



METODE ODREĐIVANJA OTPORNOSTI/OSJETLJIVOSTI BAKTERIJA NA ANTIBIOTIKE

Lejla Tatlić

Bahceci BIH IVF centar, Sarajevo, BiH

Sažetak

Antibiotici su jedni od najčešće upotrebljivanih lijekova koji baš zbog te činjenice stvaraju veliki problem u medicini. Njihova uspješnost u terapiji ugrožena je sve većim brojem bakterija koje postaju otporne na njihovo djelovanje. Prvi mehanizam rezistencije na antibiotike opisan je za penicilinazu, odnosno za enzim koji inaktivira penicilin njegovom razgradnjom. Danas je otkrivena rezistencija na svaki antibiotik, a brzina nastanka te otpornosti ovisi o različitim faktorima, ali ponajviše o potrošnji antibiotika. Zbog velike i česte rezistencije na antibiotike, prije liječenja određenog patogena mora se provesti ispitivanje na antimikrobnu osjetljivost. S tim u vezi razvile su se metode kojima se provodi i prati širenje rezistentnih bakterija. Antibiogram je izraz za metodu kojom se ispituje osjetljivost bakterija na antibiotike gdje sve imaju isti cilj predvidjeti da li će bakterija reagirati na primijenjeni antibiotik. Poseban problem u liječenju infekcija stvaraju bakterije otporne na više antibiotika takozvane MDR (MULTIPLE DRUG RESISTANCE) bakterije. One mogu biti intenzivno otporne na lijekove (XDR) ili panrezistentne (PDR). MDR bakterije najčešće nastaju stjecanjem ekstrakromosomskih elemenata od drugih bakterija u okolini. Za otkrivanje najboljeg načina liječenja bolesti uzrokovane bakterijom, trebaju se provesti ispitivanja antimikrobne osjetljivosti i utemeljiti koja vrsta bakterije uzrokuje bolest. Pošto nije jedini problem rezistencija bakterija na antibiotike već i nedovoljan razvitak novih antibiotika kombiniranje informacija s do sada provedenih istraživanja moglo bi dovesti do pronalaska novih vrsta antibiotika. S tim dobivenim rezultatima i sa smjernicama propisanim od raznih organizacija (npr. EUCAST - Europski odbor za ispitivanje antimikrobne osjetljivosti), određuje se najbolja opcija liječenja.

1.UVOD

Antibiotici su jedni od najčešće upotrebljivanih lijekova koji baš zbog te činjenice stvaraju veliki problem u medicini. Njihova uspješnost u terapiji ugrožena je sve većim brojem bakterija koje postaju otporne na njihovo djelovanje. Povećanje stope rezistencije na antibiotike dovodi do niza problema kao što su povećanje morbiditeta odnosno oboljenja, smrtnosti, povećanih troškova liječenja, te samim time postaju jednim od najvećih globalnih prijetnji javnom zdravlju.

Autor za korespondenciju:

Lejla Tatlić, dipl. ing. MLD
Bahceci BIH IVF centar, Sarajevo
Hamdije Kreševljakovic, 57
71000 Sarajevo
E-mail: ltatlic@bahceci.com





Prema izvješćima World Economic Forum Global Risks antibiotička otpornost predstavljena je kao jedna od najvećih prijetnji ljudima. Procjenjuje se da u Europi 25.000 ljudi umire svake godine kao rezultat bakterija otpornih na lijekove. Već sredinom 20. st A. Fleming je najavio pojavu rezistencije na penicilin kada je početkom 40-ih godina 20. stoljeća uveo penicilin u kliničku praksu. Prvi mehanizam rezistencije na antibiotike opisan je za penicilinazu, odnosno za enzim koji inaktivira penicilin njegovom razgradnjom. Danas je otkrivena rezistencija na svaki antibiotik, a brzina nastanka te otpornosti ovisi o različitim faktorima, ali ponajviše o potrošnji antibiotika. Njegovo prisutnosti i aktivnosti prvi su izvijestili Abraham i Lanac 1940. godine neposredno nakon njegova otkrića. Antibiotici ne razlikuju patogene bakterije od nepatogenih bakterija normalne flore, time dolazi do nakupljanja odnosno skladištenja gena rezistencije u prirodi. Takve rezistentne bakterije postaje teško ili nemoguće liječiti. Problem je najočitiji u bolničkoj flori, gdje terapijski postupci pospješuju razvoj infekcija, a široka upotreba antibiotika pospješuje širenje rezistentnih bakterijskim sojeva. U bolničkoj flori dominira MRSA, enterobakterije otporne na III. generaciju cefalosporina i pseudomonasi rezistentni na karbapanem. MRSA i Escherichia coli (koja producira β laktamaze proširenoga spektra) uzrokuju i izvanbolničke infekcije. Postoje dvije vrste rezistencije koja može biti urođena ili primarna (intrinzična), te sekundarna ili stečena preko mutacija u kromosomskim genima i prijenosom horizontalnim genom. Primarna (urođena ili intrinzična) rezistencija.

Primarna rezistencija na određeni antibiotik je sposobnost bakterije da se na temelju svojih strukturalnih ili funkcionalnih karakteristika odupre djelovanju antibiotika.

Primarna rezistencija određuje spektar djelovanja antibiotika: antibiotici uskog (užeg) spektra se prepisuju kada je poznato koja bakterija je prisutna, jer su djelotvorni protiv specifičnih vrsta bakterija; antibiotici šireg (širokog) spektra djeluju na više vrsta bakterija stoga se prepisuju kada se ne zna koja je točno bakterija uzrokovala bolest. Sekundarna rezistencija kada mikroorganizam stekne rezistenciju na neki određeni antibiotik koji je prije na njega djelovao aktivno javlja se tzv. sekundarna rezistencija (1,2,8,9,13).

2. METODE ISTRAŽIVANJA

Zbog velike i česte rezistencije na antibiotike, prije liječenja određenog patogena mora se provesti ispitivanje na antimikrobnu osjetljivost. S tim u vezi razvile su se metode kojima se provodi i prati širenje rezistentnih bakterija. Antibiogram je izraz za metodu kojom se ispituje osjetljivost bakterija na antibiotike gdje sve imaju isti cilj predvidjeti da li će bakterija reagirati na primijenjeni antibiotik.

Metode testiranja osjetljivosti na antibiotike su:

- Metoda razrjeđivanja
- Disk-difuzijska metoda
- E-test
- Automatizovana metoda
- Testovi specifični za mehanizam rezistencije
- Genotipske metode kao što su PCR i DNA hibridizacijske metode (1,2).



Dilucioni metod

Postoje dvije varijante ovog metoda — agar dilucioni i bujon dilucioni — mada se drugi primjenjuje češće. U epruvetama sa hranljivim bujonom napravi se niz razblaženja (serijski, tako da svaka sljedeća epruveta ima duplo manju koncentraciju) antibiotika, a zatim se u njih doda ista količina ispitivanih bakterija. Nakon inkubacije vizuelno se određuje da li je došlo do inhibicije rasta mikroorganizama. Koncentracija antibiotika u prvoj epruveti u kojoj nema zamućenja (nema prirasta bakterija) odgovara minimalnoj inhibitornoj koncentraciji (MIK). Za određivanje minimalne baktericidne (mikrobicidne) koncentracije, vrši se presijavanje iz preostalih epruveta bez zamućenja i prve sa zamućenjem na čvrstu hranljivu podlogu pa nakon inkubacije traži prirast kolonija. Prvi izostanak kolonija odgovara minimalnoj baktericidnoj (mikrobicidnoj) koncentraciji (MBK ili MMK). Odnos MBK i MIK je značajan parametar osjetljivosti bakterijskog soja. Visoko tolerantnim sojevima označavaju se oni kod kojih je ovaj odnos veći od 32 (1,3,8).

Disk-difuziona metoda ispitivanja osjetljivosti bakterija na antibiotike

Zasniva se na principu difuzije antibiotika kroz čvrstu hranljivu podlogu (agar) najčešće Mueller-Hinton prethodno zasijanu ispitivanom bakterijskom kulturom. *Disk metoda* (metoda tablete) to je najčešće primjenjena metoda. Upotrebljavaju se diskovi ili tablete obloženi tačno određenom vrstom i koncentracijom antibakterijskog lijeka,

koja je odgovarajuća onoj koja se postiže u organizmu primjenom terapijskih doza tog lijeka. Sam postupak izvodimo tako što

- Iz čiste bakterijske kulture uzimamo- kolonija ezom.
- Pravimo suspenziju određene gustine od ispitivane bakterijske kulture.
- Bris natopimo suspenzijom bakterija i ocijedimo višak tečnosti lakim pritiskom o zidove epruvete.
- Ravnomerno nanosimo bakterijske suspenzije brisem na cijelu površinu agara (najčešće Mueller-Hinton) da bise dobio konfluentan porast.

Poslije nanošenja suspenzije na podlogu vrši se stavljanje diskova sa određenim(standardnim) koncentracijama antibiotika pincetom. Postoji tačno određen raspored diskova sa antibioticima. Inkubacija u termostatu je od 16 do 24 h na temperaturi 37°C .Poslije inkubacije vrši se očitavanje prečnika zone inhibicije (1,3,11,12,13).

Ako su svi uslovi standardizovani (pritisak, temperatura, pH, vrijeme inkubacije) onda je prečnik zone inhibicije proporcionalan koncentraciji datog antibakterijskog sredstva.

U toku inkubacije dolazi do umnožavanja bakterija na hranjivoj podlozi. Antibiotik difunduje kroz hranjivu podlogu. Koncentracija antibiotika postepeno i radialno opada sa udaljavanjem od diska sve do tačke gdje više nije inhibitorna i gdje se pojavljuje porast bakterija. Nastaje zona inhibicije rasta. Zona inhibicije rasta:okrugla zona oko diska sa



antibiotikom u kojoj nema vidljivog porasta bakterija. Mjerenjem njenog prečnika tumačimo dobivene rezultate.

Tumačenje rezultata disk –difuzionog metoda, Postoje 3 kategorije osjetljivosti:

S/osjetljiv - vjerovatnoća uspjeha terapije je visoka nakon primjene uobičajenih doza antibiotika, datih na uobičajen način.

I/intermedijarno - (umjereno) - osjetljiv-mogući uspjeh terapije ako se antibiotik da u maksimalnim koncentracijama i parenteralnim

R/rezistentan - nikada se ne primjenjuje u terapiji; bez obzira na dozu, terapija je vjerovatno neuspješna.

Na zonu inhibicije mogu da utiču sljedeći faktori: osobine podloge, veličina inokuluma, faza razmnožavanja u kojoj se nalazi ispitivana bakterija, stabilnost antibakterijskog sredstva. Da bi se otklonio utjecaj ovih faktora za izvođenje ANTIBIOGRAMA koristi se standardna Mueller-Hintonova podloga (1,3,12,13).

Epsilon test ili E test

E test je kvantitativni metod za određivanje antimikrobne osjetljivosti, odnosno minimalne inhibitorne koncentracije MIK-a antibiotika. E test predstavlja kombinaciju difuzionog i dilucionog metoda. Pored sličnosti sa difuzionom metodom, razlikuje se od nje po preformiranom i stabilnom koncentracionom gradijentu antibiotika. Epsilon test se takođe izvodi na čvrstoj podlozi i zasniva na difuziji antibiotika kroz medijum. Za izvođenje se koriste posebne, komercijalno dostupne plastične trake koje sadrže neravnomerno impregniran antibiotik

čija koncentracija eksponencijalno opada duž trake. Jedna strana trake je kalibrisana sa MIK skalom u $\mu\text{g/ml}$ i to od 0,002-1024 $\mu\text{g/ml}$ zavisno od antibiotika. Nakon inkubacije je uočljiva elipsoidna zona inhibicije rasta, a minimalna inhibitorna koncentracija (MIK) se očitava sa skale u presjeku užeg segmenta zone i same trake. Vrijednost na traci u presjeku sa zonom inhibicije rasta odgovara MIK. Rezultat se takođe očitava kao S-osjetljiv, I-intermedijarno osjetljiv i R-rezistentan uz MIK u $\mu\text{g/m}$ (1,3,4).



Slika 1. Tehnika očitavanja E-testa

Automatizovane metode

Osiguravaju pripremljene i oblikovane ploče za mikrodiluciju, instrumentaciju i automatsko očitavanje ploča. Većina takvih automatiziranih sistema za ispitivanje osjetljivosti na antibiotike osigurava i automatsku inokulaciju, čitanje te tumačenje.

Identifikacija bakterija se vrši automatskim sistemom. Koristi se automatizovani sistem npr. VITEK Compact, koji omogućava identifikaciju više od 330 vrsta mikroorganizama. Identifikacija se završi vrlo brzo, u toku pet sati, što omogućava pravovremenu dijagnozu. Uz identifikaciju određuje se i osjetljivost na antimikrobna sredstva što sa vrijednostima MIK-a, omogućava



kliničarima odabira najadekvatnijeg antibiotskog tretmana

Pri odredjivanju antibiograma na VITEK Compact aparatu: očitavanje rezultata vrši se automatski uz pomoć Expert sistema za validaciju testa osjetljivosti postoji mogućnost identifikacije potencijalnih mehanizama rezistencije, čak i „emerging“ i niskog niva rezistencije. Takođe doprinosi otkrivanju nozokomijalnih infekcija. Velika im je prednost ovih metoda što su brze, ali velika je mana što su skupe.(1,10)

Testovi specifični za mehanizam rezistencije

Testovi specifični za mehanizam rezistencije se obavljaju na temelju otkrivenog prisutnog mehanizma rezistencije. Kao što se detekcija beta laktamaza može provesti upotrebom kromogenog testa cefalosporinaze. Sposobnost izvjesnih bakterija da stvaraju enzime koji inaktiviraju antibiotike sa β -laktamom, tj. peniciline i cefalosporine. U najčešće korišćene kliničke procedure spadaju jodometrijska metoda, acidometrijska metoda i mnoštvo različitih hromogenih podloga. Jodometrijski i acidometrijski testovi se generalno izvode sa penicilinom kao podlogom pa, iz tog razloga, mogu da otkriju samo one enzime koji hidrolizuju penicilin.

Jedan od hromogenih cefalosporina, PADAC (Calbiochem-Behring), pokazao se kao efektivan u otkrivanju većine poznatih β -laktamaza osim nekih penicilina koje stvaraju stafilokoke i nekih β -laktamaza koje stvaraju anaerobne bakterije. Još jedan hromogeni cefalosporin, npr. nitrocef

(Glaxo Research), pokazao se kao efikasan u otkrivanju svih poznatih β -laktamaza uključujući i penicilinaze stafilokoka. U svrhu testa koriste se Cefinase diskovi natopljeni nitrocefinom. Kod ovog jedinjenja vidljiva je vrlo brza promjena žute boje u crvenu prilikom hidrolize amidne veze u β -laktamskom prstenu β -laktamazom. Kada bakterija proizvodi ovaj enzim u značajnim količinama, žuti disk pocrveni tamo gdje je izolat nanešen (1,7).

Genotipske metode

Genotipske metode-podrazumijevaju utvrđivanje prisustva gena za rezistenciju na antibiotike.

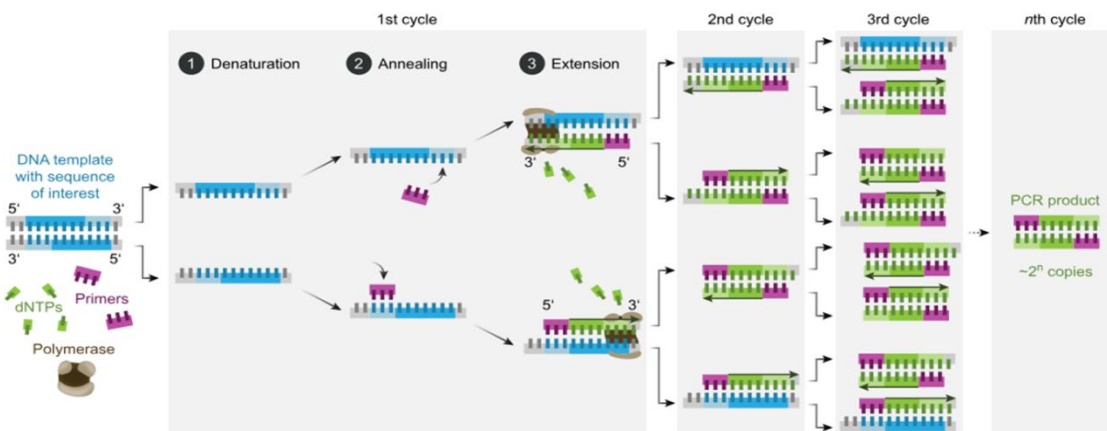
Ukoliko je MIC vrijednost za neki soj mikroorganizma iznad postavljenih graničnih vrijednosti, neophodno je dalje ispitivanje prirode rezistencije, kako bi se utvrdilo da li je rezistencija urođena ili stečena. Urođena rezistencija je specifičnost vrste ili roda i tačna identifikacija taksonomske pripadnosti ispitivanog soja predstavlja osnovni preduslov za utvrđivanje genetske baze rezistencije. Genetska baza rezistencije utvrđuje se molekularno-biološkim metodama od kojih je najčešće korišćena PCR tehnika i DNA hibridizacija.

PCR je jedna od najčešće upotrebljivanih molekularnih tehnika za detekciju određene DNA sekvence. U tu je tehniku uključeno nekoliko ciklusa denaturacije uzorka DNA, vezivanje specifičnih početnica na ciljnu sekvencu, i produživanje tih sekvenci olakšano termostabilnim polimerazama dovodeći do replikacije i duplikacije DNA sekvenci.



PCR je ciklična reakcija amplifikacije specifičnog regiona DNK molekula. Ona omogućava da se od male početne količine DNK dobije veliki broj kopija njenog željenog fragmenta koje se potom mogu detektovati. Osim određivanja prisustva patogena u uzorku (kvalitativna analiza) PCR analizom se može precizno i pouzdano odrediti i količina patogena u uzorku (kvantitativna analiza). Najpreciznija kvantitativna analiza se dobija primjenom real-time PCR metode (qPCR). Za razliku od klasičnog PCRa gdje se količina patogena određuje na kraju reakcije (end point analiza) kod qPCR se količina patogena određuje u realnom vremenu nakon svakog ciklusa tokom reakcije, primjenom fluorescentnih markera (fluorescentnih boja ili DNK proba sa fluoroforama). Analiza qPCR metodom pruža mogućnost da se osim detektovanja prisustva patogena određivanjem njegove količine u uzorku dobiju i informacije o stepenu infekcije i stadijumu bolesti kao i da se prati odgovor na terapiju.

DNA hibridizacija je fenomen u kojem se jednostruki polulanci molekula dezoksiribo-nukleinske kiseline (DNK) ili ribonukleinske kiseline (RNK) različitog porijekla međusobno ostvaruju komplementarne veze, stvarajući kombiniranu DNK ili RNK. DNK hbridizacija općenito se odnosi na molekularno-genetičku tehniku kojom se mjeri stepen genetičke sličnosti između kompariranih fondova DNK sekvenci. Pritom se obično određuje međusobna genetička distanca organizama i/ili populacija. DNA hibridizacija temelji se na specifičnim parovima purina i pirimidina u DNA. Stoga se lanac radioaktivno označen s poznatim slijedom baza može spariti sa denaturanom DNA iz uzorka. Pojavom ove hibridizacije lanac se označava sa signalnim radioaktivnim izotopom ili enzimom, a ukoliko nema ciljne sekvence ili izolat ne sadrži specifični gen ne dolazi do otkrivanja signala. DNK hibridizacije je zlatni standard za razlikovanje bakterijskih vrsta, kada vrijednost sličnosti manja od 70%



Shka 2. Shematski prikaz PCR metode



ukazuje da poređeni sojevi pripadaju posebnim vrstama. Iako je PCR najčešće korišćena metoda za dokazivanje gena rezistencije, ona zahtjeva izolaciju bakterija i njihove DNK i zavisna je od kulturnih tehnika i njihovih ograničenja pri izolaciji bakterija, zbog čega se za ispitivanje rezistencije unapređuju i razvijaju najsavremenije, kulturalno nezavisne tehnike poput metagenomike i sekvencioniranja cijelog genoma. Ove metode omogućuju detekciju i ispitivanje cjelokupnog bakterijskog genoma, identifikaciju novih genetskih osobina i identifikaciju nepoznatih genetskih elemenata, što upotrebom samog PCR metoda nije moguće (1,5,6).

3. ZAKLJUČAK

Poseban problem u liječenju infekcija stvaraju bakterije otporne na više antibiotika takozvane MDR (MULTIPLE DRUG RESISTANCE) bakterije. One mogu biti intenzivno otporne na lijekove (XDR) ili panrezistentne (PDR). MDR bakterije najčešće nastaju stjecanjem ekstrakromosomskih elemenata od drugih bakterija u okolini. Za otkrivanje najboljeg načina liječenja bolesti uzrokovane bakterijom, trebaju se provesti ispitivanja antimikrobne osjetljivosti i utemeljiti koja vrsta bakterije uzrokuje bolest. Pošto nije jedini problem rezistencija bakterija na antibiotike već i nedovoljan razvitak novih antibiotika kombiniranje informacija s do sada provedenih istraživanja moglo bi dovesti do pronalaska novih vrsta antibiotika. S tim dobivenim rezultatima i sa smjernicama propisanim od raznih organizacija (npr. EUCAST - Europski odbor za ispitivanje antimikrobne osjetljivosti), određuje se najbolja opcija liječenja (1,15).

4. LITERATURA

1. Musa M. Mehanizmi stjecanja otpornosti na antibiotike kod bakterija, Završni rad, Osijek 2017.
2. Tambić Andrašević. Otpornost bakterija na antibiotike - vodeći problem medicine u 21. Stoljeću, Medicina, 43 (2007), 7-14.
3. Hukić M i saradnici, Bakteriologija, Sarajevo 2005, 115-119.
4. https://en-m-wikipedia-org.translate.google.com/translate?_x_tr_sl=en&_x_tr_tl=bs&_x_tr_hl=bs&_x_tr_pto=sc
5. https://www.researchgate.net/publication/325606136_METODE_ZA_ODREDIVANJE_ANTIMIKROBNE_REZISTENCIJE_KOD_MIKROORGANIZAMA_U_HRANI
6. https://bs.wikipedia.org/wiki/DNK-DNK_hibridizacija
7. [https://legacy.bd.com/europe/regulatory/Assets/IFU/US/8800801\(0604\)_SR.pdf](https://legacy.bd.com/europe/regulatory/Assets/IFU/US/8800801(0604)_SR.pdf)
8. https://sr.wikipedia.org/sr-el/%D0%90%D0%BD%D1%82%D0%B8%D0%B1%D0%B8%D0%BE%D0%B3%D1%80%D0%B0%D0%BC%D0%94%D0%B8%D0%BB%D1%83%D1%86%D0%B8%D0%BE%D0%BD%D0%B8_%D0%BC%D0%B5%D1%82%D0%BE%D0%B4
9. Payerl-Pal M. Potrošnja antibiotika u hrvatskim bolnicama, Infektološki glasnik, 29 (2009), 157-164.
10. http://www.ukctuzla.ba/ukctuzla/?page_id=552&lang=bs
11. <https://dokumen.tips/documents/disk-difuziona-metoda-ispitivanja-osjetljivosti-bakterija-na-antibiotike.html>
12. Kalenić S. The resistance of bacteria to antibiotics, Medicus, 9 (2000), 149-153.



13. Kalenić S. Medicinska mikrobiologija, Medicinska naklada, Zagreb, 2013.
14. D'Costa VM, McGrann KM, Hughes DW, Wright GD. Sampling the antibiotic resistome, *Science*, 311 (2006), 374–377.
15. Znidarčić Ž. Medicinska etika 2, Centar za bioetiku ZAGREB, 2006.
16. <https://drgermophile.files.wordpress.com/2020/06/image-17.png?w=624> – slika dilucionog metoda
17. <https://html.scribdassets.com/2puoy3t rr43jbg7y/images/7-c72b74184e.png> - očitavanje rezistencije
18. <https://html.scribdassets.com/2puoy3t rr43jbg7y/images/3-b366723497.png> - slika agara
19. https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/a/ab/Polymerase_chain_reaction-en.svg/1024px-Polymerase_chain_reaction-en.svg.png - PCR
20. <https://www.bionet-skola.com/w/images/3/39/NUCLEIC.gif> - DNK HIBRIDIZACIJA



METHODS FOR DETERMINING THE RESISTANCE/SUSCEPTIBILITY OF BACTERIA TO ANTIBIOTICS

Tatlić L.

ABSTRACT

Antibiotics are one of the most commonly used drugs, which is a major problem in medicine due to this fact. Their success in therapy is threatened by the growing number of bacteria that are becoming resistant to their action. The first mechanism of antibiotic resistance is described for penicillinase, ie the enzyme that inactivates penicillin by its degradation. Today, resistance to each antibiotic has been discovered, and the rate of onset of this resistance depends on various factors, but mostly on antibiotic consumption. Due to the high and frequent resistance to antibiotics, an antimicrobial susceptibility test must be performed before treating a particular pathogen. In this regard, methods have been developed to implement and monitor the spread of resistant bacteria. An antibiogram is a term for a method that tests the susceptibility of bacteria to antibiotics where they all have the same goal of predicting whether the bacteria will react to the antibiotic applied. A special problem in the treatment of infections is created by bacteria resistant to several antibiotics, the so-called MDR (MULTIPLE DRUG RESISTANCE) bacteria. They can be intensive drug resistant (XDR) or panresistant (PDR). MDR bacteria are most often formed by acquiring extrachromosomal elements from other bacteria in the environment. To identify the best way to treat a disease caused by a bacterium, antimicrobial susceptibility testing should be conducted and to establish which type of bacterium is causing the disease. Since the only problem is not the resistance of bacteria to antibiotics, but also the insufficient development of new antibiotics, combining information with research conducted so far could lead to the discovery of new types of antibiotics. With these results and with guidelines prescribed by various organizations (eg EUCAST - European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing), the best treatment option is determined.

Corresponding author:

*Lejla Tatlić
Bahceci BIH IVF centar, Sarajevo
Hamdije Kreševljakovic, 57
71000 Sarajevo
E-mail: ltatlic@bahceci.com*