

KONTROLA BAKTERIÁLNÍHO RŮSTU

Metody kontroly růstu

- Sterilizace
 - Usmrcení nebo odstranění všech mikroorganismů a virů ve vzorku
- Desinfekce
 - Redukuje počet patogenů, ale neodstraňuje nutně všechny živé organismy
 - Desinfektant – chemikálie používaná pro desinfekci neživých věcí
 - Antiseptikum – dostatečně netoxická chemikálie používaná pro desinfekci lidské tkáně
 - Germicid – desinfektant, který zabíjí mikroorganismy a viry (baktericid, fungicid, viricid)
 - Bakteriostatická (fungistatická, virostatická) látka – zabraňuje růstu mikroorganismu, aniž by ho usmrtila

Metody kontroly růstu

- Fyzikální
 - Teplo
 - Filtrace
 - Radiace
- Chemické

Principy usmrcení mikroorganismů

- Při sterilizaci je během daného časového intervalu usmrcena pouze určitá frakce mikroorganismů a virů
- Čas potřebný k dosažení sterility je částečně závislý na počtu mikroorganismů na počátku sterilizace
- Různé mikroorganismy a viry jsou různě citlivé ke sterilizačním a desinfekčním podmínkám
- Efektivita chemikálií usmrcujících mikroorganismy a viry je ovlivněna různými dalšími podmínkami (teplota, růstová fáze, pH)

Sterilizace pomocí tepla

- Denaturace proteinů v buňkách
- Rychlá a levná metoda
- Nezavádí žádné toxické látky
- Limitována tepelnou odolností sterilizovaných substancí

Sterilizace pomocí tepla

- Suché teplo
 - Vyžaduje vysoké teploty (160 – 170°C, 2 - 3 h)
 - Sklo, kovové objekty
- Var
 - Nevhodné pro usmrcení endospor
 - Pitná voda
- Pára a tlak
 - Nevhodné pro sterilizaci látek nepropustných pro páru
 - Konzervace potravin, chirurgické nástroje, kulturační média
 - Autokláv
- Pasterizace
 - Kontrolované zahřátí při teplotách pod bodem varu
 - Mnohé organismy přežívají
 - Odstranění určitých patogenů z jídla a nápojů
 - Nejedná se o sterilizaci

Sterilizace filtrací

- Pro sterilizaci tepelně nestabilních látek
- Porcelán, skleněné částice, azbest
 - Náhodně seskupená vlákna
 - Levné, neucpávají se
 - Neodstraní viry
 - Příliš velký aplikovaný tlak může způsobit průchod bakterií
 - Proteiny a další látky mohou neutralizovat elektrostatické náboje na filtru a redukovat tak účinnost
 - Mohou absorbovat enzymy a jiné látky
 - Použít jako předfiltry
 - HEPA filtry pro čištění vzduchu
- Membránové filtry
 - Acetát, nitrát celulózy, polykarbonát, polyvinyliden fluorid
 - Mají póry o určité velikosti
 - Obvykle 0,2 nebo 0,4 μm
 - Pro viry ještě menší

Sterilizace radiací

- Záření gama
 - Ionizační záření způsobující poškození vytvářením hyperaktivních iontů (superoxidový a hydroxylový radikál), které reagují s DNA a jinými sloučeninami v buňce
 - Sterilizace lékařských potřeb, spotřebních plastů
- UV záření
 - 200 - 310 nm
 - Poškození nukleových kyselin (tvorba dimerů thyminu)
 - Limitováno na usmrcení mikroorganismů ve vzduchu a na čistém povrchu v blízké vzdálenosti

Použití chemikálií

- Obecně méně efektivní v přítomnosti organického materiálu
- Teplo zvyšuje jejich účinnost
- Fungují pomalu proti endosporám, *Mycobacteriu tuberculosis* a některým virům
- Výběr desinfektantu je dán na základě
 - Chemického složení
 - Podmínek použití
 - Požadavku na stupeň sterility

Stupeň germicidní aktivity

- Vysoký
 - Usmrtí i endospory a *Mycobacterium tuberculosis*
- Střední
 - Neusmrtí endospory, ale je aktivní proti *M. tuberculosis*
- Nízký
 - Usmrtí vegetativní bakterie

Alkoholy

- Ethyl a isopropyl alkohol, 40 – 80%
- Neefektivní k endosporám
- Koagulace důležitých proteinů
 - Nutná přítomnost vody
 - 75% alkohol
- Zvyšují aktivitu jiných chemických látek
 - Jod, chlorhexidin, kvartérní amoniové sloučeniny

Halogeny

- Chlor
 - Oxidační účinek
 - Účinné množství závisí na množství organického materiálu (váže chlor)
 - Cl_2 nebo chlornan
 - Dráždivý
 - Korozivní pro gumu a kovy
- Jod
 - Oxidace molekul v buňce
 - Účinnost zvýšena přítomností alkoholu (tinktura)
 - Neúčinný proti endosporám
- Jodofory
 - Sloučeniny jodu a povrchově aktivních látek

Aldehydy

- Formaldehyd (8%)
 - Vysoká účinnost
 - Zředěný snížená účinnost
 - Dráždivý, podezřelý na karcinogenitu
- Glutaraldehyd
- Alkylační činidlo
- Koagulace proteinů

Fenoly

- Kresoly a xylenoly
- Vegetativní bakterie, při vysokých koncentracích i *M. tuberculosis*
- Některé nejsou účinné proti virům
- Narušují cytoplasmatickou membránu
- Široké spektrum aktivity, levné
- Aktivní i v přítomnosti detergentů a mýdla
- Desinfekce kontaminovaných povrchů
- Lysol

Kvartérní amoniové sloučeniny

- Snižují povrchové napětí
- Atakují cytoplasmatickou membránu
- Inaktivace mýdly, detergenty a organickým materiálem (gáza)
- Desinfekce neživých objektů
- Preservativum nepotravinových substancí

Sloučeniny kovů

- Sloučeniny rtuti, stříbra
 - Vazba na –SH skupiny proteinů
 - Bakteriostatické účinky
- Sloučeniny olova, arsenu a mědi
 - Dříve používány v průmyslu jako preservativa
 - Důsledkem je silné znečištění přírodní vody

Ethylen oxid

- Snadno proniká do různých materiálů
- Alternativa ke sterilizaci teplem
- Karcinogenní, výbušný
- Pro sterilizaci tepelně náchylných materiálů (plastové nádoby, stříkačky, guma)
- Alkylační činidlo

Chemikálie jako preservativa

- Mýdla, léky, deodoranty, potraviny, roztoky na kontaktní čočky obsahují chemikálie, které zabraňují nebo zpomalují jejich zkažení
- Alergické reakce

ANTIMIKROBIÁLNÍ LÉČIVA

Úvod

- Všechny buňky vykazují podobnost v jejich biochemickém složení
 - Látky usmrcující jeden typ buněk jsou obvykle jedovaté i pro jiné typy buněk
- Existují však určité rozdíly mezi prokaryotickými a eukaryotickými buňkami
 - Některé sloučeniny vykazují selektivní toxicitu
- Sloučeniny usmrcující mikroorganismy: „-cidní“
- Sloučeniny inhibující růst: „-statické“
- Salvarsan 1910, penicilin 1929, sulfanilamid 1935

Antimikrobiální léčiva

- Pro kontrolu infekčních chorob je nezbytné, aby chemická látka byla vhodná pro vnitřní užití
 - Chemoterapeutický prostředek
- Terapeutický poměr
 - Poměr nejvyšší dávky, kterou pacient toleruje bez toxických účinků a dávky nutné pro kontrolu mikrobiální infekce
 - Selektivní toxicita

Antimikrobiální léčiva

- Dvě kategorie antimikrobiálních léčiv
 - Syntetické látky
 - Antibiotika
- Klasifikace podle
 - Struktury
 - Mechanismu účinku
 - Spektra antimikrobiální účinnosti

Antibiotika

- Chemické látky, které jsou produkovány přirozenými biosyntetickými procesy některých plísní a bakterií (sekundární metabolity)
- Semisyntetická antibiotika
 - Část molekuly je syntetizována mikroorganismem a syntéza je dokončena chemicky
- Aktinomyce (Streptomyces), gramnegativní sporulující bakterie (Bacillus), plísně (Cephalosporium, Penicillium, Micromonospora)
 - Méně než 1% známých antibiotik je klinicky použitelných
 - Toxicita
 - Příjem

Mechanismus působení antimikrobiálních látek

- Kompetitivní inhibice
 - Sulfa sloučeniny
 - Inhibice syntézy kyseliny listové
- Narušení syntézy buněčné stěny (peptidoglykanu)
 - Penicilin, cefalosporiny
 - Bacitracin, vankomycin
- Inhibice syntézy proteinů
 - Založena na rozdílnosti prokaryotických a eukaryotických ribozomů
 - Pouze několik látek je však dostatečně selektivní
 - Bakteriální typ ribozomů se vyskytuje např. v mitochondriích, což vede k vedlejším účinkům
 - Aminoglykosidy, erythromycin, tetracykliny, chloramfenikol

Mechanismus působení antimikrobiálních látek

- **Narušení cytoplasmatické membrány**
 - Polymyxin – váže se na fosfolipidy hlavně prokaryotických buněk
 - Polyeny – vazba na steroly (pouze u eukaryot), léčba houbových infekcí, toxické pro lidské buňky
- **Inhibice syntézy nukleových kyselin**
 - Rifampin
 - Vazba na bakteriální RNA polymerasu (inhibice syntézy mRNA)
 - Chinolony
 - Zastavují syntézu DNA vazbou na DNA gyrasu (štěpení a spojování DNA vláken)

Učebnice Madigan a kol., obr. 27.12. , str. 792

Syntetická antimikrobiální léčiva

- **Analoga růstových faktorů**
 - Sulfa sloučeniny
 - Sulfanilamid – první, špatně rozpustný v moči, poškození jater
 - Blokuji metabolismus (syntézu) kyselin listové a následně nukleových kyselin
 - Bakteriostatické
 - Trimethoprim
 - Blokuji syntézu kyselin listové, ale v jiném kroku
 - Zvyšuje efekt sulfa sloučenin
 - Isoaniazid
 - Účinný pouze proti *Mycobacterium tuberculosis*
 - Narušuje syntézu kyseliny mykolové
 - Analoga bazí nukleových kyselin
 - Léčba virových a fungálních infekcí
- **Chinolony**
 - Inhibice DNA gyasy

Antibakteriální antibiotika I (β-laktamy)

- **Působí na bakteriální buněčnou stěnu**
 - Syntéza peptidoglykanu – inhibice transpeptidace
- **Peniciliny**
 - Penicilin G (*Penicillium chrysogenum*)
 - Pro G⁻ neúčinné (neprostoupí vnější membránou)
 - Bakterie produkují penicilinasu (laktamasu), která penicilin inaktivuje
 - Semisyntetické peniciliny
 - Účinné i na G⁻ organismy
 - Některé rezistentní k laktamase
 - Alergická reakce
- **Cefalosporiny**
 - *Cephalosporium*
 - Některé odolné vůči laktamasám
- **Ostatní β-laktamy**

Antibakteriální antibiotika II

- **Tetracykliny**
 - *Streptomyces*
 - Zasahují do bakteriální syntézy proteinů (funkce 30S podjednotky)
 - Širokospektrá antibiotika
 - Častá rezistence
 - Kovy mohou tetracykliny inaktivovat
- **Chloramfenikol**
 - *Streptomyces*
 - Derivát benzenu
 - Inhibice proteosyntézy v 50S podjednotce ribosomu
 - Snadno difunduje do buněk a míšní tekutiny
 - Toxický při vyšších dávkách
 - Aplastická anémie

Antibakteriální antibiotika III

- **Aminoglykosidy**
 - Streptomycin
 - *Streptomyces griseus*
 - Léčba tuberkulózy
 - Vysoká frekvence rezistentních mutantů
 - Poškození ledvin, narušení rovnováhy, hluchota
 - Neomycin, gentamicin, netilmicin, kanamycin, amikacin
 - Inhibice proteosyntézy v 30S podjednotce ribosomu
- **Makrolidy**
 - Erythromycin
 - *Streptomyces erythreus*
 - Léčení nemocí u lidí alergických na penicilin
 - Inhibice proteosyntézy v 50S podjednotce ribosomu

Antibakteriální antibiotika IV

- Polypeptidová antibiotika
 - Obsahují mnoho peptidových vazeb
 - Léčba povrchových infekcí
 - Bacitracin
 - *Bacillus subtilis*
 - Proti grampozitivním bakteriím (*S. aureus*)
 - Zasahuje do syntézy peptidoglykanu
- Rifamyciny
 - *Streptomyces*
 - Meningitida, tuberkulóza, lepra
 - Častý vznik vysoce rezistentních mutantů
 - Inhibice RNA syntézy (RNA polymerasy)

Testování citlivosti bakterií

- U některých bakteriálních patogenů je možno citlivost k antimikrobiální látce předpovědět, u jiných se však liší případ od případu
- V praxi se často zkouší jeden lék po druhém, dokud není dosažena příznivá odezva nebo se v případě vážných infekcí podá více látek naráz
 - Riziko toxického nebo alergického účinku
 - Změna normální flóry, což může vést ke kolonizaci rezistentními patogeny
- Citlivost může být testována
- Citlivost a rezistence jsou posuzovány podle pravděpodobnosti léčitelnosti mikrobiální infekce

Minimální inhibiční koncentrace

- Připraví se série snižujících se koncentrací látky ve vhodném médiu a přidá se suspence bakterií
- Po inkubaci se stanoví koncentrace, při které nenastal viditelný růst
- Minimální inhibiční koncentrace (MIC)
 - Nejnížší koncentrace látky, při které nenastává růst mikroorganismu
- Minimální baktericidní koncentrace (MBC)
 - Médium, ve kterém není pozorovatelný růst, může být přeneseno do média neobsahujícího antimikrobiální látku a pozoruje se, jestli v něm zůstaly živé MO

Další metody stanovení citlivosti

- Difusní metoda
 - Použití papírových disků napuštěných antimikrobiální látkou a měření inhibiční zóny
- Měření množství antimikrobiální látky v tělních tekutinách

Rezistence mikroorganismů k antibakteriálním látkám

- Zavedení nového antibakteriálního léku bylo vždy následováno zvýšením podílu rezistentních kmenů
- Rezistence omezuje užitečnost všech používaných antimikrobiálních léků

Přirozeně rezistentní organismy

- Mechanismy přirozené rezistence
 - Organismu chybí struktura inhibované antibiotikem
 - Organismus může být pro antibiotikum nepropustný
 - Organismus může měnit strukturu antibiotika na inaktivní formu
 - Organismus modifikuje cíl antibiotika
 - Organismus vytvoří rezistentní biochemické dráhy
 - Organismus pumpuje antibiotikum z buňky (efflux)
- Nevymizí po omezení používání antibiotika
 - Adaptovány k přežití před nástupem antibiotik
- Počet se zvyšuje nadměrným používáním antibiotik

Vliv přenosu genů

- Rezistence k antibiotiku je geneticky kódována
 - Geny pro rezistenci jsou lokalizovány na chromozomech nebo plasmidech (R plasmidy)
- R plasmidy obvykle obsahují geny kódující nové enzymy schopné
 - Modifikovat a inaktivovat antibiotikum
 - Zabránit jeho příjmu
 - Pumpovat ho aktivně ven
- Přenos transdukci, konjugací a transformací zvyšuje výskyt rezistence
- Plasmidy mohou obsahovat geny pro rezistenci k několika antibiotikům naráz
 - Vyskytují se u patogenních i nepatogenních bakterií
 - Přenos z jednoho druhu na druhý
- Pomalu mizí po snížení používání

Vliv prostředí

- Zabydlení rezistentních kmenů v komunitě závisí na podmínkách, které umožňují jejich šíření z člověka na člověka a na jejich schopnosti kolonizovat člověka
- Přelidnění, klimatizace, hygienická opatření, užívání antibiotik, vysoká mobilita lidí
- (Nadměrné) užívání antimikrobiální látky zvyšuje šanci, že člověk bude kolonizován novými rezistentními kmeny díky potlačení citlivých kmenů v normální bakteriální flóře
- Nedodržení doporučených dávek vede k selekci rezistentních kmenů
- Některé mikroorganismy vyvinuly rezistenci ke všem známým antibiotikům

Mechanismy získané rezistence

- Degradace
 - Penicilinasa
- Přidání chemické skupiny (fosfát, acetát) bakteriálními enzymy
 - Změna struktury zabrání k navázání na cíl
- Změna prostupnosti buněčné stěny
- Vypuzení látky z buňky
- Změna struktury ribosomálních proteinů nebo enzymů

Další faktory omezující antimikrobiální účinnost

- Toxiny
 - Antimikrobiální látky jsou neúčinné proti toxinům, které již byly uvolněny
 - Někdy se uvolňují endotoxiny (z gramnegativní buněčné stěny), které mohou způsobit šok a smrt
- Neschopnost difúze k místu infekce
- Špatná účinnost v nepřítomnosti leukocytů
 - Důležité pro zničení mikroorganismů poškozených antimikrobiálními látkami

Léky proti eukaryotickým patogenům

- Podobnost s lidskými buňkami vede ke zvýšené toxicitě
- Velmi nízký terapeutický poměr
- Mnohé léky mohou být aplikovány na povrch těla pro léčbu kožních infekcí
- Pomalá odezva
- Některé látky jsou selektivně toxické pro houby
 - Cílené na unikátní struktury nebo metabolické procesy