

SÚVISLOSŤ MEDZI SUBINHIBIČNOU KONCENTRÁCIOU BIOCIDOV A BAKTERIÁLNOU REZISTENCIOU VOČI ANTIBIOTIKÁM PRE KMEŇ *Enterococcus faecalis*

HAJNALKA ŽSZIOVÁ, ANNA BAKOVÁ
a LUCIA BIROŠOVÁ

Oddelenie výživy a hodnotenia kvality potravín, Ústav potravinárstva a výživy, Fakulta chemickej a potravinárskej technológie, Slovenská technická univerzita, Radlinského 9, 812 37 Bratislava
zora271@gmail.com

Došlo 6.1.17, prijaté 8.4.17.

Kľúčové slová: biocídy, bakteriálna rezistencia, krížová rezistencia, antibiotiká

Úvod

Biocídy sú zlúčeniny, ktoré prinášajú spoločnosti viaceré cenné benefity. Majú dôležitú úlohu pri kontrole bakteriálnej aktivity a práve z tohto dôvodu sa musia využívať spôsobom, ktorý v priebehu času nespôsobí stratu ich účinnosti. Na to, aby sa úloha biocídov v kontrole infekcií a hygieny zachovala, je nevyhnutné zabrániť vývoju bakteriálnej rezistencie a krížovej rezistencie, ktorá vzniká v dôsledku ich nevhodného a neuváženého používania. Rezistencia voči antibiotikám sa celosvetovo zvýšila a bakteriálne patogény spôsobujú zlyhanie v liečbe infekčných chorôb ľudí a zvierat. Baktérie sú schopné rýchlo sa prispôsobovať zmenám v ich prostredí ako napr. prítomnosti antimikrobiálnych molekúl a dôsledkom toho sa so zvyšujúcou úrovňou ich vystavenia týmto molekulám zvyšuje aj bakteriálna rezistencia voči nim. Zvyšujúca sa bakteriálna rezistencia voči rôznym typom biocídov sa začala študovať až nedávno a celkovo sa jej nevenuje taká veľká pozornosť ako rezistencii voči antibiotikám. Existuje len limitované množstvo vedeckých dôkazov zameraných na správne posúdenie rizík spojených s využívaním biocídov a vývojom bakteriálnej rezistencie voči antibiotikám. Doterajšie výskumy ukazujú, že biocídy a antibiotiká môžu disponovať podobnými alebo spoločnými interakciami s cieľovými miestami baktérií, čo môže vyvolať zdieľané mechanizmy rezistencie voči obom typom týchto antimikrobiálnych látok. Ďalším z problémov spojených s využívaním biocídov je ich nadmerné a neopatrné používanie v domácnostiach, zdravotníckych zariadeniach a priemyselnej výrobe. Účinné zložky biocídnych prípravkov sa tak dostávajú do životného prostredia napr. prostredníctvom odpadových vôd, kde pretrvávajú a môžu spôsobiť vznik

adaptívnej rezistencie alebo vyselektovať prirodzene rezistentnú zložku populácie mikroorganizmov.

Štúdie mechanizmu antibakteriálneho pôsobenia antiseptík a dezinfekčných látok priniesli výrazný pokrok^{1–3}, na rozdiel od prác zaoberajúcich sa účinkom pôsobenia na huby^{4,5}, vírusy^{6,7} a prvoky⁸, ktoré neboli natoľko úspešné. Predpokladá sa, že bez ohľadu na typ mikrobiálnej bunky dochádza k rovnakému sledu udalostí. Ide napríklad o interakciu antiseptík alebo dezinfekčných látok s povrchovými štruktúrami bunky, následným prienikom do vnútra bunky a ich interakciou s cieľovým miestom. Povaha a štruktúra povrchu bunky sa môže líšiť u jednotlivých rodov, ale taktiež sa môže pozmeniť na základe zmien v životnom prostredí^{9,10}. Interakcie na povrchu bunky môžu vytvoriť značný efekt na jej viabilitu (napr. glutaraldehyd)^{11,12}, ale väčšina antimikrobiálnych látok vykazuje intracelulárnu aktivitu^{2,13}. Zvýšenie účinnosti aktivity väčšiny biocídov môže byť dosiahnuté použitím rôznych prísad. Účinnosť biocídov je závislá od škály vnútorných a vonkajších faktorov. Vnútorne faktory zahŕňajú charakteristiky biocídneho prípravku a spôsobu jeho aplikácie. Rozhodujúce sú tiež parametre ako použitá koncentrácia a dĺžka expozície. Vonkajšie faktory vychádzajú z toho, v akom prostredí je biocíd aplikovaný. Dôležitá je teplota, pretože väčšina prípravkov má nižšiu účinnosť pri nízkych teplotách. Prítomnosť proteínov v prostredí znižuje účinnosť, nakoľko tieto interagujú so zlúčeninou. Dôležité je taktiež pH, koncentrácia mikroorganizmov, vek bakteriálnej populácie a vplyv ochrany materiálom, na ktorom je prichytená¹⁴. Štúdie spôsobu účinku antimikrobiálnych látok navrhujú, že na rozdiel od antibiotík, ktoré účinkujú zásahom jedného špecifického cieľa v bunke, biocídy môžu pôsobiť na jedno alebo viacero miest bunkovej steny, membrány alebo cytoplazmy^{2,15,16}. U chemicky reaktívnych biocídov, ako je chlór alebo kyslík-produkujúce látky, je mechanizmus ich baktericídneho účinku pravdepodobne založený na oxidácií tiolových skupín a iných, spomedzi radu membránovo viazaných a intracelulárnych enzýmov. Pri posudzovaní prepojenia medzi využívaním biocídov a vyvinutím zníženej citlivosti voči antibiotikám sa naskytujú dve závažné otázky:

1. Ak baktérie disponujú mechanizmami kódujúcimi obe zníženú citlivosť na biocídy a rezistenciu voči antibiotikám, je možné, že používanie biocídov by mohlo prispievať ku rozmáhaniu antibioticky multirezistentných populácií v klinickej praxi?

2. V prípade, že biocídy prispievajú k rozvoju rezistencie voči antibiotikám, v akom rozsahu je tento faktor prispievajúci v porovnaní s inými, ako sú napríklad nadmerné, či nesprávne používanie antibiotík?

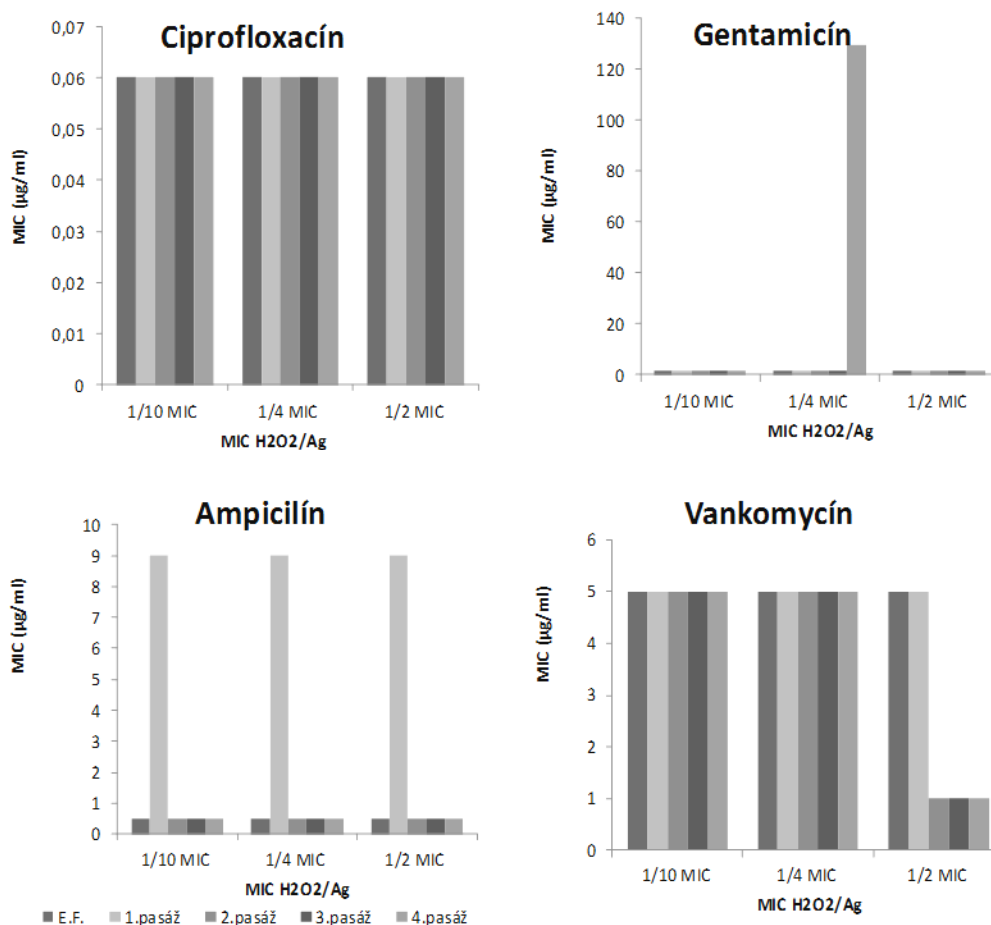
Štúdie naznačujú, že bakteriálne populácie môžu súčasne vykazovať zníženú citlivosť voči antibiotikám aj biocídom. Teoreticky tento fakt nastoľuje možnosť, že dlhodobé pôsobenie biocídov mohlo prispieť ku vytvoreniu, alebo vylepšeniu, selektívneho tlaku vyvíjaného užívaním antibiotík, ktorý sa v súčasnosti pokladá za hlavnú príčinu antibiotickej rezistencie v klinickej praxi. Determinantmi rezistencie sú najčastejšie gény kódujúce mnoho-

liekové efluxné pumpy buď plazmidového, alebo chromozomálneho pôvodu. Keďže medzi týmito dvoma aspektami existujú fundamentálne rozdiely, sú zvažované samostatne¹⁷. Biocídy a antibiotiká môžu vykazovať podobnosti v mechanizmoch ich účinku a môžu pre nich platiť všeobecné mechanizmy zníženej bakteriálnej citlivosti, ale taktiež medzi nimi existujú zásadne rozdiely. V laboratóriách sa môžu baktérie stať menej citlivými na niektoré biocídy. Bakteriálne vystavenie biocídom môže taktiež viesť ku indukcii alebo vývoju mechanizmu, ktorý je zodpovedný za krížovú rezistenciu voči niektorým antibiotikám. Dôsledkom toho môže vystavenie baktérií v laboratóriách viesť ku vývoju antibiotickej rezistencie, čo však nutne neznamená, že by sa táto rezistencia vyvinula aj v ich prirodzenom alebo klinickom prostredí. Preto je dôležité, aby sa pri využívaní výsledkov laboratórných štúdií o možnom spojení medzi využitím biocídov a výskytom antibiotickej rezistencie v klinickej praxi a ich ďalšiemu aplikovaniu v environmentálnych a klinických situáciách bral tento fakt do úvahy a boli využívané

s opatnosťou¹⁸.

Experimentálna časť

Šestnásť hodinovú kultúru citlivého kmeňa *Enterococcus faecalis* CCM 4224 (Česká zbierka mikroorganizmov, Brno) sme alikvotne napipetovali do tekutého Luria-Bertani (LB) média obsahujúce subinhibičné koncentrácie ($1/10$ MIC, $1/4$ MIC a $1/2$ MIC) sledovaných biocídov (NaClO, ClO₂, H₂O₂/Ag) tak aby výsledná koncentrácia buniek bola 10^6 KTJ ml⁻¹. Kultúru sme následne inkubovali pri 42 °C 24 h. Po tejto prvej pasáži sme kultúru naočkovali kvapkovou metódou¹⁹ na povrch Petriho misiek s LB agarom a rôznymi koncentraciami antibiotík (ampicilín, gentamicín, ciprofloxacín, vankomycín), pričom koncentrácie boli volené na základe minimálnej inhibičnej koncentrácie pôvodného kmeňa *E. faecalis* a zohľadňovali aj hranice rezistencie dané Európskym výborom pre testovanie antimikrobiálnej citlivosti



Obr. 1. Zmeny minimálnej inhibičnej koncentrácie (MIC) testovaných antibiotík počas pasážovania kmeňa *Enterococcus faecalis* v subinhibičných koncentráciách biocídov (H₂O₂/Ag)

(EUCAST) a americkým Inštitútom pre klinické a laboratórne normy (CLSI). Samotná kultúra bola následne prepasávaná do čerstvého LB média s biocídom tak aby výsledná koncentrácia inokula bola 1 %. Výsledný počet pasáží bol 4 a po každej pasáži sme stanovovali zmeny v citlivosti na antibiotiká. Pracovali sme v troch paralelných stanoveniach.

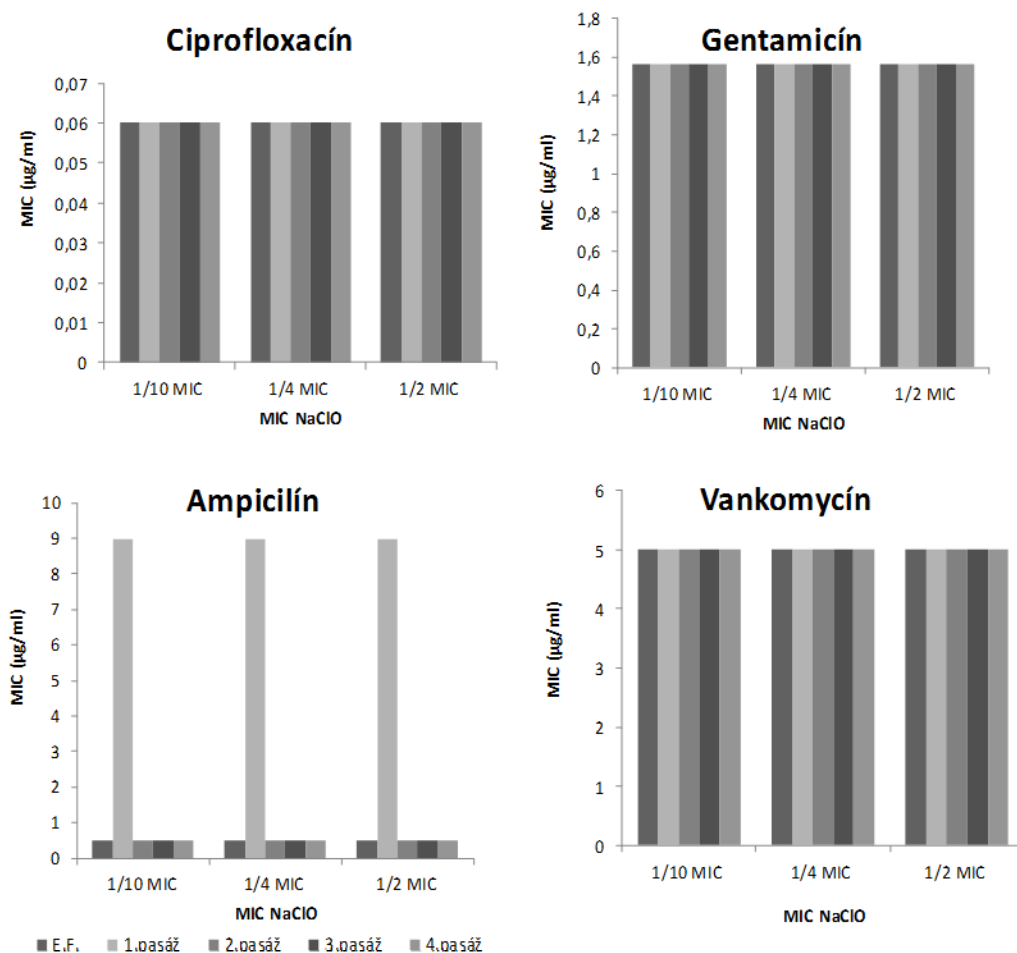
Výsledky a diskusia

Pasážovanie kmeňa *Enterococcus faecalis* voči vybraným antibiotikám v subinhibičných koncentráciách biocídov

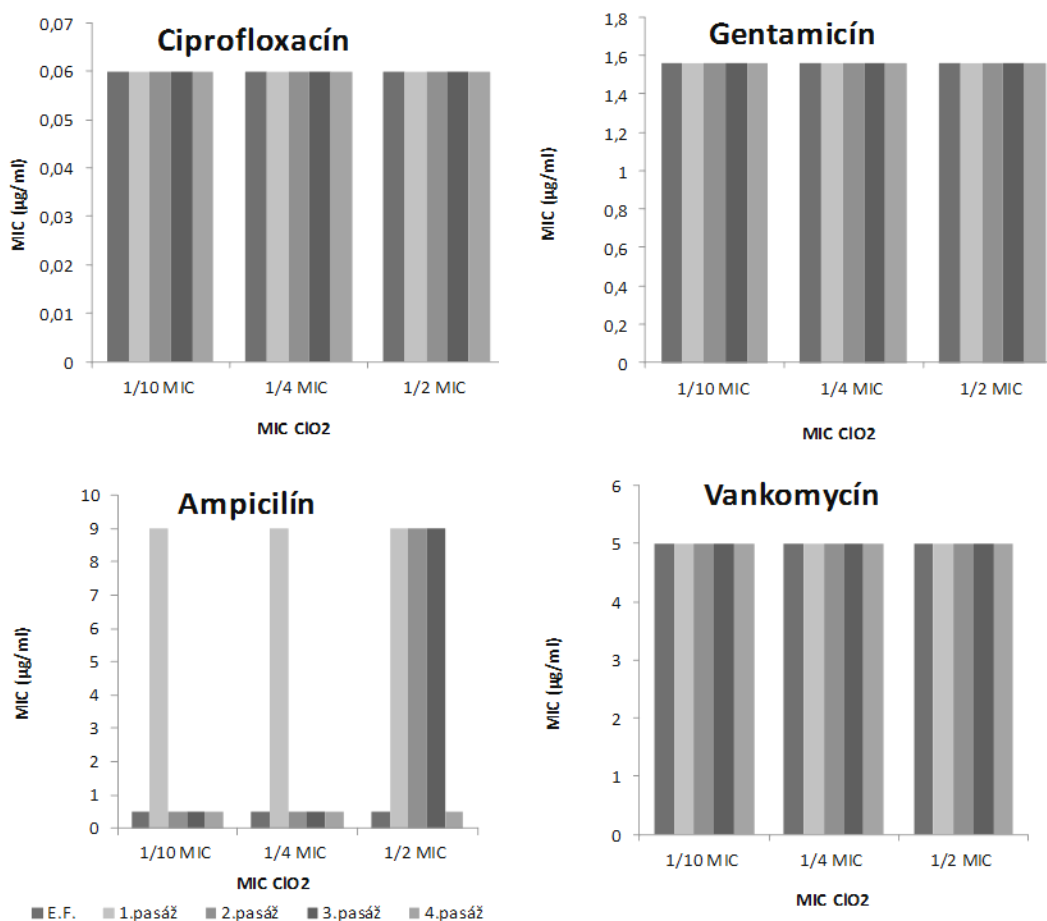
Modelový bakteriálny *E. faecalis* CCM 4224, ktorý je používaný na bežné stanovenie minimálnej inhibičnej koncentrácie antibiotík, sme inkubovali v štyroch postupných pasážach v tekutom LB-médium v troch subinhibičných

koncentráciách (1/10 MIC, 1/4 MIC, 1/2 MIC) biocídov, ktoré sa bežne používajú na dezinfekciu vody. Obrázky 1 až 3 graficky znázorňujú zmeny v citlivosti *E. faecalis* v závislosti od koncentrácie biocídu a pasáže. V prípade biocídov NaClO a ClO₂ neboli pozorované zmeny v MIC pre ciprofloxacín, gentamicín a vankomycín. Rovnakú situáciu sme zaznamenali pre ciprofloxacín po pôsobení H₂O₂/Ag, kedy MIC ostala nezmenená. V prípade ampicilínu boli detegované značné zmeny pre všetky typy biocídov (obr. 1 až 3), najmä po 1. pasáži pri všetkých použitých koncentráciách biocídu NaClO a ClO₂. Hodnota MIC pritom dosiahla hranicu rezistencie podľa EUCAST, dokonca pre ClO₂ sme pozorovali zvýšenie MIC v 2. a 3. pasáži v prítomnosti 1/2 MIC (obr. 3).

V prípade vankomycínu sme detegovali zmeny v MIC iba po pôsobení subinhibičných koncentrácií H₂O₂/Ag. Z obrázkov je zrejmé, že pôvodný kmeň je pomerne necitlivý na vankomycín, nakoľko dosahuje hranice rezistencie podľa EUCAST. Je to spôsobené tým, že tento zberkový



Obr. 2. Zmeny minimálnej inhibičnej koncentrácie (MIC) testovaných antibiotík počas pasážovania kmeňa *Enterococcus faecalis* v subinhibičných koncentráciách biocídov (NaClO)



Obr. 3. Zmeny minimálnej inhibičnej koncentrácie (MIC) testovaných antibiotík počas pasážovania kmeňa *Enterococcus faecalis* v subinhibičných koncentráciách biocidov (ClO₂)

kmeň je určený na testovanie citlivosti antibiotík, avšak iných tried. Každopádne pozitívny výsledok sme zaznamenali v prítomnosti H₂O₂/Ag pri koncentrácii 1/2 MIC počas posledných troch pasáží, kedy sme pozorovali zníženie MIC, resp. stratu rezistencie voči tomuto antibiotiku. Enterokoky rezistentné voči vankomycínu pritom v súčasnosti predstavujú jednu z najväčších hrozieb verejného zdravia. Naopak, v prípade gentamicínu po pôsobení H₂O₂/Ag (1/4 MIC) sme zaznamenali až relevantnú hodnotu rezistencie v poslednej pasáži (obr. 1).

V súčasnosti máme k dispozícii presvedčivé dôkazy o tom, že spoločné mechanizmy zodpovedné za rezistenciu voči biocidom a antibiotikám sú v baktériách prítomné a môžu byť získané prostredníctvom mobilných genetickým elementov. Tieto elementy nesú nezávislé gény, ktoré sprostredkovávajú špecifickú rezistenciu voči biocidom a antibiotikám. Niektoré biocidy majú potenciál podporovať rozvoj populácií rezistentných voči antibiotikám, buď vyselektovaním širokospektrálnych rezistentných populácií, alebo v prípade grampozitívnych druhov, prenosom

plazmidov nesúcich gény multirezistencie. Na vyhodnotenie dostupných poznatkov musia byť posúdené dve kritériá. Po prvé, do akého rozsahu sa tieto mechanizmy vyskytujú v životnom prostredí, alebo v klinickej praxi a po druhé, či úroveň odolnosti voči antibiotikám je postačujúca na ovplyvnenie ich účinnosti. Momentálne dostupné dáta ukazujú, že druhé menované sa mení na základe povahy antibiotika, cieľového miesta a daného biocidu. Jedným z riešení tohto problému by mohlo byť vyhodnotenie a zharmonizovanie pravidiel šetrného používania biocidov v rôznych aplikáciách. Ďalším odporúčaním by mohlo byť zavedenie monitorovacích programov zaoberajúcich sa bakteriálnou rezistenciou voči biocidom. V súčasnosti neexistujú žiadne jasné a všeobecne schválené kritéria alebo štandardy na vyhodnotenie schopnosti biocidu vyvolať rezistenciu voči antibiotikám. Preto je potrebné vyvinúť prostriedky na definovanie minimálnej koncentrácie biocidu, ktorá je schopná vyvolať vznik mechanizmu rezistencie týkajúcej sa danej triedy antibiotika v definovanej baktérii. Naším cieľom bude vždy snaha

o zachovanie účinnosti biocídov v situáciách, v ktorých budú pre nás prinášať cenné zdravotné benefity v podobe redukcie šírenia infekcií. Je teda potrebné zabezpečiť, aby rozširujúce sa používanie biocídov v domácnostiach a zdravotníckych zariadeniach ďalej neprispievalo ku problému bakteriálnej rezistencie.

Záver

Cieľom práce bolo zistiť, nakoľko subinhibičné koncentrácie bežne používaných biocídnych látok môžu ovplyvniť baktérie a indukovať u nich mutácie vedúce k rezistencii voči antibiotikám. Dlhodobé pôsobenie neletálnych koncentrácií NaClO, ClO₂ a H₂O₂/Ag spôsobilo zníženie citlivosti *E. faecalis* na β-laktámové antibiotikum ampicilín. Subinhibičná koncentrácia H₂O₂/Ag viedla k rozvoju rezistencie u gentamicínu. Na druhej strane H₂O₂/Ag ako jediný biocíd spôsobil zvýšenie citlivosti *E. faecalis* na vankomycín, resp. viedol k strate rezistencie tohto kmeňa.

Zoznam skratiek

ATB	antibiotikum
LB	Luria-Bertoni
MIC	minimálna inhibičná koncentrácia

LITERATÚRA

- Hugo W. B.: *Disinfection mechanisms*, v: *Principles and practice of disinfection, preservation and sterilization*, (Russell A. D., Hugo W. B., Ayliffe G. A. J., ed.), 3. vyd. Blackwell Science, Oxford 1999.
- Russell A. D., Chopra I.: *Understanding antibacterial action and resistance*. 2. vyd. Ellis Horwood, Chichester 1996.
- Russell A. D., Furr J. R., Maillard J.-Y.: *ASM News* 63, 481 (1997).
- Russell A. D.: *Antifungal activity of biocides*, v: *Principles and practice of disinfection, preservation and sterilization*, (Russell A. D., Hugo W. B., Ayliffe G. A. J., ed.), 3. vyd. Blackwell Science, Oxford 1999.
- Russell A. D., Furr J. R.: *Sci. Prog.* 79, 27 (1996).
- Maillard J.-Y.: *Mechanisms of viricidal action*, v: *Principles and practice of disinfection, preservation and sterilization*, (Russell A. D., Hugo W. B., Ayliffe G. A. J., ed.), 3. vyd. Blackwell Science, Oxford 1999.
- Maillard J.-Y., Russell A. D.: *Sci. Prog.* 80, 287 (1997).
- Furr J. R.: *Sensitivity of protozoa to disinfection B. Acanthamoeba and contact lens solutions*, v: *Principles and practice of disinfection, preservation and sterilization*, (Russell A. D., Hugo W. B., Ayliffe G. A. J., ed.), 3. vyd. Blackwell Science, Oxford 1999.
- Brown M. R. W., Gilbert P.: *Soc. Appl. Bacteriol. Symp. Suppl.* 74, 87S (1993).
- Brown M. R. W., Williams P.: *Annu. Rev. Microbiol.* 39, 527 (1985).
- Power E. G. M.: *Prog. Med. Chem.* 34, 149 (1995).
- Russell A. D.: *Infection Control Hospital Epidemiology* 15, 724 (1994).
- Russell A. D., Russell N. J.: *Symp. Soc. Gen. Microbiol.* 53, 327 (1995).
- European Commission, Scientific Committee on Emerging and Newly Identified Health Risks (SCENIHR), *Assessment of the Antibiotic Resistance Effects of Biocides* (2009).
- Denyer S. P., Stewart G. S. A. B.: *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 41, 261 (1998).
- Russell A. D., Hugo W. B., Ayliffe G. A. J.: *Bacterial sensitivity and resistance*, v: *Principles and practice of disinfection, preservation and sterilization*. 3. vyd. Blackwell Science, Oxford 1999.
- International Scientific Forum on Home Hygiene (IFH), *Microbial resistance and biocides: IFH review september* (2000).
- Russell A. D.: *Lancet* 3, 794 (2003).
- Olejníková P., Kurucová M., Švorc L., Marchalín Š.: *Can. J. Microbiol.* 59, 126 (2012).

H. Žsziová, A. Baková, and L. Birošová (Department of Nutrition and Food Quality Assessment, Institute of Food Science and Nutrition, Faculty of Chemical and Food Technology, Slovak University of Technology, Bratislava): **Association between Effect of Biocides in Subinhibitory Concentrations and Antibiotic Resistance in *Enterococcus faecalis***

Biocides are very effective against huge spectrum of microorganisms and are used in wide range. Recent research pointed out on fact that there could be connection between use of biocides and development of antibiotic resistance. This paper assesses long-term effect of common biocides in subinhibitory concentrations on the development of antibiotic resistance in *Enterococcus faecalis*. We have studied effect of three common biocides – NaClO, ClO₂ and H₂O₂/Ag. Obtained data showed, that all biocides decreased susceptibility of *E. faecalis* to ampicillin. In case of H₂O₂/Ag also gentamicin resistance has developed after long-term treatment. On the other hand, this biocide has caused loss of vancomycin resistance in *E. faecalis*. This suggests very important fact; however vancomycin resistant enterococci are according to WHO classified as pathogens with high priority.