

IVA-2018FaF/3160/83

Mikrobiologie pro farmaceuty

Dominik Rotrekl, Marcela Nejezchlebová,
Josef Feit, Jakub Tremel
Ústav molekulární biologie
a farmaceutické biotechnologie



Obecné informace

- Název a číslo projektu: Mikrobiologie pro farmaceuty, IVA-2018FaF/3160/83
- Řešitel, jeho zařazení: PharmDr. Dominik Rotrekl, DSP student
- AP zodpovědný za čerpání finančních prostředků: Ing. Marcela Nejezchlebová
- Ústav, na kterém byl projekt řešen: Ústav molekulární biologie a farmaceutické biotechnologie

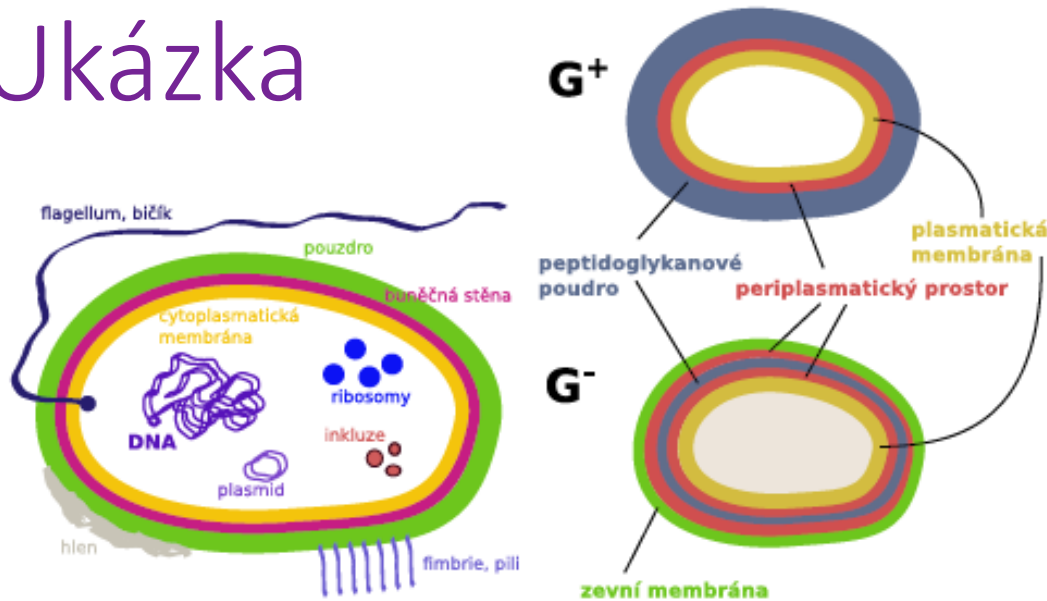
Cíl projektu

- Vytvoření uceleného studijního materiálu k povinnému předmětu mikrobiologie

Řešení projektu a výsledek

- Ve spolupráci řešitelů byla vytvořena skripta o celkovém rozsahu 270 stran
- Rozdělena na dvě části
 - Část první – teoretické podklady k přednáškám
 - témata bakteriologie, virologie, mykologie, parazitologie, antimikrobiální terapie a rezistence
 - Část druhá – teoretické podklady k praktickým cvičením a seminářům
 - témata přípravy živných médií, kultivace, sterilizace a dezinfekce, přímé a nepřímé metody určení mikroorganismu, stanovení citlivosti na antimikrobiální látky a další

Ukázka



Obrázek 1.1.1 Schema bakterie

Obrázek 1.1.2 Stěna G^+ a G^- bakterií

- **Cytoplasmatická membrána**

Skládá se z dvojité fosfolipidové vrstvy se zabudovanými proteiny: permeáza (transport dovnitř), sekreční proteinový systém, biosyntetické enzymy (pro stavbu bakteriální stěny), signální proteiny (přenos informací dovnitř i ven) a u aerobních bakterií respirační enzymy.

- **Stěna bakterie**

Stěna bakterií je komplikovaná. Udržuje tvar bakterie, chrání ji před prostředím a zároveň zprostředkuje výměnu látek s okolím a zakotvuje další struktury. Proti povrchovým strukturám bakterií se může zaměřit imunitní systém — antigenní determinanty.

Některé bakterie (mycoplasma) stěnu nemají (tudíž jsou necitlivá vůči antibiotikům blokujícím syntézu stěny).

11

1.14 Enterobacteriaceae

Úvod

Rozsáhlá skupina bakterií, které vyvolávají řadu závažných onemocnění: *Salmonella typhi* (břišní tyfus), *Shigella dysenteriae* (závažné průjemové onemocnění), *Yersinia pestis* (mor), *Escherichia coli* (řada závažných infekcí především časněho dětského věku a imunosuprimovaných), *Proteus*, *Klebsiella*, *Serratia* (nosokomiální nákazy). Některé z nich jsou součástí normální střevní mikrobioty.

Klasifikace

- *Escherichia coli*
- *Shigella* (*dysenteriae*, *sonnei*, *flexneri*, *boydii*)
- *Salmonella enterica* (*gastroenteritis*, *typhi*, *paratyphi*)
- *Yersinia pestis*
- *Klebsiella pneumoniae*
- *Proteus mirabilis*

1.14.1 Escherichia coli

Morfologie

- G^- tyčky
- motilní
- netvoří spory
- fakultativně anaerobní

Kultivace

Rychle roste na běžných médiích. Fermentuje laktózu a produkuje indol (diagnostická média).

Patogenita

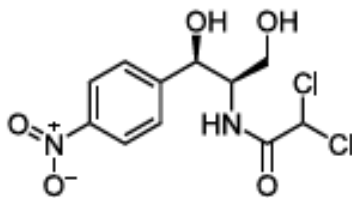
Adhezní struktury (pili), exotoxiny: α -hemolysin (perforace buněčných membrán), cytotoxický nekrotizující faktor (narušuje mezibuněčnou signalizaci), shigatoxin (blokádá proteosyntézy, kódován v genomu profága nejen u *Shigella*, ale i u některých sérotypů *E. coli*) a další.

Epidemiologie

Běžný komensál trávicího traktu lidí i zvířat. Intestinální infekce jsou přenášeny potravou i vodou.

• Chloramfenikol

Chloramfenikol je širokospektré antibiotikum — působí na aerobní i anerobní G^+ i G^- bakterie, včetně rickettsií, chlamydií atd. Inhibuje proteosyntézu vazbou na 50S podjednotku a inhibicí tvorby peptidové vazby. Je to sice účinné antibiotikum, ale je relativně nebezpečné. Kvůli riziku indukce aplastické anémie a poruch kostní dřeně se nepodává jako antibiotikum první volby.



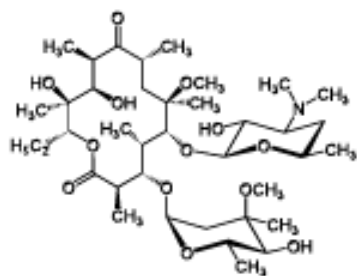
* Rezistence na chloramfenikol

Hlavním mechanismem rezistence je inaktivace antibiotika pomocí chloramfenikol acetyltransferázy. K rezistenci na chloramfenikolová antibiotika dále dochází sníženou permeabilitou vnější membrány a aktivním efluxem.

• Pleuromutiliny

Mechanismem účinku pleuomutilinů je vazba na 50S podjednotku a inhibice tvorby peptidové vazby. Tento mechanismus je však odlišný od mechanismu chloramfenikolu. Zástupcem této skupiny antibiotik je *retapamulin*, který se používá k lokální terapii impetiga (způsobeného bakterií *Staphylococcus aureus* nebo *Streptococcus pyogenes*).

• Makrolidy



Makrolidová antibiotika (zástupce *Klaritromycin*) působí bakteriostaticky a mají široké spektrum účinku. Ve svojí struktuře obsahují 14- nebo 16-členný makrocyclický lakton a glykosidicky vázaný cukr. Makrolidy byly v 50. letech izolovány z aktinomycet, ale klinické využití mají spíše semisyntetické deriváty. Makrolidy inhibují proteosyntézu vazbou na 50S podjednotku a tím zabraňují posunu ribozomu po mRNA. Indikací makrolidů jsou chlamydiové infekce, pneumonie

způsobené mykoplazmaty nebo legionelami, záškrt a stafylokokové a streptokokové infekce při přecitlivělosti na penicilin. Nežádoucí účinky zahrnují GIT obtíže (nauzea,

• Rezistence na makrolidy, linkosamidy a streptograminy

Přestože se jedná o chemicky rozdílné skupiny antibiotik, všechny působí na stejnou podjednotku ribozómu. K těmto antibiotikům jsou přirozeně rezistentní gramnegativní bakterie, díky složitějšímu složení buněčné stěny. U gram pozitivních bakterií byly pozorovány tři druhy rezistence. Jedním je změna cílové struktury, konkrétně se nejčastěji jedná o metylaci adeninu V domény 23S ribozomální RNA. Další méně častou variantou je i přímo ribozomální mutace u některých *Strep. pneumoniae*. V neposlední řadě důležitým mechanismem rezistence zůstává eflux.

Obrázek 5.6.2 Streptomycin



Obrázek 5.6.3 Linezolid



Obrázek 5.6.4 Retapamulin



Obrázek 5.6.5 Clindamycin



5.7 Antituberkulotika

5.7.1 Antituberkulotika

Terapie tuberkulózy (viz kap. 1.9^[43]) je specifická v tom, že je dlouhodobá a využívají se v ní kombinace antibiotik vyhrazených pro tuto léčbu, kvůli zábraně rezistence. Minimální doba terapie je 6 měsíců — v prvních 2 měsících se podává kombinace isoniazidu, rifampicinu a pyrizinamidu (s etambutolem nebo bez); pak se 4 měsíce pokračuje s kombinací isoniazid + rifampicin. Antituberkuloticky působící antibiotika proto probíráme zvlášť (str. 185).

Mezi léčiva 1. volby řadíme *isoniazid* (hydrazid kyseliny izonikotinové). Kyselina izonikotinová vznikající z isoniazidu se kumuluje v mykobakteriích a tím je poškozující.

9.1 Seminář/cvičení I.

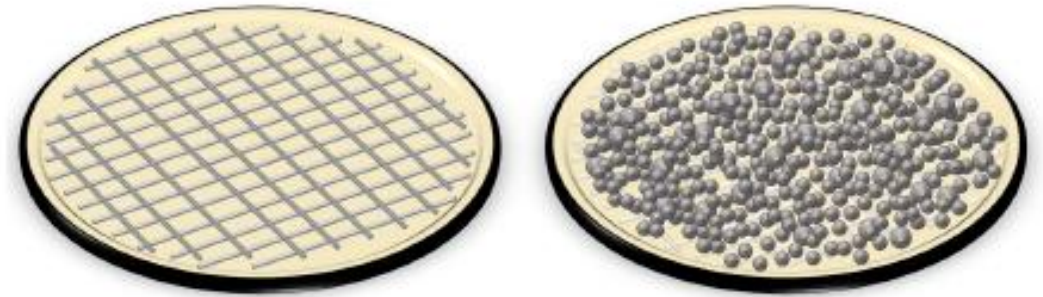
9.1.1 Úvod

Příprava živných médií, kultivace mikroorganismů a testování antiseptické účinnosti dezinfekčních (antiseptických) látek

Jak již bylo uvedeno v předmluvě, z didaktického hlediska je vhodné, aby byl student před prováděním cvičení seznámen s pojmy a problematikou, která se týká náplně určitého cvičení. A proto si nyní řekneme základní informace o *terminologii, laboratorních pomůlkách a přístrojích*, používaných v mikrobiologii, dále si definujeme *aseptickou práci*, se kterou úzce souvisí i *bezpečnost práce*. Musíme si říci něco o získávání a uchovávání *mikrobiálních kultur*, jakým způsobem můžeme mikroby *kultivovat* a také jak je dokážeme likvidovat pomocí *dezinfekčních a sterilizačních metod*. Vzhledem k tomu, že skripta jsou určena primárně pro studenty farmacie, zaměříme se také na *antiseptika*, což jsou vlastně dezinfekční prostředky určené na kůži a sliznice.

9.1.2 Terminologie

- *Asepsa* — dodržování opatření, které zabraňují kontaminaci a infekci.
- *Dezinfekce* — likvidace vegetativních buněk a méně stabilních klidových stadií patogenních a podmíněně patogenních mikroorganismů účinky vnějšího prostředí.
- *Inkubace* — proces, při němž se za přesně stanovených podmínek množí určitý mikroorganismus.
- *Inokulace (očkování)* — aseptické přenesení inokula (živé mikrobiální buňky žádaného druhu) do sterilní živné pudy.
- *Izolace mikroorganismu* — získání čisté kultury určitého mikroorganismu z mikrobiální směsi.
- *Kmen* — populace mikrobiálních buněk pocházející z jedné původní mikrobiální buňky, kterou dále kultivujeme a udržujeme. Buňky této populace vykazují shodné vlastnosti.



Obrázek 9.1.1 Očkování rozetřem



Obrázek 9.1.2 Izolační očkování

tj. kolonií s morfolofií typickou pro daný druh či skupinu mikroorganismů. *Izolační očkování (vyočkování, křížový rozěr)* je zředování mikrobiální směsi postupným čárkováním po povrchu agarové plotny, a tak získání jednotlivých kolonií mikroorganismů. Tato metoda je použitelná pro bakterie, kvasinky i plísňe a je prováděna sterilní bakteriologickou kličkou, přičemž každý krok vyžaduje její opětovnou sterilizaci vyžháním, popř. novou sterilní kličku, používáme-li plastové. Celá plocha misky je tedy nakonec vyplněna očkovací čarou, jejíž konec se nesmí dotknout začátku očkování. Pokud na agarovou pudu naočkujeme směs více druhů mikrobů, a pokud tato směs není příliš hustá, vytvoří každý z těchto druhů své vlastní charakteristické kolonie. Ty pak můžeme přeočkovat (to znamená odebrat a nechat znovu kultivovat na novém médiu) a různými metodami identifikovat (obr. 9.1.2).

2 Příprava živných médií, kultivace, testování anti-septik, izolační očkování

Cíle:

- Připravit živná média pro následnou kultivaci mikroorganismů.
- Testování antiseptické účinnosti vybraných dezinfekčních látek.
- Izolační očkování

(práce ve dvojicích)

Materiál

- Sklo a přístroje: Erlenmayerova baňka k přípravě médií (100 ml), skleněný odměrný válec, váhy, hliníková fólie, plastové Petriho misky, vatové tampóny, míchadlo se

zahříváním, vortex, laminární box, tlakový hrnec pro fyzikální dezinfekci, denzitometr, vaříč, automatika pipeta, špičky, bakteriologická zkumavka, kalibrovaná zkumavka plastová

- Půdy (ve formě prášku i jako hotová půda v Petriho misce): masopeptonový bujón (Nutrient broth), Malt bujón, agar
- Mikroorganismy sk. 1: *Micrococcus luteus* CCM 732, *Escherichia coli* CCM 7929, *Saccharomyces cerevisiae* CCM 8191
- Dezinfekční prostředky (antiseptika): Betadine, 70% ethanol, 0,1% KMnO_4 , 2% chlorhexidin, Septonex, sterilní medium Nutrient

Pracovní postup

1) Příprava kultivačních médií

- do Erlenmayerovy baňky připravte 30 ml Nutrient broth bujónu (podle návodu na zásobní láhvi)
- míchejte tak dlouho, až se prášek rozpustí, a přidejte agar tak, aby jeho výsledná koncentrace byla 3% (w/v)
- uzavřete nádobu hliníkovou fólií, popište ji a připravte k fyzikální dezinfekci
- předejte nádobu vyučujícímu, který fyzikální dezinfekci médií zajistí

3) proveďte kvantitativní test mikrodiluční metodou (stanovení MIC): tři dvojice studentů budou mít k dispozici takto rozdělenou mikrotitrační destičku a postupně každá dvojice zpracuje své 4 sloupce, viz 6.1^[43]:

- nejprve přidejte do jamek tekuté médium Nutrient broth:

- řádek A 180 μl
- řádky B až G 100 μl
- řádek H 100 μl

- do jamky v řádku A přidejte 20 μl zásobního roztoku chloramfenikolu 320 $\mu\text{g/ml}$, roztok pipetou promíchejte a do jamky v řádku B přepipetujte 100 μl — takto postupujte až do řádku G (z jamky v řádku G nezapomeňte 100 μl odpipetovat pryč, aby zůstal zachovaný stejný objem média)

- nyní přelijte připravené inokulum *E. coli* (0,5 McFarlanda) do sterilní plastové Petriho misky, odeberte multikanálovou pipetou 1 μl inokula a převedte do jamek v destičce, postupujte od kontroly směrem nahoru. Mikrotitrační destičku nechejte kultivovat při 37°C 24 hodin; destičky budou pak uloženy v lednici do dalšího cvičení.

Protokol

Protokol č. 3 bude obsahovat:

- co je to McFarlandova stupnice optické denzity? a jak ji stanovujeme?
- popište postup při diskovém difúzním testu, v dalším cvičení provedete měření velikosti inhibičních zón a doplníte do tohoto protokolu
- následným porovnáním s referenčními hodnotami dle EUCAST vyhodnotíte, zda je testovaný kmen *E. coli* senzitivní anebo rezistentní, náčrt nebo foto
- postup při stanovení MIC, v dalším cvičení doplníte výsledek (koncentraci chloramfenikolu v $\mu\text{g/ml}$, která inhibovala růst *E. coli*)
- srovnáním s referenčními hodnotami dle EUCAST vyhodnotíte, zda je testovaný kmen *E. coli* citlivý anebo rezistentní, náčrt nebo foto
- popište ATB chloramfenikol (baktericidní nebo bakteriostatické, princip účinku, užití. . .)

Závěr

- Vytvořená skripta jsou v současné době v oponentském řízení v rámci získávání čísla ISBN
- Skripta budou dostupná pro studenty jak v elektronické podobě, tak v tištěné podobě v knihovně

Děkuji za pozornost

