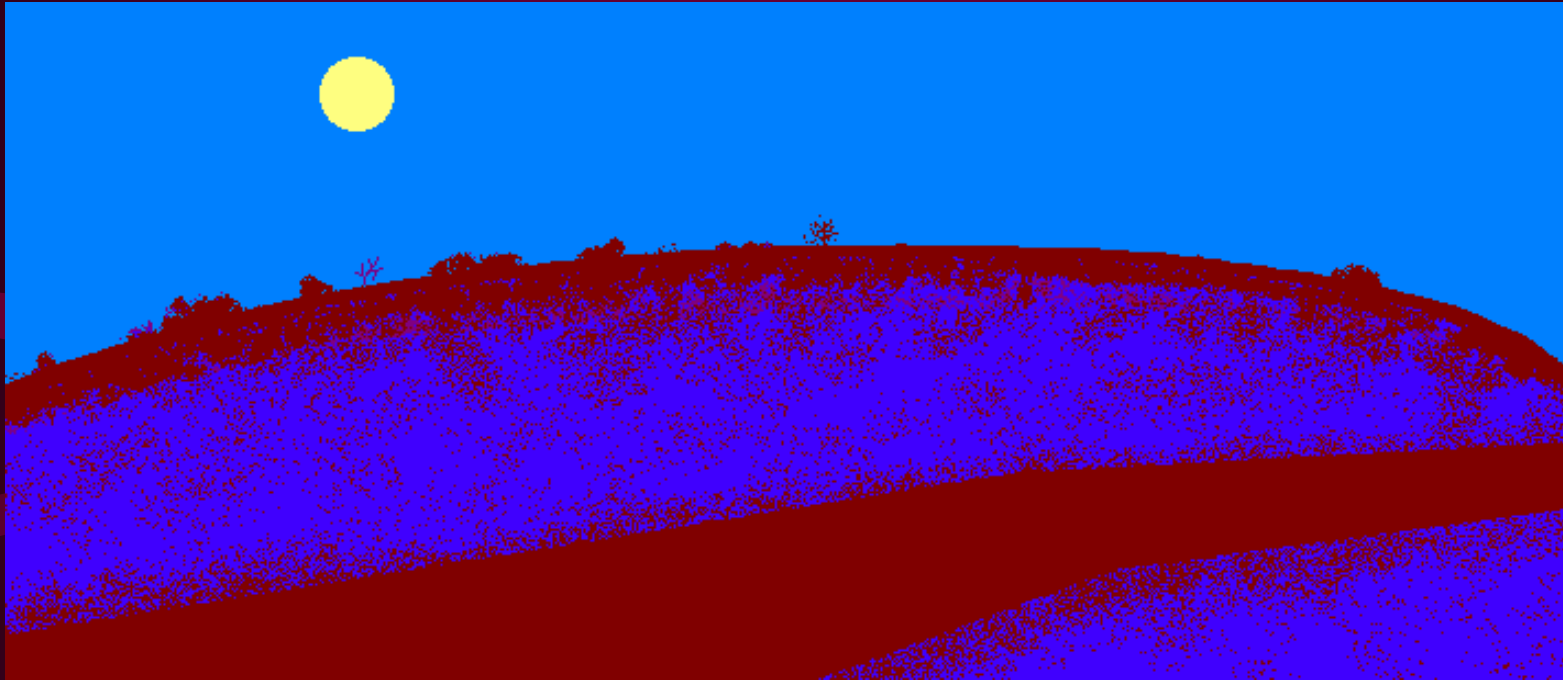


Hlavní mechanismy rezistence.

In vitro testování citlivosti a rezistence.



Základy antimikrobiální terapie – VSAT081

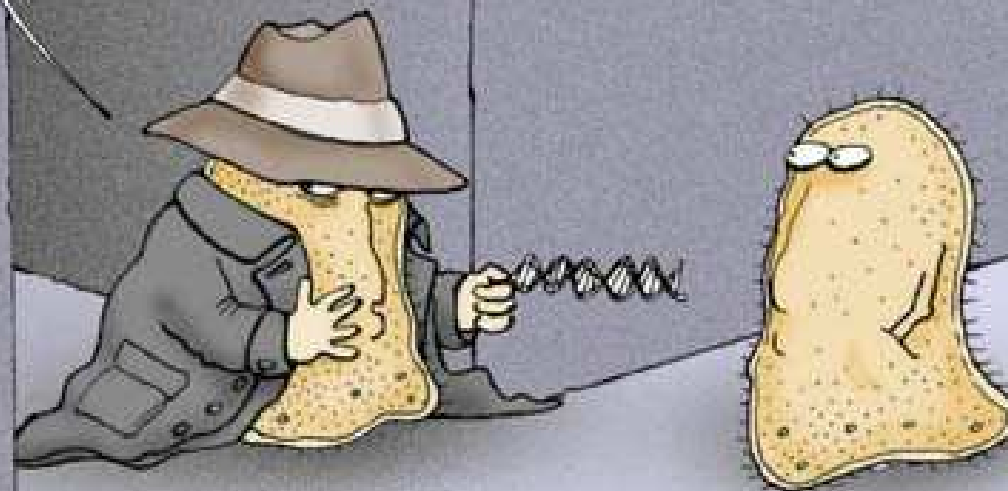
Týden 4

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)

Pssst! Hey kid! Wanna be a Superbug...?
Stick some of this into your genome...
Even penicillin won't be able to harm you...!



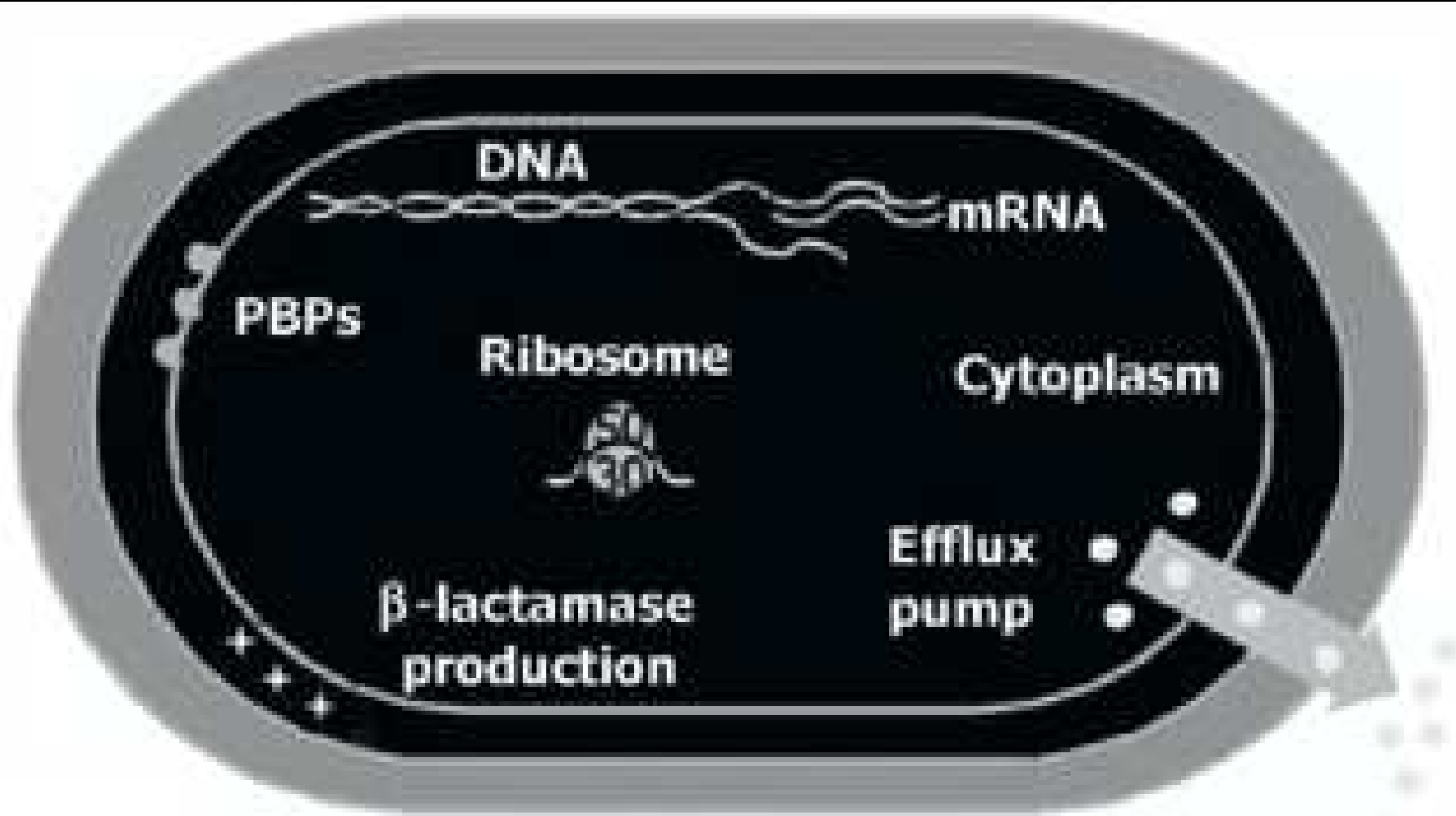
http://www.nearingzero.net/screen_res/nz149.jpg

INCK

It was on a short-cut through the hospital kitchens that Albert was first approached by a member of the Antibiotic Resistance.

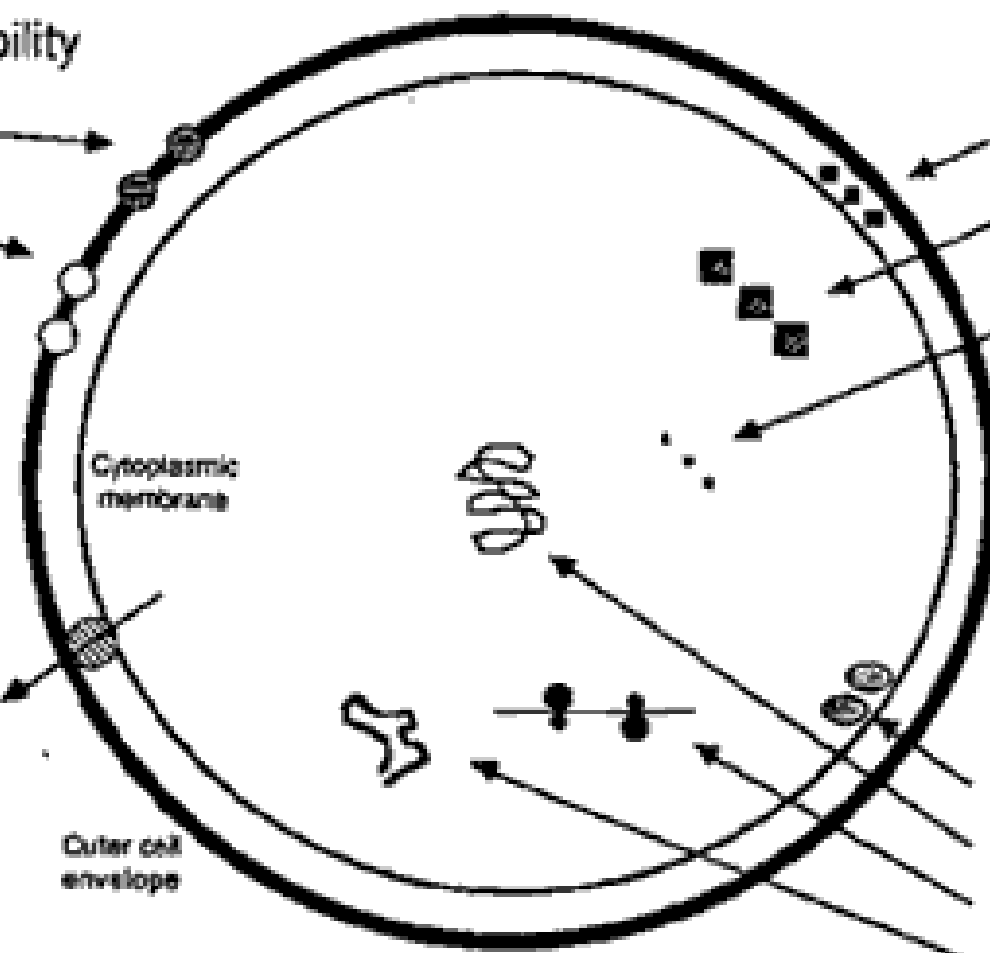
Mechanismy rezistence I

- 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)



(1) Decreased Permeability

Permeability barrier
Porin channels



Inactivating Enzymes (2)

Beta-lactamases
Aminoglycoside modifying enzymes
Esterases and acetyltransferases

(4) Active Efflux

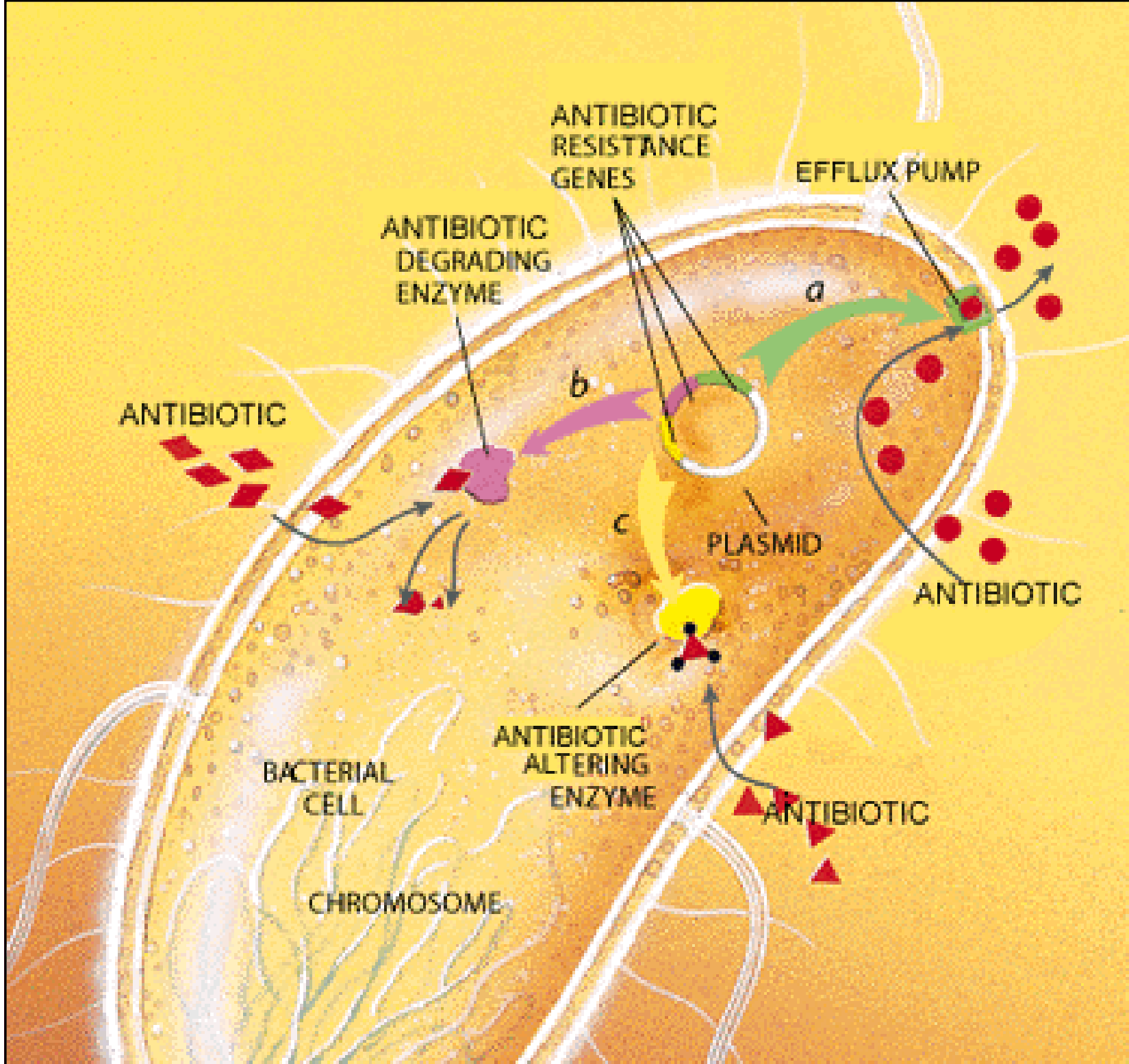
Cytoplasmic membrane
Outer cell envelope

Altered Target Sites (3)

Penicillin-binding proteins
DNA gyrase
Ribosomes
RNA polymerase and DHFR

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**



<http://www.adrian.edu/chemistry/th/Somelinks/Spages/jtessmer/why.php>

Mechanismy rezistence:

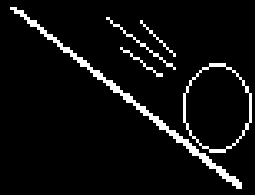
I. Betalaktamová antibiotika

- 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*)

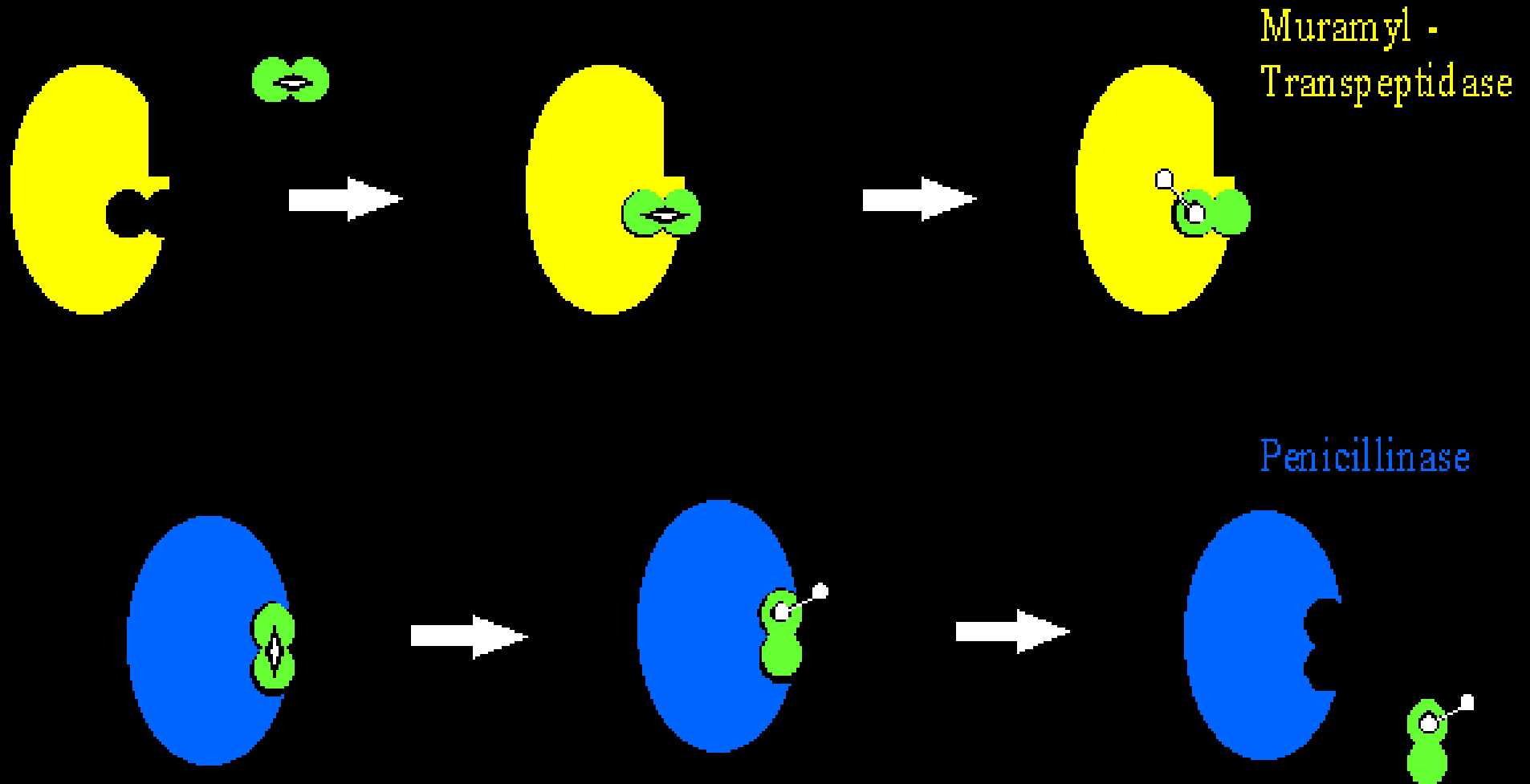
Betalaktamázy

- 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)

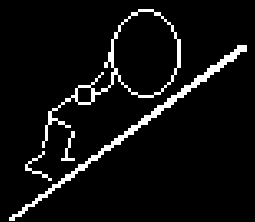
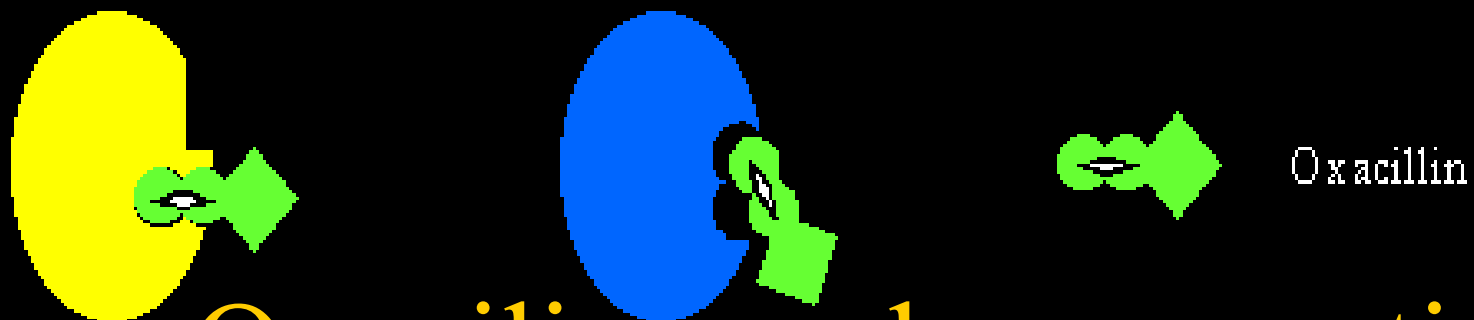
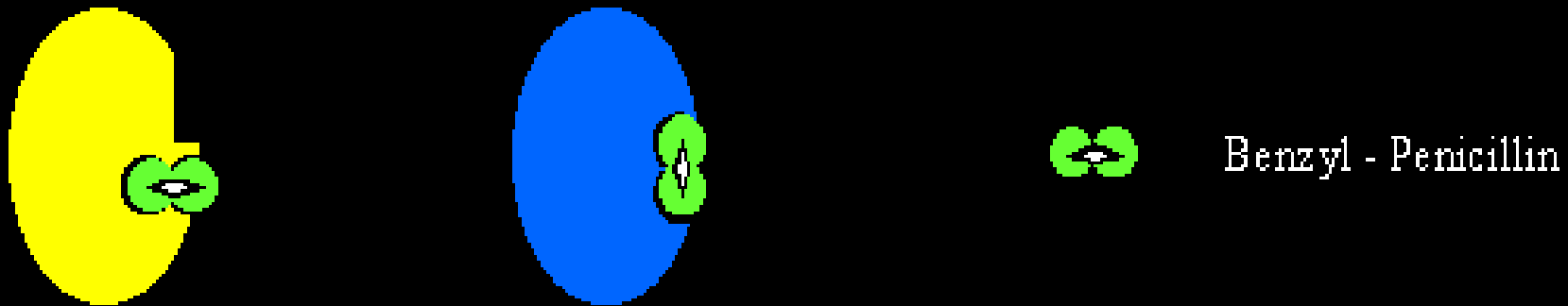


Resistenz gegen Penicillin: Die Penicillinase spaltet Penicillin, ohne irreversibel mit ihm zu reagieren



Penicilináza – první betalaktamáza

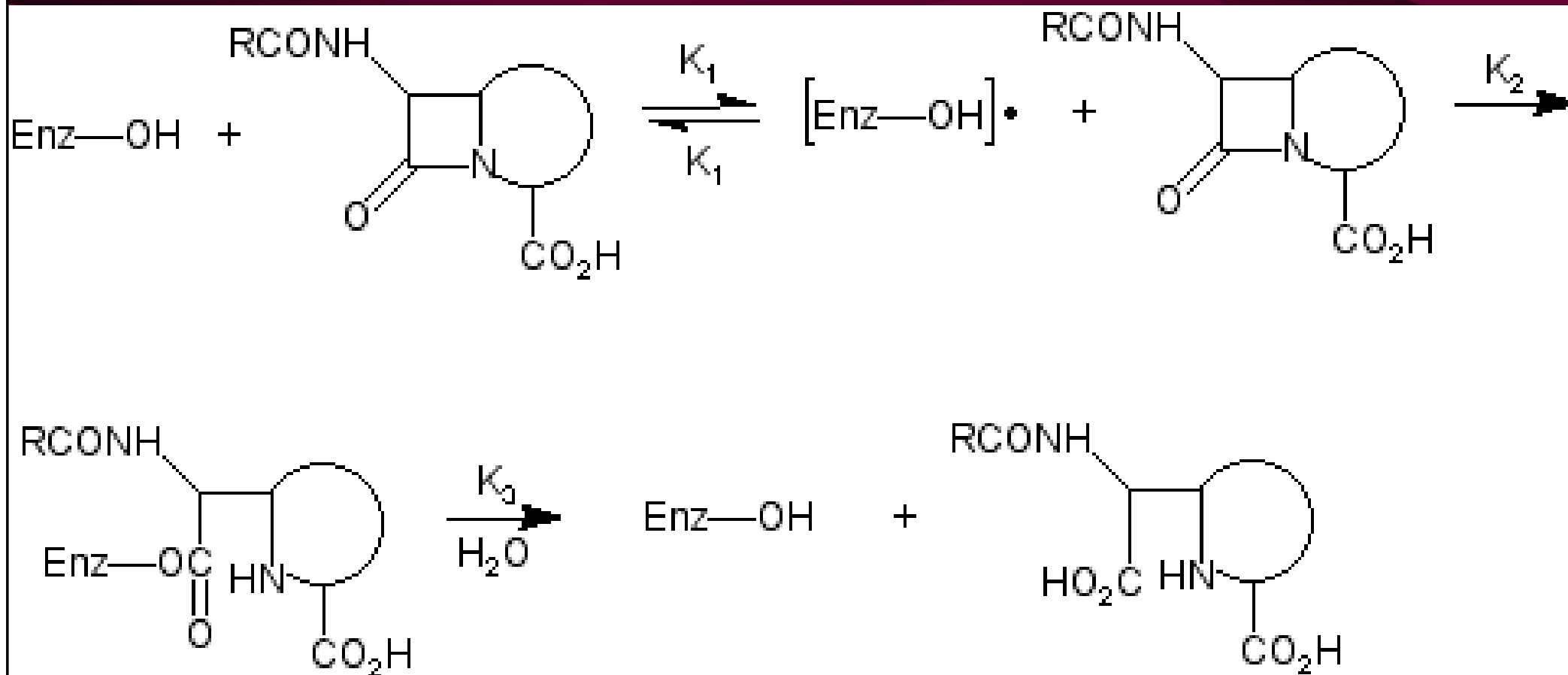
Schutz des Penicillin - Moleküls vor der Penicillinase
durch chemische Veränderung; z.B. Oxacillin.
B: das Prinzip.



**Oxacillin – ochrana proti
stafylokokové penicilináze**

Funkce betalaktamázy

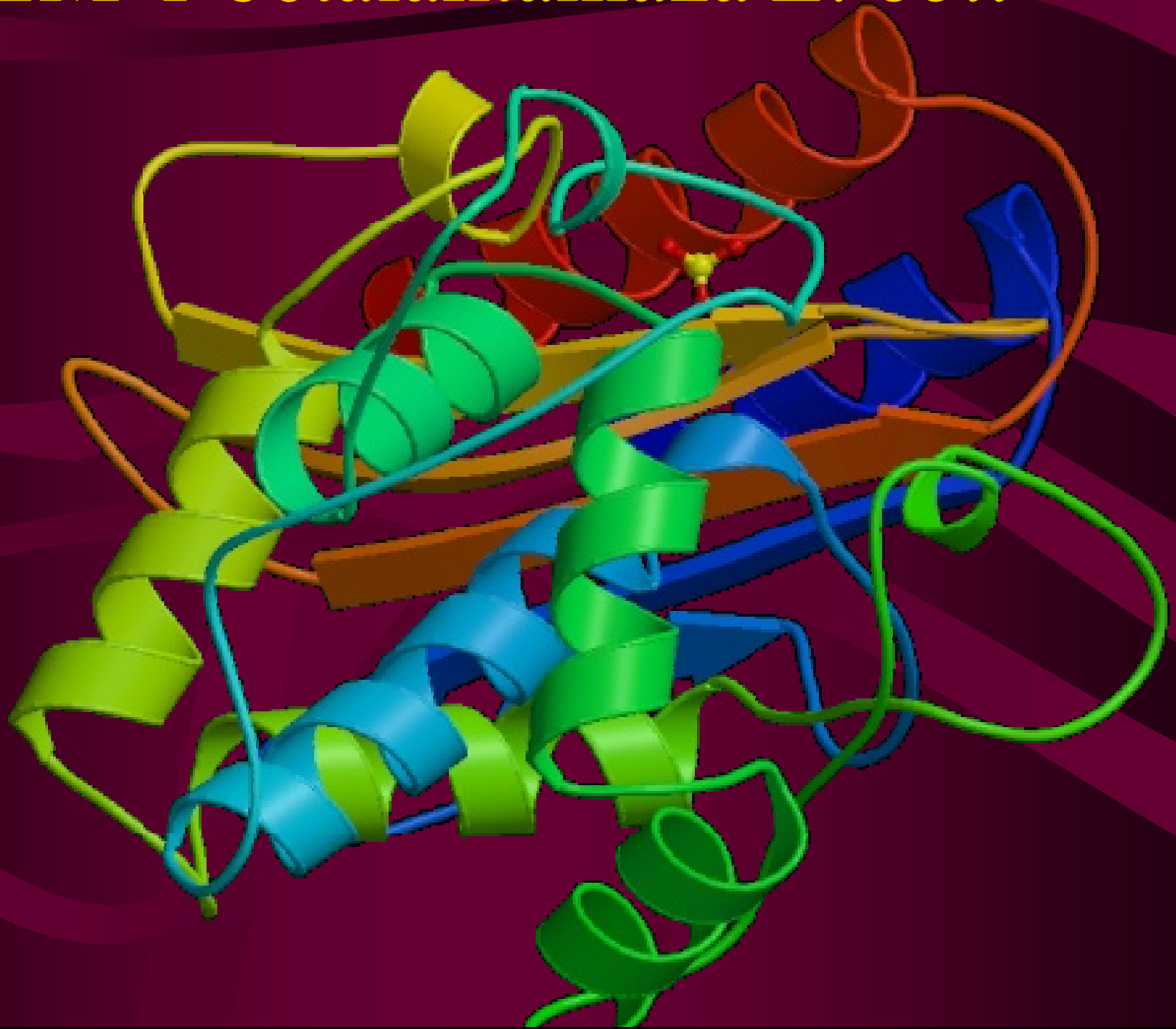
http://www.chemistry.org/portal/a/c/s/1/acdisplay.html?DOC=patentwatch%5Carchive%5C011904_patentwatch.html



Klasifikace betalaktamáz dle Bushe

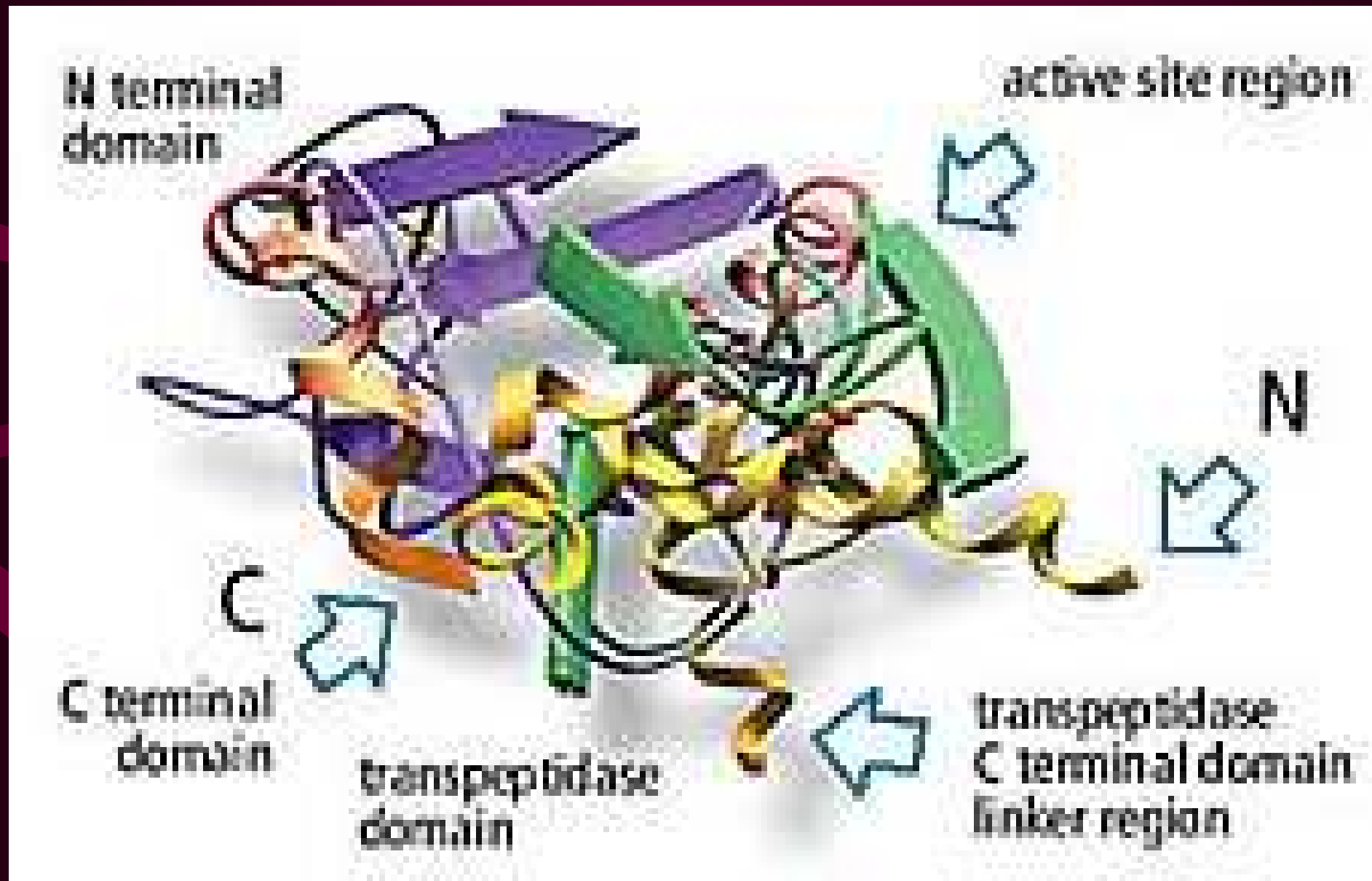
Charakteristika	Příklady
Enzymová skupina 1	
Cefalosporinázy (neinhibované kys. klavul.)	Chromosomy, u pseudo- monád a enterobakterů
Enzymová skupina 2	
Penicilizázy/cefalosporinázy (inhib. kys. klavulanovou)	Plasmidy i chromozomy, u klebsiel a stafylokoků
Enzymová skupina 3	
Metalobetalaktamázy	G- nefermentující,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

TEM-1 betalaktamáza *E. coli*



Alterace PBP (penicilin binding proteins)

<http://www.proteinexpert.com/RD-services/Protein-engineering.php>



Mechanismy rezistence:

II. Aminoglykosidy a makrolidy

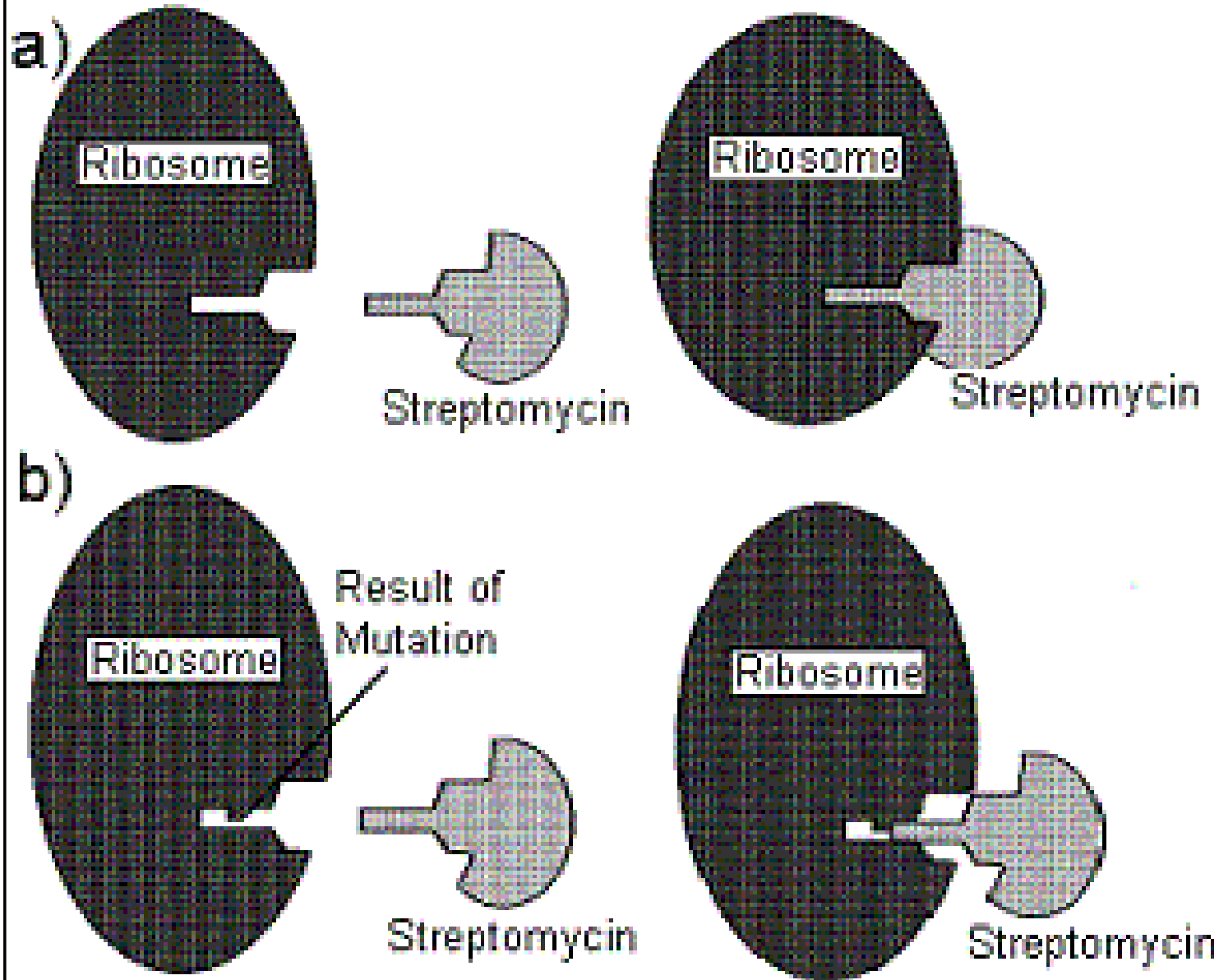
- Snížená vazba na cílové ribozomy
- Snížená permeabilita buněčné stěny
- Produkce inaktivujících enzymů

Mechanismy rezistence:

III. Chloramfenikol

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

Jak streptomycin (či jiný aminoglykosid) přestane být účinný



<http://www.ideacenter.org/contentmgr/showdetails.php/id/1145>

Mechanismy rezistence:

IV. Tetracykliny

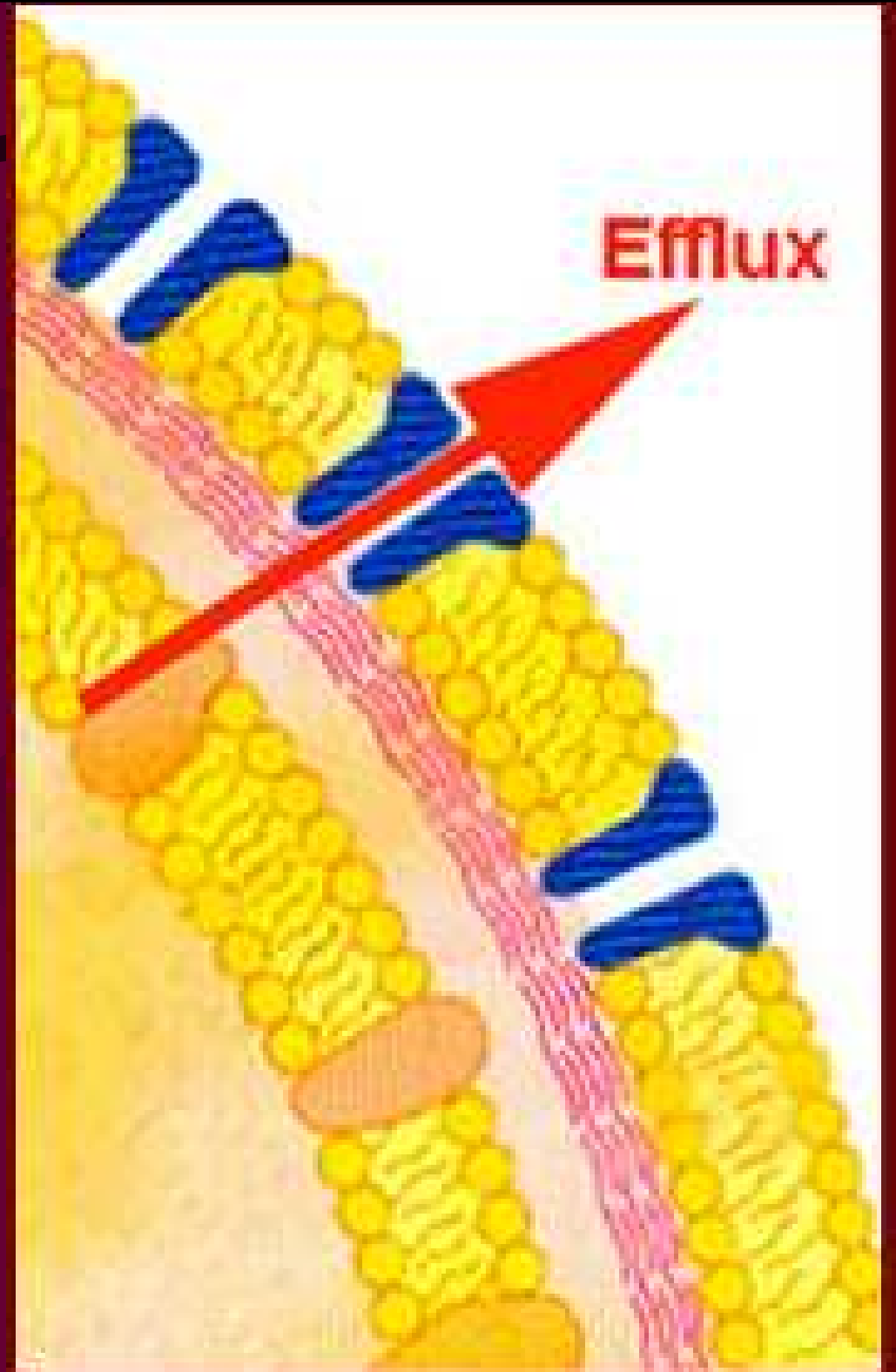
- Nedostupnost cílových ribozomů
- Aktivní buněčný eflux (vylučování atb z buňky)

Mechanismy rezistence:

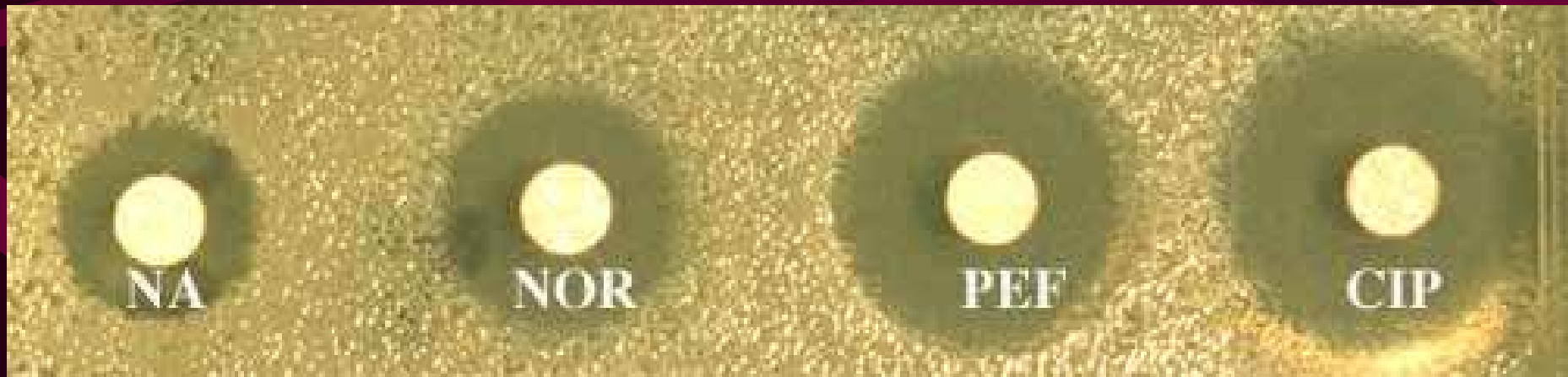
V. Chinolony

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

Eflux



Silnější chinolon (ciprofloxacin) je ještě účinný, slabší už ne. Ale i při použití toho silnějšího je nutná opatrnost!



Mechanismy rezistence:

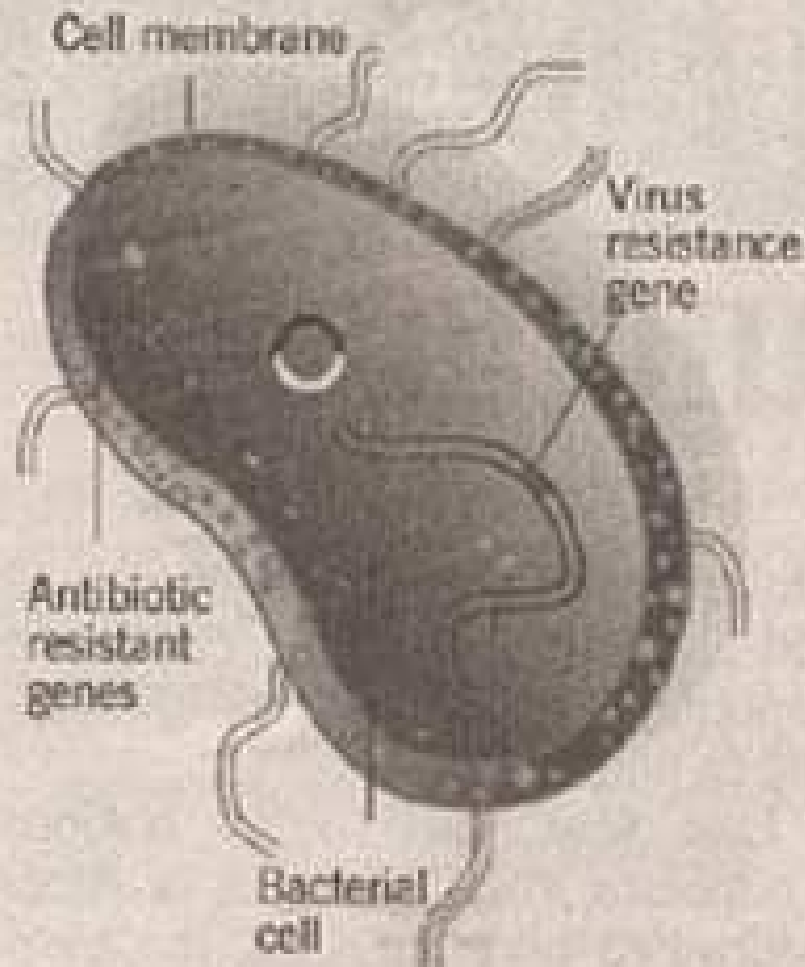
VI. Sulfonamidy, trimetoprim

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

Eluding the enemy

FEBRUARY 18, 2000

Some genes enable bacteria to "learn" new tactics for evading and inhibiting antibiotics



How bacteria fight antibiotics



Expelling
Genetically developed pumps catch antibiotics as they enter the membrane and expel them from the bacterium.



Degrading
Some genes produce enzymes that degrade the antibiotics, rendering them useless against disease.

Source: Scientific America, George Johnson

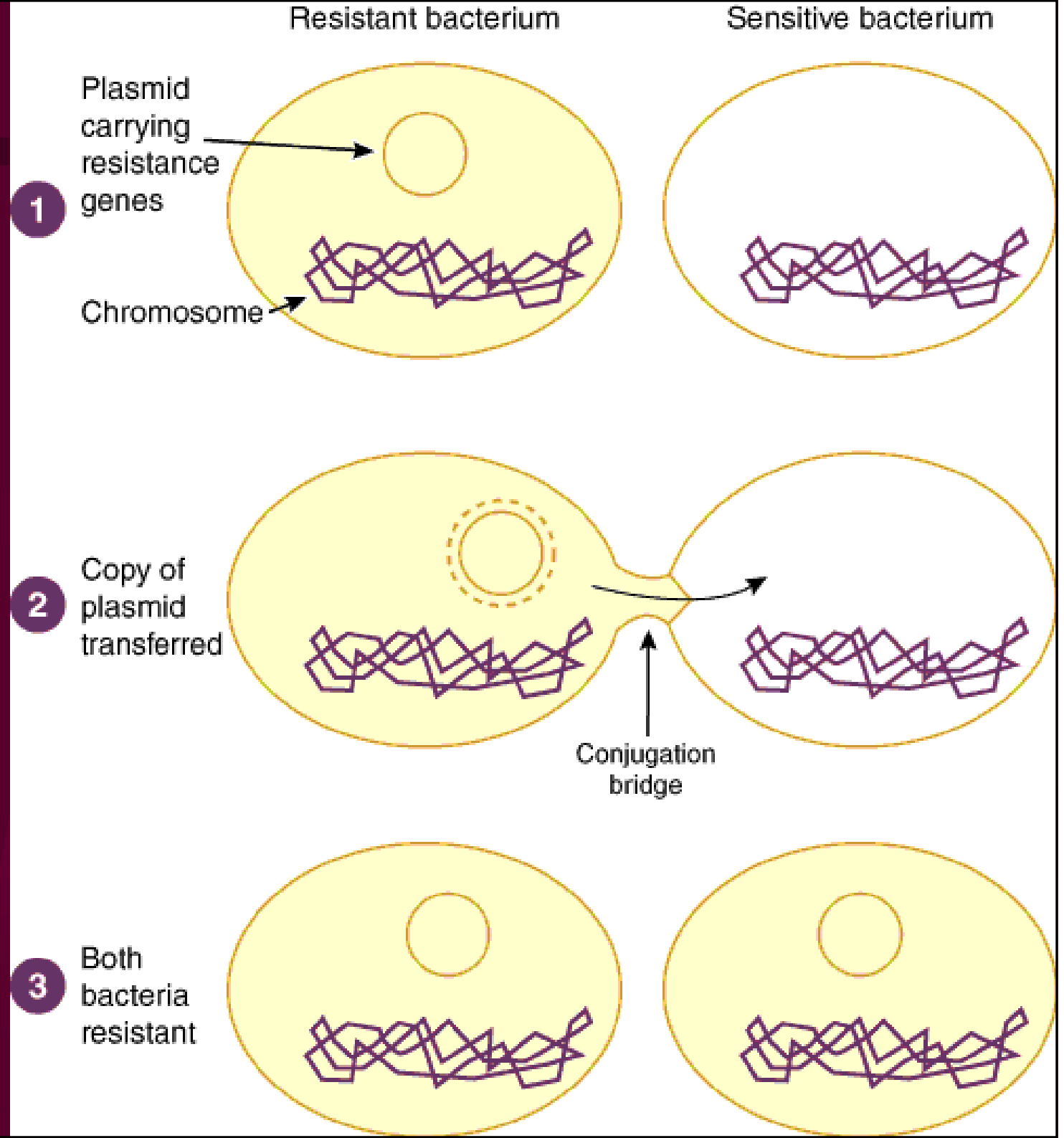
MARK WILLIAMS/POST-DISPATCH

Resistance – shrnutí

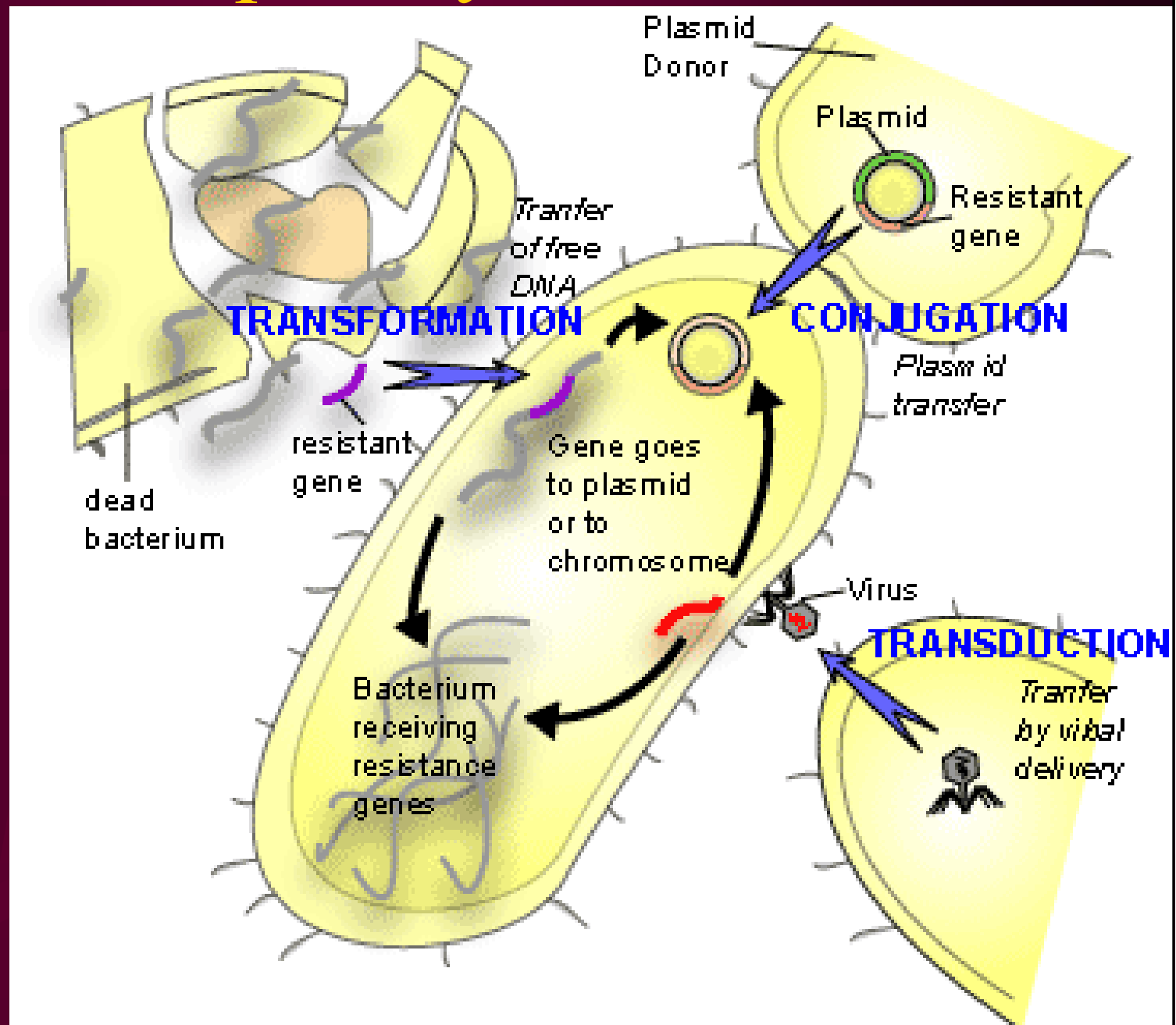
- Jak jsme viděli, je celá řada **mechanismů rezistence**, a celá řada **možností genetického kódování**
- Tudíž nelze ke všem rezistencím přistupovat stejně:
 - Některé jsou **epidemiologicky významné, jiné ne.**
 - Některé se týkají jen **jednoho antibiotika, jiné celé skupiny či několika skupin**
 - Některé lze překonat **zvýšeným dávkováním antibiotika** (jde spíše o kvantitativní posun, „horší účinnost“ – časté např. u aminoglykosidů)
 - U jiných jde o rezistenci **„bud’ anebo“**. Pokud je, nelze ji překonat ani mnohonásobkem normální dávky

Přenos resistance

http://www.mja.com.au/public/issues/177_06_160902/col10836_fm.html

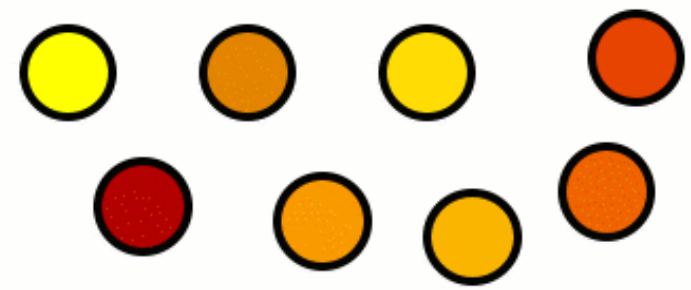


Přenos genů pro rezistenci různými způsoby

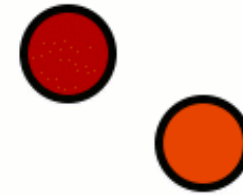


Selekcce rezistentních kmenů

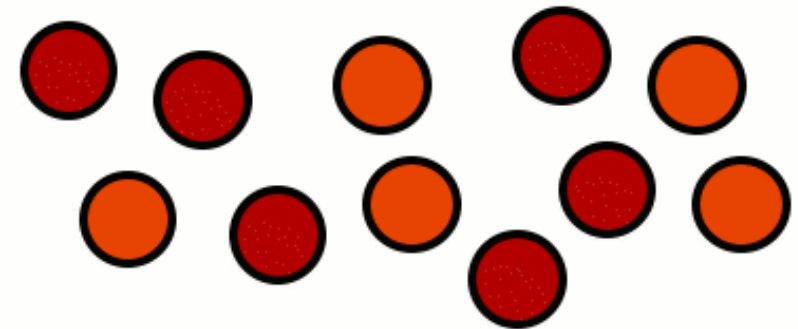
www.answers.com/topic/antibiotic-resistance-gif



Before selection



Directly after selection



Final population

Low      High
Resistance level

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/MBEC**, a to nejen na jednotlivá atb, **ale i na kombinace**
- **Využívat jinou než atb terapii** (výměna katetru, lokální léčba a podobně)

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⁺ tyčky a jiné se musí testovat na jiných půdách.



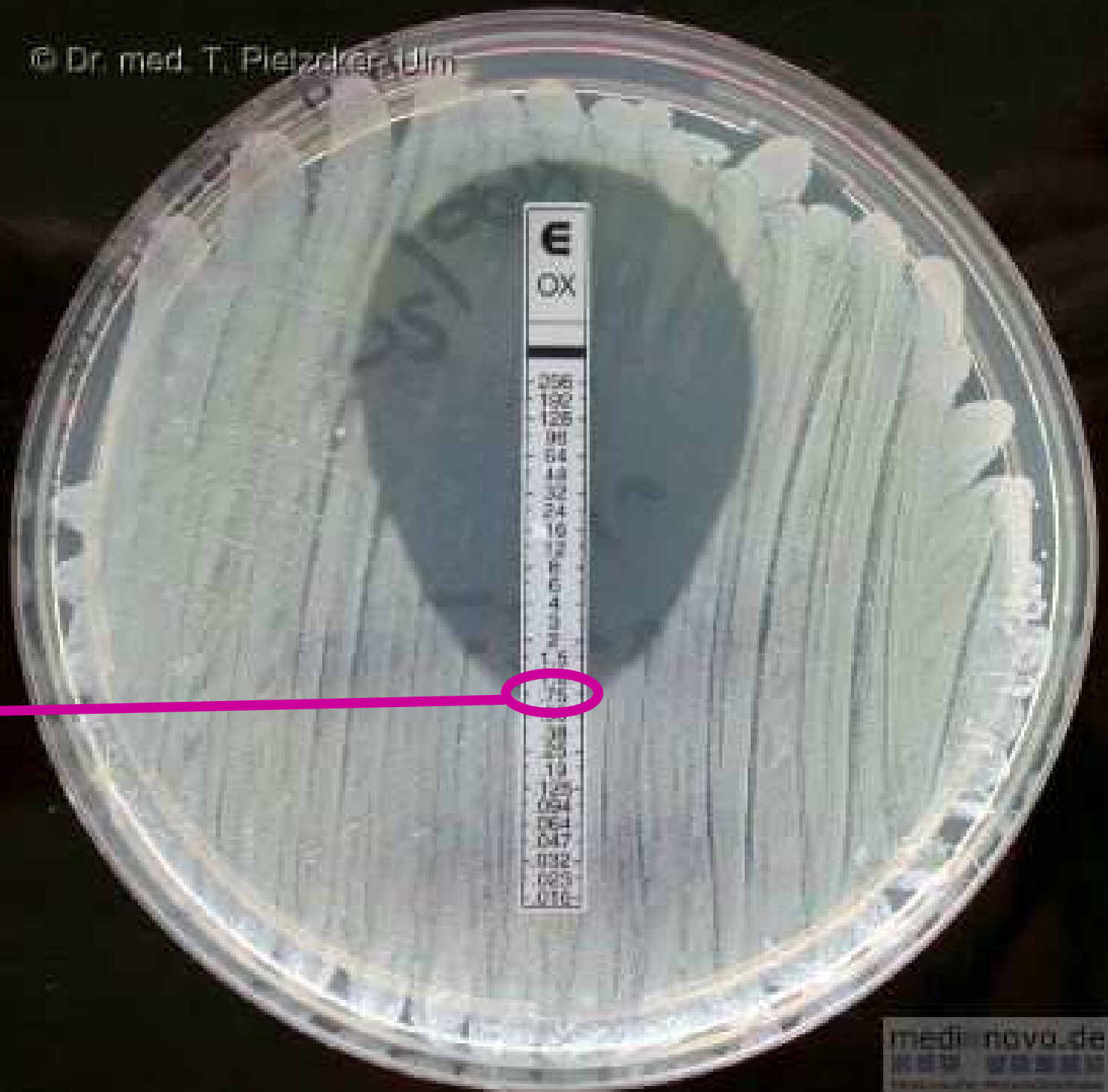
E-testy

- **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)

© Dr. med. T. Pietzcker, JDM



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 nahoře je kontrola růstu*)

Interpretace stanovení MIC

- Klinický mikrobiolog by si měl všímat nejen citlivosti či rezistence, ale i např. **vzestupu MIC, který stále ještě zůstává v pásmu citlivosti**
- V rámci konzultace pracovníka antibiotického střediska je možné, že pracovník navrhne i použití antibiotika, kde výsledek vyjde jako „rezistentní“, **rezistence je však překonatelná zvýšeným dávkováním**
- To je však možné **jen u některých antibiotik**, u jiných by byl takový postup nesprávný

Příklady interpretace MIC (1)



Příklady interpretace MIC (2)

64	Model šablony mikrodil. testu
32	
16	
8	
4	
2	
1	
0,5	

Break-point je roven 8

64	<input type="radio"/>	Kmen jasně rezis- tentní
32	<input type="radio"/>	
16	<input type="radio"/>	
8	<input type="radio"/>	
4	<input type="radio"/>	
2	<input type="radio"/>	
1	<input type="radio"/>	
0,5	<input type="radio"/>	

64	<input type="radio"/>	Kmen je rezis- tentní, ale lze překo- nat zvýš. dávku atb
32	<input type="radio"/>	
16	<input type="radio"/>	
8	<input type="radio"/>	
4	<input type="radio"/>	
2	<input type="radio"/>	
1	<input type="radio"/>	
0,5	<input type="radio"/>	

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: breakpoints 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.

MIC versus MBIC a MBEC

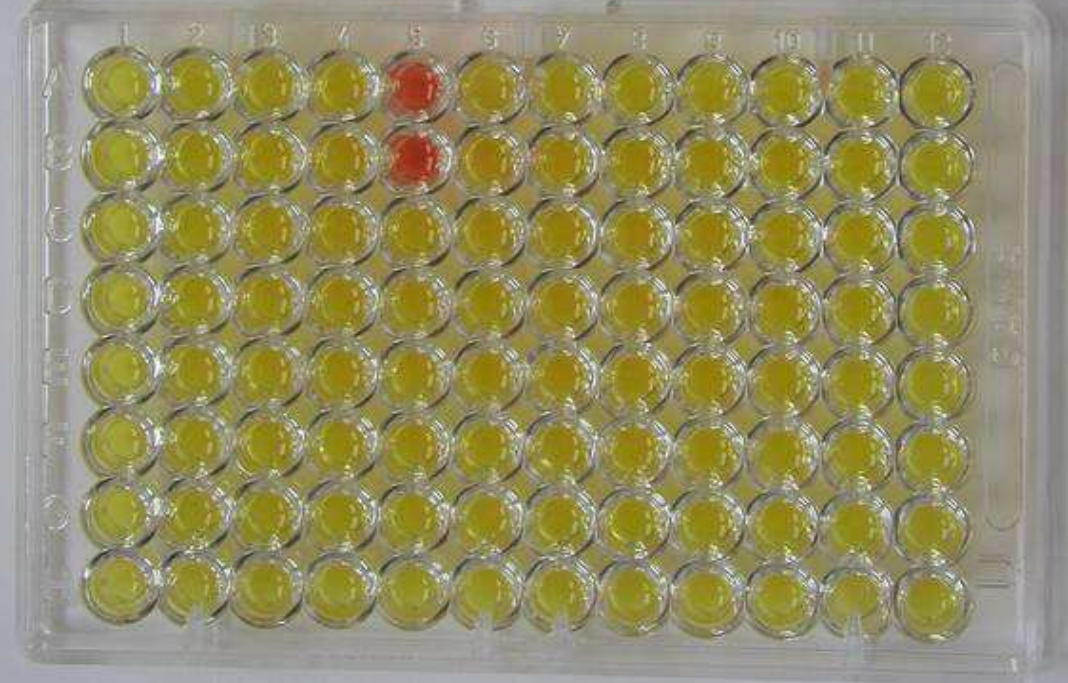
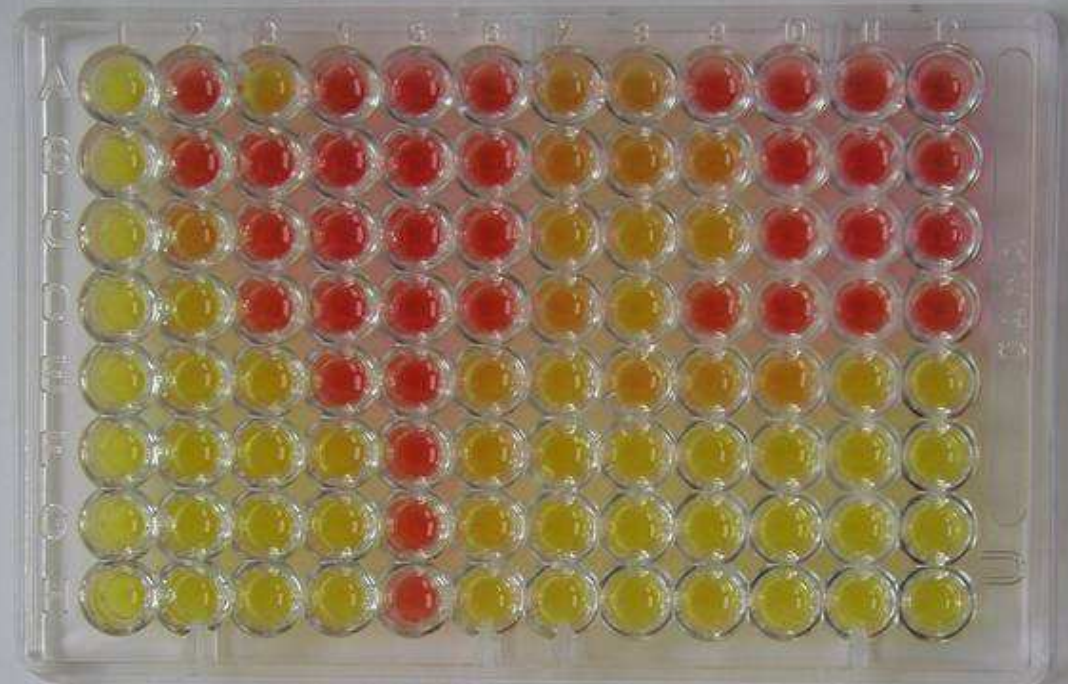
- Zatímco MIC je metoda určující minimální inhibiční koncentraci ATB u planktonické formy, **MBIC zjistí inhibici a MBEC eradikaci bakteriálního biofilmu.**

Vypovídá tedy lépe o skutečném účinku antibiotika na bakterie žijící ve formě biofilmu.

- MBEC odpovídá **nejnižší koncentraci antibiotika, kde ještě prokážeme eradikaci biofilmu**

Určování MBIC a MBEC

- **Hodnoty MBIC** (minimální biofilm inhibující koncentrace), popř. **MBEC** (minimální biofilm eradikující koncentrace) se měří speciálními, zatím jen výzkumně prováděnými postupy. Může jít o kombinaci mikrodilučního testu s tzv. Christensenovou metodou, kde se biofilm vizualizuje krystalovou violetí, nebo o jiné způsoby, jak zviditelnit, že na místě zůstal biofilm.



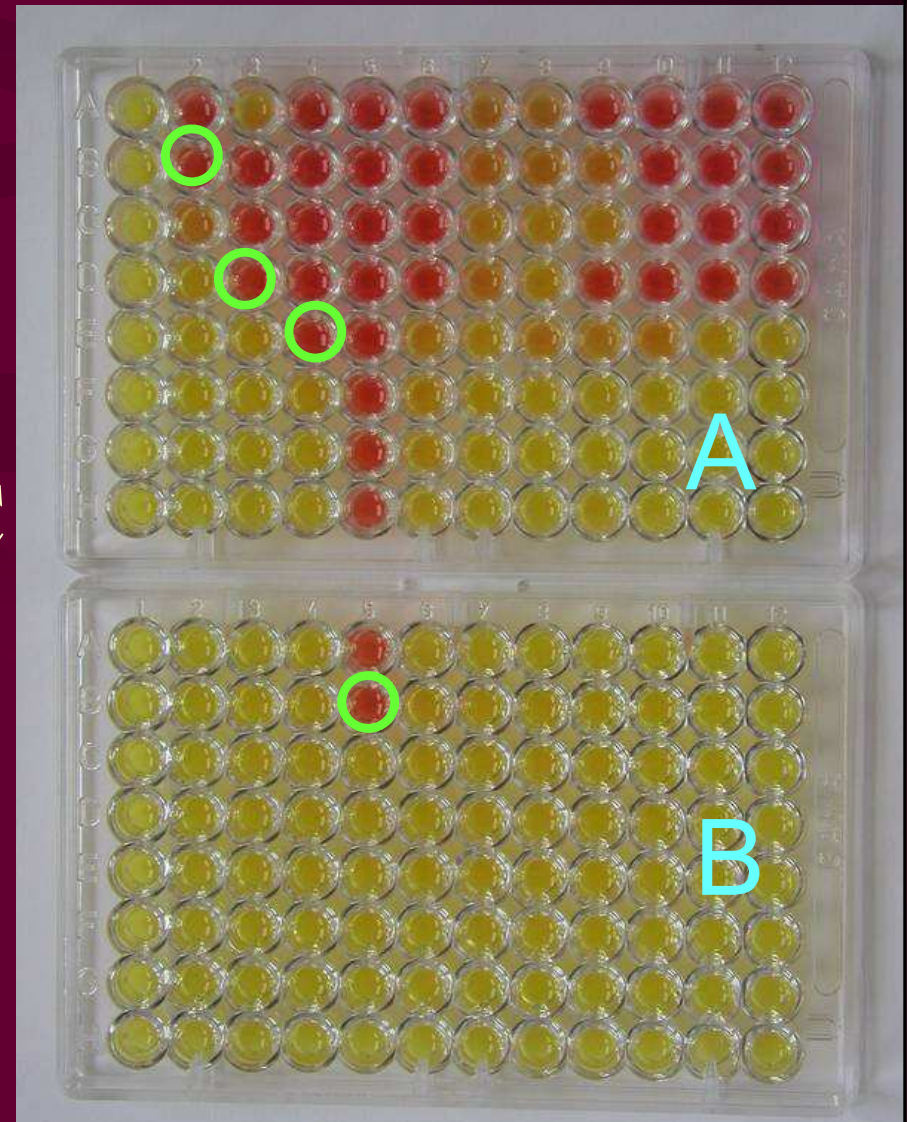
Jak se odečítá MBEC I

Destičky A a B se přiloží k sobě a odečítají společně. Dvě destičky jsou nutné proto, že hodnoty v základní destičce, na rozdíl od testování MIC, zpravidla nestačí, takže je destičku nutno „nastavit“

Lze si celou dvojici destiček **představit jako jednu destičku, kde je každé antibiotikum v šestnácti různých koncentracích**

Jak se odečítá MBEC II

Zelené kroužky označují důlky s hodnotami MBEC pro atb ve druhém až pátém sloupci. Pro antibiotikum v prvním sloupci nelze hodnotu MBEC určit, je příliš vysoká (vyšší než sledované)



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) β -laktamázy.



Genotypové metody

- V poslední době se čím dál více prosazuje také **detekce genů zodpovědných za rezistenci**
- Nutno si ale uvědomit, že **přítomnost genu ještě neznamená jeho expresi**. Ta může být dána jak přítomností dalších genů, tak i řadou jiných faktorů
- **Fenotypové metody jsou tedy nezastupitelné**

Děkuji za
pozornost

Použitá literatura:

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

O. Lochmann: Stručný
přůvodce léčbou
antibiotiky a
chemoterapeutiky

Neoznačené fotografie
pocházejí z archivu MÚ

<http://www.warnwisconsin.org/consumer/childcare-education.htm>

