

# Hlavní mechanismy rezistence. In vitro testování citlivosti a rezistence.



Základy antimikrobiální terapie – VSAT081

Týden 4

Ondřej Zahradníček

# Rezistence mikrobů na antimikrobiální látky

- Primární rezistence: všechny kmeny daného druhu jsou rezistentní. Příklad: betalaktamová atb nepůsobí na mykoplasmata, která vůbec nemají buněčnou stěnu.
- Sekundární rezistence: vznikají necitlivé mutanty, a ty při selekčním tlaku antibiotika začnou převažovat. (Escherichie mohou být citlivé na ampicilin, ale v poslední době výrazně přibývá rezistentních kmenů)

# Mechanismy rezistence I

- Mikrob zabrání vniknutí antibiotika do buňky
- Mikrob aktivně vypuzuje atb z buňky
- Mikrob změní cílový receptor nebo nabídne antibiotiku falešný receptor
- Mikrob prodělá metabolické změny, jež atb zabrání vyvinout účinek v obvyklých cílových strukturách
- Mikrob enzymaticky štěpí antibiotikum (například betalaktamázy štěpí betalaktamová antibiotika)



# Mechanismy rezistence II: vzájemné rozdíly mezi nimi

- Některé rezistence jsou kódovány chromozomálně
- Jiné naopak plasmidově, přičemž plasmidy mohou být předávány vnitro- i mezidruhově
- Některé jsou typu „bud’ – anebo“, zpravidla nejsou překonatelné zvýšeným dávkováním antibiotika
- Jiné naopak znamenají kvantitativně vyjádřitelné zhoršení citlivosti, vyšší dávka může rezistenci překonat (často např. u aminoglykosidů)
- U druhé skupiny je obtížné genotypové určení

# Mechanismy rezistence:

## I. Betalaktamová antibiotika

- Změna penicilin-vázajících proteinů (penicilin binding proteins, PBP), např. u MRSA (*podrobněji příště*)
- Snížená permeabilita membrány
- Produkce betalaktamáz, například:
  - Stafylokokové penicilinázy
  - Penicilinázy enterobakterií
  - Cefalosporinázy různých mikrobů
  - Širokospektré betalaktamázy (*podrobněji příště*)

# Betalaktamázy

- Existuje jich různé typy, mohou být účinné proti všem či většině betalaktamových atb či jen proti některým z nich
- Mohou být kódovány chromozomálně i plasmidově
- Principem je vždy rozštěpení betalaktamového kruhu

*Tabulku na následující straně uvádím jen pro ilustraci, je to jen jedno z možných členění. Je opsaná ze „Simona a Stilleho“, kteří ji zase převzali z „Animikrob. Ag. Chemother., 33, 1989, 271)*

# Klasifikace betalaktamáz dle Bushe

Charakteristika	Příklady
Enzymová skupina 1	
Cefalosporinázy (neinhibované kys. klavul.)	Chromosomy, u pseudo- monád a enterobakterů
Enzymová skupina 2	
Penicilizázy/cefalosporinázy (inhib. kys. klavulanovou)	Plasmidy i chromozomy, u klebsiel a stafylokoků
Enzymová skupina 3	
Metalobetalaktamázy	G- nefermentující, účinkují i na karbapenemy
Enzymová skupina 4	
Penicilinázy, neinh. k. klav.	Chromosomální, <i>B. cepacia</i>

## Mechanismy rezistence:

### II. Aminoglykosidy a makrolidy

- Snížená vazba na cílové ribozomy
- Snížená permeabilita buněčné stěny
- Produkce inaktivujících enzymů

## Mechanismy rezistence:

### III. Chloramfenikol

- Snížená vazba na ribozomy
- Snížená permeabilita
- Produkce chloramfenikol-acetyltransferázy



# Mechanismy rezistence:

## IV. Tetracykliny

- Nedostupnost cílových ribozomů
- Aktivní buněčný eflux (vylučování atb z buňky)

# Mechanismy rezistence:

## V. Chinolony

- Rezistence DNA-gyrázy
- Snížená permeabilita pro antibiotikum
- Aktivní buněčný eflux

# Mechanismy rezistence:

## VI. Sulfonamidy, trimetoprim

- Rezistence syntetázy kyseliny dihydrolistové
- Rezistence reduktázy kyseliny dihydrolistové
- Snížená permeabilita



# Další důvod in vitro neúčinnosti: Bakterie v biofilmu

*Následujících několik obrazovek je převzato,  
přeloženo a upraveno z prezentace mé  
kolegyně:*

MUDr. Lenka Černohorská, PhD.:  
Antimicrobial resistance of biofilm-  
forming bacteria

# Stádia rozvoje biofilmu

- Přímý kontakt planktonických bakterií s povrchem 

- Přilnutí na tento povrch 

- Adhese, růst a shlukování bakterií do mikrokolonií 

- Produkce polymerické matrix 

- Vytvoření třidimenzionální struktury známé jako biofilm 

# Hlavní význam tvorby biofilmu

- Bakterie v biofilmu jsou chráněny proti
  - účinku antibiotika
  - imunitní odpovědi hostitele
  - desinfekci

*Biofilm je i  
slizká vrstva na  
kameni v potoku*



# Neúčinnost antibiotik může být způsobena

- Polyanionickým nábojem usazených buněk
- Sníženým množením bakterií
- Difusní bariérou glykokalyxu
- Reakcí s matrix biofilmu
- Tvorbou chráněných fenotypů
- Mechanismy intercelulární signalizace (quorum sensing)
- Vlivem imunitní odpovědi hostitele

**Příklad: citlivost kmene**  
***Staphylococcus aureus* číslo 351**

351	MIC	MBIC
amp/sulbact.	0,125*	2*
tetracyklin	2*	64
klindamycin	2*	32
ofloxacin	0.25*	>8
teikoplanin	0.031*	>8
vankomycin	0.5*	4*

\* Citlivé dle konvenčního stanovení MIC

# Řešení

- Myslet na reálnou skutečnost, že bakterie nežijí jen v planktonické formě, ale i ve formě biofilmu (zejména u některých typů infekcí)
- Využívat synergických kombinací antibiotik
- Vedle MIC vyšetřovat i MBIC, a to nejen na jednotlivá atb, ale i na kombinace

*Tato problematika je v současnosti předmětem výzkumných úkolů. Realitou je i to, že in vivo může být terapie úspěšná i tam, kde podle in vitro stanovení MBIC by být neměla*



# Metody zjišťování citlivosti in vitro

- Zjišťování citlivosti in vitro = v laboratoři
  - Nezaručí stoprocentní účinnost léčby
  - Přesto vhodné u většiny nálezů kultivovatelných patogenních bakterií
- 
- V běžných případech kvalitativní testy (citlivý - rezistentní)
  - U závažných pacientů kvantitativní (zjišťujeme MIC)

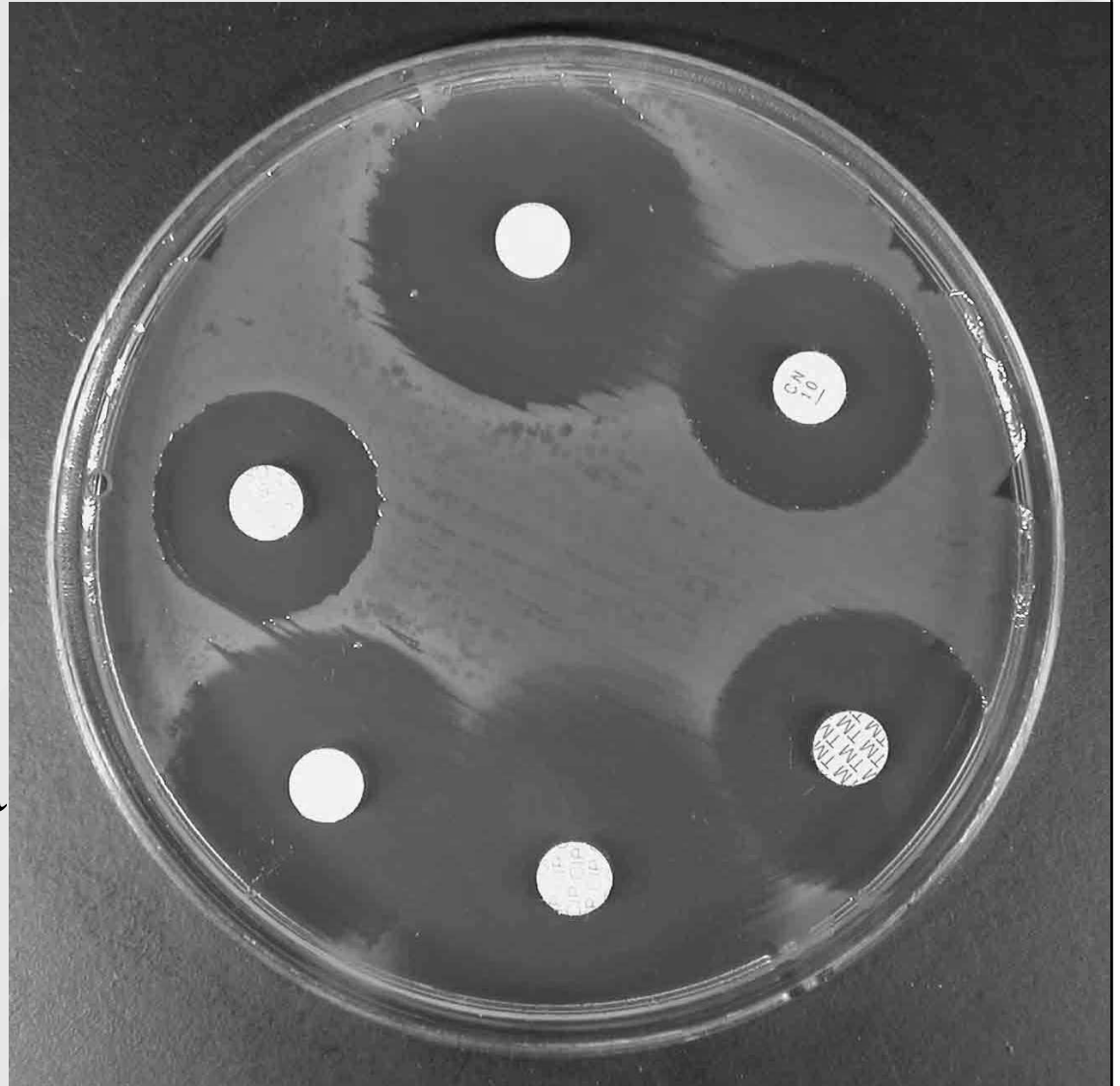


# Difúzní diskový test

- Na MH (nebo jiný) agar se štětičkou plošně naočkuje suspenze bakterie
- Pak se nanášejí tzv. antibiotické disky – papírky napuštěné antibiotikem
- Atb difunduje (prostupuje) z disku agarem dál
- Koncentrace atb klesá se vzdáleností od disku
- Pokud mikrob roste až k disku, nebo má jen malou zónu, je rezistentní (necitlivý)
- Je-li kolem disku dost velká zóna citlivosti (větší než stanovená hranice), je citlivý.

# Difúzní diskový test

- Tato pseudomonáda, stejně jako enterobakterie, stafylokoky či enterokoky, roste na běžném MH agaru. Zato streptokoky, neisserie, G<sup>+</sup> tyčky a jiné se musí testovat na jiných půdách.

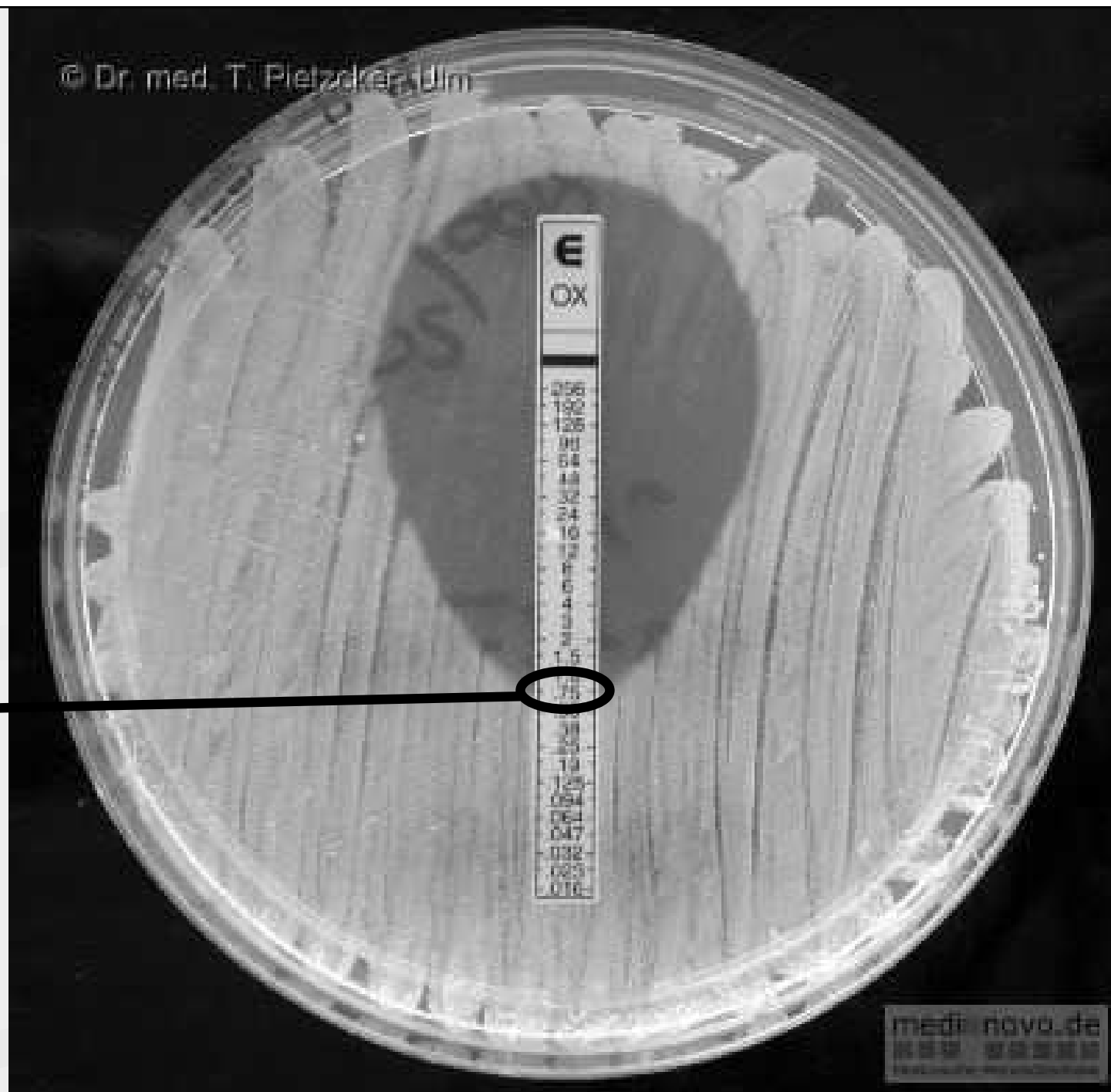


# E-testy

- Podobné v principu difúznímu diskovému testu
- Místo disku se však použije proužek
- V proužku stoupající koncentrace atb od jednoho konce ke druhému (získáno díky speciální technologii – proto jsou tak drahé)
- Zóna není kruhová, ale vejčitá.
- Test je kvantitativní
- Na papírku je stupnice – jednoduché odečítání  
(viz obrázek na další obrazovce)

# E-test: ukázka

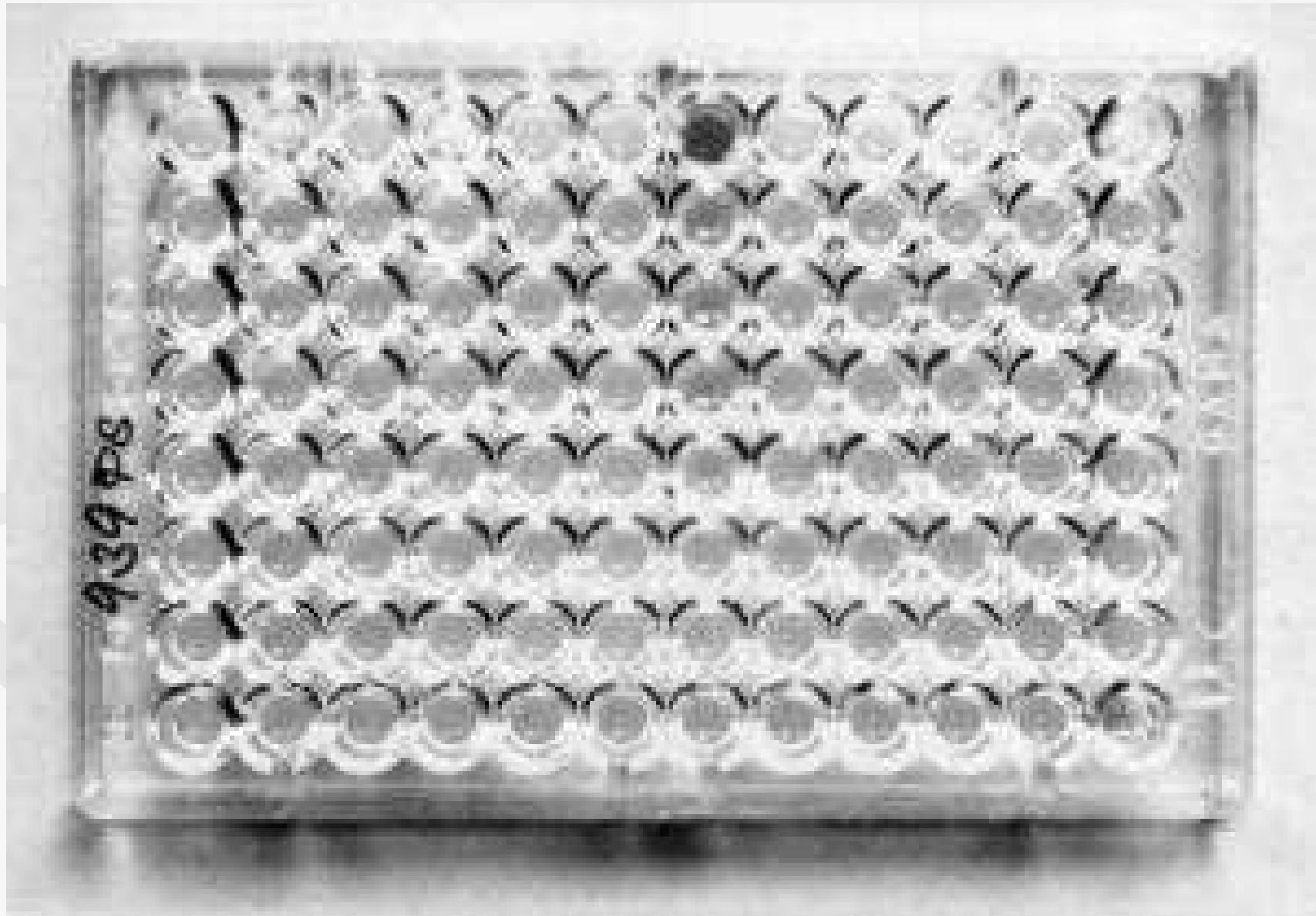
- Hodnota MIC je v tomto případě 0,75 mg/l (tam, kde okraj zóny kříží stupnici)



# Mikrodiluční test

- Atb je v řadě důlků v plastové destičce, koncentrace postupně klesá
- Nejnižší koncentrace, která inhibuje růst, představuje hodnotu MIC
- V přiložené šabloně je zpravidla označen breakpoint. Je-li MIC nižší než breakpoint, je kmen citlivý. Je-li MIC vyšší, je rezistentní
- Jedna destička se zpravidla použije pro jeden kmen, např. 12 antibiotik, každé v 8 různých koncentracích (*přesněji: dvanácté jen v sedmi, rohový důlek vpravo nahore je kontrola růstu*)

# Mikrodiluční test – ukázka



# Interpretace stanovení MIC

- Ideální je nastolit stav aktivní spolupráce klinického oddělení a mikrobiologie
- Pokud se stanovení MIC používá jen kvalitativně (jako „lepší diskový test“), je to škoda
- Klinik by měl chtít vědět, jaký je poměr mezi MIC a breakpointem pro jednotlivá antibiotika, a při výběru ATB volit i podle tohoto poměru.
- Na druhé straně, konečný výběr antibiotika je na klinikovi – mikrobiolog nezná další souvislosti (alergie, stav jater a ledvin pacienta apod.)



# Interpretace testu I

<b>64</b>	<b>Model šablony mikrodil. testu</b>	<b>64</b>	<input type="radio"/>	<b>Kmen</b>	<b>64</b>	<input type="radio"/>	<b>Kmen</b>	
<b>32</b>		<b>32</b>	<input type="radio"/>	<b>jasně</b>	<b>32</b>	<input type="radio"/>	<b>sice</b>	
<b>16</b>		<b>16</b>	<input type="radio"/>	<b>citlivý</b>	<b>16</b>	<input type="radio"/>	<b>citlivý,</b>	
<b>8</b>		<b>8</b>	<input type="radio"/>	<b>MIC je</b>	<b>8</b>	<input type="radio"/>	<b>ale je-li</b>	
<b>4</b>		<b>Break- point je roven 8</b>	<b>4</b>	<input type="radio"/>	<b>mnohem</b>	<b>4</b>	<input type="radio"/>	<b>mikrob</b>
<b>2</b>			<b>2</b>	<input type="radio"/>	<b>nižší než</b>	<b>2</b>	<input checked="" type="radio"/>	<b>ve tkáni,</b>
<b>1</b>			<b>1</b>	<input type="radio"/>	<b>break-</b>	<b>1</b>	<input checked="" type="radio"/>	<b>nemusí</b>
<b>0,5</b>			<b>0,5</b>	<input type="radio"/>	<b>point</b>	<b>0,5</b>	<input checked="" type="radio"/>	<b>to stačit</b>
			<b>0,5</b>	<input checked="" type="radio"/>		<b>0,5</b>	<input checked="" type="radio"/>	

# Interpretace testu II



# Kdy nestačí „citlivost“

- U močových infekcí by nás měl zajímat breakpoint odvozený od koncentrací dosažitelných v moči, nikoli v séru. (U většiny močových infekcí se ovšem MIC nezjišťuje)
- U abscesů, procesů v kostech a zejména u meningitid: breakpointy jsou vyjádřením koncentrace atb především v séru, a že v různých místech těla mohou být mnohem nižší
- Je také nutno počítat s tím, že mikroby mohou existovat ve formě biofilmu – nutno určovat hodnoty např. minimální biofilm eradikující konc.

# Určování MBIC a MBEC

- Hodnoty MBIC (minimální biofilm inhibující koncentrace), popř. MBEC (minimální biofilm eradikující koncentrace) se měří speciálními, zatím jen výzkumně prováděnými postupy. V podstatě jde o kombinaci mikrodilučního testu s tzv. Christensenovou metodou, kde se biofilm vizualizuje krystalovou violetí .



# Zjišťování faktorů rezistence

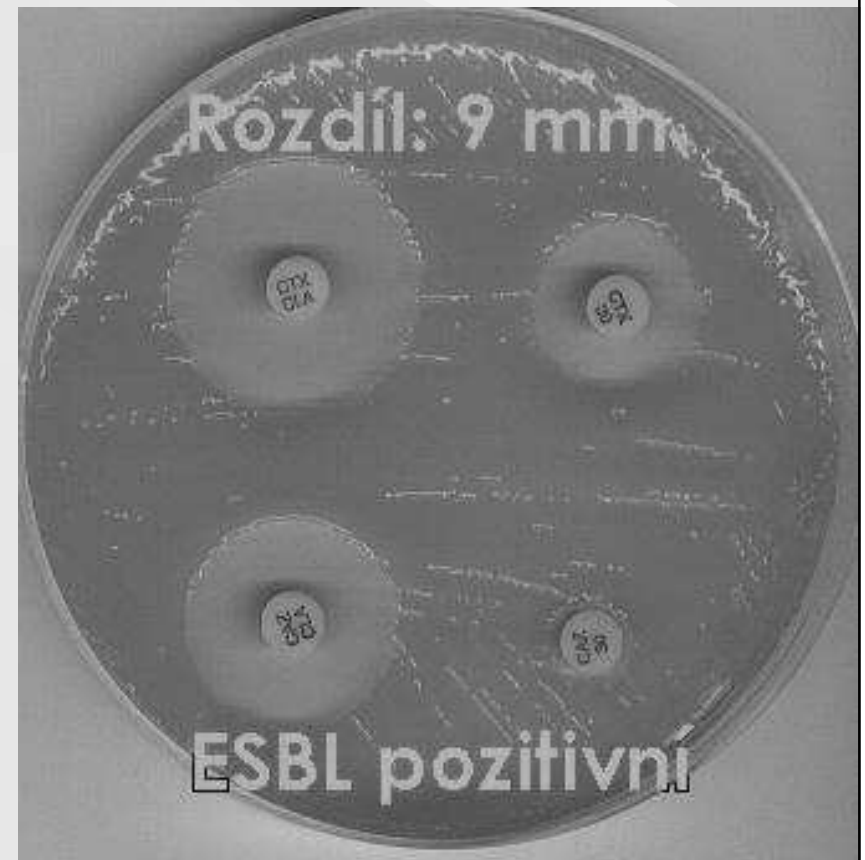
- Někdy je lépe speciálními metodami zjišťovat přítomnost konkrétních faktorů rezistence, např. betalaktamáz.
- Může se jednat o diagnostické proužky (chemický průkaz daného enzymu) nebo testy na jiném principu.
- Používá se zejména tam, kde testy citlivosti nedávají spolehlivé výsledky (z různých důvodů, např. nepůsobí testovaná látka přímo, ale jeho metabolit, a podobně)

# Testování kmenů na produkci běžných betalaktamáz

- Používá se tam, kde výsledek difusního diskového testu, popř. ani mikrodilučního testu není spolehlivý
- Zejména se to týká
  - neisserií (penicilin)
  - *Moraxella catarrhalis* (ampicilin)
  - *Haemophilus influenzae* (ampicilin)
- Provedení testu je stejné jako u biochemických identifikačních testů (oxidázový test)

# Testování na produkci širokospektrých betalaktamáz

- U širokospektrých betalaktamáz má inhibitor betalaktamázy (např. kyselina klavulanová) svůj účinek, i když není dle dostupných údajů dostatečný pro léčbu in vitro. Lze ho však využít – činí-li rozdíl mezi zónami kolem disků cefotaximu (ceftazidimu) bez inhibitoru a s ním více než pět milimetrů, je kmen považován za producenta (širokospektré)  $\beta$ -laktamázy.



Děkuji za  
pozornost

Použitá literatura:

C. Simon, W. Stille:  
Antibiotika v současné  
lékařské praxi.

O. Lochmann: Stručný  
průvodce léčbou  
antibiotiky a  
chemoterapeutiky

