

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Petra FIČUR

OBČUTLJIVOST KLINIČNIH IZOLATOV
***Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* IN**
***Enterococcus faecium* ZA LIPOPEPTIDNI**
ANTIBIOTIK DAPTOMICIN

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2009

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Petra FIČUR

**OBČUTLJIVOST KLINIČNIH IZOLATOV *Staphylococcus aureus*,
Enterococcus faecalis IN *Enterococcus faecium* ZA LIPOPEPTIDNI
ANTIBIOTIK DAPTOMICIN**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**SUSCEPTIBILITY OF CLINICAL ISOLATES *Staphylococcus aureus*,
Enterococcus faecalis AND *Enterococcus faecium* TO A LIPOPEPTIDE
ANTIBIOTIC DAPTOMYCIN**

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2009

Diplomsko delo je bilo opravljeno v Laboratoriju za hemokulture in druge urgentne mikrobiološke preiskave (HEM) Inštituta za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete v Ljubljani.

Študijska komisija dodiplomskega študija mikrobiologije je na seji dne 04. 04. 2008 za mentorico dodiplomskega dela imenovala prof. dr. Manica Mueller-Premru, dr. med. in za recenzentko prof. dr. Eva Ružić-Sabljić, dr. med.

Mentorica: prof. dr. Manica Mueller-Premru, dr. med.

Recenzentka: prof. dr. Eva Ružić-Sabljić, dr. med.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednica: prof. dr. Darja ŽGUR-BERTOK, univ. dipl. biol.

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Članica: prof. dr. Manica MUELLER-PREMRU, dr. med.

Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo

Članica: prof. dr. Eva RUŽIĆ-SABLJIĆ, dr. med.

Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo

Datum zagovora:

Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Petra Fičur

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD Dn

DK UDK 579.24: 615.33(043)= 163.6

KG antibiotiki/daptomicin/občutljivost za antibiotike/proti meticilinu odporen
Staphylococcus aureus/MRSA/proti vankomicinu odporni enterokoki/VRE/Etest

AV FIČUR, Petra

SA MUELLER-PREMRU, Manica (mentorica)/RUŽIĆ-SABLIJĆ, Eva (recenzentka)

KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101

ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija
mikrobiologije

LI 2009

IN OBČUTLJIVOST KLINIČNIH IZOLATOV *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus*
faecalis in *Enterococcus faecium* ZA LIPOPEPTIDNI ANTIBIOTIK DAPTOMICIN

TD Diplomsko delo (univerzitetno)

OP XII, 63 str., 5 pregl., 19 sl., 56 vir.

IJ sl

JI sl/en

AI Večkratno odporne bakterije predstavljajo v zdravstvu velik problem. Med temi so pogosto omenjeni proti meticilinu odporni izolati *Staphylococcus aureus* (MRSA, iz angl. methicillin-resistant *S. aureus*) ter proti vankomicinu odporni izolati enterokokov (VRE, iz angl. vancomycin-resistant *Enterococcus* spp.). Zdravljenje okužb z njimi je velikokrat problematično, saj ostane zaradi odpornosti teh bakterij proti številnim antibiotikom na voljo le malo učinkovitih. Iz navedenega razloga je odkrivanje novih protimikrobnih sredstev izrednega pomena. Daptomicin je novejši antibiotik, ki se v Sloveniji uporablja kot rezervni antibiotik. Deluje na po Gramu pozitivne bakterije, vključno z večkratno odpornimi. V raziskavi smo želeli ugotoviti, kakšna je občutljivost stafilokokov in enterokokov za daptomicin. V raziskavo smo vključili 200 bakterijskih izolatov, katerih občutljivost za daptomicin smo testirali z Etesti. Vsi testirani izolati stafilokokov in enterokokov so bili, glede na sprejete kriterije za opredeljevanje občutljivosti, občutljivi za daptomicin. Testirani stafilokoki so imeli minimalne inhibitorne koncentracije (MIK) ≤ 1 $\mu\text{g/ml}$, enterokoki pa ≤ 3 $\mu\text{g/ml}$. Vrednosti MIK₅₀ in MIK₉₀ sta bili pri za meticilin občutljivih *S. aureus* (MSSA, iz angl. methicillin-sensitive *S. aureus*) 0,25 $\mu\text{g/ml}$ in 0,5 $\mu\text{g/ml}$, pri MRSA pa 0,5 $\mu\text{g/ml}$ in 0,75 $\mu\text{g/ml}$. Bakterije vrste *Enterococcus faecalis* so imele nekoliko nižje vrednosti MIK kot bakterije vrste *Enterococcus faecium*. Vrednosti MIK₅₀ in MIK₉₀ sta bili pri *E. faecalis* 1,0 $\mu\text{g/ml}$ oziroma 1,5 $\mu\text{g/ml}$, pri *E. faecium* pa 2,0 $\mu\text{g/ml}$ oziroma 3,0 $\mu\text{g/ml}$. Vsi testirani izolati VRE so bili vrste *E. faecium*, vrednosti MIK₅₀ in MIK₉₀ pa sta sovpadali z vrednostma pri za vankomicin občutljivih *E. faecium*. Na podlagi rezultatov smo zaključili, da je daptomicin primeren za zdravljenje stafilokoknih okužb, vključno z MRSA, ter enterokoknih okužb, vključno z VRE.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dn

DC UDC 579.24: 615.33(043)= 163.6

CX antibiotics/daptomycin/antimicrobial susceptibility/methicillin-resistant
Staphylococcus aureus/MRSA/vancomycin-resistant enterococci/VRE/Etest

AU FIČUR, Petra

AA MUELLER-PREMRU, Manica (supervisor)/RUŽIĆ-SABLJIĆ, Eva (reviewer)

PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101

PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Interdepartmental Programme in Microbiology

PY 2009

TY SUSCEPTIBILITY OF CLINICAL ISOLATES *Staphylococcus aureus*,
Enterococcus faecalis AND *Enterococcus faecium* TO A LIPOPEPTIDE
ANTIBIOTIC DAPTOMYCIN

DT Graduation Thesis (University Studies)

NO XII, 63 p., 5 tab., 19 fig., 56 ref.

LA sl

AL sl/en

AB Health service is frequently facing a rather big problem – the multidrug-resistant bacteria, among them are also the methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) as well as the vancomycin-resistant enterococci (VRE). Hence the rather problematic treatment of these infections, for the resistance of the previously mentioned bacteria to a number of antibiotics leaves just a handful of the antibiotics able to face the infection. Therefore, discovering ever new antimicrobial agents is of utmost importance. Daptomycin is a relatively new antibiotic used in Slovenia as a reserve antibiotic. It has bactericidal activity against a wide spectrum of Gram-positive bacteria, including multi-resistant strains. The purpose of the following research has been to evaluate the *in vitro* activity of daptomycin against staphylococci and enterococci. The research demanded 200 clinical isolates that have been tested for daptomycin susceptibility using Etests. According to the preestablished criteria of susceptibility all the tested isolates have resulted susceptible to daptomycin. The tested staphylococci showed minimum inhibitory concentrations (MIC) $\leq 1 \mu\text{g/ml}$, the enterococci $\leq 3 \mu\text{g/ml}$. The values of MIC₅₀ and MIC₉₀ of methicillin-sensitive *S. aureus* (MSSA) were 0,25 $\mu\text{g/ml}$ and 0,5 $\mu\text{g/ml}$, those of MRSA 0,5 $\mu\text{g/ml}$ and 0,75 $\mu\text{g/ml}$. The bacteria *Enterococcus faecalis* had a bit lower MIC values compared to the MIC values of the bacteria *Enterococcus faecium*. The values were as follows: the *E. faecalis* MIC₅₀ and MIC₉₀ were 1,0 $\mu\text{g/ml}$ and 1,5 $\mu\text{g/ml}$ respectively, the *E. faecium* 2,0 $\mu\text{g/ml}$ and 3,0 $\mu\text{g/ml}$ respectively. All the tested VRE isolates have been of the same species – the *E. faecium*, the MIC₅₀ and MIC₉₀ values of which were in line with the vancomycin susceptible *E. faecium*. Based on research results, daptomycin appears to be an excellent therapeutic option for serious infection caused by staphylococci, including MRSA and enterococci, including VRE.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO PREGLEDNIC	VIII
KAZALO SLIK	IX
SEZNAM OKRAJŠAV	XI
1 UVOD	1
1.1 NAMEN DELA	2
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 ANTIBIOTIKI	3
2.2 LIPOPEPTIDNI ANTIBIOTIK DAPTOMICIN	3
2.2.1 Razvoj novih antibiotikov	4
2.2.1.1. Zgodovina daptomicina	4
2.2.2 Kemijske lastnosti	5
2.2.3 Mehanizem delovanja	6
2.2.3.1 Baktericidna aktivnost daptomicina na celice v stacionarni fazi	10
2.2.4 Farmakologija	11
2.3 BAKTERIJE, NA KATERE DELUJE DAPTOMICIN	12
2.3.1 Stafilokoki	13
2.3.1.1. <i>Staphylococcus aureus</i>	13
2.3.2 Enterokoki	14
2.3.2.1 <i>Enterococcus faecalis</i> in <i>Enterococcus faecium</i>	15
2.4 SKUPINE ANTIBIOTIKOV, KI JIH TESTIRAMO PRI STAFILOKOKIH IN ENTEROKOKIH	16
2.5 ODPORNOST BAKTERIJ PROTI ANTIBIOTIKOM	16
2.5.1. Stafilokoki	17

2.5.2 Enterokoki	20
2.6 OBČUTLJIVOST BAKTERIJ ZA DAPTOMICIN	22
2.7 UČINKOVITOST DAPTOMICINA V PRIMERJAVI Z DRUGIMI ANTIBIOTIKI	25
2.7.1 Daptomicin v primerjavi s teikoplaninom in vankomicinom	25
2.7.2 Daptomicin v primerjavi z linezolidom	25
2.8 METODE ZA IDENTIFIKACIJO STAFILOKOKOV IN ENTEROKOKOV	26
2.8.1 Klasične metode za identifikacijo	26
2.8.2 Kristal GP	26
2.8.3 Vitek 2 GP	27
2.9 METODE ZA DOLOČANJE OBČUTLJIVOSTI STAFILOKOKOV IN ENTEROKOKOV ZA ANTIBOTIKE	27
2.9.1 Difuzijska metoda z diski	27
2.9.2 Kvantitativno določanje občutljivosti z Etestom	28
2.9.3 Vitek AST	29
2.9.4 Vankomicin presejalna plošča	29
2.9.5 Oksacilin presejalna plošča	29
2.10 DOLOČANJE OBČUTLJIVOSTI ZA DAPTOMICIN	30
2.10.1 Mikrodilucija v bujonu	31
2.10.2 Etest	31
2.10.3 Avtomatski in polavtomatski sistemi	32
2.10.4 Metode, ki niso priporočene za testiranje občutljivosti	32
3 MATERIALI IN METODE	34
3.1 PRIPRAVA UPORABLJENIH GOJIŠČ	34
3.1.1. Krvni agar (KA)	34
3.1.2 Mueller-Hinton agar (MHA)	34
3.2 BAKTERIJSKI IZOLATI	35
3.3 KLASIČNA IDENTIFIKACIJA BAKTERIJ	35
3.3.1 Rast bakterij na krvnem agarju	36
3.3.2 Barvanje po Gramu	36
3.3.3 Dokaz katalaze	37
3.3.4 PYR (L-pirolidonil-β-naftilamid) test	37

3.4 KRISTAL GP	37
3.5 VITEK GP	38
3.6 DOLOČANJE OBČUTLJIVOSTI BAKTERIJ ZA ANTIBIOTIKE	38
3.6.1 Difuzijska metoda z diski	38
3.6.1.1 Priprava inokuluma ter polaganje standardiziranih diskov antibiotikov	38
3.6.1.2 Inkubacija	39
3.6.1.3 Odčitavanje rezultatov	39
3.6.1.4 Uporabljeni antibiotiki in njihove koncentracije v diskih	40
3.6.2 Vankomicin presejalna plošča	40
3.6.3 Oksacilin presejalna plošča	41
3.6.4 VITEK AST	41
3.6.5 Kvantitativno določanje občutljivosti z Etestom	41
3.6.5.1 Določanje občutljivosti kliničnih izolatov za antibiotik daptomicin	41
3.6.5.2 Izvedba Etesta	42
3.6.5.2 Interpretacija rezultatov	42
3.6.5.4 Kontrola metode Etesta	43
3.6.5.5 Analiza podatkov	44
4 REZULTATI	45
4.1 STAFILOKOKI	46
4.2 ENTEROKOKI	48
5 RAZPRAVA IN SKLEPI	51
5.1 RAZPRAVA	51
5.2 SKLEPI	53
6 POVZETEK	54
7 VIRI	56

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Antibiotiki, ki jih običajno testiramo pri stafilokokih in enterokokih (v μg , le pri penicilinu v mednarodnih enotah – IU; iz angl.: international unit)	40
Preglednica 2: Meje vrednosti za testna organizma <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213 in <i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212 ter obenem vse stafilokoke ter enterokoke	43
Preglednica 3: Razpon dobljenih vrednosti minimalnih inhibitornih koncentracij daptomicina (MIK_{DPC} ; v $\mu\text{g/ml}$) ter MIK_{50} in MIK_{90} pri izolatih posameznih vrst	46
Preglednica 4: Rezultati testiranja občutljivosti (MIK_{DPC} v $\mu\text{g/ml}$) 100 bakterijskih izolatov vrste <i>Staphylococcus aureus</i> za antibiotik daptomicin	47
Preglednica 5: Rezultati testiranja občutljivosti (MIK_{DPC} v $\mu\text{g/ml}$) 100 bakterijskih izolatov enterokokov za daptomicin	48

KAZALO SLIK

Slika 1: Prikaz mesta delovanja daptomicina pri po Gramu pozitivnih bakterijah (Ihan, 2002: 7)	4
Slika 2: Kemijska struktura daptomicina (Steenbergen, 2005: 284)	6
Slika 3: Mehanizem delovanja daptomicina (Steenbergen in sod., 2005: 284)	8
Slika 4: Natančnejši mehanizem delovanja daptomicina (Straus in Hancock, 2006: 1220)	9
Slika 5: Od koncentracije odvisno delovanje daptomicina na kulturo <i>Staphylococcus aureus</i> v stacionarni fazi rasti (Mascio in sod., 2007: 4257)	10
Slika 6: Vpliv različnih antibiotikov (100 µg/ml) na kulturo <i>Staphylococcus aureus</i> v stacionarni fazi rasti (Mascio in sod., 2007: 4257)	11
Slika 7: Prikaz deležev proti meticilinu odpornih <i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA; iz angl.: methicillin-resistant <i>S. aureus</i>), izoliranih iz hemokultur in likvorja, v posameznih državah v letu 2007 (EARSS, 2008: 50)	18
Slika 8: Shematski prikaz sinteze peptidoglikana pri divjem tipu <i>Staphylococcus aureus</i> (zgoraj) in pri proti meticilinu odpornem <i>S. aureus</i> (MRSA; iz angl.: methicillin-resistant <i>S. aureus</i>) (spodaj) (Moreillon in sod., 2000: 2328)	19
Slika 9: Prikaz deležev izolatov proti vankomicinu odpornih <i>Enterococcus faecium</i> , izoliranih iz hemokultur in likvorja, v posameznih državah v letu 2007 (EARSS, 2008: 56)	21
Slika 10: Izguba vodikove vezi med vankomicinom in D-Ala-D-laktatom (Walsh, 2003: 151)	22
Slika 11: Etest z daptomicinom: umerjena lestvica koncentracij antibiotika (µg/ml) (AB Biodisk, 2007)	32

Slika 12: Rast bakterij na krvnem agarju – levo: <i>Staphylococcus aureus</i> , desno: <i>Enterococcus faecalis</i>	36
Slika 13: Prikaz merjenja premera zaviralne cone ob disku z antibiotikom (Mueller-Premru in Seme, 2003; 102)	39
Slika 14: Merilnik gostote bakterijske suspenzije	42
Slika 15: Testiranje občutljivosti kontrolnih sevov za antibiotik daptomicin – levo: <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213, desno: <i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	44
Slika 16: Odčitavanje minimalne inhibitorne koncentracije (MIK) daptomicina	45
Slika 17: Število za meticilin občutljivih <i>Staphylococcus aureus</i> (MSSA; iz angl: methicillin-sensitive <i>S. aureus</i>) in proti meticilinu odpornih <i>S. aureus</i> (MRSA; iz angl: methicillin-resistant <i>S. aureus</i>) z določeno vrednostjo minimalne inhibitorne koncentracije (MIK; v µg/ml) daptomicina	47
Slika 18: Število bakterij <i>Enterococcus faecalis</i> in <i>Enterococcus faecium</i> z določeno vrednostjo minimalne inhibitorne koncentracije (MIK; v µg/ml) daptomicina	49
Slika 19: Primerjava deležev izolatov <i>Enterococcus faecium</i> (za vankomicin občutljivih in proti vankomicinu odpornih – VRE; iz angl: vancomycin-resistant <i>Enterococcus</i> spp.) pri posameznih vrednostih minimalne inhibitorne koncentracije (MIK; v µg/ml) daptomicina	50

SEZNAM OKRAJŠAV

Ace	angl. adhesin of collagen from <i>Enterococcus faecalis</i>
AS	angl. aggregation substance
ATCC	angl. American Type Culture Collection
BHI	angl. brain heart infusion agar
CFU	angl. colony forming units
CLSI	angl. Clinical and Laboratory Standards Institute
CNS	koagulaza negativni stafilokoki (angl. coagulase-negative <i>Staphylococcus</i> spp.)
EARSS	angl. European Antimicrobial Resistance Surveillance System
EMA	angl. European Medicines Agency
FDA	angl. Food and Drug Administration
GISA	za glikopeptidno intermediarno občutljivi <i>Staphylococcus aureus</i> (angl. glycopeptide-intermediate <i>S. aureus</i>)
KA	krvni agar
MHA	Mueller-Hinton agar
I	intermediaren
IU	mednarodna enota (angl. international unit)
IUPAC	angl. International Union of Pure and Applied Chemistry
MIK	minimalna inhibitorna koncentracija
MIK _{DPC}	minimalna inhibitorna koncentracija daptomicina
MIK ₅₀	minimalna inhibitorna koncentracija, ki inhibira rast 50 % testiranih izolatov
MIK ₉₀	minimalna inhibitorna koncentracija, ki inhibira rast 90 % testiranih izolatov
MRSA	proti meticilinu odporni <i>S. aureus</i> (angl. methicillin-resistant <i>S. aureus</i>)
MSSA	za meticilin občutljivi <i>S. aureus</i> (angl. methicillin-sensitive <i>S. aureus</i>)
NS	neobčutljiv (angl. non-susceptible)
PYR	pirolidonil- β -naftilamid (angl. pyrrolidonyl- β -naphthylamide)
PBP	penicilin vezoči proteini (angl. penicillin-binding proteins)
PRSP	proti penicilinu odporni <i>Streptococcus pneumoniae</i> (angl. penicillin-resistant <i>S. pneumoniae</i>)
R	odporen (angl. resistant)
S	občutljiv (angl. susceptible)

- tRNK transportna ribonukleinska kislina
- UV ultravijoličen
- VISA za vankomicin intermediarno občutljivi *S. aureus* (angl. vancomycin-intermediate *S. aureus*)
- VRSA proti vankomicinu odporni *S. aureus* (angl. vancomycin-resistant *S. aureus*)
- VRE proti vankomicinu odporni enterokoki (angl. vancomycin-resistant *Enterococcus* spp.)

1 UVOD

Doba antibiotikov se je pričela v tridesetih letih prejšnjega stoletja, čeprav so že več stoletij pred tem ljudski zdravilci za zdravljenje okuženih ran uporabljali plesni, za katere danes vemo, da so najpogostejši izdelovalci antimikrobnih snovi. Kot prvi pravi antibiotik je v zgodovino zapisan Flemingov penicilin. V sedemdesetih letih so nato odkrili in za uporabo pripravili na stotine antibiotikov, mnoge med njimi so preoblikovali v še bolj učinkovite pilsintetične in sintetične različice (kemoterapevtiki).

Kljub vsemu koristnemu pa v zadnjem času spoznavamo, da so antibiotiki prinesli tudi marsikaj negativnega. Zaradi vse večje porabe antibiotikov se proti številnim do sedaj učinkovitim razvija odpornost in posledično postaja izbor ustreznih antibiotikov za zdravljenje bakterijskih okužb vedno ožji. Iz navedenega razloga je potreba po razvoju povsem novih oblik protimikrobnih sredstev zelo velika. Pojavi večkratne odpornosti, porušenje ekološkega ravnotežja v naravi in v telesu so mnogo pogostejši, posledice pa mnogo bolj dramatične, kot smo si lahko kdajkoli predstavljali (Kotnik, 2001).

Daptomicin, eden od novejših antibiotikov, je ciklični lipopeptidni antibiotik naravnega izvora, ki učinkuje na večino klinično pomembnih po Gramu pozitivnih bakterij, vključno z zelo odpornimi patogeni, kot so proti meticilinu odporni *Staphylococcus aureus* (MRSA, iz angl.: methicillin-resistant *S. aureus*), za vankomicin intermediarno občutljivi *S. aureus* (VISA, iz angl.: vancomycin-intermediate *S. aureus*), proti vankomicinu odporni enterokoki (VRE, iz angl.: vancomycin-resistant *Enterococcus* spp.), koagulaza negativni stafilokoki (CNS, iz angl.: coagulase-negative *Staphylococcus* spp.) in proti penicilinu odporni *Streptococcus pneumoniae* (PRSP, iz angl.: penicillin-resistant *S. pneumoniae*). Odobren je za zdravljenje zapletenih okužb kože in mehkih tkiv ter za zdravljenje bakteriemijske in endokarditisa (Tally in DeBruin, 2000).

1.1 NAMEN DELA

V diplomskem delu smo preverjali učinkovitost daptomicina na kliničnih izolatih.

Namen naloge je bil ugotoviti občutljivost sevov iz kliničnih vzorcev za antibiotik daptomicin. Testirali smo 100 izolatov *S. aureus* in 100 izolatov enterokokov. Med omenjenimi pa tako občutljive izolate, kot tudi izolate, odporne proti številnim antibiotikom.

Ker se pri nas daptomicin uporablja še zelo poredko, smo domnevali, da pri testiranih izolatih ne bomo opazili pojava odpornosti.

Pričakovali smo tudi, da ne bo statistično pomembnih razlik v minimalnih inhibitornih koncentracijah (MIK) za daptomicin med občutljivimi sevi *S. aureus* in sevi MRSA, med *Enterococcus faecalis* in *Enterococcus faecium* in med za vankomicin občutljivimi enterokoki in VRE.

V nalogi smo najprej predstavili antibiotik daptomicin ter bakterije, na katere deluje in katerih občutljivost smo v diplomski nalogi tudi testirali, poleg tega pa tudi identifikacijo teh bakterij in določanje občutljivosti za antibiotike s klasičnimi metodami.

2 PREGLED OBJAV

2.1 ANTIBIOTIKI

Antibiotiki so snovi, ki ovirajo razmnoževanje mikroorganizmov oziroma preprečujejo njihovo rast. Navadno so proizvod živih celic – gliv in bakterij, lahko pa so, zlasti v novejših časih, izdelani s sintezo ali kemijsko modifikacijo naravnega antibiotika - slednje imenujemo kemoterapevtiki.

Antibiotike razdelimo v skupine glede na njihov mehanizem delovanja in kemično zgradbo. Po učinkih na bakterije so lahko baktericidni – poškodujejo mikroorganizem tako, da se ni več zmožen razmnoževati, ali bakteriostatični – razmnoževanje samo zavrejo. Glede na mehanizem delovanja uvrstimo antibiotike v skupine: antibiotiki, ki preprečujejo sintezo celične stene, antibiotiki, ki delujejo na sintezo znotrajceličnih beljakovin, antibiotiki, ki vplivajo na sintezo jedrnih kislin in antibiotiki, ki ovirajo dejavnosti, povezane s citoplazemsko membrano.

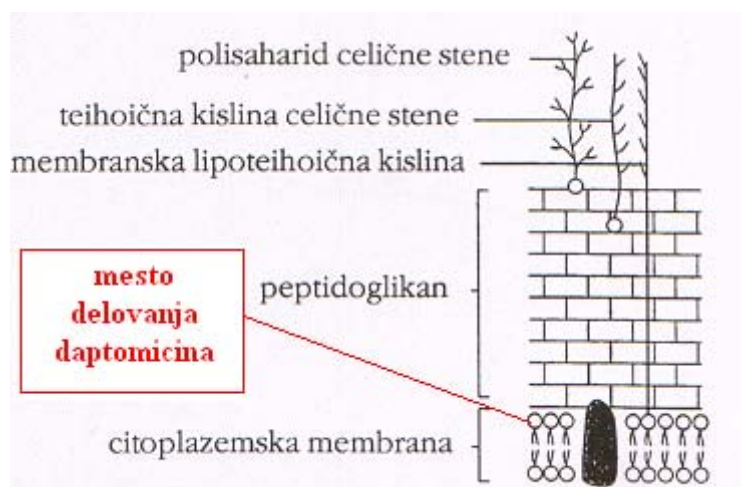
Na uporabnost antibiotikov pomembno vplivajo njihove lastnosti. Zaželenosti antibiotikov so širok spekter delovanja, dolga razpolovna doba v plazmi, dobro prodiranje v medceličnino, celice in likvor, možnost peroralnega jemanja, odsotnost stranskih učinkov ter druge (Kotnik, 2002).

2.2 LIPOPEPTIDNI ANTIBIOTIK DAPTOMICIN

Daptomicin je nov baktericiden antibiotik, ki ga proizvaja bakterija *Streptomyces roseosporus* (Tally in DeBruin, 2000). Je ciklični lipopeptid, ki deluje na membrano po Gramu pozitivnih bakterij – stafilokokov, enterokokov in streptokokov (slika 1).

Primeren je za zdravljenje zapletenih okužb kože in podkožja ter bakteriemije in endokarditisa, predvsem tistih, ki jih povzročajo večkratno odporne bakterije iz teh skupin.

Pojavljajo se tudi že odporni sevi, vendar so zaenkrat še relativno redki (Enoch in sod., 2007).



Slika 1: Prikaz mesta delovanja daptomicina pri po Gramu pozitivnih bakterijah (Ihan, 2002: 7)

2.2.1 Razvoj novih antibiotikov

Razvijanje novih antibiotičnih substanc je izrednega pomena, saj se število okužb z bakterijami, odpornimi proti številnim antibiotikom, zelo hitro povečuje. Med večkratno odpornimi bakterijami so pomembni *S. aureus*, odporen proti meticilinu, drugim betalaktamskim antibiotikom, makrolidom, linkozamidom, kinolonom in aminoglikozidom, enterokoki, ki so razen proti penicilinom in aminoglikozidom odporni še proti vankomicinu in teikoplaninu ter mnogi drugi (Mueller-Premru, 2001). Antibiotik daptomicin deluje prav proti bakterijam iz omenjenih skupin, zaenkrat pa se pri nas uporablja le kot rezervni antibiotik.

2.2.1.1. Zgodovina daptomicina

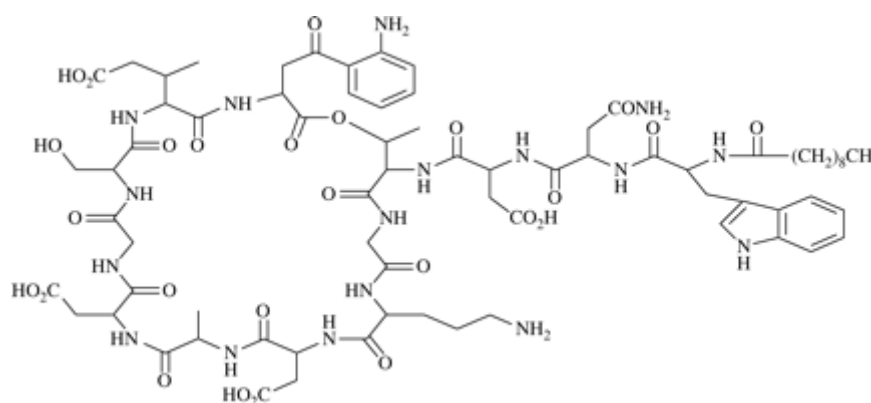
Daptomicin je fermentacijski produkt bakterije *S. roseosporus*, ki so ga odkrili v zgodnjih 80-ih letih prejšnjega stoletja v družbi Eli Lilly. Razvili so ga kot LY 146032 za intravensko zdravljenje resnih okužb, povzročenih s po Gramu pozitivnimi bakterijami (Tally in DeBruin, 2000). Z nadaljnjimi preiskavami so nato ugotovili, da visoki odmerki

antibiotika (4 mg/kg dvakrat dnevno) povzročajo stranske učinke na skeletnih mišicah, zato je njihovo zanimanje za daptomicin upadlo (Enoch in sod., 2007).

Kljub temu je antibiotik vzbudil zanimanje v podjetju Cubist Pharmaceuticals, ki je leta 1997 pridobilo licenco za nadaljnji razvoj daptomicina za zdravljenje resnih okužb, ki jih povzročajo po Gramu pozitivne bakterije pri hospitaliziranih bolnikih. Zvezna agencija za prehrano in zdravila (FDA, iz angl.: Food and Drug Administration) je daptomicin odobrila septembra 2003, januarja 2006 pa ga je za zdravljenje zapletenih okužb kože in mehkih tkiv, povzročenih s po Gramu pozitivnimi bakterijami, odobrila še Evropska agencija za zdravila (EMA, iz angl.: European Medicines Agency) ter predpisala odmere 4 mg/kg dnevno. Marca 2006 je FDA antibiotik odobrila še za zdravljenje bakteriemije in endokarditisa (okužba zaklopk) desne strani srca, ki ga povzroča bakterija *S. aureus*, in sicer odmere 6 mg/kg enkrat dnevno (Enoch in sod., 2007; Sader in sod., 2007). Imetnik dovoljenja za promet je družba Novartis Europharm Limited. Družba, ki izdeluje zdravilo Cubicin (zdravilna učinkovina zdravila Cubicin je daptomicin), izvaja nadaljnje študije, s katerimi želi raziskati ali zdravilo vpliva na mišice ter preučiti varnost in učinkovitost pri starejših ter pri bolnikih z ledvičnimi obolenji (EMA, 2007).

2.2.2 Kemijske lastnosti

Kemijsko ime (IUPAC, iz angl.: international union of pure and applied chemistry) daptomicina je *N*-dekanoil-L-triptofil-D-asparaginil-L-aspartil-L-treonilglicil-L-ornil-L-aspartil-D-alanil-L-aspartilglicil-D-seril-*treo*-3-metil-L-glutamil-3-antranoil-L-alanin ϵ_1 -lakton, molekulska formula pa je $C_{72}H_{101}N_{17}O_{26}$. Je ciklični lipopeptid, sestavljen iz 13 aminokislin in dekanoilne stranske verige (Enoch in sod., 2007). Njegova molekulska masa znaša 1620,67 g/mol. Kemijska struktura daptomicina je prikazana na sliki 2.



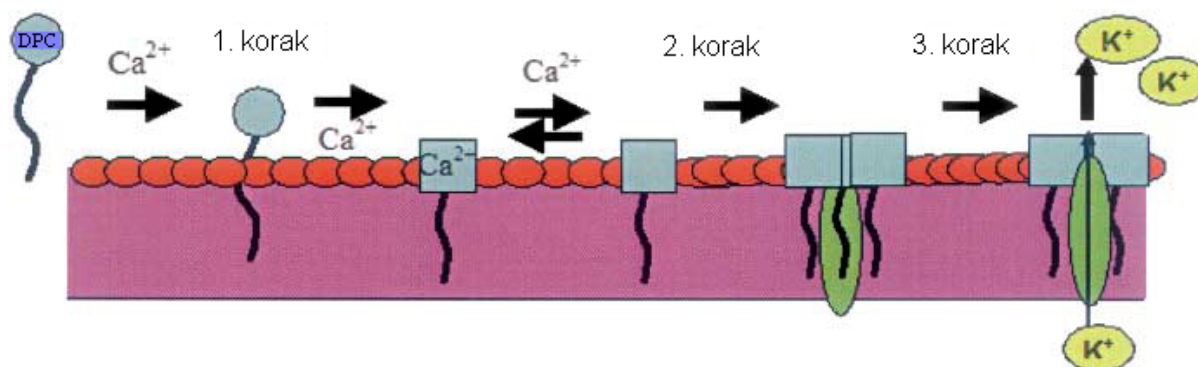
Slika 2: Kemijska struktura daptomicina (Steenbergen, 2005: 284)

2.2.3 Mehanizem delovanja

Mehanizem delovanja daptomicina še ni natančno poznan. Znanstveniki si glede mehanizma delovanja sprva niso bili enotni. Ena od postavljenih hipotez, ki so jo pozneje ovrgli, je bila, da je baktericidna aktivnost daptomicina posledica inhibicije biosinteze lipoteihoične kisline (Laganas in sod., 2003; Silverman in sod., 2003). Drugi predpostavljen mehanizem delovanja daptomicina je bil razpršitev bakterijskega membranskega potenciala in posledično prekinitev različnih celičnih funkcij. Baktericidno delovanje, kot posledica prekinitve membranskega potenciala, je mehanizem delovanja številnih antimikrobnih peptidov, zato so Silverman in sod. (2003) poskušali natančneje razvozlati vlogo bakterijskega membranskega potenciala pri delovanju daptomicina. V svoji študiji so dokazali pomembno povezavo med baktericidno aktivnostjo daptomicina in membransko depolarizacijo. Membransko depolarizacijo, ki je posledica prehajanja ionov preko citoplazemske membrane, so merili fluorimetrično in s pomočjo pretočne citometrije. Z obema metodama so opazili, da se je v 30 minutah po dodatku daptomicina za > 99 % zmanjšala celična viabilnost, membranski potencial pa za > 90 %. Proces sta potekala istočasno. Zaradi relativno počasnega upada membranskega potenciala (v roku 30 do 60 minut) sklepajo na povsem nov mehanizem delovanja antibiotika. Nizin, na primer, peptid, ki tvori pore, prekine membranski potencial v manj kot 5 minutah. Poleg tega nekateri antimikrobni peptidi povzročijo hitro depolarizacijo citoplazemske membrane, celična smrt pa nastopi šele po eni do dveh urah. V tem primeru najverjetneje depolarizacija membrane ni mehanizem delovanja antibiotika, temveč mu le olajša vstop v

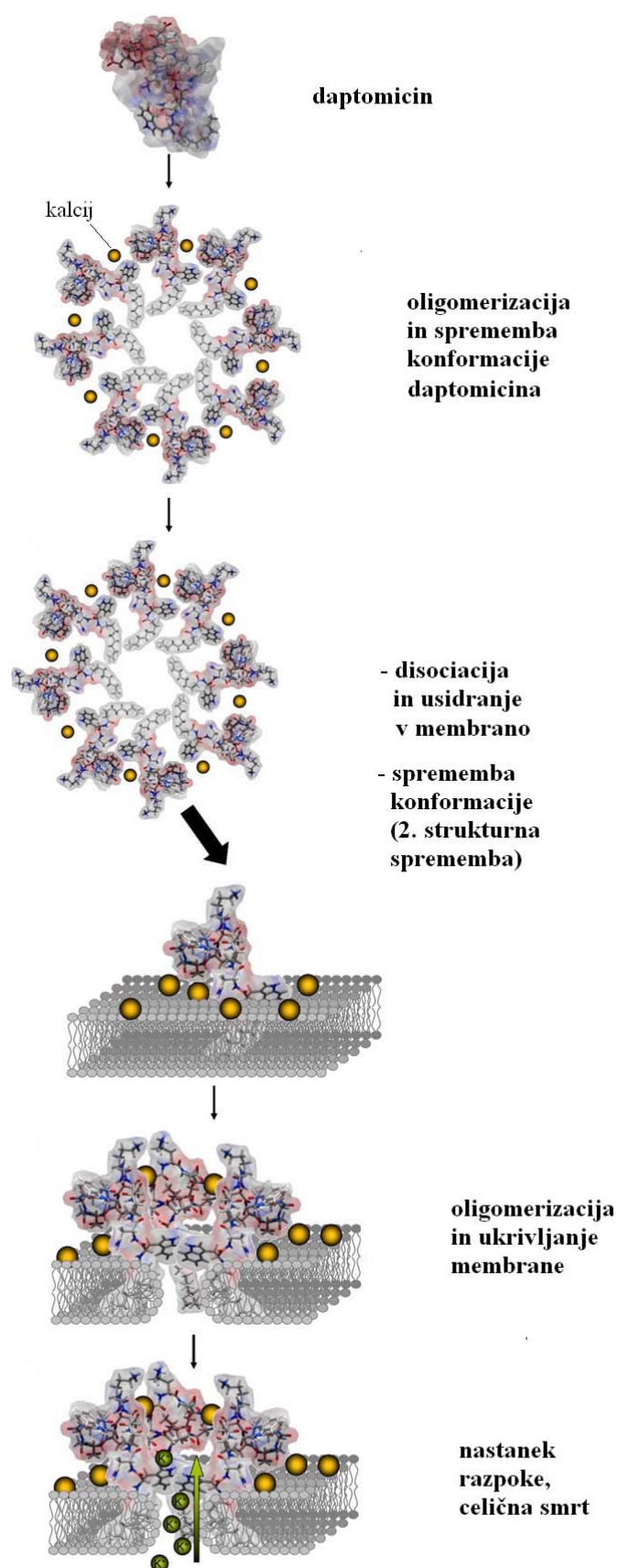
bakterijo, kjer nato učinkuje. Pri daptomicinu pa ni opaziti časovnega odstopanja med depolarizacijo in celično smrtjo, na podlagi česar lahko smatramo, da je depolarizacija primarni mehanizem njegovega delovanja. Po tem spoznanju so Silverman in sod. (2003) želeli natančneje opredeliti mehanizem poteka celične depolarizacije. Glede na to, da je za vzdrževanje vitalnih procesov mikroorganizmov ključnega pomena K^+ gradient, so med izpostavitvijo *S. aureus* daptomicinu merili prehajanje le-tega. Prišli so do zaključka, da je po dodatku daptomicina prišlo do od kalcija odvisne sprostitve K^+ , ki je sovpadala s celično smrtjo. S tem so potrdili tudi predhodne ugotovitve o fiziološki koncentraciji kalcija, ki je potrebna za delovanje daptomicina. Interpretacije poskusov so lahko različne. K^+ gradient med izpostavitvijo daptomicinu je lahko vzrok za depolarizacijo membrane, lahko pa je K^+ le eden od številnih ionov, ki se sprostijo tekom procesa (Silverman in sod., 2003).

Na podlagi ugotovitev v povzeti in pa predhodnih študijah so predpostavili, da gre pri daptomicinu za večstopenjski model delovanja antibiotika (slika 3). Po dosedanjih raziskavah so torej mnenja, da se, v prvem koraku, lipofilna veriga molekule usidra v bakterijsko celično membrano. Kljub temu, da zaenkrat niso dokazali nobene specifične bakterijske komponente, ki bi bila za to odgovorna, niso izključili možnosti, da bi bil za vezavo daptomicina na membrano po Gramu pozitivnih bakterij odgovoren kakšen specifičen receptor. V drugem koraku so predpostavili pojav oligomerizacije. Ker na tej stopnji še niso izvedli natančnejših raziskav, lahko sedaj znanstveniki le predvidevajo, da pride do nastanka ionskih kanalov, večjih nespecifičnih por ali nepravilnih strukturnih agregatov, ki prekinajo integriteto membrane ter omogočijo sprostitve celičnih ionov (npr. K^+) ter posledično celično smrt (tretji korak). Nadaljnje raziskave pa bodo pokazale morebiten vpliv drugih ionov (Na^+ , H^+) in večjih molekul (ATP, proteini) pri mehanizmu delovanja daptomicina (Silverman in sod., 2003; Steenbergen in sod., 2005; Mascio in sod., 2007).



Slika 3: Mehanizem delovanja daptomicina. Hipotetični koraki: 1. korak – vezava daptomicina na citoplazemsko membrano v odvisnosti od kalcija; 2. korak – oligomerizacija daptomicina ter poškodba membrane; 3. korak – sprostitvev znotrajceličnih ionov in celična smrt (Steenbergen in sod., 2005: 284)

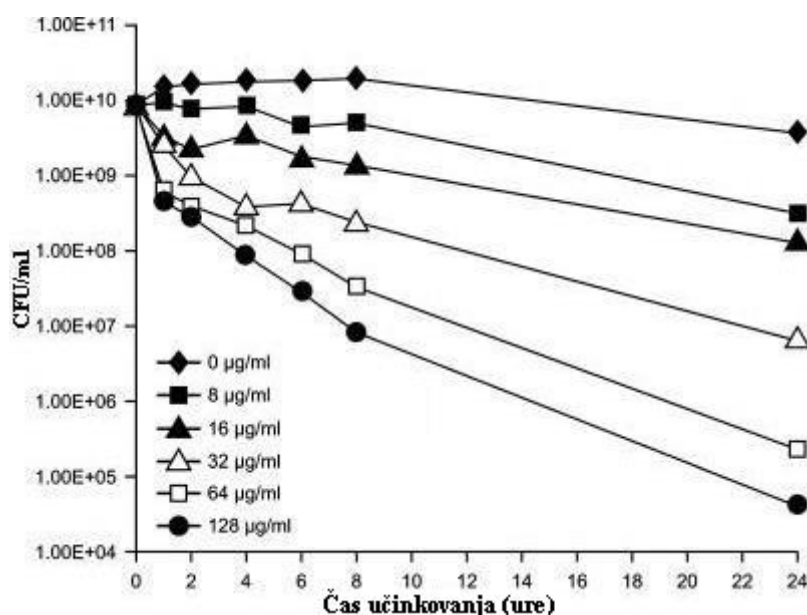
Raziskave o interakciji med daptomicinom in dvovalentnimi kationi ter modeli membran pa so prinesle nova, dodatna spoznanja. Jung in sod. (2004) so objavili nekoliko spremenjen oziroma dopolnjen mehanizem delovanja daptomicina, čeprav so tudi glede tega nesoglasja. V prvem koraku naj bi daptomicin v prisotnosti Ca^{2+} , ki je z daptomicinom v molarnem razmerju vsaj 1:1, agregiral. Prisotnost Ca^{2+} naj bi povzročila konformacijsko spremembo molekule, vendar Ball in sod. (2004), ki so izvajali podobne raziskave pod drugačnimi pogoji, tega niso potrdili (Jung in sod., 2004; Ball in sod., 2004). Kljub temu pa vsi potrjujejo nastanek agregata v obliki micela, ki pa pred interakcijo daptomicina z bakterijsko membrano disociira. Daptomicin se nato usidra v membrano, pri čemer se kalcij močno veže na glave fosfatidilglicerola. Po ugotovitvah Junga in sod. (2004) naj bi prišlo nato še do druge konformacijske spremembe daptomicina. Daptomicin naj bi v tem koraku povzročil ukrivljanje membrane. Možno je, da pride do oligomerizacije molekul v membrani, vendar to še ni dokazano. V zadnjem koraku se membrana pretrga, sledi pa celična smrt, ki nastopi zaradi depolarizacije ali kakšnega drugega, z membrano povezanega procesa (Jung in sod., 2004; Straus in Hancock, 2006). Dopolnjen mehanizem delovanja daptomicina prikazuje slika 4.



Slika 4: Natančnejši mehanizem delovanja daptomicina (Straus in Hancock, 2006: 1220)

2.2.3.1 Baktericidna aktivnost daptomicina na celice v stacionarni fazi

Steenberger in sod. (2005) so potrdili, da je baktericiden efekt daptomicina hiter – v manj kot eni uri antibiotik povzroči smrt več kot 99,9 % bakterijskih celic (MSSA in MRSA). S pomočjo simulacijskega modela so opazili, da ima daptomicin v prav tolikšni meri baktericiden učinek tudi v kulturi v stacionarni fazi, kjer so MRSA ali MSSA prisotni v visoki gostoti (10^9 CFU – iz angl.: colony forming units) (Steenbergen in sod., 2005). Neposredna vezava daptomicina na bakterijski dvosloj mu omogoča delovanje, neodvisno od faze rasti celice ali celične metabolne aktivnosti. Mascio in sod. (2007) so v svoji raziskavi prav tako preverjali delovanje daptomicina na celice v stacionarni fazi rasti. Opazili so, da ima daptomicin baktericidno delovanje na *S. aureus* v stacionarni fazi rasti, le da so potrebne približno 15-krat večje koncentracije antibiotika ($\sim 32 \mu\text{g/ml}$; slika 5) v primerjavi s koncentracijo, ki je potrebna za baktericiden učinek na celice v eksponentni fazi ($\sim 2 \mu\text{g/ml}$). Vzrok za to je najverjetneje razlika v fiziologiji celic.

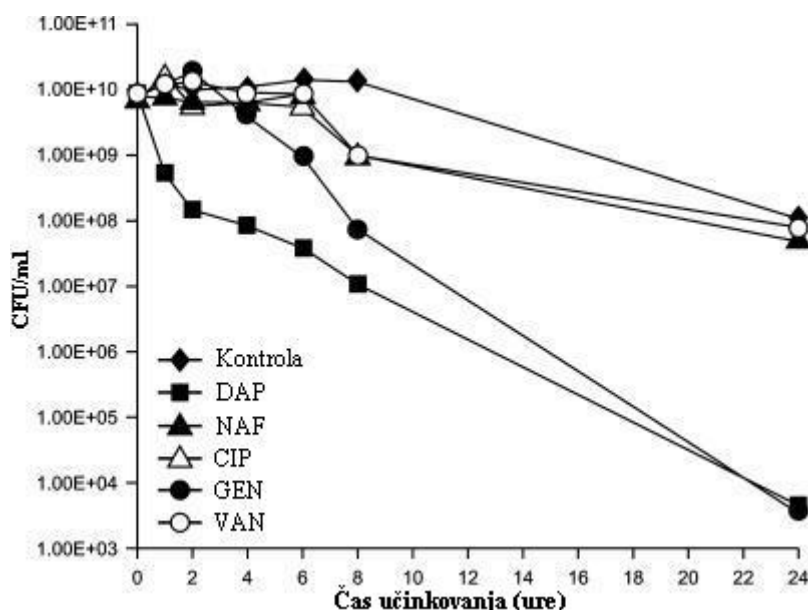


Slika 5: Od koncentracije odvisno delovanje daptomicina na kulturo *Staphylococcus aureus* v stacionarni fazi rasti (Mascio in sod., 2007: 4257)

V študiji so nato primerjali delovanje daptomicina na celice *S. aureus* v stacionarni fazi še z delovanjem drugih antibiotikov – nafcilinom, ciprofloksacinom, gentamicinom ter

vankomicinom, kar prikazuje slika 6. Pri testiranih rastnih pogojih so baktericidno aktivnost zasledili le pri gentamicinu in daptomicinu, slednji pa je bil učinkovitejši (Mascio in sod., 2007).

Dosedanja odkritja so sprožila veliko zanimanje za izvedbo dodatnih raziskav o vplivu daptomicina na bakterije v stacionarni fazi oziroma na počasi rastoče po Gramu pozitivne bakterije.



Slika 6: Vpliv različnih antibiotikov (100 µg/ml) na kulturo *Staphylococcus aureus* v stacionarni fazi rasti (Mascio in sod., 2007: 4257)

Legenda: DAP - daptomicin, NAF - nafcilin, CIP - ciprofloksacin, GEN - gentamicin, VAN - vankomicin

2.2.4 Farmakologija

Za okužbe kože ali mehkega tkiva brez bakteriemije je priporočen odmerek za odrasle 4 mg/kg, in sicer na vsakih 24 ur, od 7 do 14 dni ali dokler okužba ni ozdravljena. Za endokarditis ali za okužbe kože oziroma mehkega tkiva z bakteriemijo pa je priporočeni odmerek 6 mg/kg vsakih 24 ur (Novartis, 2006; EMEA, 2007).

Študija o potencialni toksičnosti daptomicina, ki so jo Oleson in sod. (2000) izvajali na pseih, je potrdila, da enkrat dnevni odmerek zdravila zmanjša njegov efekt na skeletne mišice. V primerjavi z večkrat dnevnim doziranjem, je najverjetneje razlog za to spoznanje, da je pri enkrat dnevnem odmerku koncentracija antibiotika v plazmi dlje časa nizka, kar pomeni, da je časa za popravilo nastalih poškodb več, posledično pa se zmanjša nevarnost nastanka nepopravljivih nepravilnosti (Oleson in sod., 2000).

Na podlagi *in vitro* ter *in vivo* analiz so ugotovili, da je daptomicin učinkovit v odvisnosti od njegove koncentracije, ima dolgo razpolovno dobo (8 ur) in podaljšan post antibiotični efekt do 6,8 ur (Safdar in sod., 2004; Steenbergen in sod., 2005).

Daptomicin se prednostno porazdeli v bogato vaskulariziranih tkivih. V manjši meri prehaja krvno-možgansko in placentarno bariero (Novartis, 2006). V eni od študij, ki so jo izvajali na zajcih z meningitisom, povzročenim s *S. pneumoniae*, so zasledili 5 % prodiranje (v primerjavi s serumom) v njihovo cerebrospinalno tekočino in tamkajšnjo učinkovitost (Cottagnound in sod., 2004).

Antibiotik se reverzibilno veže na humane plazemske proteine. Pri zdravih prostovoljcih in bolnikih, zdravljenih z daptomicinom, je vezava na proteine znašala povprečno okrog 90 % (Novartis, 2006).

Daptomicin se večinoma v nespremenjeni obliki izloča preko ledvic (Steenbergen in sod., 2005).

2.3 BAKTERIJE, NA KATERE DELUJE DAPTOMICIN

Daptomicin deluje na po Gramu pozitivne bakterije, vključno s proti meticilinu odpornimi bakterijami *S. aureus* (MRSA), za glikopeptide intermediarnimi *S. aureus* (GISA, iz angl. glycopeptide-intermediate *S. aureus*), proti vankomicinu odpornim enterokokom (VRE), koagulaza negativnim stafilokokom (CNS) in proti penicilinu odpornim *S. pneumoniae* (PRSP) (Shoemaker in sod., 2006).

2.3.1 Stafilokoki

Stafilokoki so po Gramu pozitivni koki, s premerom približno 1 μm . Urejajo se v grozdu podobne skupke in druge nepravilne gruče, na kar je prvi opozoril škotski kirurg Alexander Ogston leta 1880. So negibljivi, nesporogeni fakultativni anaerobi, ki imajo encim katalazo (Bannerman in Peacock, 2007; Seme, 2002b).

Stafilokoki so v naravi splošno razširjeni, najpogosteje pa jih najdemo na koži in sluzničnih membranah sesalcev in ptic (Bannerman in Peacock, 2007). Približno 20 do 30 % odraslih oseb je zdravih nosilcev bakterije *S. aureus*, najpogosteje se ta nahaja v nosu (Seme, 2002b).

Danes poznamo že 41 različnih vrst rodu *Staphylococcus*, med njimi pa je v klinični mikrobiologiji najpomembnejša patogena vrsta *S. aureus* (Euzéby, 2008; Seme, 2002b).

2.3.1.1. *Staphylococcus aureus*

S. aureus povzroča lokalizirane gnojne okužbe kože, kirurških ran, opeklin, vnetje očesne veznice in srednjega ušesa, od koder se lahko nato razširi v kri (bakteriemija). Posledice takega širjenja so endokarditis, osteomielitis, septični artritis, meningitis in sepsa. Možne so tudi zastrupitve s hrano, kontaminirano s sevi *S. aureus*, ki izdelujejo enterotoksine (Seme, 2002b).

S. aureus sintetizira veliko število različnih virulentnih dejavnikov. Sprva imajo glavno vlogo številni površinski proteini – adhezini, ki prepoznajo molekule matriksa gostitelja. Vežejo se lahko na kolagen, fibronektin, fibrinogen. Po vezavi se bakterija razmnožuje in ohranja na različne načine. *S. aureus* lahko tvori tudi biofilme, kar ga zaščiti pred gostiteljevimi obrambnimi mehanizmi in delovanjem antibiotikov. Pogosto se to zgodi na površini različnih vsadkov.

S. aureus pa ima še veliko drugih, zanj koristnih lastnosti, s pomočjo katerih se lahko med okužbo izogne imunskemu sistemu gostitelja. Površinski polisaharidi s protifagocitno aktivnostjo ščitijo *S. aureus* pred makrofagi, protein A veže del Fc v imunoglobulinskih molekulah in prepreči opsonizacijo, levkocidin s tvorbo por v celični membrani povzroči propad levkocitov. *S. aureus* pa sintetizira še številne druge toksine (Gordon in Lowy, 2008; Seme, 2002b).

Poglavitno vlogo v patogenezi igra regulacija ekspresije virulentnih faktorjev. Ekspresija površinskih proteinov – adhezinov poteka med logaritemsko rastjo bakterij, medtem ko npr. toksine bakterija proizvaja tekom stacionarne faze rasti. V začetni fazi, fazi infekcije, je namreč pomembna vloga adhezinov, toksini pa imajo poglavitno vlogo šele pozneje, pri širjenju bakterijske okužbe. Uravnavanje poteka preko zaznavanja gostote bakterij. V to je vpleten sistem Agr (iz angl.: accessory gene regulator). Opazili so, da so posamezni tipi *agr* povezani z določenimi kliničnimi sindromi ter da imajo mutante v genu *agr* zmanjšano virulenco.

S. aureus ima torej za povzročitev infekcije in izogib gostiteljevi obrambi na voljo številne dejavnike. Potrebno pa je vedeti, da imajo lahko različni sevi različne adhezine ter toksine in se lahko med seboj razlikujejo v sposobnosti tvorbe biofilmov in izogibanju fagocitozi (Gordon in Lowy, 2008).

2.3.2 Enterokoki

Enterokoki so katalaza negativni, po Gramu pozitivni koki, ki se v mikroskopskem preparatu pojavljajo posamično, v parih ali kratkih verižicah. So fakultativni anaerobi, ki večinoma hidrolizirajo pirolidonil- β -naftilamid (PYR) (Teixeira in sod., 2007).

Enterokoki so del normalne bakterijske flore črevesja in nožnice, okužbe pa povzročajo, ko vdrejo v primarno sterilna področja (Seme, 2002c). Med povzročitelji bolnišničnih okužb so po pogostosti na tretjem mestu, za bakterijama *Escherichia coli* in *S. aureus*. Poleg

okužb sečil in ran pa povzročajo v bolnišnici tudi okužbe v trebušni votlini, okužbe krvi, endokarditis in drugo (Ribič in sod., 2007).

Znanih je 40 vrst enterokokov, medicinsko pomembni pa sta predvsem vrsti *E. faecalis* in *E. faecium* (Euzéby, 2008; Ribič in sod., 2007).

2.3.2.1 *Enterococcus faecalis* in *Enterococcus faecium*

Med enterokoki je iz kliničnih vzorcev ljudi najpogosteje izolirana vrsta *E. faecalis*, ki predstavlja kar 80 do 90 % izolatov, sledi pa vrsta *E. faecium*, ki predstavlja 5 do 10 % izolatov.

Pri enterokokih so odkrili številne potencialne virulentne dejavnike, vendar za nobenega niso dokazali, da bi imel poglobitni prispevek k virulenci pri ljudeh (Teixeira in sod., 2007). Eden od virulentnih faktorjev je površinski glikoprotein (AS, iz angl.: aggregation substance), ki naj bi bil vpleten v specifično vezavo enterokokov na črevesni epitelij, epitelne celice ledvic, humane nevtrofilce in makrofage. Dodaten površinski protein Ace (iz angl.: adhesin of collagen from *E. faecalis*) naj bi posredoval vezavo na določene kolagene. Možno je, da ima pomembno vlogo pri patogenezi endokarditisa. Domnevni kolonizacijski faktor naj bi bil tudi površinski protein Esp (iz angl.: extracellular surface protein), za katerega domnevajo, da pri nekaterih izolatih *E. faecalis* prispeva k uspešni kolonizaciji urinarnega trakta. Možno je, da posreduje primarno vezavo enterokokov na površine in sodeluje pri tvorbi biofilma. Virulentni faktorji pa bi lahko bile tudi molekule, ki jih enterokoki izločajo. Citolizin npr. izraža hemolitično (proti humanim, konjskim in zajčjim eritrocitom) in baktericidno aktivnost proti drugim po Gramu pozitivnim bakterijam. Domnevajo, da ima pomembno vlogo pri človeških infekcijah. *E. faecalis* izloča tudi želatinazo (GelE), ki se začne izražati v pozni eksponentni fazi pri visoki celični gostoti. Hidrolizira lahko želatino, kazein, hemoglobin in druge peptide, zaradi česar predpostavljajo, da gre tudi v tem primeru za virulentni faktor enterokokov (Koch in sod., 2004).

Nekatere vrste enterokokov lahko najverjetneje preživijo tudi znotraj fagocitnih celic. S pomočjo teh lahko pridejo preko črevesne stene, nato pa naprej do oddaljenih organov. Fagocitne celice ne morejo uničiti znotrajceličnih enterokokov, posledica pa je sistemsko razširjenje le-teh (Koch in sod., 2004).

2.4 SKUPINE ANTIBIOTIKOV, KI JIH TESTIRAMO PRI STAFILOKOKIH IN ENTEROKOKIH

V kliničnih mikrobioloških laboratorijih testiramo občutljivost stafilokokov za penicilin, pri čemer rezultat velja tudi za ampicilin, amoksisilin in piperacilin, testiramo oksacilin, pri čemer rezultat velja za vse antistafilokokne peniciline, za kombinacije penicilinov z inhibitorji laktamaz beta (amoksisilin-klavulanska kislina, ampicilin-sulbaktam, piperacilin-tazobaktam), odgovarjajoče cefalosporine (cefazolin, cefuroksim, cefotaksim, ceftriakson, cefepim idr.) ter karbapeneme (imipenem, meropenem). Občutljivost stafilokokov testiramo še za gentamicin, ciprofloksacin, klindamicin, eritromicin, trimetoprim-sulfametoksazol, rifampicin, teikoplanin in vankomicin (Mueller-Premru in Seme, 2003).

Občutljivost enterokokov testiramo za penicilin, ampicilin, pri čemer rezultat velja tudi za amoksisilin, piperacilin, za kombinacije penicilinov z inhibitorji laktamaz beta in karbapeneme. Občutljivost testiramo še za vankomicin, teikoplanin, v višjih koncentracijah pa še za gentamicin ter streptomycin (Mueller-Premru in Seme, 2003).

2.5 ODPORNOST BAKTERIJ PROTI ANTIBIOTIKOM

Odpornost bakterij proti antibiotikom delimo na naravno (intrinzično) in pridobljeno. Naravno ali intrinzično odpornost najdemo pri večini predstavnikov določene vrste ali rodu in je rezultat normalnega genetskega, strukturnega in fiziološkega stanja mikroorganizma. Tako so npr. enterokoki intrinzično odporni proti aminoglikozidom in cefalosporinom (Mueller-Premru, 2001; Murray, 2000). Pridobljeno odpornost bakterij proti antibiotikom

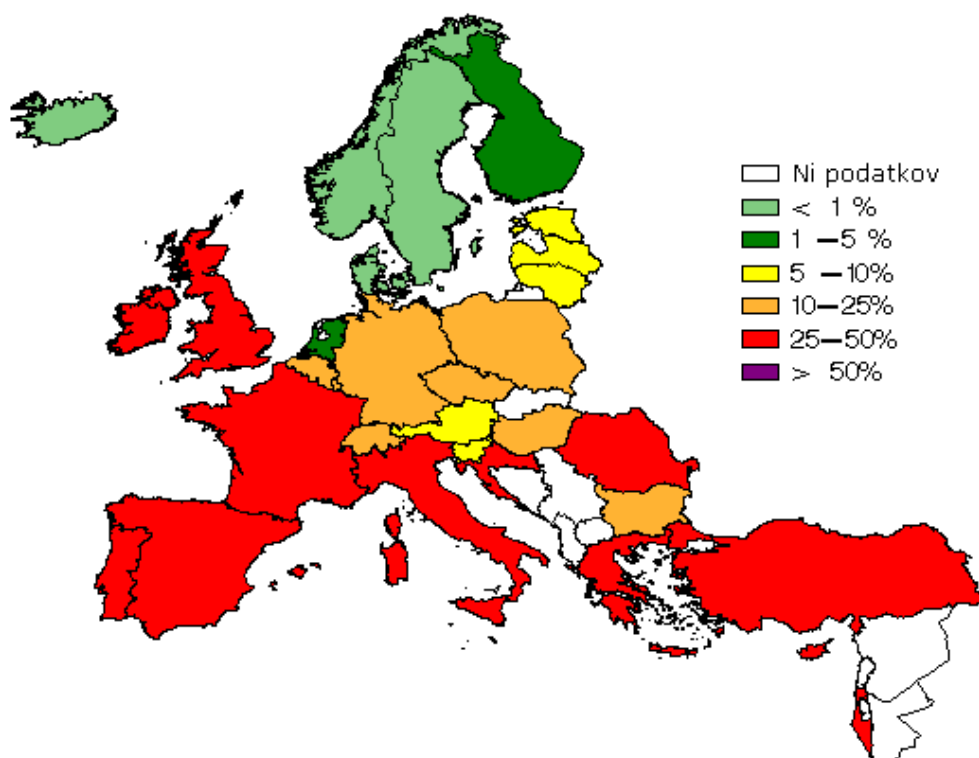
imajo, v nasprotju z naravno, samo posamezni sevi določene vrste ali rodu. Lahko je posledica mutacije kromosomskega ali plazmidnega gena posamezne bakterijske celice ali pridobljene nove genetske informacije z genskim prenosom iz druge bakterijske celice, predvsem s konjugacijo ali transformacijo (Seme, 2002a). Pridobljena odpornost proti antibiotikom temelji na petih glavnih mehanizmih. Ti so sprememba tarčnega mesta, preprečevanje dostopa antibiotika do tarče, razgradnja ali modifikacija antibiotika z encimi, aktivno črpanje antibiotika iz celice in sprememba presnovne poti, na katero deluje antibiotik (Mueller-Premru, 2001).

2.5.1. Stafilokoki

Več kot 90 % izolatov bakterije *S. aureus* izloča encim laktamazo beta. Ta hidrolizira penicilin in širokospektralne peniciline (aminopeniciline, ureidopeniciline), zapisi zanj pa so na plazmidih in se zato učinkovito prenašajo med različnimi stafilokoknimi sevi (Mueller-Premru, 2001)

Resen problem pri zdravljenju okužb s *S. aureus* predstavlja odpornost bakterij proti meticilinu (MRSA), kar v kliničnem smislu pomeni odpornost proti vsem beta-laktamskim antibiotikom (Bolnišnica Golnik, 2008). Pred leti so v Kliničnem centru v Ljubljani proti meticilinu odporni stafilokoki predstavljali približno tretjino sevov *S. aureus*, sedaj pa je število teh zaradi poostrenih ukrepov znatno upadlo (Beović in Seme, 2001).

Na sliki 7 lahko vidimo, da predstavljajo izolati MRSA v Evropi še vedno pereč problem. V letnem poročilu EARSS (iz angl.: European antimicrobial resistance surveillance system) iz leta 2007 so glede na državo podani naslednji deleži izolatov MRSA, izoliranih iz hemokultur in likvorja: Slovenija (8 %), Italija (34 %), Hrvaška (38 %), Avstrija (9 %), Madžarska (23 %), Nemčija (16 %), Francija (26 %), Španija (25 %), Velika Britanija (36 %) idr. (EARSS, 2008). V nizko endemičnih državah je opaziti porast izolatov MRSA, medtem ko je večina visoko endemičnih držav delež izolatov MRSA stabilizirala ali celo znižala. Manjši delež je v primerjavi s prejšnjimi leti mogoče opaziti v Franciji, Sloveniji, Turčiji, pa tudi v Avstriji, Bolgariji, Italiji, Latviji in Veliki Britaniji.

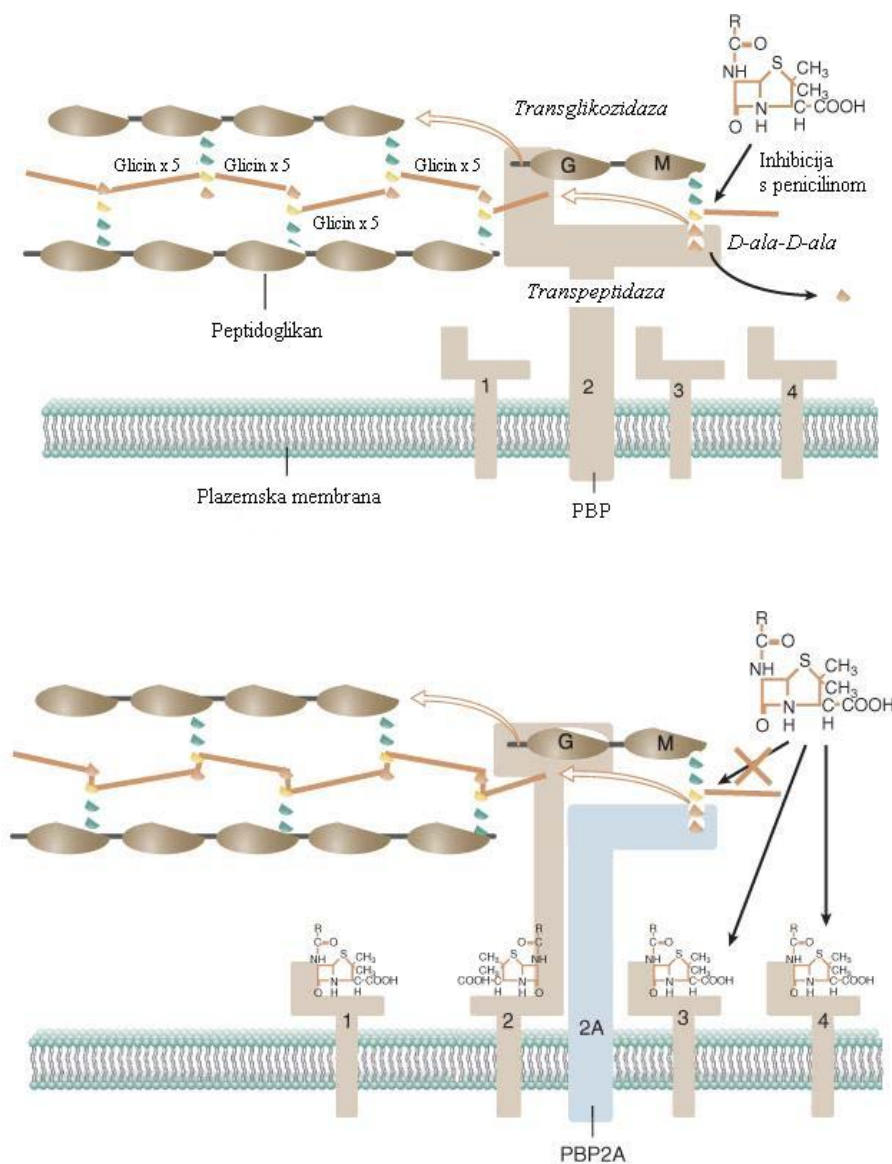


Slika 7: Prikaz deležev proti met icilinu odpornih *Staphylococcus aureus* (MRSA; iz angl.: methicillin-resistant *S. aureus*), izoliranih iz hemokultur in likvorja, v posameznih državah v letu 2007 (EARSS, 2008: 50)

Zdravljenje okužb z MRSA je težko, ker so antibiotiki, ki še ostanejo na razpolago za zdravljenje, manj učinkoviti kot protistafilokokni penicilini oziroma drugi betalaktami (cefalosporini, karbapenemi, monobaktami). Večina sevov MRSA je odpornih tudi proti številnim drugim antibiotikom oziroma skupinam antibiotikov (kinolonom, aminoglikozidom, trimetoprim/sulfametoksazolu, klindamicinu), zato se za zdravljenje največkrat uporabljata glikopeptidna antibiotika vankomicin in teikoplanin (Seme, 2002b; Bolnišnica Golnik, 2008).

Vzrok za odpornost stafilokokov proti met icilinu temelji na razvoju alternativne poti sinteze peptidoglikana z geni, ki kodirajo nastanek novih penicilin vezočih proteinov (PBP; iz angl: penicillin-binding proteins), katerih delovanja betalaktamski antibiotiki ne zavirajo (slika 8). PBP so encimi v bakterijski celični steni, potrebni za sintezo peptidoglikana,

osnovne sestavine bakterijske celične stene. *S. aureus* ima štiri PBP, odpornost proti meticilinu pa nastane, ko bakterija pridobi genetsko informacijo v obliki gena *mecA* za tvorbo dodatnega PBP, imenovanega PBP2a (proti betalaktamskim antibiotikom odporna transpeptidaza). Meticilin pri takšnih sevih zavira vse nespremenjene PBP, vendar se sinteza peptidoglikana kljub temu nadaljuje, ker PBP2a nadomesti njihovo aktivnost (Mueller-Premru, 2001; Seme, 2002a).



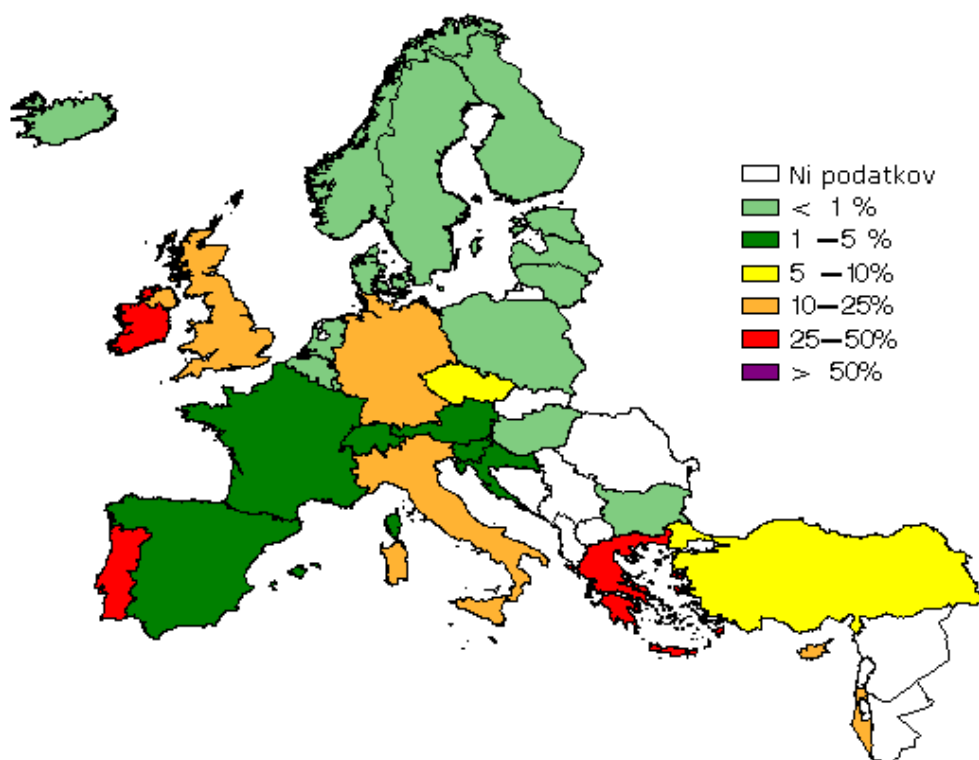
Slika 8: Shematski prikaz sinteze peptidoglikana pri divjem tipu *Staphylococcus aureus* (zgoraj) in pri proti meticilinu odpornem *S. aureus* (MRSA; iz angl.: methicillin-resistant *S. aureus*) (spodaj) (Moreillon in sod., 2000: 2328)

Bolnike z okužbo, ki jo povzroča MRSA, običajno zdravijo z vankomicinom. Pogosta uporaba vankomicina pa ima za posledico nevarnost razvoja odpornosti proti vankomicinu. Leta 1996 so na Japonskem osamili prvi sev, ki je bil le še zmerno občutljiv za vankomicin, leta 2002 pa so že iz kužnin bolnikov izolirali proti vankomicinu odporen sev (VRSA, iz angl.: vancomycin-resistant *S. aureus*) (Bamberger, 2007; Bolnišnica Golnik, 2008). Sevi VISA so razvili debelejšo celično steno, ki ovira vankomicinu dostop do svojega tarčnega mesta v citoplazemski membrani. Pri proti vankomicinu odpornih izolatih *S. aureus* pa ne gre za odebeljeno celično steno, temveč za pridobitev gena *vanA*, zaradi katerega pride do spremembe tarče za vankomicin. Na spremenjeno tarčno mesto pa se vankomicin ne more vezati (Bamberger, 2007).

2.5.2 Enterokoki

Problem zdravljenja odkužb z enterokoki je njihova naravna odpornost proti številnim antibiotikom. Naravno so odporni proti cefalosporinom, protistafilokoknim penicilinom, trimetoprimu in nizkim koncentracijam klindamicina ter aminoglikozidov. Poleg prirojene odpornosti se pri enterokokih lahko razvije tudi pridobljena odpornost, in sicer proti številnim skupinam antibiotikov, tudi proti glikopeptidom (Teixeira, 2007; Murray, 2000).

Število proti vankomicinu odpornih enterokokov je v zadnjih 6 letih poraslo v Sloveniji, Nemčiji, Grčiji, Izraelu, Turčiji in na Irskem, upadlo pa na Hrvaškem, Portugalskem in v Veliki Britaniji. V letnem poročilu EARSS iz leta 2007 so glede na državo podani naslednji deleži VRE (*E. faecium*), izolirani iz hemokultur in likvorja: Slovenija (5 %), Italija (11 %), Hrvaška (2 %), Avstrija (2 %), Madžarska (1 %), Nemčija (15 %), Francija (1 %), Španija (2 %), Velika Britanija (21 %) idr. (slika 9) (EARSS, 2008).

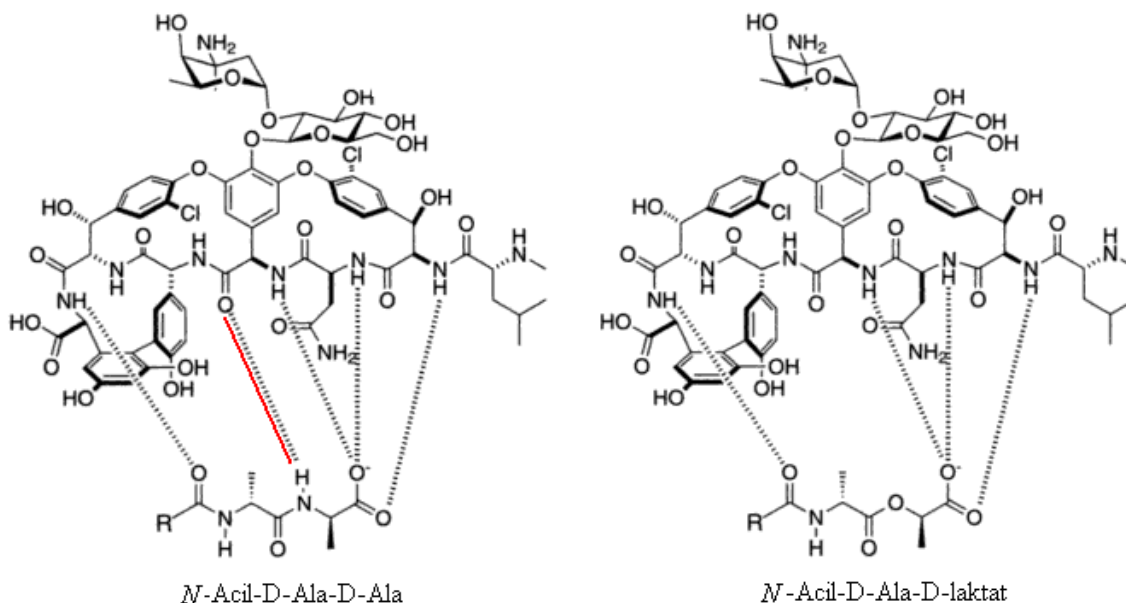


Slika 9: Prikaz deležev izolatov proti vankomicinu odpornih *Enterococcus faecium*, izoliranih iz hemokultur in likvorja, v posameznih državah v letu 2007 (EARSS, 2008: 56)

Za naraščajočo odpornost proti glikopeptidom sta pri *E. faecalis* in *E. faecium* odgovorni dve skupini genov, *vanA* in *vanB*, katerih zapisi se nahajajo na mobilnih genetskih elementih in se lahko prenašajo tako znotraj rodu enterokokov, kot tudi na druge po Gramu pozitivne koke, npr. *S. aureus* (Ribič, 2007). Enterokoki s fenotipom VanA so visoko odporni proti vankomicinu in teikoplaninu, enterokoki fenotipa VanB pa so odporni proti vankomicinu, vendar občutljivi za teikoplanin (Seme, 2002a).

Glikopeptidi motijo zadnjo stopnjo sinteze peptidoglikana. Njihova konformacija jim omogoča, da s pomočjo vodikovih vezi tvorijo stabilne komplekse s terminalnim dipeptidom D-ala-D-ala peptidoglikanske verige. Preprečijo tako transglikozilacijo (podaljšanje verige) kot transpeptidacijo (navzkrižno povezovanje). Odpornost proti glikopeptidom pa nastane zaradi spremembe peptidoglikanskega prekursorja. Terminalni

D-alanin je zamenjan z D-laktatom, kar ima, zaradi izgube vodikove vezi, za posledico približno 1000-krat manj stabilno vezavo antibiotika (slika 10) (Rice in Bonomo, 2007).



Slika 10: Izguba vodikove vezi med vankomicinom in D-Ala-D-laktatom (Walsh, 2003: 151)

V Evropi so pojav VRE povezovali z uporabo avoparcina, ki je po strukturi soroden glikopeptidnim antibiotikom in so ga uporabljali kot pospeševalca rasti v živinoreji.

Zaradi odpornosti proti številnim antibiotikom, posegamo pri zdravljenju okužb z VRE po rezervnih antibiotikih – za zdravljenje okužb sečil, kože in mehkih tkiv je običajno učinkovit novejši antibiotik linezolid. Za zdravljenje okužb kože in mehkih tkiv, bakteriemije in endokarditisa je primeren tudi daptomicin (Ribič, 2007).

2.6 OBČUTLJIVOST BAKTERIJ ZA DAPTOMICIN

Mejna vrednost za občutljivost za daptomicin je pri stafilokokih po standardih CLSI (iz angl.: Clinical and Laboratory Standards Institute) $\leq 1 \mu\text{g/ml}$, za odpornost pa $> 1 \mu\text{g/ml}$. Pri enterokokih je mejna vrednost za občutljivost $\leq 4 \mu\text{g/ml}$, za odpornost pa $> 4 \mu\text{g/ml}$ (CLSI, 2008).

Raziskave, s katerimi so znanstveniki želeli preveriti ustreznost daptomicina za zdravljenje okužb, povzročenih s stafilokoki in enterokoki, so pokazale, da gre za antibiotik, ki je glede na rezultate testiranj občutljivosti bakterij *in vitro*, zelo učinkovit.

V eni od študij so znanstveniki zbrali 4640 iz kliničnih vzorcev izoliranih stafilokokov in enterokokov. Te so prejeli od 23 zdravstvenih centrov iz 10 evropskih držav, Turčije in Izraela. Občutljivost bakterijskih izolatov so testirali s pomočjo mikrodilucijske metode. Vse testirane bakterije vrste *S. aureus* so bile občutljive za daptomicin, z $\text{MIK} \leq 1 \text{ mg/l}$. MIK_{50} je znašal 0,25 mg/l, MIK_{90} pa le 0,5 mg/l. Nekoliko povišane MIK so zaznali med bakterijami MRSA. Daptomicin je bil zelo učinkovit tudi proti enterokokom. Vseh 646 testiranih *E. faecalis* je bilo občutljivih za daptomicin, z MIK_{50} 0,5 mg/l ter MIK_{90} 1 mg/l. Najvišji zaznani MIK je znašal le 2 mg/l (2,2 % testiranih izolatov). Izolati *E. faecium* so imeli MIK_{50} 2 mg/l ter MIK_{90} 4 mg/l, medtem ko je bil pri teh najvišji MIK 4 mg/l. Na podlagi rezultatov so zaključili, da daptomicin predstavlja odlično opcijo za zdravljenje okužb, povzročenih s stafilokoki in enterokoki, saj učinkuje tudi na izolate MRSA in VRE (Sader in sod., 2007).

Do podobnih zaključkov so prišli tudi znanstveniki v nekoliko starejši raziskavi, kjer so testirali občutljivost 6737 izolatov iz več kot 70 zdravstvenih centrov iz Evrope ter Severne in Južne Amerike. Več kot 99,9 % stafilokokov je imelo $\text{MIK} \leq 1 \text{ mg/l}$ (MIK_{90} 0,5 mg/l). Streptokoki so imeli $\text{MIK}_{50} \leq 0,12$, MIK_{90} pa 0,25 mg/l. Enterokoki so imeli $\text{MIK} \leq 4 \text{ mg/l}$, en izolat *E. faecium* pa je imel MIK 8 mg/l (Streit in sod., 2004).

Pojav spontane odpornosti proti daptomicinu je zelo redek, prav tako je imelo povečevanje koncentracije daptomicina s serijsko pasažo le redkokdaj za posledico pojav odpornosti pri stafilokokih, enterokokih in pnevmokokih.

Mehanizem nastanka odpornosti še ni identificiran, prav tako tudi ne mobilni elementi, ki bi lahko posredovali odpornost (Cui in sod., 2006).

Po svetu pa potekajo številne študije, s katerimi poskušajo znanstveniki razrešiti to uganko. V eni izmed študij so Cui in sod. (2006) potrdili zastavljeno hipotezo. Domnevali so

namreč, da ima *S. aureus* podobne mehanizme odpornosti proti vankomicinu in daptomicinu. Rezultati so pokazali močno pozitivno povezavo med občutljivostjo *S. aureus* za vankomicin in daptomicin. Pri izolatih VISA so odkrili močno povezavo med zmanjšano občutljivostjo za vankomicin in zmanjšano občutljivostjo za daptomicin. Zmanjšano občutljivost za daptomicin so povezali s stopnjo odebelitve celične stene (Cui in sod., 2006). Zmanjšana občutljivost bakterij za daptomicin bi namreč lahko bila posledica oteženega prehoda daptomicina, katerega molekulska masa znaša 1,620 g/mol, skozi odebeljeno celično steno (Bamberger, 2007). Tako je daptomicinu onemogočen dostop do citoplazemske membrane in s tem preprečen baktericiden učinek na tarčne celice (Cui in sod., 2006).

Izolati VRSA – odporni proti vankomicinu, ki so odpornost pridobili ob pridobitvi gena *vanA* in imajo običajno debelino celične stene, ostajajo občutljivi za daptomicin. Pri izolatih, izoliranih iz kužnin bolnikov, ki so bili predhodno zdravljeni z vankomicinom, so opazili majhen, vendar statistično pomemben porast MIK za daptomicin, tudi med sevi, ki so bili kljub povišanju še vedno pod mejno vrednostjo, ki ločuje občutljive bakterije od odpornih (Bamberger, 2007).

Friedman in sod. so leta 2006 objavili študijo o genetskih spremembah, ki bi lahko bile pri *S. aureus* povezane z zmanjšano občutljivostjo za daptomicin. Pri izolatih *S. aureus* z MIK nad mejno vrednostjo so opazili mutacije v *mprF* (kodira lizilfosfatidilglicerol sintetazo), *yycG* (kodira histidin kinazo) ter *rpoB* in *rpoC* (kodirata β in β' podenoto RNK polimeraze). Glede na to, da mutacije niso prisotne pri vseh proti daptomicinu odpornih sevih *S. aureus*, bodo potrebne še dodatne raziskave, s katerimi bodo preverili ali so mutacije teh in mogoče še drugih genov odgovorne za nastanek zmanjšane občutljivosti bakterij za daptomicin (Friedman in sod., 2006; Boucher in Sakoulas, 2007).

V literaturi še ni objavljenih raziskav, ki bi pojasnile mehanizem odpornosti enterokokov proti daptomicinu. Montero in sod. (2008) so izključili vpliv točkovnih mutacij v genih, opisanih pri *S. aureus*, na odpornost enterokokov proti daptomicinu.

2.7 UČINKOVITOST DAPTOMICINA V PRIMERJAVI Z DRUGIMI ANTIBIOTIKI

Do sedaj so bile izvedene že številne raziskave, v katerih so znanstveniki primerjali delovanje daptomicina z drugimi antibiotiki.

2.7.1 Daptomicin v primerjavi s teikoplaninom in vankomicinom

Fuchs in sod. (2000) so preverjali aktivnost teikoplanina, vankomicina ter daptomicina. Daptomicin so testirali pri koncentraciji Ca^{2+} 50 $\mu\text{g/ml}$ in ugotovili, da ima pri stafilokokih najmanjše vrednosti MIK med testiranimi antibiotiki. V raziskavo so vključili 227 izolatov; 100 % jih je bilo občutljivih za daptomicin, za teikoplanin pa 96 %. Medtem ko je bil teikoplanin bolj učinkovit pri za vankomicin občutljivih enterokokih, je imel daptomicin učinkovitejše delovanje na VRE. Testirani streptokoki so bili občutljivi za vse tri omenjene antibiotike (Fuchs in sod., 2000).

2.7.2 Daptomicin v primerjavi z linezolidom

Linezolid je antibiotik iz skupine oksazolidinonov, ki zavira sintezo beljakovin v bakterijski celici. Učinkovit je proti večini po Gramu pozitivnih bakterij, nekaterim po Gramu negativnim bakterijam in proti anaerobnim bakterijam (Zurenko in sod., 2001). Mehanizem delovanja se močno razlikuje od delovanja drugih antibiotikov, ki prav tako zavirajo sintezo beljakovin. Z vezavo na 50S podenoto ribosomov okvari vezavno mesto za tRNK in prepreči nastanek začetnega (iniciacijskega) kompleksa (Beović in Seme, 2001).

V primerjavi z daptomicinom, deluje linezolid na stafilokoke in enterokoke bakteriostatično. Baktericidno deluje na streptokoke, vključno s pnevmokoki, ter na anaerobne bakterije (Beović in Seme, 2001; Zurenko in sod., 2001).

Postantibiotični učinek proti stafilokokom in enterokokom *in vitro* traja le 1,4 ure, pri poskusnih živalih pa je trajal do 3,8 ur (Beović in Seme, 2001). Postantibiotični učinek pri daptomicinu traja do 6,8 ur (Steenbergen in sod., 2005).

Posledica uporabe linezolida za zdravljenje bakterijskih okužb, povzročenih z VRE, je porast enterokokov, odpornih ne le proti vankomicinu, temveč tudi proti linezolidu. V takih primerih je na voljo daptomicin, ki učinkuje proti bakterijam, ki so odporne proti obema antibiotikoma (Malli in sod., 2008).

2.8 METODE ZA IDENTIFIKACIJO STAFILOKOKOV IN ENTEROKOKOV

2.8.1 Klasične metode za identifikacijo

Pri identifikaciji bakterij si pomagamo z izgledom kolonij na krvnem agarju in drugih gojiščih, pripravimo mikroskopski preparat, barvan po Gramu, preverimo prisotnost katalaze in oksidaze. Pri po Gramu pozitivnih bakterijah, če sumimo, da gre za stafilokoke, naredimo test DNA-ze ter koagulaze, pri sumu na enterokoke – če ni beta hemolize in sta testa katalaze ter oksidaze negativna, pa naredimo test PYR.

2.8.2 Kristal GP

Za identifikacijo večine klinično pomembnih aerobnih po Gramu pozitivnih bakterij je na voljo komercialni identifikacijski sistem BBL Kristal GP (BBL, Becton, Dickinson and Company, ZDA). Ta vsebuje različne teste s prilagojenimi tradicionalnimi, fluorogenimi in kromogenimi substrati in kontrolo fluorescence. Identifikacija temelji na bakterijski uporabi in razgradnji testnih substratov, ki jo zaznamo preko pojava fluorescence, ki jo ugotavljamo pod UV lučjo. Razgradnjo kromogenih substratov zaznamo preko spremembe barve v vidnem spektru svetlobe. Rezultate reakcij pretvorimo v 10-mestno identifikacijsko kodo, na podlagi katere s pomočjo računalniškega programa dobimo podano ime izolata (Becton, 2007).

2.8.3 Vitek 2 GP

Avtomatizirani sistem VITEK 2 GP (bioMérieux, Francija) se v zadnjih letih vse bolj uporablja za identifikacijo po Gramu pozitivnih bakterij. Identifikacija temelji na biokemičnih testih, ki merijo sposobnost uporabe sladkorjev, encimsko aktivnost in odpornost bakterij proti nekaterim antimikrobnim snovem.

Izvedba metode je enostavna. Pripraviti moramo bakterijski inokulum predpisane gostote, nadaljnji postopki pa so avtomatizirani. Avtomatizirano je polnjenje ploščic z biokemičnimi substrati s pripravljenim inokulumom mikroorganizma, odčitavanje rezultatov in njihova interpretacija. Rezultat je podan v največ 8 urah.

2.9 METODE ZA DOLOČANJE OBČUTLJIVOSTI STAFILOKOKOV IN ENTEROKOKOV ZA ANTIBOTIKE

Za določanje občutljivosti stafilokokov in enterokokov za antibiotike se uporabljajo difuzijska metoda z diski, Etest, VITEK AST, vankomicin presejalna plošča in oksacilin presejalna plošča.

2.9.1 Difuzijska metoda z diski

Občutljivost klinično pomembnih bakterij za antibiotike se določa z difuzijsko metodo z diski, standardizirano po CLSI.

Difuzijska metoda z diski je hitra, enostavna in učinkovita metoda za ugotavljanje občutljivosti bakterij za številne antibiotike. Ne zahteva posebnih aparatov, rezultate enostavno odčitamo in jih interpretiramo.

Izvajamo jo tako, da položimo komercialno pripravljene diske, prepojene z določenimi koncentracijami antibiotikov, na površino agarske plošče (Mueller-Hinton agar), na katero

smo predhodno z brisom enakomerno nanесли bakterijski inokulum. Antibiotik nato iz diska difundira v gojišče in zavre razmnoževanje občutljivih bakterij. Po inkubaciji izmerimo premer zaviralne cone okoli diskov ter stopnjo občutljivosti kvalitativno izrazimo kot občutljivo (S), intermediarno (I) ali odporno (R) (Jorgensen in Turnidge, 2007).

Premjer zaviralne cone izmerimo tako, da petrijevo ploščo držimo nad temno površino in ob odbiti svetlobi izmerimo premer. Pri linezolidu, oksacilinu in vankomicinu pa moramo zaviralno cono izmeriti ob presevni svetlobi – petrijevo ploščo usmerimo proti viru svetlobe (CLSI, 2008). Pozorni moramo biti na posamezne kolonije, ki lahko porastejo ob disku oksacilina pri stafilokokih in disku vankomicina pri enterokokih, znotraj zaviralne cone. Te lahko kažejo na odpornost proti testiranemu antibiotiku. Sicer pa so kolonije, porasle znotraj zaviralne cone najpogosteje indikator mešane bakterijske kulture. V takem primeru je potrebno test občutljivosti ponoviti (Jorgensen in Turnidge, 2007).

2.9.2 Kvantitativno določanje občutljivosti z Etestom

Etest je kvantitativna metoda za določanje občutljivosti mikroorganizmov za protimikrobna sredstva. Etesti so posebne, zelo tanke membrane, impregnirane z rastočimi koncentracijami antibiotika. Minimalno inhibitorno koncentracijo (MIK) določimo s pomočjo eksponentno rastočega antibiotičnega gradienta, ki ga vsebujejo trakovi Etest (Mueller-Premru in Seme, 2003).

Suspenzijo bakterij razporedimo po celotni površini agarske plošče. S pinceto nato na agar položimo Etest (AB Biodisk, Solna, Švedska). Po inkubaciji je ob Etest traku zaradi antibiotičnega gradienta vidna inhibicijska cona v obliki elipse. MIK je tista vrednost na Etestu, kjer se bakterijska rast dotika traku.

2.9.3 Vitek AST

Vitek AST (bioMérieux, Francija) je avtomatizirani sistem, namenjen kvantitativnemu določanju občutljivosti testiranih bakterij za antibiotike. Pri odpornih bakterijah nam poda tudi mehanizme odpornosti.

Kartica AST vsebuje vdolbinice z znanimi koncentracijami antibiotikov, ti pa so pomešani z gojiščem v dehidrirani obliki. V dodatni kontrolni vdolbinici je gojišče brez antibiotika. Ustrezno razredčena raztopina z bakterijskim izolatом napolni vdolbinice kartice AST in rehidrira njihovo vsebino. V 6 do 17 urah aparat poda vrednosti MİK za testirane antibiotike (Richter in Ferraro, 2007).

2.9.4 Vankomicin presejalna plošča

Plošča z vankomicinom se uporablja kot presejalni test za ugotavljanje odpornosti enterokokov proti vankomicinu. Koncentracija omenjenega antibiotika v gojišču BHI (iz angl.: brain heart infusion) znaša 6 µg/ml. Test izvajamo poleg diska, saj z diskom ne zaznamo nizke stopnje odpornosti.

Bakterijski inokulum inokuliramo na BHI agar z vankomicinom in po 24 urah preverimo rast bakterij. Ta kaže na odpornost seva proti vankomicinu (Swenson in sod., 2007).

2.9.5 Oksacilin presejalna plošča

Oksacilinska plošča se uporablja kot presejalni test za ugotavljanje odpornosti stafilokokov proti oksacilinu. V uporabi je kot dopolnilna metoda za detekcijo bakterije MRSA. Za testiranje uporabljamo gojišče, ki vsebuje Mueller-Hinton agar s 6 µg/ml oksacilina in 4% NaCl.

Na gojišče inokuliramo bakterijsko suspenzijo stafilokokov. Po 24-urni inkubaciji na gojišču porastejo samo sevi stafilokokov, ki so odporni proti oksacilinu (Swenson in sod., 2007).

2.10 DOLOČANJE OBČUTLJIVOSTI ZA DAPTOMICIN

Pri določanju občutljivosti bakterij za daptomicin moramo upoštevati lastnost antibiotika, ki pomembno vpliva na testiranje občutljivosti. Daptomicin namreč za delovanje tako *in vitro*, kot tudi *in vivo*, potrebuje prisotnost prostih kalcijevih ionov (Ca^{2+}), ki vplivajo na samo aktivnost omenjenega antibiotika. Optimalno določanje vrednosti MIK omogoča koncentracija Ca^{2+} v rastnih medijih, ki znaša 50 $\mu\text{g/ml}$, kar tudi ustreza fiziološki koncentraciji prostega Ca^{2+} v plazmi pri človeku (Barry in sod., 2001; Novartis, 2008)

Velik pomen Ca^{2+} pri delovanju daptomicina so potrdili tudi Fuchs in sod. (2000). V svoji raziskavi so opazili, da je daptomicin proti vsem testiranim vrstam bakterij dva- do štirikrat učinkovitejši pri 50 $\mu\text{g/ml}$ Ca^{2+} kot pri 25 $\mu\text{g/ml}$ Ca^{2+} . Pri testiranju pri koncentraciji Ca^{2+} 75 $\mu\text{g/ml}$ so opazili še boljše delovanje daptomicina, vendar je bila ta razlika bistveno manjša kot pri koncentracijah Ca^{2+} 25 $\mu\text{g/ml}$ in 50 $\mu\text{g/ml}$ Ca^{2+} (Fuchs in sod., 2000).

Priporočeni metodi za testiranje občutljivosti mikroorganizmov za daptomicin sta mikrodilucija v bujonu in Etest (Novartis, 2008).

V eni od raziskav so znanstveniki primerjali rezultate dveh komercialnih metod (Etest in ozka mikrodilucijska ploščica JustOne), namenjenih za določanje občutljivosti bakterij za antibiotik daptomicin, z referenčno metodo – mikrodilucijo v bujonu. Kar se izvedbe testa tiče, so ugotovili, da je primernejša in hitrejša uporaba testnih lističev Etest, vendar je odčitavanje rezultatov pri omenjeni metodi nekoliko težje. Zlasti pri enterokokih je rob elipse meglen, kar oteži odčitavanje rezultata. Na podlagi rezultatov obeh komercialnih metod, ki so bili primerljivi z rezultati referenčne metode, so zaključili, da sta obe metodi primerni za določanje občutljivosti bakterij za daptomicin (Jorgensen in Crawford, 2006).

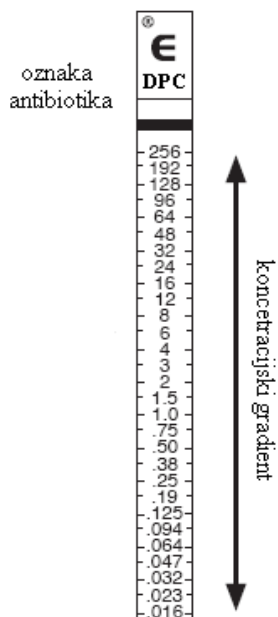
2.10.1 Mikrodilucija v bujonu

Mikrodilucija v bujonu je standardizirana metoda za določanje občutljivosti bakterij za številne antibiotike. Rast bakterij spremljamo na mikrotitrskih ploščah, ki jih lahko pripravimo sami ali kupimo že komercialno pripravljene. Bakterijsko kulturo dodamo v luknjice s predhodno nanešenimi rastočimi koncentracijami antibiotikov in inkubiramo. Najnižja koncentracija agensa, ki inhibira rast testnega organizma, je vrednost MIK. To predstavlja prva bistra luknjica na mikrotitrski ploščici. Odčitavanje rezultatov lahko poteka polavtomatsko ali avtomatsko. Metoda je enostavna, hitra in ekonomsko ugodna, poleg tega pa omogoča istočasno testiranje več protimikrobnih snovi (Jorgensen in Turnidge, 2007).

Za testiranje občutljivosti bakterij za številne antibiotike z metodo mikrodilucije v bujonu, je priporočena uporaba bujona Mueller-Hinton, ki vsebuje 20 do 25 mg Ca^{2+} /l in 10 do 12,5 mg Mg^{2+} /l. Tako so dosegli standardizacijo mikrodilucijskega testa za aminoglikozide in tetracikline, pri testiranju občutljivosti bakterij za daptomicin pa so ugotovili, da je Ca^{2+} potrebno še dodati (Barry in sod., 2001). Inštitut za klinične in laboratorijske standarde (CLSI) je odobril metodo, ki predpisuje uporabo bujona Mueller-Hinton z 2-5 % lizirane konjske krvi ali brez nje, pripravljenega tako, da vsebuje koncentracijo Ca^{2+} 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Določanje MIK z uporabo drugih bujonov pa ni bilo validirano (Novartis, 2008).

2.10.2 Etest

Poleg mikrodilucije v bujonu se za testiranje občutljivosti bakterij za antibiotik daptomicin kot priporočena metoda uporabljajo tudi testni lističi Etest (AB Biodisk, Solna, Švedska), ki imajo v celotnem gradientu daptomicina enakomerno koncentracijo Ca^{2+} . Zelo pomembna pa je tudi koncentracija kalcijevih ionov v agarju. Ta mora biti v območju 25-30 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Testni lističi Etest z daptomicinom (slika 11) so primerni za uporabo z agarjem Mueller-Hinton. Priporočen je BBLTM agar Mueller-Hinton, ker dosledno vsebuje kalcij v predpisanem območju (Novartis, 2008).



Slika 11: Etest z daptomicinom: umerjena lestvica koncentracij antibiotika ($\mu\text{g/ml}$) (AB Biodisk, 2007)

2.10.3 Avtomatski in polavtomatski sistemi

Zaključili so tudi že razvoj daptomicinskih ploščic in kartic za bioMerieux VITEK1, BD Phoenix in Trek SensiTitre. Drugi sistemi so še v razvoju (Novartis, 2008).

2.10.4 Metode, ki niso priporočene za testiranje občutljivosti

Metodi, ki nista priporočeni za testiranje občutljivosti bakterij za antibiotik daptomicin sta metoda razredčevanja v agarju in difuzijska metoda z diski.

Metoda razredčevanja v agarju ni priporočena, ker noben agar ne vsebuje primerne, točno določene koncentracije kalcija, ki bi bila primerna za testiranje občutljivosti, dodajanje Ca^{2+} v agar pa je težavno. Tako je zaradi variabilne vsebnosti Ca^{2+} v agarju med posameznimi serijami in izdelovalci ta metoda nepredvidljiva.

Tudi difuzijska metoda z diski zaenkrat ni priporočena. S trga v ZDA so zaradi težav z razlikovanjem odpornih izolatov od občutljivih odpoklicali 30-mikrogramski disk (Jorgensen in Crawford, 2006; Novartis, 2008).

3 MATERIALI IN METODE

Pri pripravi mikrobioloških gojišč smo se opirali na predpise Splošnih operativnih postopkov Inštituta za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete v Ljubljani, pri izvajanju metod pa na priporočila CLSI (CLSI, 2008).

3.1 PRIPRAVA UPORABLJENIH GOJIŠČ

3.1.1. Krvni agar (KA)

Krvni agar je splošno uporabno gojišče za gojenje številnih klinično pomembnih bakterij.

Za pripravo gojišča KA (Merck KGaA, Nemčija) smo v 1 l vode dodali 40 g pripravljene mešanice (Blood Agar Base).

Mešanica vsebuje:

20,0 g ekstrakta govejega srca,
5,0 g NaCl
15,0 g agarja.

Gojišče smo avtoklavirali, mu aseptično dodali citrirano govejo kri (5 %) in razlili v petrijeve posodice.

3.1.2 Mueller-Hinton agar (MHA)

Mueller-Hinton agar je splošno uporabno gojišče, ki ga uporabljamo za ugotavljanje občutljivosti bakterij za antibiotike.

Za pripravo gojišča MHA (BBL, Becton, Dickinson & Company., ZDA) smo v 1 l vode dodali 38 g pripravljene mešanice, ki vsebuje:

2,0 g govejega ekstrakta,

17,5 g kislega hidrolizata kazeina,
1,5 g škroba in
17,0 g agarja.

Gojišče smo 15 minut avtoklavirali pri 121 °C, nato pa razlili v sterilne petrijevke.

3.2 BAKTERIJSKI IZOLATI

Skupno smo testirali občutljivost 200 izolatov iz kliničnih vzorcev za antibiotik daptomicin. Preverili smo občutljivost 100 izolatov *S. aureus*, od tega 50 za meticilin občutljivih (MSSA) in 50 proti meticilinu odpornih *S. aureus* (MRSA). Testirali smo tudi 100 izolatov enterokokov, in sicer 38 za vankomicin občutljivih *E. faecalis*, 38 za vankomicin občutljivih *E. faecium* ter 24 proti vankomicinu odpornih enterokokov (VRE), ki so bili vsi vrste *E. faecium*.

Vzorci bolnikov, ki smo jih zbirali od novembra 2007 do junija 2008, smo dobili iz različnih oddelkov Kliničnega centra v Ljubljani in iz nekaterih zdravstvenih domov. Ker v tem času nismo zbrali zadostnega števila ustreznih bakterijskih izolatov, zlasti VRE in MRSA, smo jih nekaj vzeli iz zbirke izolatov Laboratorija za hemokulture in druge urgentne mikrobiološke preiskave ter iz zbirke izolatov Laboratorija za bakteriološko diagnostiko infekcij sečil.

Bakterijske izolate smo osamili iz različnih kužnin – krvi, punktatov, brisov punktatov, abscesov, tkiv, katetrov, urina. Pri posameznem bolniku smo v raziskavi uporabili le en izolat.

3.3 KLASIČNA IDENTIFIKACIJA BAKTERIJ

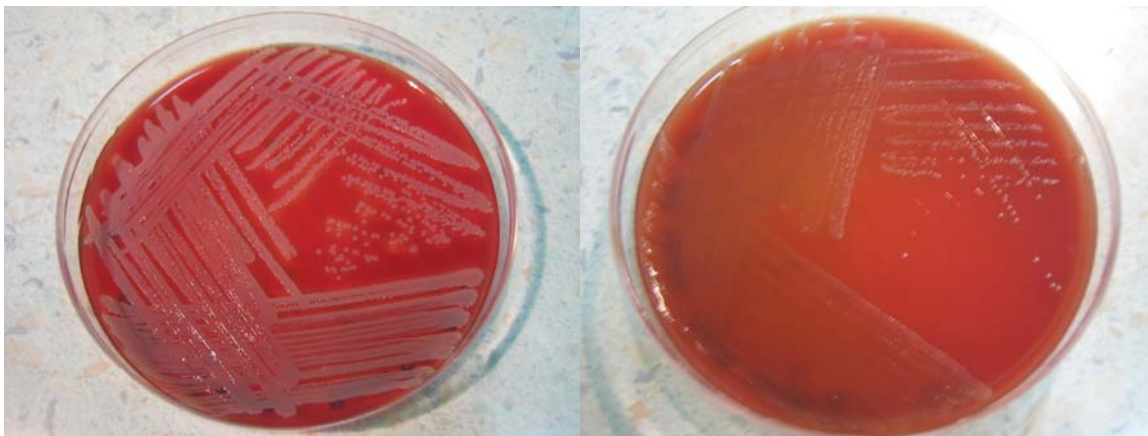
Kužnine smo zasejali na krvni ter čokoladni agar, na agar po Schaedler-ju ter v tekoče tioglikolatno gojišče. Na gojiščih so nato zrasle bakterije v obliki čistih ali mešanih kultur.

3.3.1 Rast bakterij na krvnem agarju

Osnova identifikacije je izolacija bakterij v čisti kulturi.

Izolate smo gojili na krvnem agarju in jih inkubirali aerobno pri 35 °C. Krvni agar je s krvjo obogateno osnovno gojišče, ki se v diagnostičnih laboratorijih najpogosteje uporablja za rast patogenih bakterij.

Najprej smo torej pregledali rast bakterij na krvnem agarju. *S. aureus* raste na krvnem agarju v obliki gladkih, zlatorumenih kolonij, ki so velike do 2 mm. Okoli kolonij je lahko pas popolne (beta) hemolize (Seme, 2002b). Kolonije enterokokov, ki so navadno brez pigmenta, so po 24 urah rasti na krvnem agarju velike med 1 in 2 mm, včasih so lahko tudi manjše. Večinoma so alfa ali gama hemolitične (slika 12) (Teixeira in sod., 2007).



Slika 12: Rast bakterij na krvnem agarju – levo: *Staphylococcus aureus*, desno: *Enterococcus faecalis*

3.3.2 Barvanje po Gramu

Razmaze smo pripravljali direktno iz kužnin ali iz tekočih oziroma trdnih gojišč. V slednjem primeru smo na predmetno stekelce kanili kapljico fiziološke raztopine, v njej pa suspendirali kolonijo bakterij z gojišča. Pred barvanjem smo preparat posušili in ga fiksirali z metanolom. Nato smo ga za 30 do 60 sekund prelili z raztopino kristal vijoličnega ter sprali z rahlim curkom vode. Sledilo je barvanje z lugolom za 30 do 60

sekund, spiranje z vodo ter razbarvanje preparata z aceton alkoholom. Preparat smo ponovno sprali z vodo, na koncu pa ga še za 30 sekund prelili s safraninom. Tudi to barvilo smo sprali z vodo in preparat posušili.

3.3.3 Dokaz katalaze

S katalaznim testom smo ugotavljali prisotnost encima katalaze, ki razgrajuje vodikov peroksid (H_2O_2).

Na predmetnik smo kanili kapljico 3 % vodikovega peroksida. Z zanko smo vzeli kulturo s plošče in jo pomešali s peroksidom. V primeru pozitivne reakcije smo opazili nastanek mehurčkov (*S. aureus*), v primeru negativne reakcije pa mehurčkov ni bilo (enterokoki).

3.3.4 PYR (L-pirolidonil- β -naftilamid) test

S testnim brisom smo pobrali kolonijo iz agarске plošče, nato pa na bris kanili kapljico destilirane vode. Po 2-minutni inkubaciji smo na bris kanili še PYR reagent (Remel, Lenexa, ZDA). Pozitiven rezultat, ki je značilen za enterokoke in se pojavi v minuti, je pojav rožnate barve na mestu bakterijske kulture.

3.4 KRISTAL GP

Test smo izvedli tako, da smo s sterilnim brisom prenesli kolonije bakterij v epruveto z inokulacijsko tekočino. Končna gostota je morala biti 0,5 po McFarlandu (1×10^8 do 2×10^8 CFU/ml). Bakterijsko suspenzijo smo nato vlili v vdolbino na desni strani ploščice. Inokulum smo s pretakanjem enakomerno porazdelili po vseh vdolbinicah ter ploščico pokrili s pokrovom s substrati. Identifikacijski sistem smo inkubirali aerobno na 35 °C 18-24 ur s pokrovom, obrnjenim navzgor. Po inkubaciji smo rezultate odčitali na BBL čitalniku tako, da smo uporabili kartico z barvnimi reakcijami za pozitivne in negativne

rezultate za BBL Crystal GP test in UV luč. Rezultate smo vnesli v priložen obrazec. Vsak pozitiven rezultat v prvi vrstici smo vrednotili s 4 točkami, vsak pozitiven rezultat v drugi vrstici z 2 točkama, v tretji pa s točko. S seštevanjem točk v posameznih stolpcih smo nato dobili identifikacijsko kodo, ki smo jo vnesli v program za odčitavanje kod, kamor smo vnesli tudi pod mikroskopom opaženo obliko bakterij (koki ali bacili). Program nam je nato na podlagi vnešenih podatkov podal ime testiranega izolata (Becton, 2007).

3.5 VITEK GP

V posebno epruveto smo s pomočjo avtomatizirane črpalke odmerili 3 ml raztopine za pripravo inokuluma. Na trdnem gojišču smo izbrali kolonije in pripravili bakterijsko suspenzijo, katere gostota je morala biti med 0,5 in 0,63 po McFarlandu. Nato smo epruveto namestili v nosilec za epruvete, vnesli podatke v računalnik, s čitalcem kod pa še kodirali ploščico s substrati za identifikacijo. Nosilec s ploščicami smo vstavili v glavni inkubator.

Vrednotenje rezultatov je potekalo na osnovi primerjave rezultatov biokemijskih testov z informacijsko bazo sistema. Rezultat je nato Vitek podal avtomatsko v obliki imena bakterijske vrste. V primeru, da je rezultat podal dvoumno, smo naredili dodatne komercialne ali klasične teste.

3.6 DOLOČANJE OBČUTLJIVOSTI BAKTERIJ ZA ANTIBIOTIKE

3.6.1 Difuzijska metoda z diski

3.6.1.1 Priprava inokuluma ter polaganje standardiziranih diskov antibiotikov

Za izdelavo antibiogramov smo uporabili 18-24 urno bakterijsko kulturo. S sterilnim brisom smo pobrali bakterijske kolonije z agarske plošče, jih suspendirali v 0,85 % NaCl ter dobro premešali. Končna gostota je morala biti 0,5 po McFarlandu. Z brisom smo nato

s pomočjo inokulatorja prenesli suspenzijo na Mueller-Hinton agar in pred polaganjem diskov z avtomatskim polagalcem počakali nekaj minut, vendar ne več kot 15 minut.

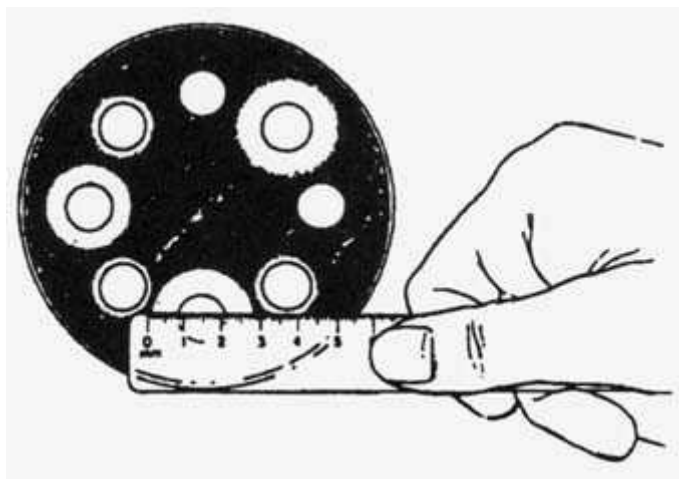
3.6.1.2 Inkubacija

Inokulirane antibiogramne plošče smo prenesli v termostat na 35 °C za 18-24 ur.

3.6.1.3 Odčitavanje rezultatov

Ob pravilni inokulaciji agarških plošč je bakterijska rast konfluentna, zaviralne cone, ki se pojavijo ob položenem disku z antibiotikom, pa so enakomerno okrogle oblike.

S pomočjo umerjenega kljunastega merila smo izmerili premer zaviralne cone (slika 13), nato pa testirani mikroorganizem na podlagi predpisanih kriterijev uvrstili kot občutljiv (S), intermediaren (I) ali odporen (R).



Slika 13: Prikaz merjenja premera zaviralne cone ob disku z antibiotikom (Mueller-Premru in Seme, 2003; 102)

3.6.1.4 Uporabljeni antibiotiki in njihove koncentracije v diskih

V preglednici 1 so v oklepajih napisane koncentracije antibiotikov v µg, za penicilin pa v mednarodnih enotah (IU, iz angl.: international unit).

Preglednica 1: Antibiotiki, ki jih običajno testiramo pri stafilokokih in enterokokih (v µg, le pri penicilinu v mednarodnih enotah – IU; iz angl.: international unit)

<i>Stafilokoki</i>	<i>Enterokoki</i>
penicilin (10 IU)	ampicilin (10)
oksacilin (1)	vankomicin (30)
vankomicin (30)	gentamicin (120)
teikoplanin (30)	streptomycin (300)
gentamicin (10)	
eritromicin (15)	
klindamicin (2)	
tetraciklin (30)	
ciprofloksacin (5)	
sulfametoksazol + trimetoprim (1,25 / 23,75)	
rifampin (5)	

3.6.2 Vankomicin presejalna plošča

Pripravili smo homogeno suspenzijo bakterijske kulture enterokokov gostote 0,5 po McFarlandu in jo z brisom inokulirali na agarsko ploščo. Ploščo smo inkubirali 24 ur na temperaturi 35 °C in nato rast ovrednotili s presežno svetlobo. Rast enterokokov na plošči je bila dokaz za odpornost seva proti vankomicinu.

3.6.3 Oksacilin presejalna plošča

Pripravili smo homogeno suspenzijo bakterijske kulture stafilokokov gostote 0,5 po McFarlandu in jo z brisom inokulirali na agarско ploščo. Po 24-urni inkubaciji smo rast ovrednotili s presežno svetlobo. Na gojišču so porasli samo sevi stafilokokov, ki so odporni proti oksacilinu.

3.6.4 VITEK AST

Metodo smo izvajali sočasno z identifikacijo bakterij. Za epruveto z bakterijsko suspenzijo, ki smo jo pripravili za identifikacijo bakterij, smo namestili prazno epruveto in vanjo namestili ustrezno AST kartico. Kasete smo nato vnesli v aparat (bioMérieux, Francija). Ta je nato iz prve epruvete pripravil suspenzijo z ustrezno gostoto, meril rast testiranega organizma brez in v prisotnosti antibiotika ter nato podal vrednost MIK za vsak antibiotik na kartici AST.

3.6.5 Kvantitativno določanje občutljivosti z Etestom

Občutljivost bakterij za lipopeptidni antibiotik daptomicin določamo po navodilih proizvajalca kvantitativno z Etesti (AB Biodisk, Solna, Švedska). Omenjeno metodo uporabljamo tudi pri drugih antibiotikih v primerih, ko ugotovimo, da se rezultati klasične difuzijske metode z diski ne ujemajo z rezultati VITEK.

3.6.5.1 Določanje občutljivosti kliničnih izolatov za antibiotik daptomicin

Občutljivost kliničnih izolatov smo testirali s priporočeno metodo, in sicer s testnimi lističi Etest za daptomicin (AB Biodisk, Solna, Švedska), ki imajo v celotnem gradientu daptomicina enakomerno koncentracijo Ca^{2+} . Aktivnost antibiotika je odvisna od prisotnosti fizioloških koncentracij kalcijevih ionov, zato je zelo pomembna tudi

koncentracija le-teh ionov v agarju. Za testiranje občutljivosti je primeren agar Mueller-Hinton, v katerem mora biti koncentracija Ca^{2+} med 25-30 $\mu\text{g/ml}$.

3.6.5.2 Izvedba Etesta

Bakterijski inokulum smo pripravili enako kot za klasični difuzijski antibiogram z diski. S sterilnim vatiranim brisom smo iz dan starega gojišča pobrali bakterijske kolonije ter jih suspendirali v stekleni epruveti s fiziološko raztopino. Bakterijsko suspenzijo smo dobro premešali, končna gostota pa je morala biti 0,5 po McFarlandu (slika 14). Suspenzijo smo nato s sterilnim brisom enakomerno nanесли na Mueller-Hinton agar. S pinceto smo na inokulirano agarsko ploščo položili z daptomicinom impregnirano membrano Etesta (AB Biodisk, Solna, Švedska), ki vsebuje daptomicin v koncentraciji od 0,016 $\mu\text{g/ml}$ do 256 $\mu\text{g/ml}$ ter inkubirali 16 do 20 ur pri 35 °C.



Slika 14: Merilnik gostote bakterijske suspenzije

3.6.5.2 Interpretacija rezultatov

Po inkubaciji je bila ob Etestu zaradi antibiotičnega gradienta vidna inhibicijska cona v obliki elipse. Minimalna inhibitorna koncentracija je bila vrednost na Etestu, kjer se je

bakterijska rast stikala z Etest trakom. Dobljene rezultate smo interpretirali na osnovi standardov CLSI.

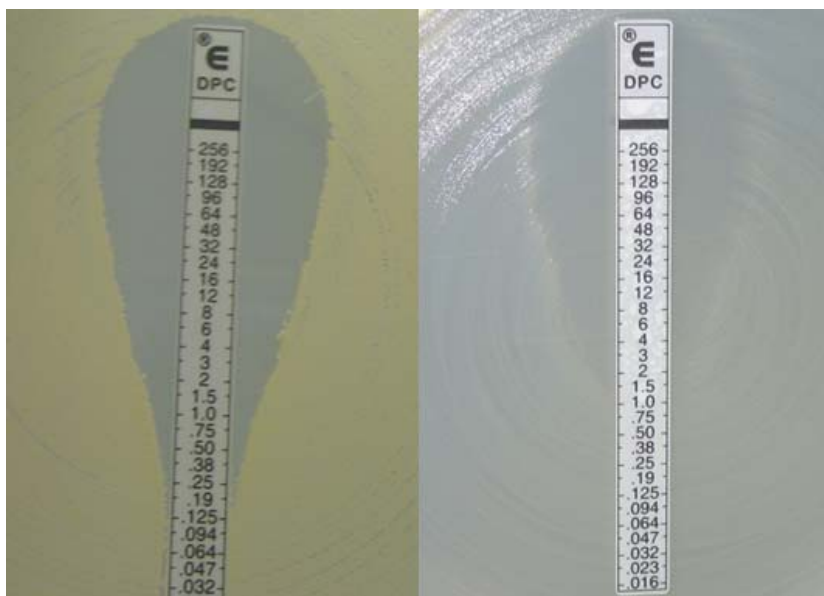
3.6.5.4 Kontrola metode Etesta

Pred pričetkom določanja občutljivosti izbranih bakterij za antibiotik daptomicin smo morali izvesti kontrolo metode. V ta namen smo uporabili dva kontrolna seva, ki sta predpisana v priloženih navodilih za pravilno izvedbo Etestov in standardu CLSI. To sta bila *S. aureus* ATCC 29213 ter *E. faecalis* ATCC 29212. Rezultate testiranja občutljivosti kontrolnih sevov prikazuje slika 15. V priloženih navodilih so zapisane mejne vrednosti minimalnih inhibitornih koncentracij antibiotika (MIK), na podlagi katerih nato testiran mikroorganizem uvrstimo kot občutljiv (S) ali neobčutljiv (NS). V preglednici 2 so podane mejne vrednosti v µg/ml.

Preglednica 2: Meje vrednosti za testna organizma *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 in *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 ter obenem vse stafilokoke ter enterokoke

<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213	$S \leq 1 \mu\text{g/ml}$	$NS > 1 \mu\text{g/ml}$
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	$S \leq 4 \mu\text{g/ml}$	$NS > 4 \mu\text{g/ml}$

Legenda: S - občutljiv, NS - neobčutljiv



Slika 15: Testiranje občutljivosti kontrolnih sevov za antibiotik daptomicin – levo: *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, desno: *Enterococcus faecalis* ATCC 29212

3.6.5.5 Analiza podatkov

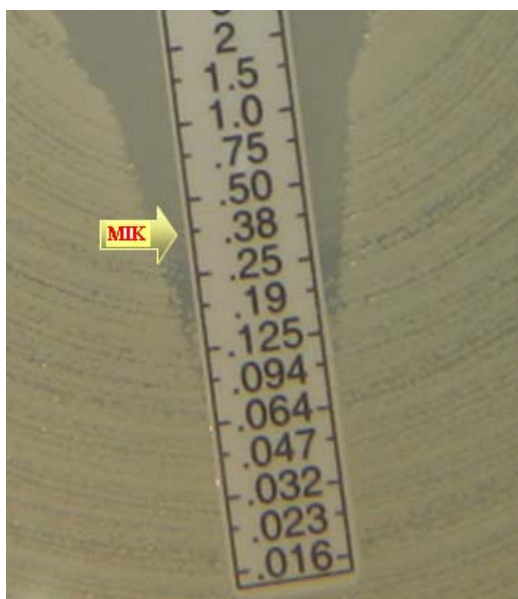
Za analizo podatkov smo v Microsoft Excelu uporabili ukaz Orodja/ Analiza podatkov, *t-test*: Preskus skupin z upoštevanjem enakih varianc. Uporaba *t*-testa je dopustna, če je razmerje večje in manjše variance, ki ju primerjamo, manjše od 2 (Košmelj, 2001). Vrednosti MIK smo logaritmirali, saj smo tako zadostili navedenemu pogoju. Za mejo statistične pomembnosti smo določili α -vrednost 0,05. Če je bila dobljena *p*-vrednost manjša od α , smo ničelno domnevo zavrnil, če pa je bila *p*-vrednost večja od α , smo ničelno domnevo obdržali.

4 REZULTATI

Izmed vseh bakterij, ki smo jih v času opravljanja diplomske naloge identificirali s pomočjo različnih identifikacijskih postopkov, smo izbrali le stafilokoke in enterokoke.

Izolate smo zbirali 8 mesecev, vendar kljub temu, da smo jih nekaj vzeli iz zbirke shranjenih izolatov, v tem času nismo zbrali zadostnega števila proti vankomicinu odpornih enterokokov. Glede na to, da smo želeli testirati 100 enterokokov, od tega 50 za vankomicin občutljivih in 50 odpornih, smo morali število slednjih zmanjšati. Tako smo testirali le 24 proti vankomicinu odpornih enterokokov (vrsta *E. faecium*), število občutljivih pa smo zato povečali na 76, skupno torej 100 enterokokov.

Za določanje vrednosti MIK smo uporabili metodo difuzijskega gradienta z Etestom (AB Biodisk, Solna, Švedska). MIK smo odčitali na mestu, kjer je zaviralna elipsa sekala Etest. MIK je namreč najmanjša koncentracija antibiotika, ki prepreči rast bakterij. Glede na navodila proizvajalca testa je pri odčitavanju MIK daptomicina potrebno odčitati koncentracijo antibiotika na testnem lističu na dnu elipse (tudi če je ta na dnu nekoliko podaljšana), in sicer na mestu, kjer ni prisotnih posameznih kolonij. Primer odčitavanja rezultata je prikazan na sliki 16.



Slika 16: Odčitavanje minimalne inhibitorne koncentracije (MIK) daptomicina

Zaradi boljše preglednosti so v preglednici 3 povzeti rezultati študije, natančnejši rezultati testiranja občutljivosti za daptomicin pri posameznih vrstah pa so podani v sledečih vrsticah. Poleg razpona MIK smo za testirane bakterije določili še MIK₅₀ ter MIK₉₀, ki predstavljata najnižjo koncentracijo antibiotika, ki inhibira rast 50 % oziroma 90 % izolatov posamezne vrste.

Preglednica 3: Razpon dobljenih vrednosti minimalnih inhibitornih koncentracij daptomicina (MIK_{DPC}; v µg/ml) ter MIK₅₀ in MIK₉₀ pri izolatih posameznih vrst

Izolat	Število izolatov	MIK _{DPC} (µg/ml)		
		razpon	MIK ₅₀	MIK ₉₀
MSSA	50	0,094-0,5	0,25	0,5
MRSA	50	0,25-1	0,5	0,75
<i>Enterococcus faecalis</i>	38	0,25-3	1,0	1,5
<i>Enterococcus faecium</i>	38	0,75-3	2,0	3,0
VRE (<i>E. faecium</i>)	24	1-3	2,0	3,0

Legenda: MSSA – iz angl.: methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus*, MRSA – iz angl.: methicillin-resistant *S. aureus*, VRE – iz angl.: vancomycin-resistant *Enterococcus* spp.

4.1 STAFILOKOKI

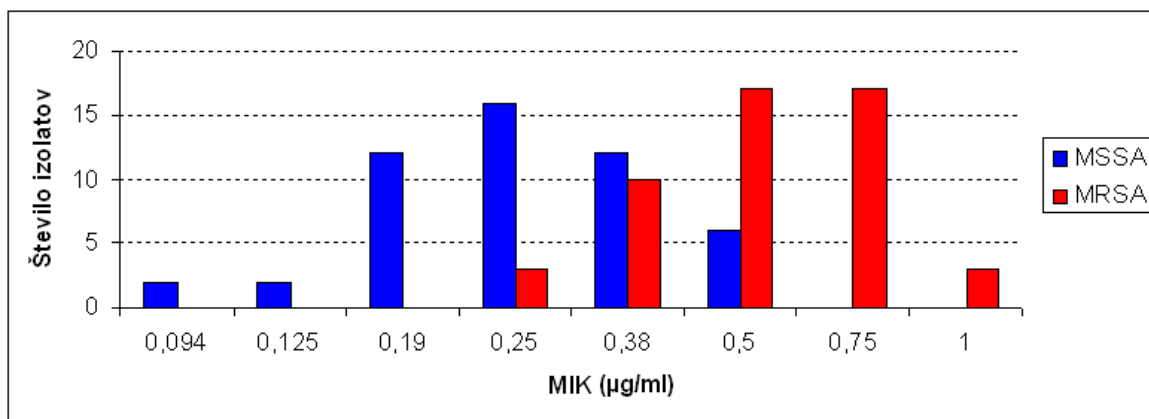
V preglednici 4 so prikazani rezultati testiranja občutljivosti (MIK) 100 stafilokokov za antibiotik daptomicin (v µg/ml). Vsi testirani izolati so bili, glede na kriterije za opredeljevanje občutljivosti, občutljivi za daptomicin. Vrednosti MIK bakterij MSSA so bile nizke – obsegale so koncentracije do 0,5 µg/ml. Nekoliko višje so bile vrednosti MIK bakterij MRSA, ki so zavzele koncentracije vse do mejne vrednosti 1,0 µg/ml.

Preglednica 4: Rezultati testiranja občutljivosti (MIK_{DPC} v µg/ml) 100 bakterijskih izolatov vrste *Staphylococcus aureus* za antibiotik daptomicin

MIK _{DPC} (µg/ml)	MSSA		MRSA	
	Število izolatov	Odstotek (%)	Število izolatov	Odstotek (%)
0,094	2	4	0	0
0,125	2	4	0	0
0,19	12	24	0	0
0,25	16	32	3	6
0,38	12	24	10	20
0,5	6	12	17	34
0,75	0	0	17	34
1	0	0	3	6
Skupaj	50	100	50	100

Legenda: MIK_{DPC} – minimalna inhibitorna koncentracija daptomicina, MSSA – iz angl.: methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus*, MRSA – iz angl.: methicillin-resistant *S. aureus*

Slika 17 prikazuje podatke iz preglednice 4. Bakterije MSSA so imele vrednosti MIK od 0,094 µg/ml do 0,5 µg/ml, bakterije MRSA pa od 0,25 µg/ml do 1 µg/ml.



Slika 17: Število za meticilin občutljivih *Staphylococcus aureus* (MSSA; iz angl: methicillin-sensitive *S. aureus*) in proti meticilinu odpornih *S. aureus* (MRSA; iz angl: methicillin-resistant *S. aureus*) z določeno vrednostjo minimalne inhibitorne koncentracije (MIK; v µg/ml) daptomicina

S t-preizkusom smo preverili domnevo o enakih povprečnih vrednostih za log(MIK). Dobljeni povprečni log(MIK) za MSSA je znašal -0,58, za MRSA pa -0,26. Pri stopnji značilnosti 0,05 smo zavrnilo ničelno hipotezo, ki predpostavlja, da sta povprečji enaki, v korist alternativne hipoteze (povprečji se razlikujeta). Povprečni vrednosti za log(MIK) za MSSA in MRSA se statistično značilno razlikujeta ($p < 0,001$). Grafični porazdelitvi sta po obliki primerljivi, porazdelitev za MRSA pa je pomaknjena v desno, kar je razvidno iz slike 17.

4.2 ENTEROKOKI

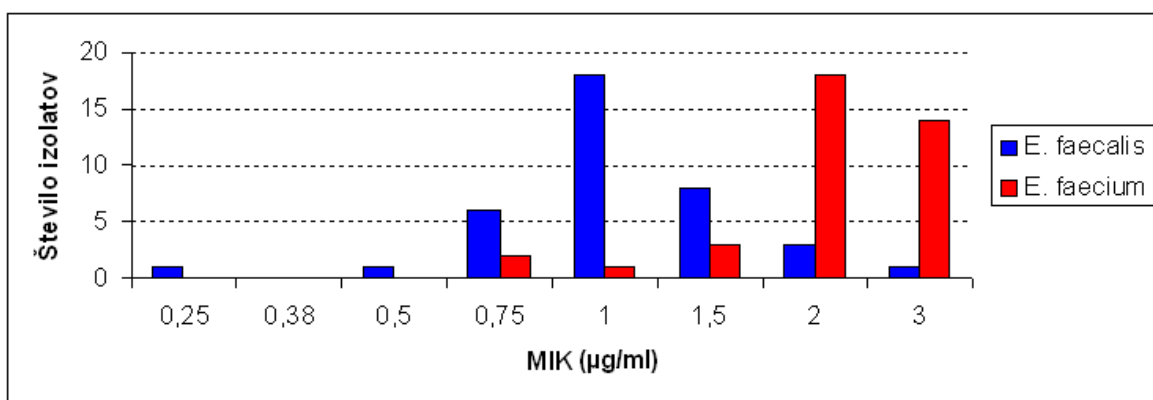
Rezultati testiranja občutljivosti enterokokov so podani v preglednici 5. Vrednosti MIK za daptomicin so bile pri enterokokih, občutljivih za vankomicin, v razponu od 0,25 µg/ml do 3 µg/ml, pri VRE pa od 1 µg/ml do 3 µg/ml. Vse testirane enterokoke lahko torej označimo kot občutljive, saj je vrednost, ki ločuje občutljive enterokoke od odpornih, 4 µg/ml.

Preglednica 5: Rezultati testiranja občutljivosti (MIK_{DPC} v µg/ml) 100 bakterijskih izolatov enterokokov za daptomicin

MIK _{DPC} (µg/ml)	Enterococcus faecalis		Enterococcus faecium		VRE (<i>E. faecium</i>)	
	Število izolatov	Odstotek (%)	Število izolatov	Odstotek (%)	Število izolatov	Odstotek (%)
0,25	1	2,6	0	0	0	0
0,38	0	0	0	0	0	0
0,5	1	2,6	0	0	0	0
0,75	6	15,8	2	5,3	0	0
1	18	47,4	1	2,6	4	16,7
1,5	8	21,1	3	7,9	4	16,7
2	3	7,9	18	47,4	12	50,0
3	1	2,6	14	36,8	4	16,7
Skupaj	38	100	38	100	24	100

Legenda: MIK_{DPC} – minimalna inhibitorna koncentracija daptomicina, VRE – iz angl.: vancomycin-resistant *Enterococcus* spp.

Na sliki 18 so prikazane vrednosti MIK bakterij *E. faecalis* in *E. faecium*. Med porazdelitvama minimalnih inhibitornih koncentracij daptomicina pri bakterijah *E. faecalis* in *E. faecium* lahko opazimo nekoliko razliko. Modre stolpce, ki prikazujejo vrednosti MIK *E. faecalis*, opazimo že pri nižjih koncentracijah antibiotika (0,25 µg/ml), segajo pa do 3 µg/ml, medtem ko se rdeči stolpci, ki prikazujejo vrednosti MIK *E. faecium*, pojavijo pri 0,75 µg/ml, segajo pa prav tako do 3 µg/ml.

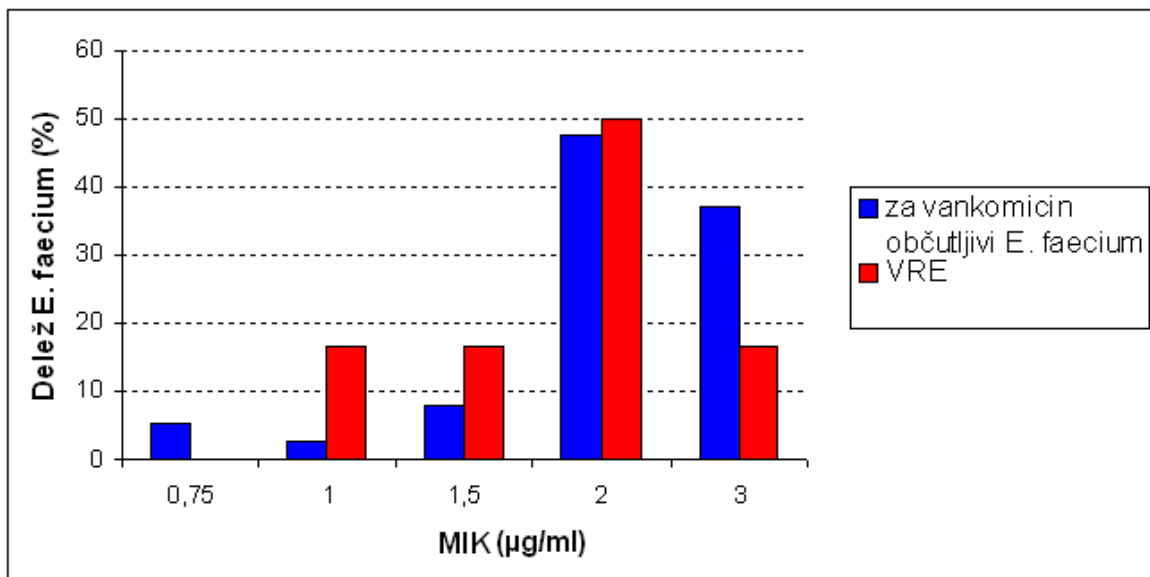


Slika 18: Število bakterij *Enterococcus faecalis* in *Enterococcus faecium* z določeno vrednostjo minimalne inhibitorne koncentracije (MIK; v µg/ml) daptomicina

Tudi v tem primeru smo s t-preizkusom preverili domnevo o enakih povprečnih vrednostih za log(MIK). Dobljeni povprečni log(MIK) za bakterije vrste *E. faecalis* je znašal 0,03, za *E. faecium* pa 0,33. Pri stopnji značilnosti 0,05 smo zavrnilni ničelno hipotezo, ki predpostavlja, da sta povprečji enaki, v korist alternativne hipoteze (povprečji se razlikujeta). Povprečni vrednosti za log(MIK) za *E. faecalis* in *E. faecium* se statistično značilno razlikujeta ($p < 0,001$). Na sliki 18 lahko opazimo, da je porazdelitev za *E. faecium* pomaknjena v desno, torej proti višjim vrednostim MIK.

Minimalne inhibitorne koncentracije daptomicina pri izolatih VRE so prikazane v preglednici 5. Vrednosti MIK se gibljejo od 1 µg/ml pa do 3 µg/ml, kar pomeni, da so bili tudi vsi testirani VRE občutljivi za antibiotik daptomicin. Polovica testiranih sevov je imela MIK 2 µg/ml, ostali so imeli vrednosti MIK enakomerno porazdeljene (pri 1 µg/ml, 1,5 µg/ml in 3 µg/ml).

Vsi testirani VRE so bili vrste *E. faecium*. Zanimalo nas je ali bo opaziti razliko v občutljivosti bakterij za daptomicin med za vankomicin občutljivimi in odpornimi bakterijami *E. faecium*. Na sliki 19 je grafično prikazana omenjena primerjava. Glede na to, da smo testirali različno število za vankomicin občutljivih ter odpornih *E. faecium*, smo primerjali deleže izolatov z določenimi vrednostmi MIK.



Slika 19: Primerjava deležev izolatov *Enterococcus faecium* (za vankomicin občutljivih in proti vankomicinu odpornih – VRE; iz angl: vancomycin-resistant *Enterococcus* spp.) pri posameznih vrednostih minimalne inhibitorne koncentracije (MIK; v µg/ml) daptomicina

Dobljeni povprečni log(MIK) pri *E. faecium*, ki so občutljivi za vankomicin je 0,33, pri VRE pa 0,26. V tem primeru smo obdržali ničelno domnevo, ki pravi, da sta vzorčni povprečji enaki ($p=0,10$).

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

V diplomski nalogi smo preverjali učinkovitost daptomicina na kliničnih izolatih stafilokokov in enterokokov. Občutljivost bakterij smo testirali s priporočeno metodo Etest (AB Biodisk, Solna, Švedska).

Naši rezultati so primerljivi z rezultati obsežnejših študij – grške (Mali in sod., 2008) ter ameriške študije (Barry in sod., 2001). Slednji so občutljivost kliničnih izolatov za daptomicin testirali z metodo mikrodilucije. MIK_{50} ter MIK_{90} pri posameznih vrstah bakterij, ki smo jih dobili na podlagi naših rezultatov (preglednica 3) so namreč podobni objavljenim. Pri za meticilin občutljivih *S. aureus* sta MIK_{50} oziroma MIK_{90} znašala 0,25 $\mu\text{g/ml}$ oziroma 0,5 $\mu\text{g/ml}$, kar se ujema z rezultati ameriške študije pri za oksacilin/meticilin občutljivih *S. aureus*. V naši raziskavi je bil MIK_{50} pri MRSA 0,5 $\mu\text{g/ml}$, MIK_{90} pa 0,75 $\mu\text{g/ml}$, v ameriški pa 0,25 $\mu\text{g/ml}$ oziroma 0,5 $\mu\text{g/ml}$. Pri *E. faecalis* sta bili vrednosti MIK_{50} v obeh študijah enaki, in sicer 1,0 $\mu\text{g/ml}$, MIK_{90} pa je bil v našem primeru 1,5 $\mu\text{g/ml}$, v ameriški študiji pa 2,0 $\mu\text{g/ml}$. Pri bakterijah vrste *E. faecium*, tako pri za vankomicin občutljivih, kot tudi odpornih, ni bilo opaznih razlik v vrednostih MIK_{50} ter MIK_{90} . V obeh raziskavah je bil MIK_{50} pri za vankomicin občutljivih in odpornih *E. faecium* 2,0 $\mu\text{g/ml}$, MIK_{90} pa je v naši raziskavi bil 3,0 $\mu\text{g/ml}$, v raziskavi Barry-ja in sod. (2001) pa 4,0 $\mu\text{g/ml}$. Glede na to, da je naša raziskava zajemala bistveno manjše število bakterijskih izolatov kot nekoliko starejša ameriška ter grška študija, objavljena leta 2008, smo lahko z dobljenimi rezultati zadovoljni, saj so precej podobni tujim. Pri manjšem vzorcu izolatov ima namreč vsak rezultat veliko večji vpliv na MIK_{50} ter MIK_{90} , kar bi lahko vodilo do napačno postavljenih zaključkov.

Vsekakor lahko na podlagi rezultatov testiranja občutljivosti stafilokokov in enterokokov za daptomicin potrdimo na začetku postavljeno hipotezo, da so pri nas izolati stafilokokov in enterokokov občutljivi za testirani antibiotik. Pri vseh testiranih bakterijah vrste *S. aureus* so bile vrednosti $MIK \leq 1 \mu\text{g/ml}$, pri testiranih enterokokih pa $\leq 3 \mu\text{g/ml}$.

Pri MRSA lahko v primerjavi z MSSA opazimo nekoliko višje vrednosti MIK. S t-testom smo ugotovili, da se povprečni vrednosti za log(MIK) daptomicina pri MSSA in MRSA statistično značilno razlikujeta. Pri MSSA je najvišji MIK znašal 0,5 µg/ml, medtem ko so bile vrednosti MIK pri MRSA razporejene vse do 1 µg/ml, ki predstavlja mejno vrednost, določeno za razlikovanje za daptomicin občutljivih sevov od odpornih (preglednica 4, slika 17). Kar 6 % testiranih MRSA je imelo MIK 1 µg/ml.

Pri enterokokih je bil največji MIK 3 µg/ml (preglednica 5, slika 18). Zaznali smo ga tako pri bakterijah vrste *E. faecalis* (pri < 3 % izolatov) kot tudi *E. faecium* (pri 37 % izolatov). Izolati *E. faecium* so imeli višje vrednosti MIK kot izolati *E. faecalis*. S t-testom smo ugotovili, da se povprečni vrednosti za log(MIK) daptomicina pri *E. faecalis* in *E. faecium* statistično značilno razlikujeta.

Vsi testirani VRE so bili občutljivi za antibiotik daptomicin, z največjo vrednostjo MIK 3 µg/ml (slika 19). Povprečni vrednosti za log(MIK) med za vankomicin občutljivimi sevi *E. faecium* in VRE (*E. faecium*) pa se statistično značilno ne razlikujeta.

Na podlagi rezultatov lahko zaključimo, da je antibiotik daptomicin primeren za zdravljenje bakterijskih okužb, predvsem tistih, ki jih povzročajo večkratno odporne bakterije. Zaradi hitrega nastanka odpornosti tudi proti novejšim antibiotikom, pa je priporočljiva smotrna uporaba le-teh. Predvsem je potrebno testirati in natančno spremljati občutljivost sevov iz kliničnih vzorcev za antibiotik daptomicin, saj imajo nekatere bakterije že mejne vrednosti MIK.

Vzrok za višje vrednosti MIK pri MRSA v primerjavi z MSSA in višje vrednosti MIK pri *E. faecium* v primerjavi z *E. faecalis*, bi morali še dodatno preveriti in raziskati. Raziskavo bi bilo potrebno izvesti pri večjem številu kliničnih izolatov, v primeru potrditve statistično značilnih razlik med primerjanimi bakterijami pa ugotoviti vzrok za nastanek le-teh. Morda so večje vrednosti MIK pri MRSA posledica sprememb v celični steni, pri enterokokih pa zaradi razlik v celični steni, ki bi lahko otežile daptomicinu dostop do celične membrane.

5.2 SKLEPI

- Vsi testirani stafilokoki, tako za meticilin občutljivi, kot odporni, ter enterokoki, za vankomicin občutljivi in odporni, so bili občutljivi za daptomicin. Vrednosti MIK testiranih stafilokokov so bile $\leq 1 \mu\text{g/ml}$, enterokokov pa $\leq 3 \mu\text{g/ml}$. Iz tega sklepamo, da je daptomicin tudi v našem okolju učinkovit za zdravljenje bakterijskih okužb, povzročenih s po Gramu pozitivnimi organizmi.
- Sevi MRSA so imeli statistično značilno višje vrednosti MIK kot MSSA.
- Vrednosti MIK so bile pri bakterijah vrste *E. faecium* višje kot pri bakterijah vrste *E. faecalis*. Razlika je statistično značilna.
- VRE vrste *E. faecium* niso imeli statistično značilnih višjih vrednosti MIK kot za vankomicin občutljivi *E. faecium*.
- Glede na to, da je daptomicin eden od novejših antibiotikov in je sedaj v uporabi le kot rezervni antibiotik, smo pričakovali in nato potrdili, da zaenkrat med sevi iz kliničnih vzorcev še ni takih, ki bi bili odporni proti daptomicinu.

6 POVZETEK

Odkritje antibiotikov predstavlja pomemben mejnik v razvoju in napredku medicine, saj je močno prispevalo k zmanjšanju zapletov zdravljenja bakterijskih okužb in umrljivosti zaradi infekcijskih bolezni. Kljub vsemu, pa je ravno pojav antibiotikov oziroma prekomerna in neupravičena uporaba le-teh prispevala k nastanku odpornosti bakterij, s katerimi se dandanes spopadajo številni znanstveniki. Resen problem predstavljajo predvsem večkratno odporne bakterije, za katere ostaja na voljo le še ozek izbor protimikrobnih sredstev. Med temi najpogostejše omenjamo proti meticilinu odporne izolate *S. aureus* – MRSA, proti vankomicinu odporne izolate enterokokov – VRE in nekatere druge.

Pomemben korak pri zmanjševanju bakterijske odpornosti in omejitvi širjenja okužb je hitro in zgodnje odkrivanje odpornih izolatov in smotrna uporaba antibiotikov. Pomembno je, da se za zdravljenje uporablja antibiotik čim ožjega spektra ter da zdravljenje poteka ustrezen čas s pravimi odmerki.

V primeru okužb z večkratno odpornimi bakterijami, zaradi odpornosti proti številnim antibiotikom, za zdravljenje posegamo po rezervnih antibiotikih, kar pa povečuje verjetnost za razvoj odpornosti tudi proti tem. Prav zaradi tega je potreba po odkrivanju vedno novih protimikrobnih sredstev zelo velika.

Lipopeptidni antibiotik daptomicin je pri nas na voljo kot rezervni antibiotik. Primeren je za zdravljenje okužb, povzročenih s po Gramu pozitivnimi bakterijami, tudi večkratno odpornimi. V Evropi je bil sprva odobren za zdravljenje zapletenih okužb kože in mehkih tkiv, nato pa še za zdravljenje bakteriemije in endokarditisa desne strani.

Daptomicin potrebuje za delovanje prisotnost prostih kalcijevih ionov. Koncentracija, ki omogoča optimalno določanje minimalne inhibitorne koncentracije in obenem ustreza fiziološki koncentraciji prostih Ca^{2+} v plazmi pri človeku, znaša 50 $\mu\text{g/ml}$.

V diplomski nalogi smo s priporočeno metodo Etest (AB Biodisk, Solna, Švedska) testirali 200 izolatov bakterijskih vrst *S. aureus*, *E. faecalis* in *E. faecium*, med njimi tudi večkratno odporne. Glede na obstoječe kriterije za opredeljevanje občutljivosti bakterij za daptomicin so bili vsi testirani izolati zanj občutljivi. To nakazuje, da je daptomicin primeren predvsem za zdravljenje bakterijskih okužb, pri katerih je zdravljenje oteženo zaradi odpornosti bakterij proti številnim antibiotikom, ki so sicer na voljo.

Poglavitno domnevo, ki smo jo želeli preveriti, smo torej potrdili. Vsi testirani izolati, ki smo jih izolirali iz kliničnih vzorcev, so bili občutljivi za daptomicin. V naslednjem koraku pa smo želeli preveriti še ali je mogoče zaznati razliko v občutljivosti bakterij za daptomicin med MSSA in MRSA, *E. faecalis* in *E. faecium* ter med za vankomicin občutljivimi in odpornimi *E. faecium* (VRE).

Pri bakterijah MSSA in MRSA ter *E. faecalis* in *E. faecium* smo opazili statistično pomembni razlike v povprečnih vrednostih MIK. Ti so bili pri bakterijah MRSA višji kot pri MSSA, pri bakterijah vrste *E. faecium* pa višji od vrednosti MIK pri bakterijah *E. faecalis*. Med za vankomicin občutljivimi *E. faecium* in VRE (tudi *E. faecium*) pa ni bilo statistično značilnih razlik.

Na podlagi rezultatov lahko torej zaključimo, da je antibiotik daptomicin v našem okolju primeren za zdravljenje okužb, ki jih povzročajo predvsem večkratno odporne bakterije. Občutljivost bakterij pri bolnikih, ki jih zdravimo z daptomicinom, pa je potrebno spremljati, ker imajo nekatere večkratno odporne bakterije že mejne vrednosti MIK.

7 VIRI

AB Biodisk. 2007. Etest for antimicrobial susceptibility testing. Solna. Sweden, AB Biodisk: 2 str.

Ball L.J., Goult C.M., Donarski J.A., Micklefield J., Ramesh V. 2004. NMR structure determination and calcium binding effects of lipopeptide antibiotic daptomycin. *Organic & Biomolecular Chemistry*, 2: 1872- 1878

Bamberger D.M. 2007. Bacteremia and endocarditis due to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: the potential role of daptomycin. *Therapeutics and Clinical Risk Management*, 3, 4: 675-684

Bannerman T.L., Peacock S.J. 2007. *Staphylococcus*, *Micrococcus*, and other catalase-positive cocci. V: *Manual of clinical microbiology*. Baron E.J., Landry M.L., Jorgensen J.H., Pfaller M.A. (eds.). Washington, D.C., ASM Press: 390-429

Barry A.L., Fuchs P.C., Brown S.D. 2001. *In vitro* activities of daptomycin against 2,789 clinical isolates from 11 north American medical centers. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 45, 6: 1919-1922

Becton, Dickinson and Company. 2007. BBL CRYSTAL™ Identification Systems Gram-Positive ID Kit. 2007. Sparks, Becton, Dickinson and Company: 6 str.

Beović B., Seme K. 2001. Novi antibiotik linezolid. V: *Mikrobi in antibiotiki 2001*. Mikrobiološki simpozij z mednarodno udeležbo, Ljubljana, 22.-23. jun. 2001. Mueller-Premru M., Gubina M. (ur.). Ljubljana, Medicinska fakulteta: 72- 79

Bolnišnica Golnik. 2008. Preprečevanje širjenja MRSA. Golnik, Bolnišnica Golnik, Klinični oddelek za pljučne bolezni in alergijo (26. maj 2008)

<http://www.klinika-golnik.si/dejavnost-bolnisnice/klinicna-dejavnost/datoteke/Navodila-za-preprecevanje-sirjenja-MRSA.pdf> (31. jul. 2008): 22 str.

Boucher H.W., Sakoulas G. 2007. Perspectives on daptomycin resistance, with emphasis on resistance in *Staphylococcus aureus*. *Clinical Infectious Diseases*, 45: 601-608

CLSI – Clinical and Laboratory Standards Institute. 2008. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; Eighteenth Informational Supplement. M100-S18. Winkler M.A. (ed.). Wayne. Pennsylvania, Clinical and Laboratory Standards Institute: 181 str.

Cottagnoud P., Pfister M., Acosta F., Cottagnoud M., Flatz L., Kühn F., Müller H.-P., Stucki A. 2004. Daptomycin is highly efficacious against penicillin-resistant and penicillin- and quinolone-resistant pneumococci in experimental meningitis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 48, 10: 3928-3933

Cui L., Tominaga E., Neoh H., Hiramatsu K. 2006. Correlation between reduced daptomycin and vancomycin resistance in vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 50, 3: 1079-1082

EARSS – European Antimicrobial Resistance Surveillance System. 2008. EARSS annual report 2007. Bilthoven, EARSS Management team: 156 str.

EMA – European Medicines Agency. 2007. Evropsko javno poročilo o oceni zdravila (EPAR) Cubicin – Povzetek EPAR za javnost. London, European medicines agency: EMA/H/C/632

<http://www.emea.europa.eu/humandocs/PDFs/EPAR/cubicin/2907006s11.pdf> (7. nov. 2008)

Enoch D.A., Bygott J.M., Daly M.-L., Karas J.A. 2007. Daptomycin. *Journal of Infection*, 55, 3:205-213

Euzéby J.P. 2008. List of procariotic names with standing in nomenclature. 2008. Toulouse. France, Society for Systematic and Veterinary Bacteriology
www.bacterio.net (25. jul. 2008)

Friedman L., Alder J.D., Silverman J.A. 2006. Genetic changes that correlate with reduced susceptibility to daptomycin in *Staphylococcus aureus*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 50, 6: 2137-2145

Fuchs P.C., Barry A.L., Brown S.D. 2000. Daptomycin susceptibility tests: interpretive criteria, quality control, and effect of calcium on in vitro tests. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease, 38: 51-58

Gordon R.J., Lowy F.D. 2008. Pathogenesis of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection. Clinical Infectious Disease, 46, 5: 350-359

Ihan A. 2002. Bakterijska celica. V: Medicinska bakteriologija z imunologijo in mikologijo. Gubina M., Ihan A. (ur.). Ljubljana, Medicinski razgledi: 3-15

Jorgensen J.H., Crawford S.A. 2006. Assessment of two commercial susceptibility test methods for determination of daptomycin MICs. Journal of Clinical Microbiology, 44, 6: 2126-2129

Jorgensen J.H., Turnidge J.D. 2007. Susceptibility test methods: dilution and disk diffusion methods. V: Manual of clinical microbiology. Baron E.J., Landry M.L., Jorgensen J.H., Pfaller M.A. (eds.). Washington, D.C., ASM Press: 1152- 1172

Jung D., Rozek A., Okon M., Hancock R.E.W. 2004. Structural transitions as determinants of the action of the calcium-dependent antibiotic daptomycin. Chemistry & Biology, 11: 949-957

Koch S., Hufnagel M., Theilacker C., Huebner J. 2004. Enterococcal infections: host response, therapeutic, and prophylactic possibilities. Vaccine, 22: 822-830

Košmelj K. 2001. Uporabna statistika. Ljubljana, Biotehniška fakulteta Univerza v Ljubljani: 249 str.

Kotnik V. 2001. Kje in kako delujejo antibiotiki v mikrobnih celicah. V: Mikrobi in antibiotiki 2001. Mikrobiološki simpozij z mednarodno udeležbo, Ljubljana, 22.-23. jun. 2001. Mueller-Premru M., Gubina M. (ur.), Ljubljana, Medicinska fakulteta: 17-25

Kotnik V. 2002. Antibiotiki in kemoterapevtiki. V: Medicinska bakteriologija z imunologijo in mikologijo. Gubina M., Ihan A. (ur.). Ljubljana, Medicinski razgledi: 427-438

Laganas V., Alder J., Silverman J.A. 2003. *In vitro* bactericidal activities of daptomycin against *Staphylococcus aureus* and *Enterococcus faecalis* are not mediated by inhibition of lipoteichoic acid biosynthesis. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 47, 8: 2682-2684

Malli E., Spiliopoulou I., Kolonitsiou F., Klapsa D., Giannitsioti E., Pantelidi K., Pratti A., Panopoulou M., Grapsa S., Alepopoulou E., Neonakis I., Frantzidou F., Alexiou-Daniel S., Bakola D., Koutsia-Carouzou C., Malamou-Lada H., Zerva L., Vlahaki E., Kartali-Ktenidou S., Anastassiou E.D., Petinaki E. 2008. *In vitro* activity of daptomycin against Gram-positive cocci: the first multicentre study in Greece. International Journal of Antimicrobial Agents, 32: 525-528

Mascio C.T.M., Alder J.D., Silverman J.A. 2007. Bactericidal action of daptomycin against stationary-phase and nondividing *Staphylococcus aureus* cells. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 51, 12: 4255-4260

Montero C.I., Stock F., Murray P.R. 2008. Mechanisms of resistance to daptomycin in *Enterococcus faecium*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 52, 3: 1167-1170

Moreillon P., Que Y.-A., Glauser M.P. *Staphylococcus aureus* (including Staphylococcal toxic shock). V: Mandell, Douglas, and Bennett's principles and practice of infectious

diseases. Mandell G.L., Bennett J.E., Dolin R. (eds.), Philadelphia, Elsevier inc.: 2321-2351

Mueller-Premru M. 2001. Mehanizmi odpornosti pri po Gramu pozitivnih bakterijah. V: Mikrobi in antibiotiki 2001. Mikrobiološki simpozij z mednarodno udeležbo, Ljubljana, 22.-23. jun. 2001. Müller-Premru M., Gubina M. (ur.), Ljubljana, Medicinska fakulteta: 27-37

Mueller-Premru M., Seme K. 2003. Določanje občutljivosti bakterij za antibiotike-antibiogram. V: Priročnik za vaje iz mikrobiologije in imunologije za študente medicine. Gubina M., Mueller-Premru M. (ur.), Ljubljana, Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete v Ljubljani: 99-106

Murray B.E. 2000. Vancomycin- resistant enterococcal infections. New England Journal of Medicine, 342, 10: 710-721

Novartis Pharma Services Inc. 2006. Cubicin: povzetek glavnih značilnosti zdravila, Ljubljana, Novartis Pharma Services Inc.

http://ec.europa.eu/enterprise/pharmaceuticals/register/2006/2006011910787/anx_10787_sl.pdf (2. mar. 2009): 23 str.

Novartis Pharma Services Inc. 2008. Testiranje občutljivosti mikroorganizmov za zdravilo Cubicin (daptomicin). Ljubljana, Novartis Pharma Services Inc: 4 str.

Oleson F.B., Berman C.L., Kirkpatrick J.B., Regan K.S., Lai J.-J., Tally F.P. 2000. Once-daily dosing in dogs optimizes daptomycin safety. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 44, 11: 2948-2953

Ribič H., Grmek-Košnik I., Kramar Z., Rus I. 2007. Naše izkušnje s proti vankomicinu odpornim enterokokom v Splošni bolnišnici Jesenice. Zdravstveni vestnik, 76: 701-707

Rice L.B., Bonomo R.A. 2007. Mechanism of resistance to antibacterial agents. V: Manual of Clinical Microbiology. Baron E.J., Landry M.L., Jorgensen J.H., Pfaller M.A. (eds.). Washington, D.C., ASM Press: 1114-1145

Richter S.S., Ferraro M.J. 2007. Susceptibility testing instrumentation and computerized expert systems for data analysis and interpretation. V: Manual of Clinical Microbiology. Baron E.J., Landry M.L., Jorgensen J.H., Pfaller M.A. (eds.). Washington, D.C., ASM Press: 245-256

Sader H.S., Watters A.A., Fritsche T.R., Jones R.N. 2007. Daptomycin antimicrobial activity tested against methicillin-resistant staphylococci and vancomycin-resistant enterococci isolated in European medical centers (2005). BMC Infectious Disease, 7: 29

Safdar N., Andes D., Craig W.A. 2004. In vivo pharmacodynamic activity of daptomycin. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 48, 1: 63-68

Seme K. 2002a. Mehanizmi bakterijske odpornosti proti antibiotikom. V: Medicinska bakteriologija z imunologijo in mikologijo. Gubina M., Ihan A. (ur.). Ljubljana, Medicinski razgledi: 439- 446

Seme K. 2002b. Stafilokoki. V: Medicinska bakteriologija z imunologijo in mikologijo. Gubina M., Ihan A. (ur.). Ljubljana, Medicinski razgledi: 139-145

Seme K. 2002c. Streptokoki. V: Medicinska bakteriologija z imunologijo in mikologijo. Gubina M., Ihan A. (ur.). Ljubljana, Medicinski razgledi: 147-153

Shoemaker D.M., Simou J., Roland W.E. 2006. A review for injection (Cubicin) in the treatment of complicated skin and skin structure infections. Therapeutical and clinical risk management, 2, 2: 169-174

Silverman J.A., Perlmuter N.G., Shapiro H.M. 2003. Correlation of daptomycin bactericidal activity and membrane depolarization in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 47,8: 2538-2544

Steenbergen J.N., Alder J., Thorne G.M., Tally F.P. 2005. Daptomycin: a lipopeptide antibiotic for the treatment of serious Gram-positive infections. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 55: 283-288

Straus S.K., Hancock R.E.W. 2006. Mode of action of the new antibiotic for Gram-positive pathogens daptomycin: Comparison with cationic antimicrobial peptides and lipopeptides. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1758: 1215-1223

Streit J.M., Jones R.N., Sader H.S. 2004. Daptomycin activity and spectrum: a worldwide sample of 6737 clinical Gram-positive organisms. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 53: 669-674

Swenson J.M., Patel J.B., Jorgensen J.H. 2007. Special phenotypic methods for detecting antibacterial resistance. V: *Manual of clinical microbiology*. Baron E.J., Landry M.L., Jorgensen J.H., Pfaller M.A. (eds.). Washington, D.C., ASM Press: 1173-1192

Tally F.P., DeBruin M.F. 2000. Development of daptomycin for gram-positive infections. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 46: 523-526

Teixeira L.M., Carvalho M., Facklam R.R. 2007. Enterococcus. V: *Manual of clinical microbiology*. Baron E.J., Landry M.L., Jorgensen J.H., Pfaller M.A. (eds.). Washington, D.C., ASM Press: 430-442

Walsh C. 2003. Antibiotic resistance by replacement or modification of the antibiotic target. V: *Antibiotics, actions, origins, resistance*. American Society for Microbiology (ed.). Washington, ASM Press: 143-156

Zurenko G.E., Gibson J.K., Shinabarger D.L., Aristoff P.A., Ford C.W., Tarpley W.G.
2001. Oxazolidinones: a new class of antibacterials. *Current Opinion in Pharmacology*, 1,
5:470-476

ZAHVALA

V prvi vrsti se iskreno zahvaljujem mentorici prof. dr. Manici Müller-Premru, ker mi je omogočila izvajanje diplomske naloge, si vedno vzela čas za moja vprašanja, me prijazno in strokovno vodila ter svetovala pri izdelovanju le-te.

Iskrena hvala tudi prof. dr. Evi Ružič-Sabljic za recenzijo diplomskega dela, koristne napotke in vse prijazne besede.

Za pomoč in nasvete na statističnem področju se zahvaljujem prof. dr. Katarini Košmelj.

Zahvala je namenjena tudi sodelavkam v Laboratoriju za hemokulture in druge urgentne preiskave na Inštitutu za mikrobiologijo in imunologijo v Ljubljani za prijazen sprejem medse, nasvete pri izvedbi praktičnega dela diplomske naloge in vsestransko podporo.

Najlepša hvala tudi staršem, Katji in Mitju za potrpežljivost, skrb in zaupanje. Z vami je bilo vse lažje.

Hvala vsem kolegom in prijateljem, ki so mi bili blizu, me spremljali in spodbujali skozi čas študija.