minimální inhibiční konc. (MIC), v případě vitamínu minimální stimulační konc. Výsledek se udává jako titr účinné látky (rozmezí koncentrací), nikoliv přesná hodnota koncentrace.
- 2. nefelometrické** - hodnotíme odpověď testovacího organismu na řadu koncentrací účinné látky měřením intenzity růstu (zákalu) v tekutém mediu. Pomocí standartní křivky je možno stanovovat koncentrace v neznámých vzorcích.
- 3. titrimetrické** - jsou předešlým velmi podobné, v tomto případě hodnotíme intenzitu růstu pomocí fyzikálně-chemických změn prostředí, např. produkce kyseliny - množství zjišťujeme titrací.
- 4. difúzní** - využívají tuhých médií, ve kterých je naočkovaný citlivý mikroorganismus, testovaná látka difunduje mediem a způsobuje vznik inhibičních (antibiotika) nebo stimulačních (vitamíny) zón. Velikost zóny je závislá na koncentraci testované látky. V

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 metodu: **a/ kapkovou**, kdy se látka kape na povrch tuhého média (je nepřesná, využívá se spíše pro kvalitativní stanovení – zda je bakterie vůbec citlivá), **b/ diskovou**, 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/ komínkovou** - 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/ jamkovou**, u které se testované látky pipetují do jamek vyhloubených korkovrtem přímo do agarové vrstvy.

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.

Účinnost desinfekčních prostředků: vliv koncentrace. Stanovení minimální inhibiční koncentrace diluční metodou:

zřed'ovací metoda - v řadě ředění zkoumané látky stanovujeme minimální koncentraci účinnou pro daný organismus, v případě antibiotika minimální inhibiční koncentrace (MIC). Výsledek se udává jako titr účinné látky (rozmezí koncentrací), nikoliv přesná hodnota koncentrace.

Antimikrobiální látky, které se užívají k léčbě nemocí a aplikují se vnitřně se nazývají **chemoterapeutická činidla**. Pokud jsou to látky přírodní, produkované mikroorganismy, nazývají se **antibiotika**. Antibiotika se vzájemně liší **chemickou strukturou, spektrem**

účinnosti a mechanismem účinku. (Prvním nalezeným antibiotikem (Fleming 1928) byl penicilin produkovaný plísní *Penicillium chrysogenum*, následoval streptomycin produkovaný aktinomycetou rodu *Streptomyces*. Aktinomycety zůstávají důležitým zdrojem antibiotik.)

Působení 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..

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