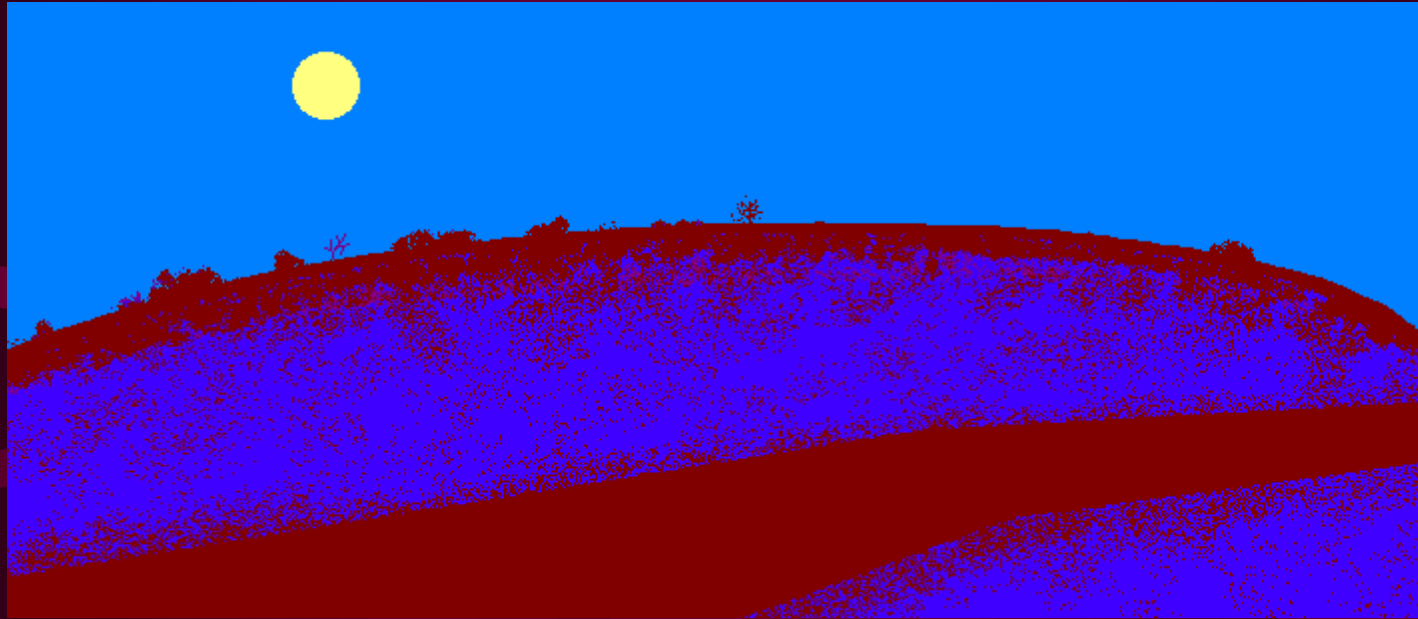


# Hlavní mechanismy rezistence.

## 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...!

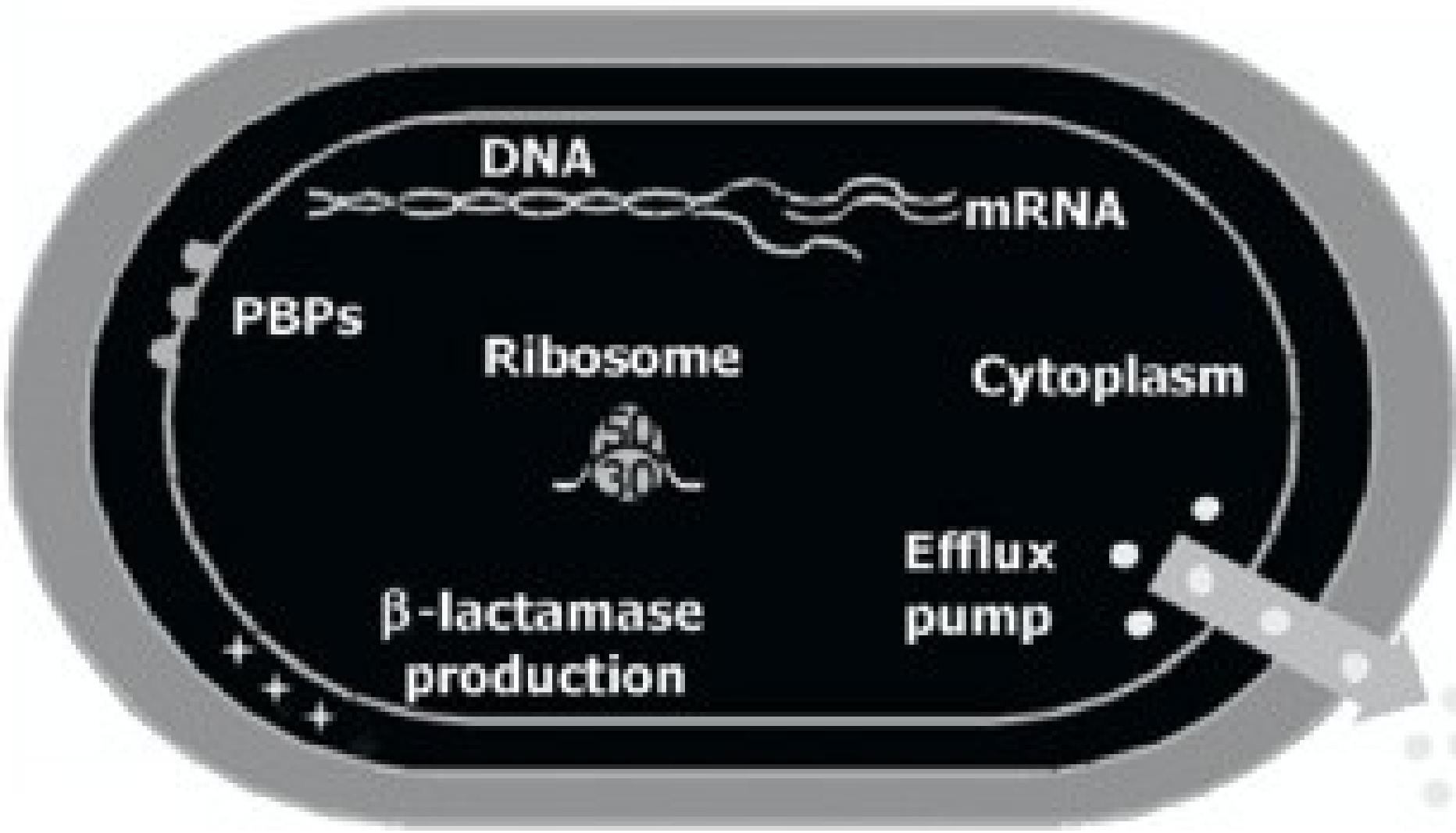


[http://www.nearingzero.net/screen\\_res/nz149.jpg](http://www.nearingzero.net/screen_res/nz149.jpg)

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)



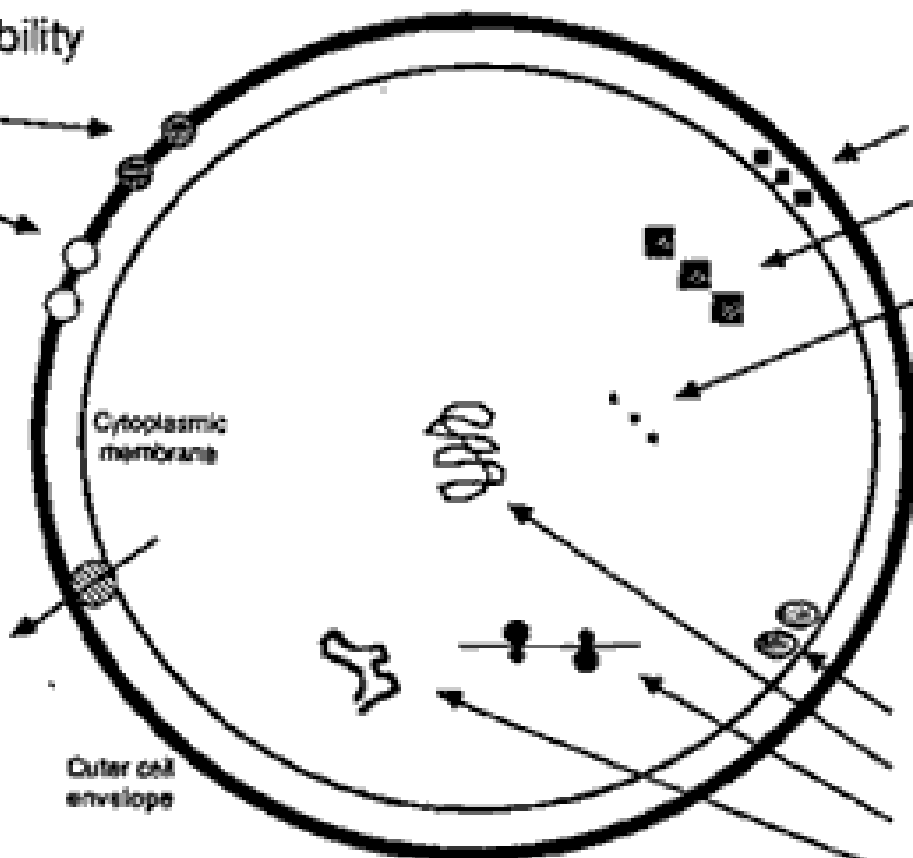
**(1) Decreased Permeability**

Permeability barrier

Porin channels

Cytoplasmic membrane

Outer cell envelope



**Inactivating Enzymes (2)**

Beta-lactamases

Aminoglycoside modifying enzymes

Esterases and acetyltransferases

**(4) Active Efflux**

**Altered Target Sites (3)**

Penicillin-binding proteins

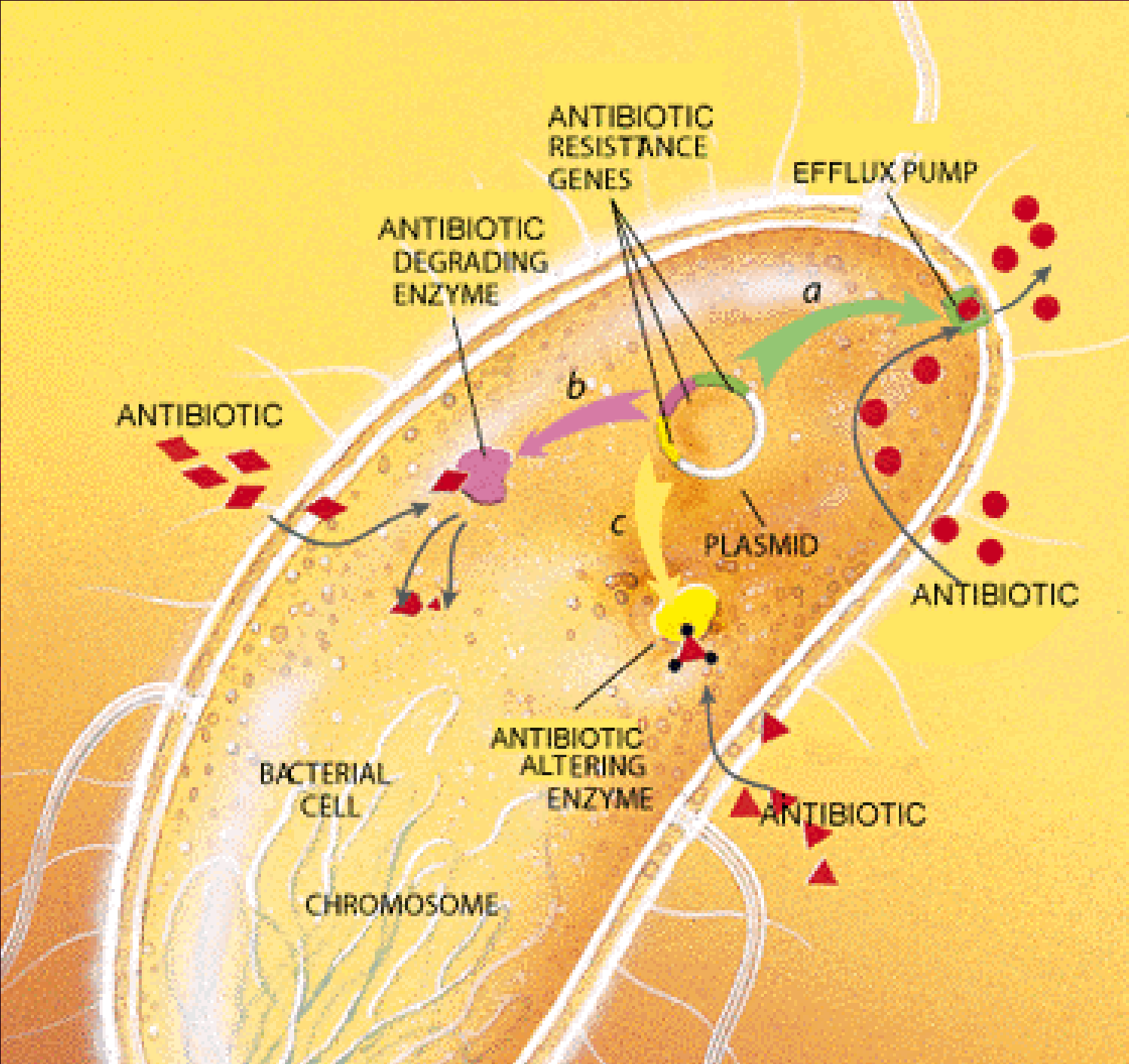
DNA gyrase

Ribosomes

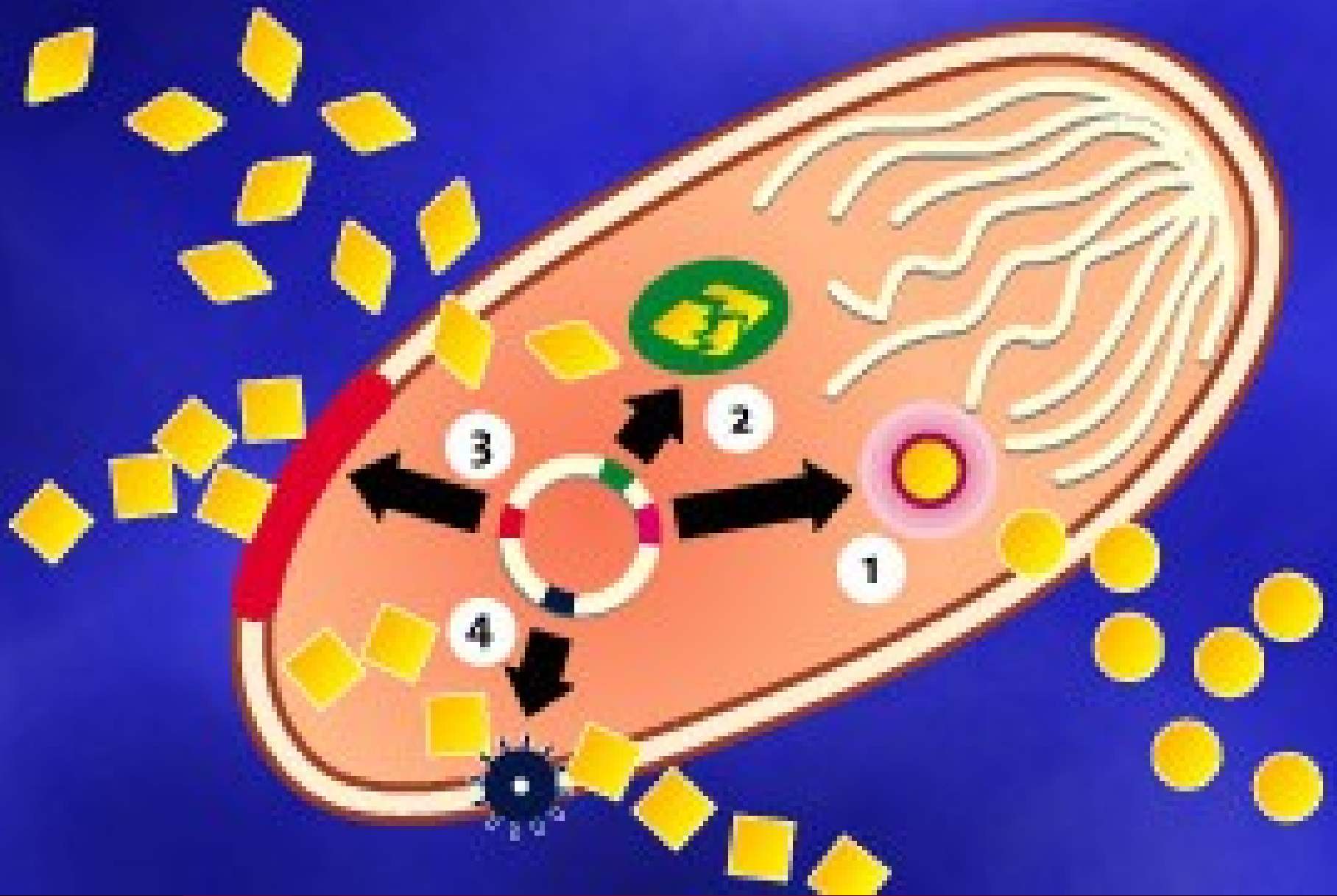
RNA polymerase and DHFR

# 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**







# 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*)

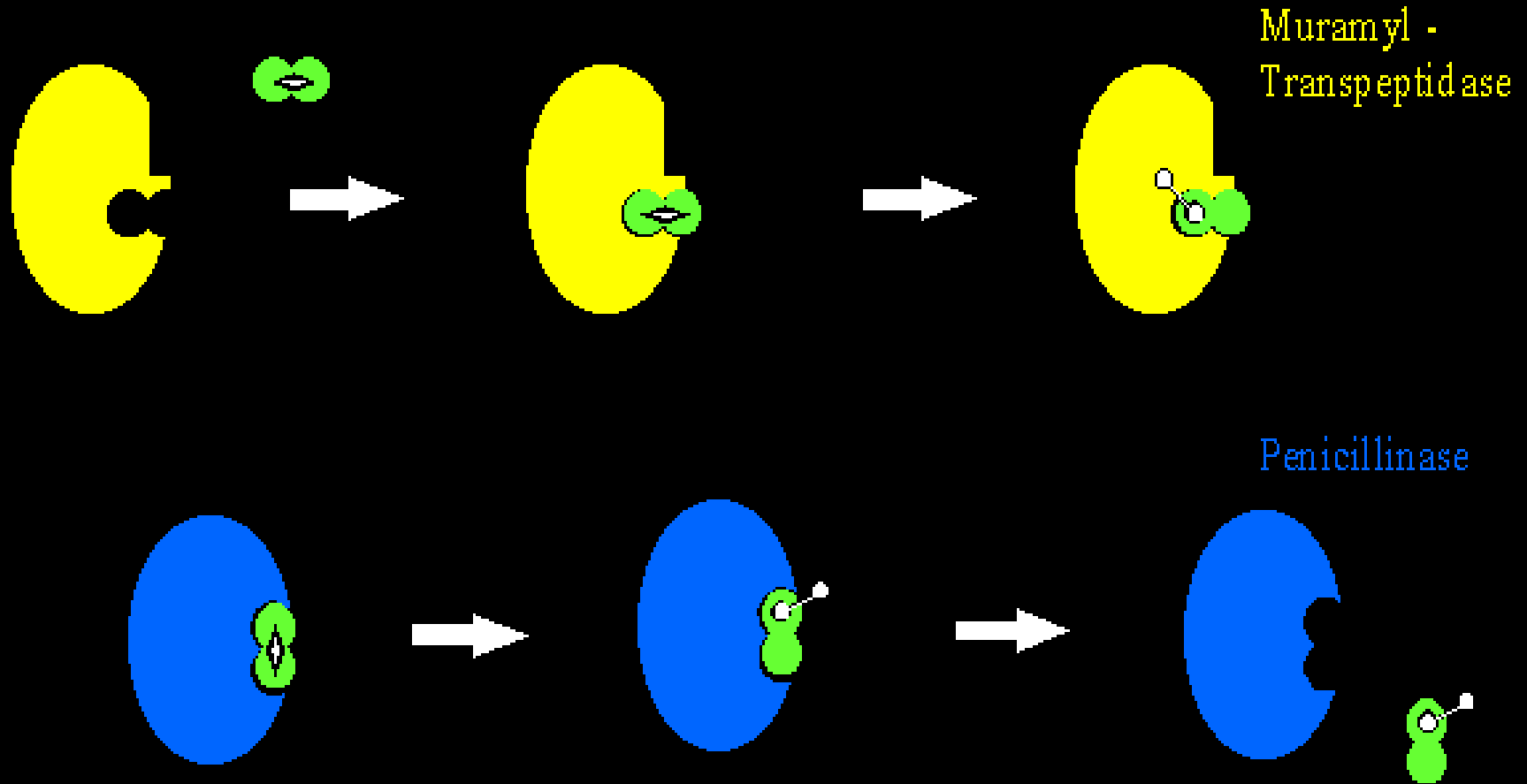
# Betalaktamázy

- 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)*

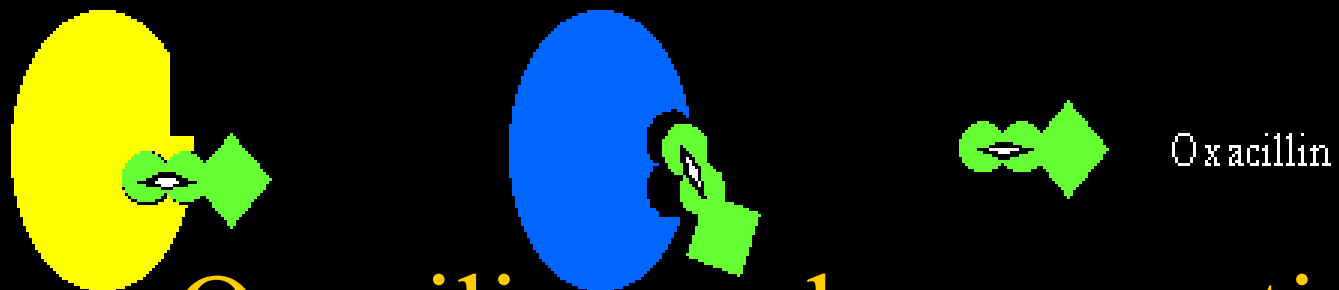
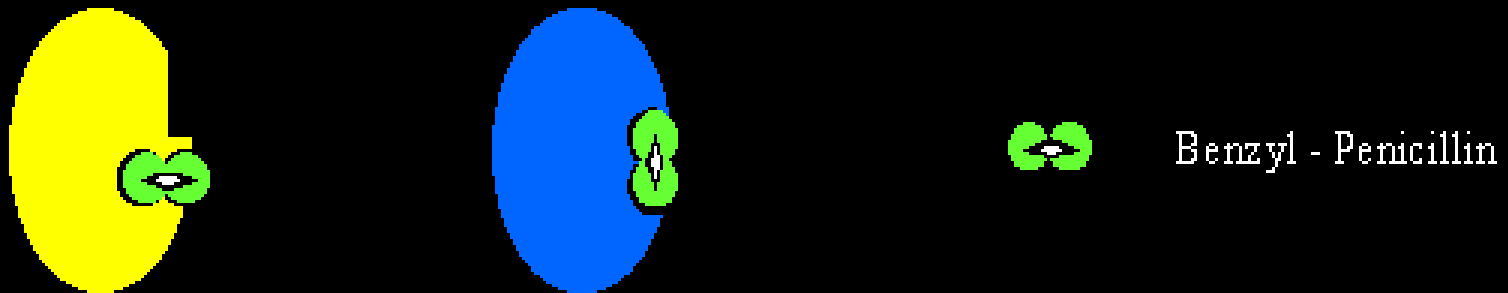


Resistenz gegen Penicillin: Die Penicillinase spaltet Penicillin, ohne irreversibel mit ihm zu reagieren

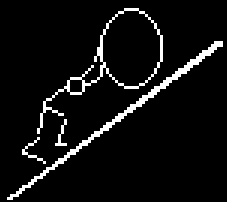


# Penicilináza – první betalaktamáza

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

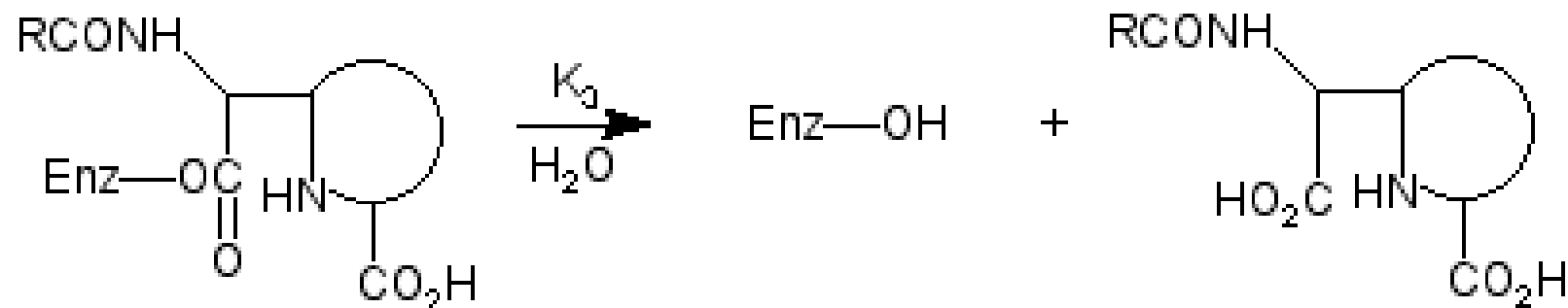
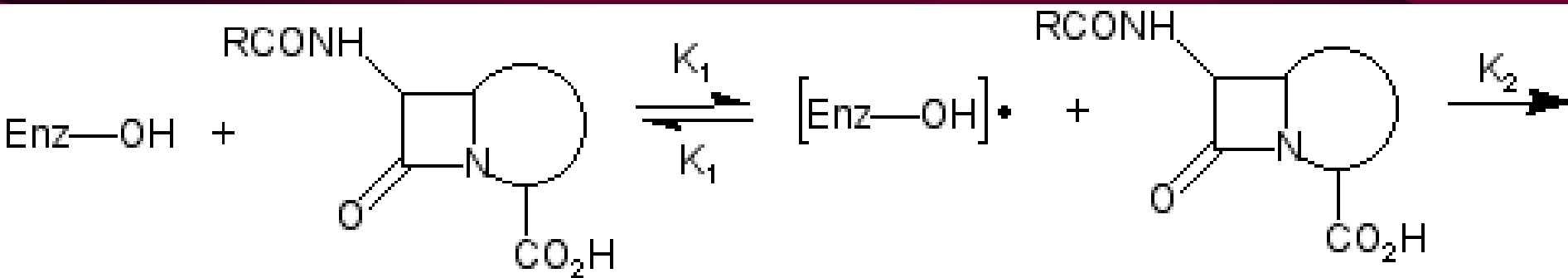


Oxacillin – ochrana proti stafylokokové penicilináze



# Funkce betalaktamázy

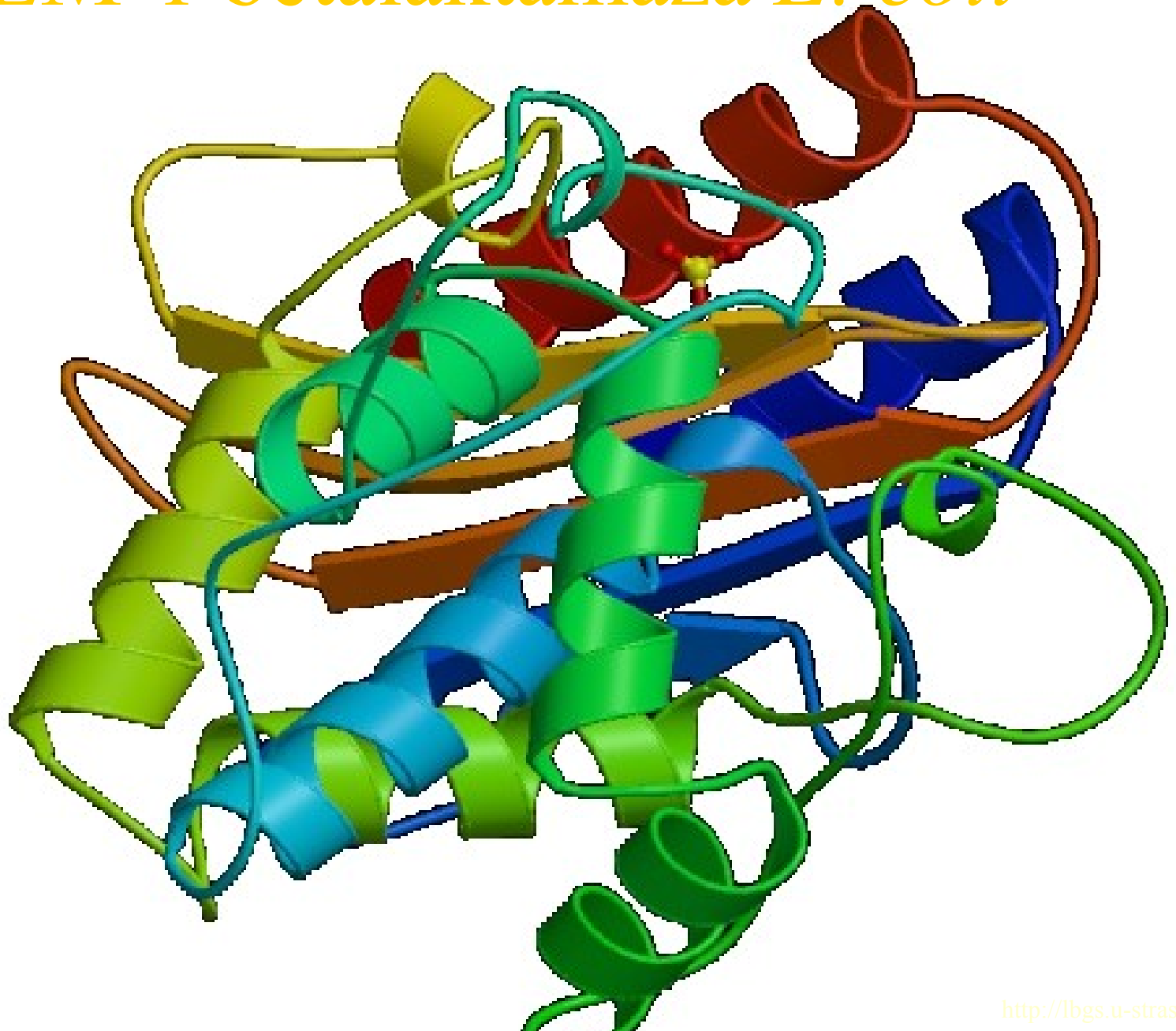
[http://www.chemistry.org/portal/a/c/s/1/acsdisplay.html?DOC=patentwatch%5Carchive%5C011904\\_patentwatch.html](http://www.chemistry.org/portal/a/c/s/1/acsdisplay.html?DOC=patentwatch%5Carchive%5C011904_patentwatch.html)



# 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>

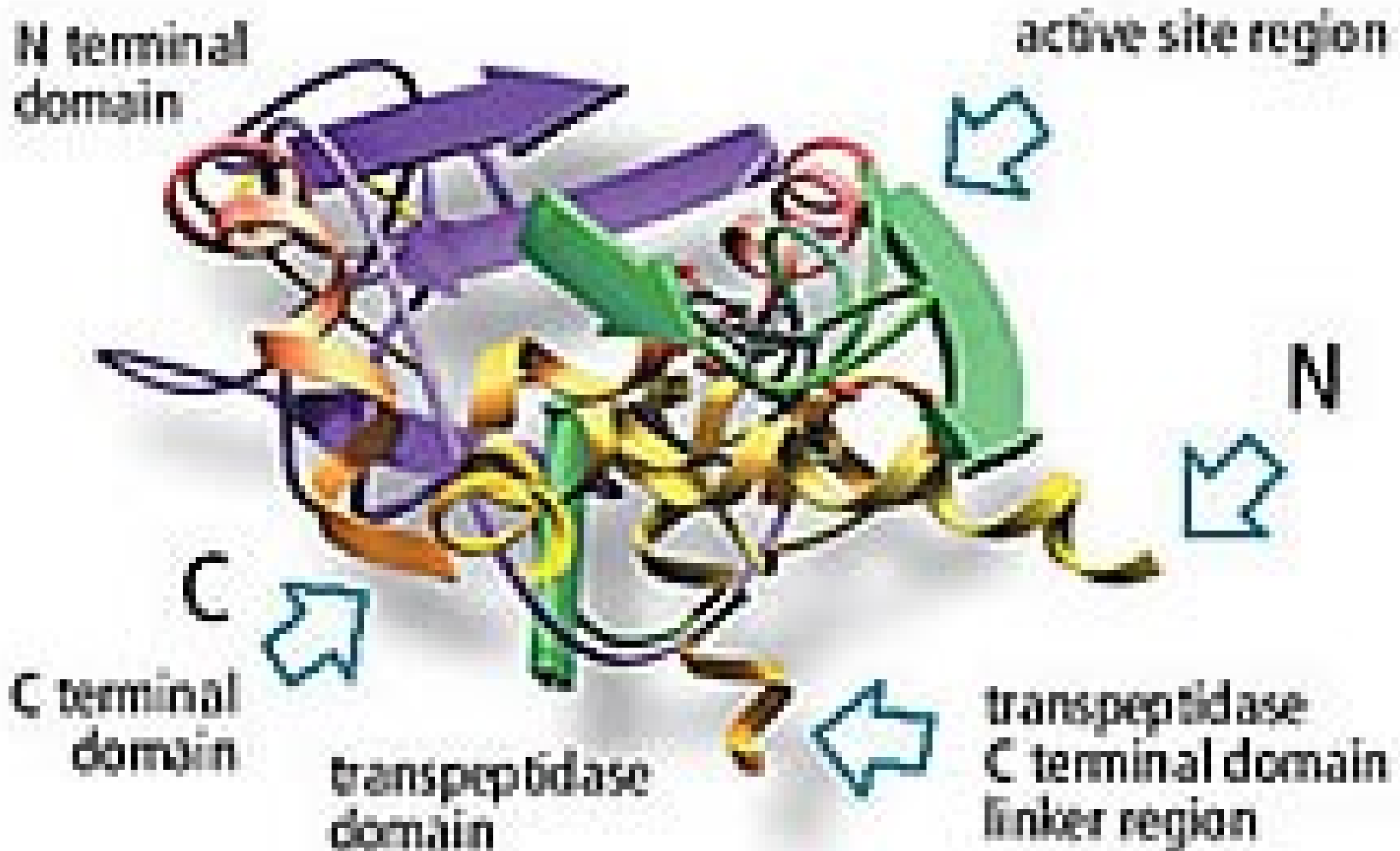
# TEM-1 betalaktamáza *E. coli*

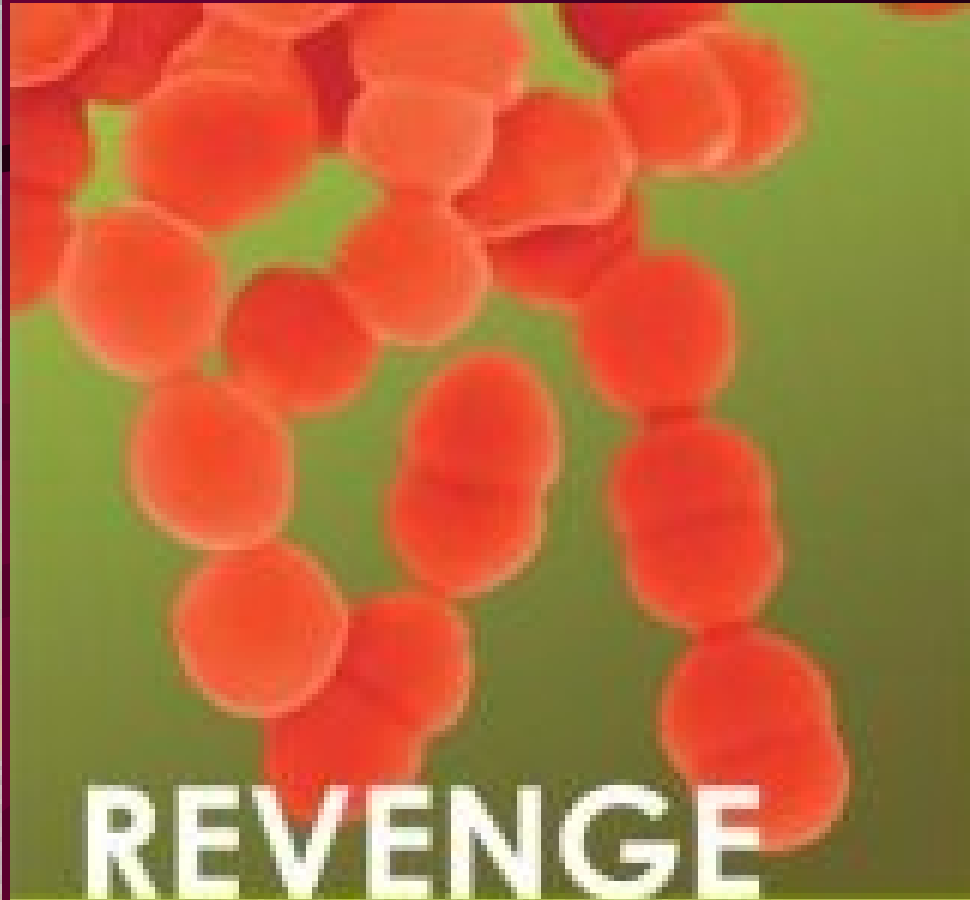
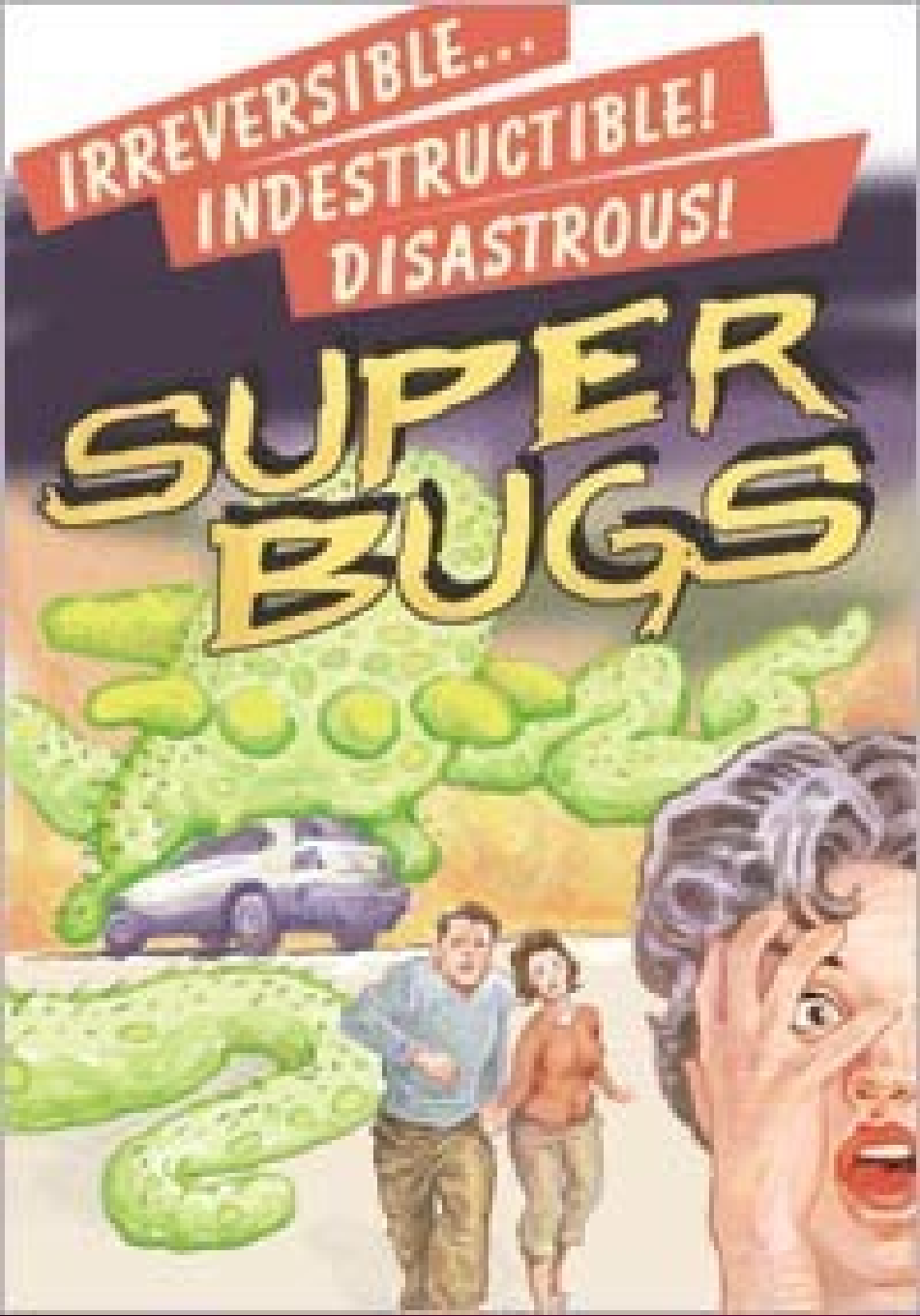




# Alterace PBP (penicilin binding proteins)

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





# REVENGE OF THE MICROBES

How Bacterial Resistance  
Is Undermining the  
Antibiotic Miracle

Abigail A. Salyers and Dixie D. Whit

# Mechanismy rezistence:

## II. Aminoglykosidy a makrolidy

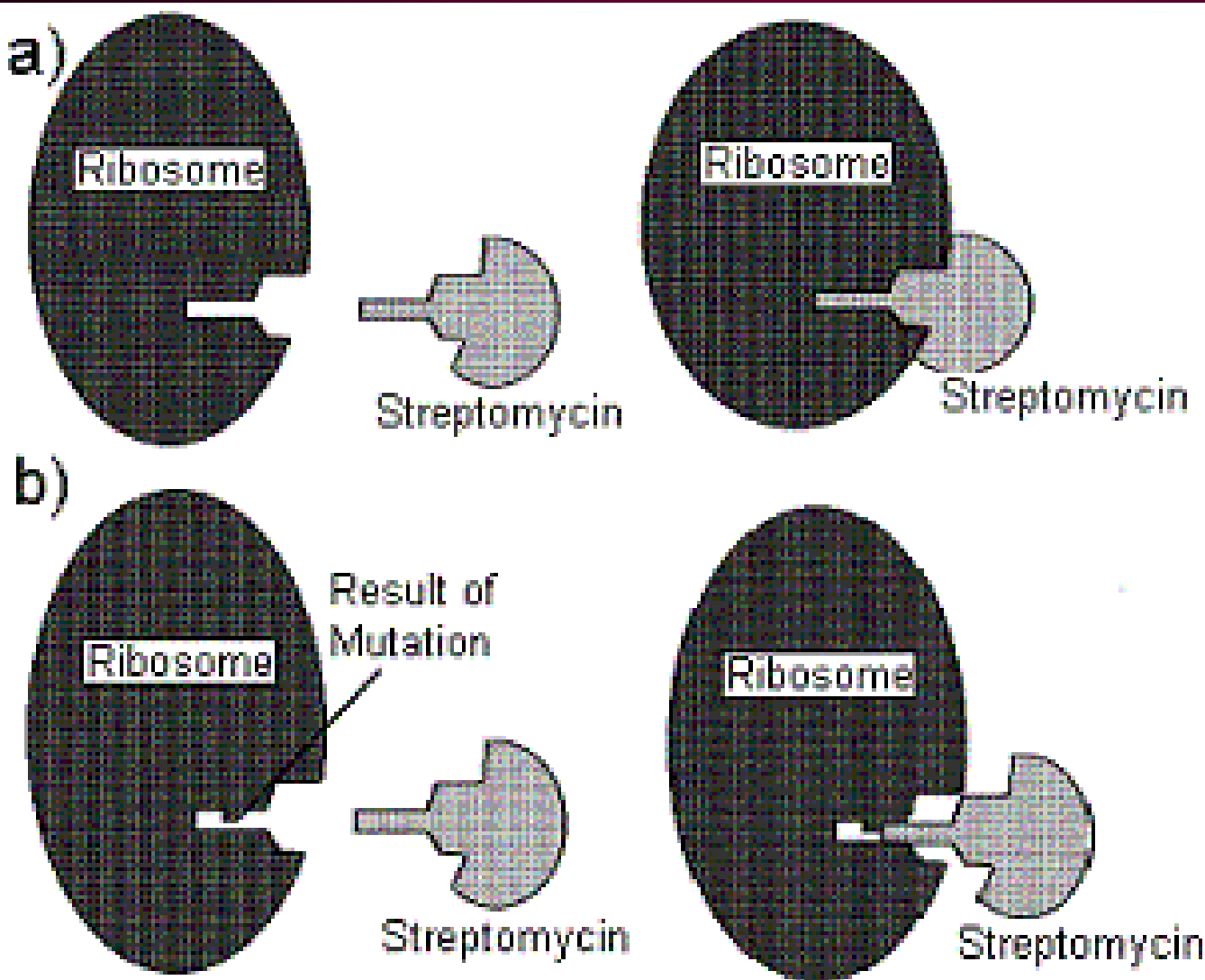
- Snížená vazba na cílové ribozomy
- Snížená permeabilita buněčné stěny
- Produkce inaktivujících enzymů

# Mechanismy rezistence:

## III. Chloramfenikol

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

# Jak streptomycin (či jiný aminoglykosid) přestane být účinný



# Mechanismy rezistence:

## IV. Tetracykliny

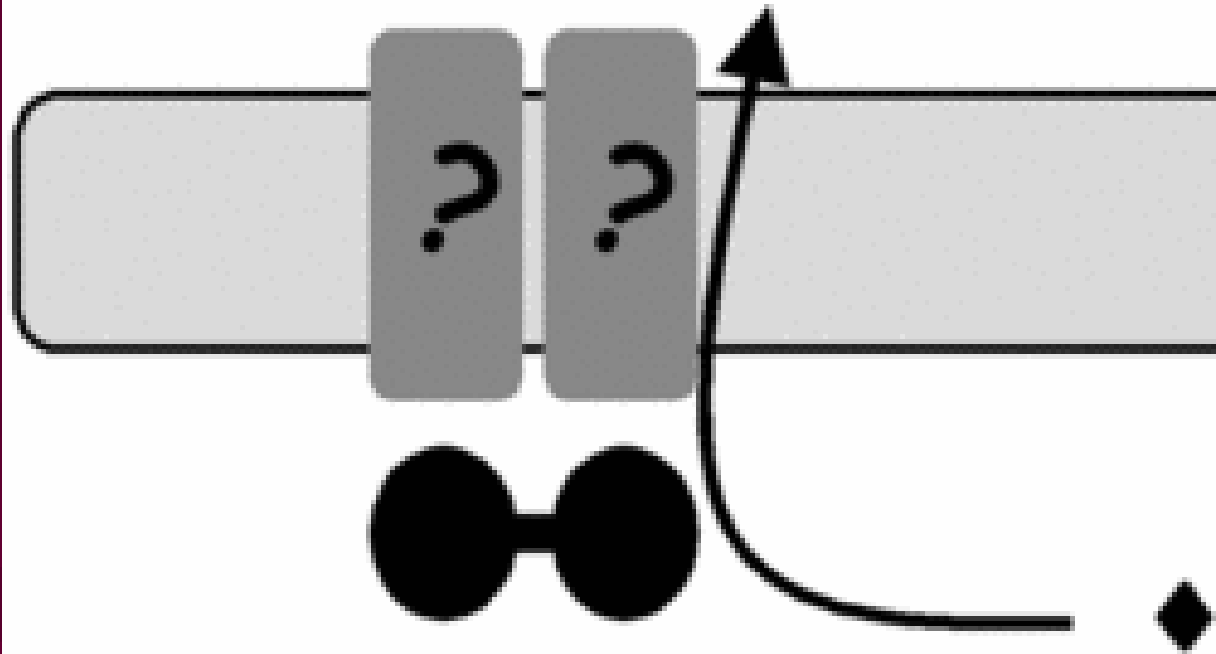
- Nedostupnost cílových ribozomů
- Aktivní buněčný eflux (vyučování atb z buňky)

# Mechanismy rezistence:

## V. Chinolony

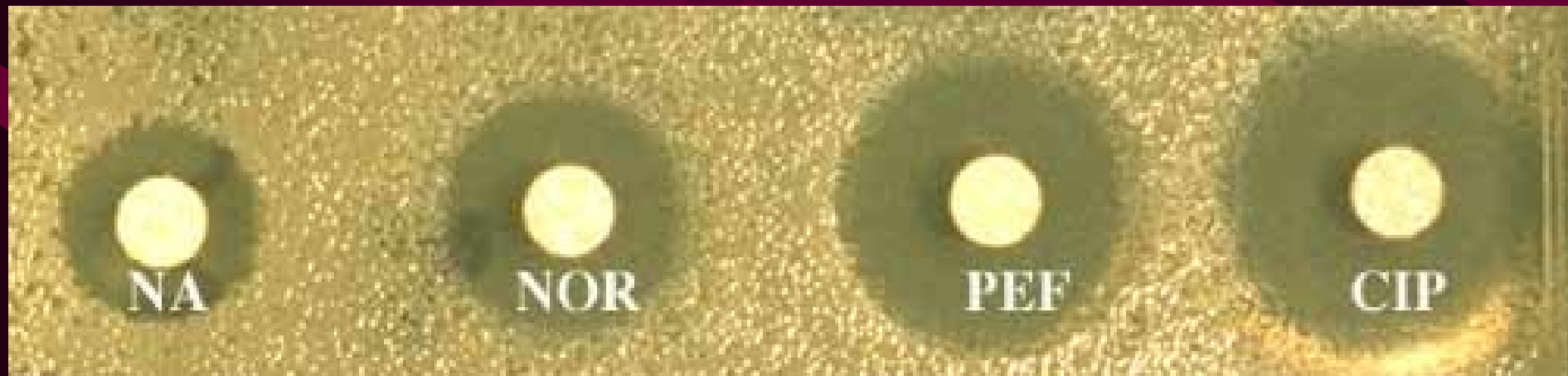
- Rezistence DNA-gyrázy
- Snížená permeabilita pro antibiotikum
- Aktivní buněčný eflux

# Eflux



*active efflux  
of antibiotic*

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



# Mechanismy rezistence:

## VI. Sulfonamidy, trimetoprim

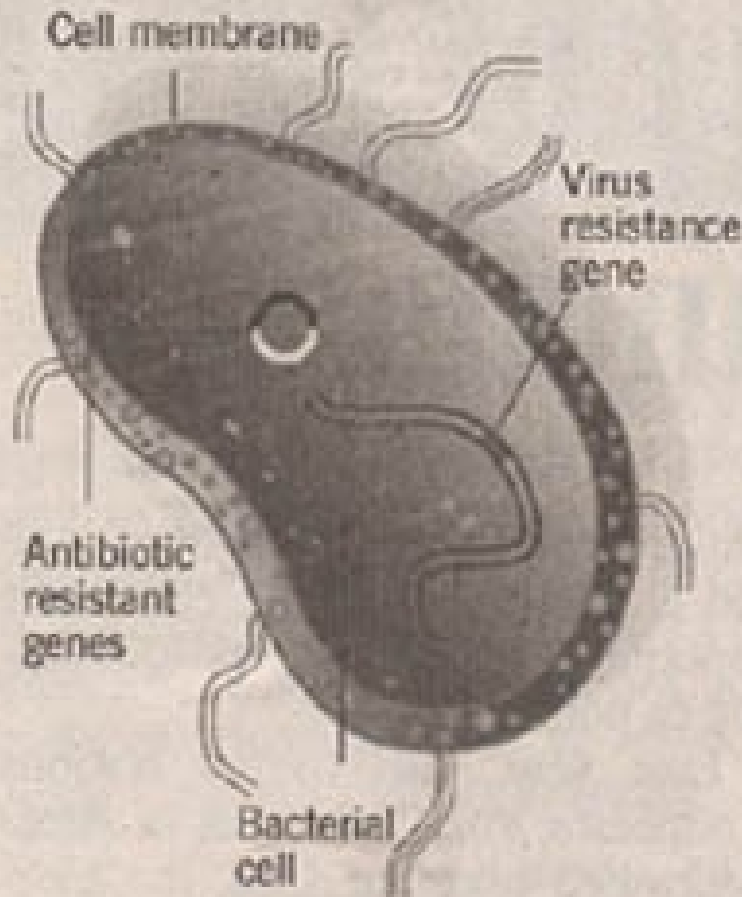
- Rezistence syntetázy kyseliny dihydrolistové
- Rezistence reduktázy kyseliny dihydrolistové
- Snížená permeabilita



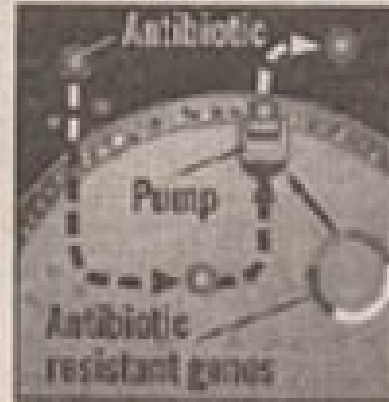
# Eluding the enemy

FEBRUARY 18, 2000

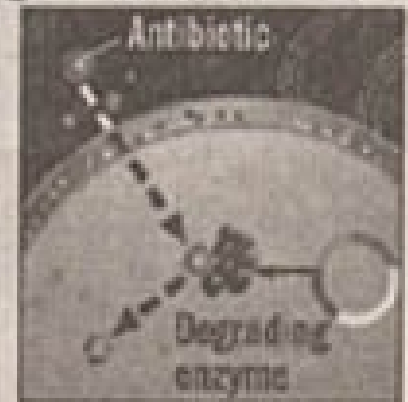
*Some genes enable bacteria to "learn" new tactics for evading and inhibiting antibiotics*



## 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.

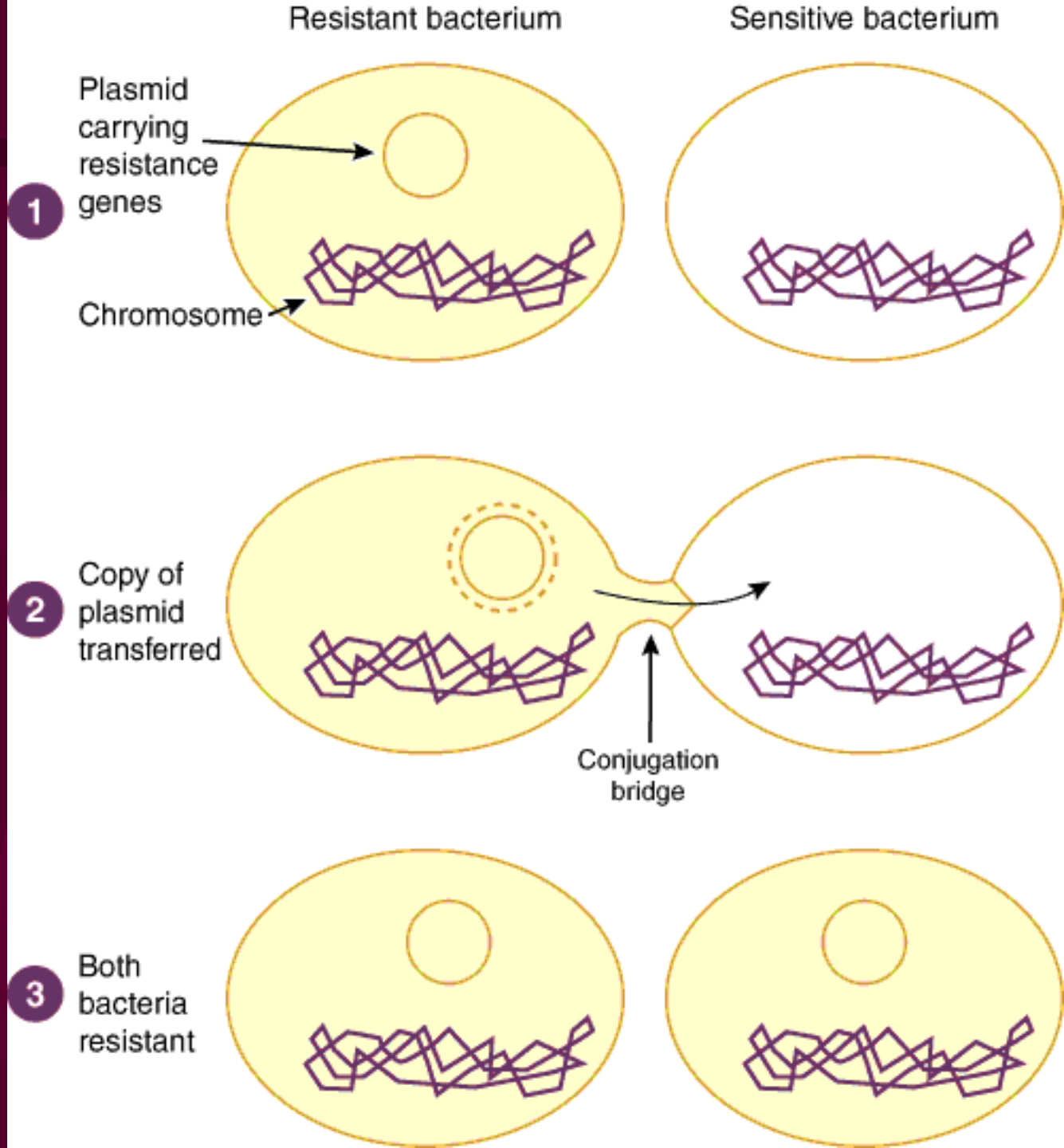
Source: Scientific America, George Johnson

MARK WILLIAMS/POST-DISPATCH

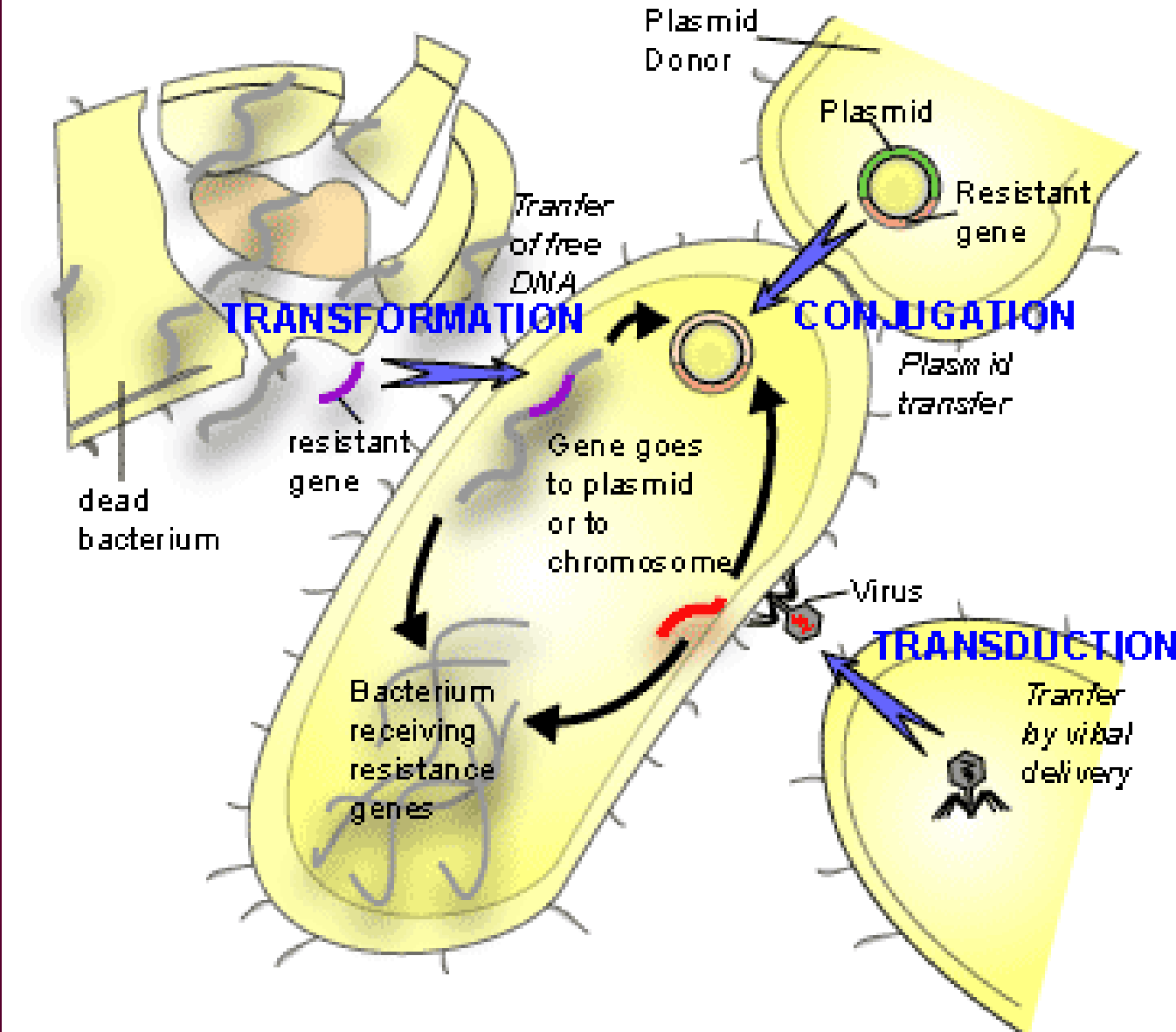
# Resistance – shrnutí

- 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

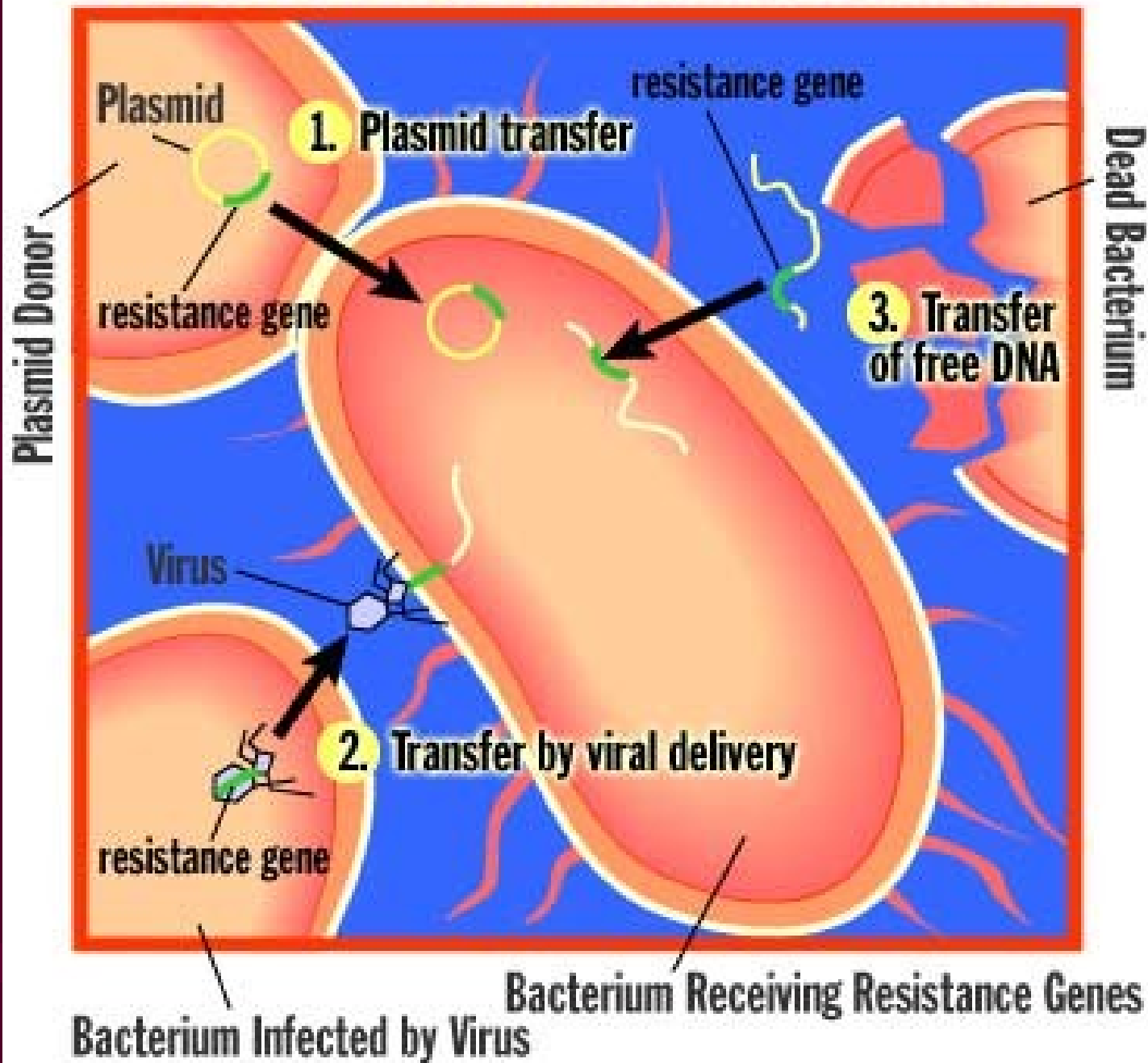
# Pre-nos resistance



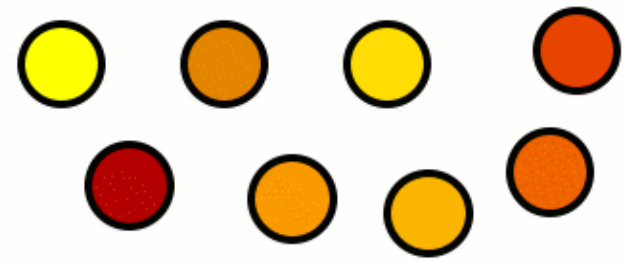
# Přenos genů pro rezistenci různými způsoby



# Transferring Resistance Genes

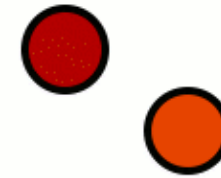


# Selekce rezistentních kmenů



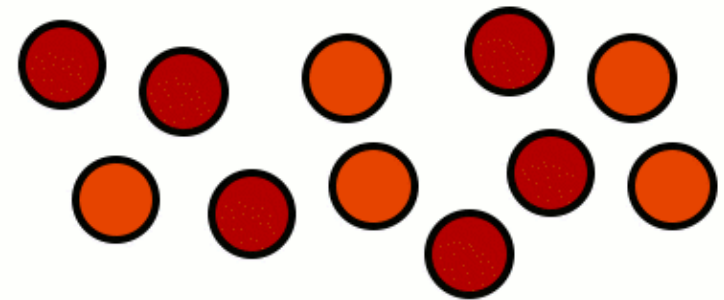
**Before selection**

---



**Directly after selection**

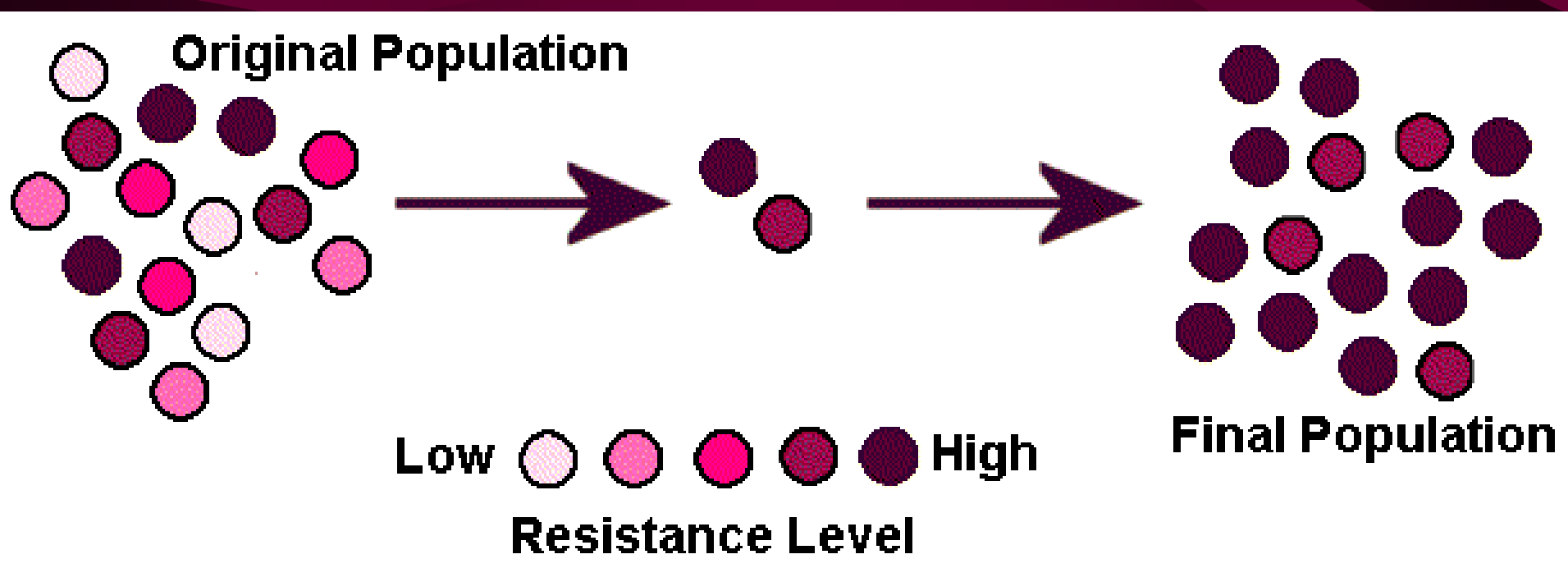
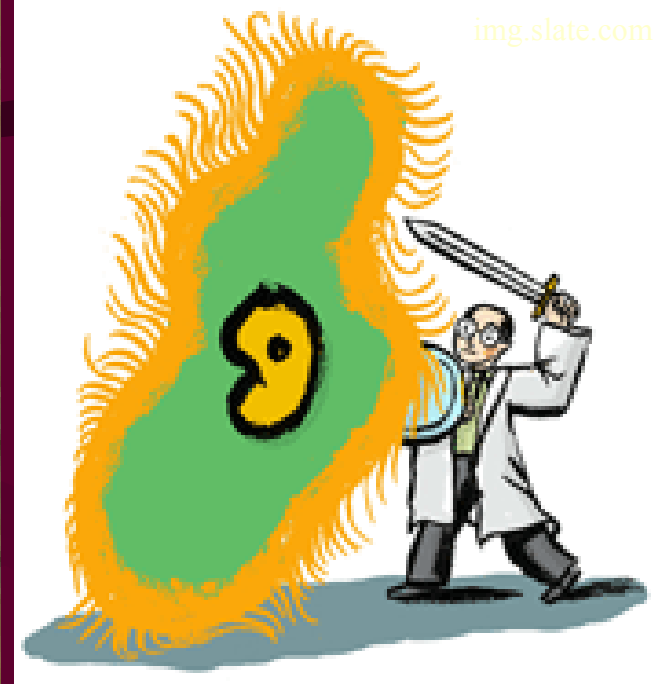
---



**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*

# Povědomí o rezistenci na antibiotika je nutno šířit i mezi sestrami

www.hsc.wvu.edu

## ANTIBIOTIC RESISTANCE

### Problem Statement

Antibiotic resistance is a global health problem. The use of antibiotics has increased over the years, leading to the development of antibiotic-resistant bacteria. This is a serious problem because these bacteria can cause infections that are difficult to treat. Antibiotic resistance is a major public health concern. According to the CDC, millions of antibiotic-resistant infections are reported each year in the United States. Antibiotic resistance is a global health problem. The use of antibiotics has increased over the years, leading to the development of antibiotic-resistant bacteria. This is a serious problem because these bacteria can cause infections that are difficult to treat. Antibiotic resistance is a major public health concern. According to the CDC, millions of antibiotic-resistant infections are reported each year in the United States.

### Highlights from the Literature Review

The ongoing antibiotic resistance epidemic can be stopped if one simple fact is learned. This is that antibiotics do not kill viruses; they only kill bacterial infections within the body. Antibiotics do nothing for viral infections, such as a fever, stuffed nose, sore throat, headache, and the like symptoms. According to the CDC, millions of antibiotics are prescribed to patients with viral infections.

Types of bacteria that are antibiotic resistant are: Methicillin-resistant staphylococcus aureus (MRSA), Escherichia Coli and Klebsiella species, Acinetobacter baumannii, Aspergillus, Vancomycin Resistant Enterococcus Faecium (VRE), Pseudomonas Aeruginosa. Once an individual is infected it is life threatening and little to no interventions to treat them.

50-75% of individuals receive an antibiotic when visiting a health care professional for the "common cold" symptoms. 90% are viral infections, in which an antibiotic will not help.

Antibiotic resistance has increased patients length of stay in the hospital.

Education about Antibiotic resistance to the public will decrease the pressure of prescribing for doctors and decrease the risk of inappropriate prescribing.

Antibiotic resistance is a global problem

### Implications for Nursing Practice

Antibiotic resistance affects the community and hospitals. Nurses have used and will continue to use various strategies to decrease this growing health problem. Certain implications are important for nurses to follow to reduce antibiotic resistance:

- Educate clients about antibiotic resistance.
- Educate clients on using these tools and hand washing.
- Monitor clients during therapy procedures with antibiotics.
- Monitor clients during therapy procedures with antibiotics.

### Project Objectives & Expected Outcomes

To inform and educate a small accessible clinic population about antibiotic resistance.

- 90% of the patients meet their scheduled appointment.

Assess previous knowledge and beliefs about antibiotic resistance from the individual.

After the completion of the education the patient will:

- State one new fact they learned.
- Identify an example of when an antibiotic would not be given.
- List a situation that an antibiotic would be an appropriate intervention.

### Methodology

To utilize for this educational program to work a variety of resources and strategies needed to come together. First, the educational program is implemented before the client's scheduled appointment. Next, the client will be asked to complete a post test. This will be used to see how effective their teaching was and how much information the patient will have the day after the appointment.

### Reflect

The feedback in this project has been positive. The feedback in this project has been positive. The feedback in this project has been positive. The feedback in this project has been positive. The feedback in this project has been positive.

### Evaluation & Summary



# 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

[www.medmicro.info](http://www.medmicro.info)

- 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

© Dr. med. T. Pietzcker, Ulm

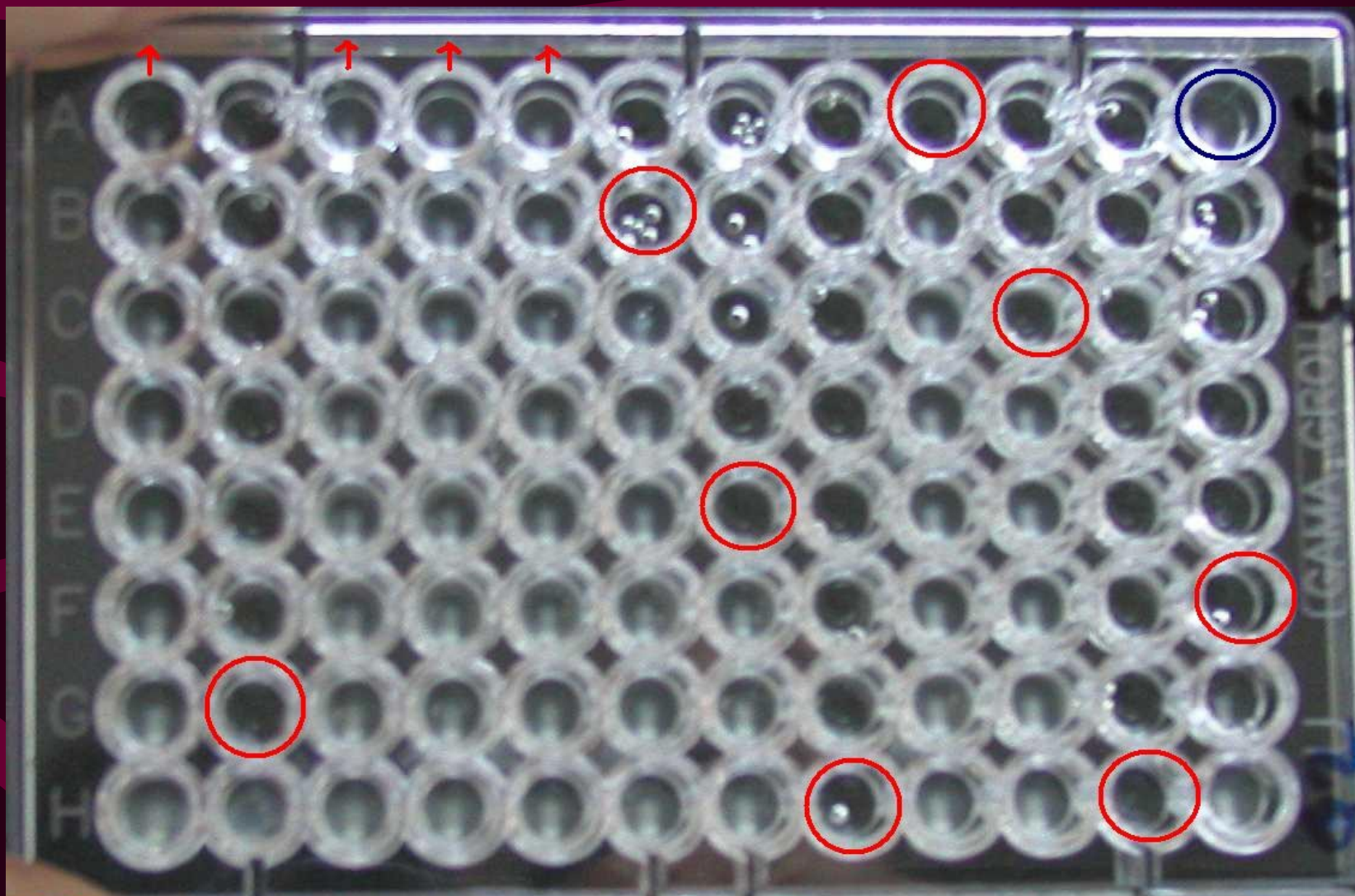


- Hodnota MIC je v tomto případě 0,75 mg/l (tam, kde okraj zóny kříží stupnici)

# 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 nahoře je kontrola růstu*)

# Mikrodiluční test – ukázka



○ MIC ○ growth control – 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)

64	<b>Model šablony mikrodil. testu</b>
32	
16	
8	
4	
2	
1	
0,5	

**Break-point je roven 8**

64	<input type="radio"/>	<b>Kmen</b>
32	<input type="radio"/>	<b>jasně</b>
16	<input type="radio"/>	<b>citlivý</b>
8	<input type="radio"/>	<b>MIC je</b>
4	<input type="radio"/>	<b>mnohem</b>
2	<input type="radio"/>	<b>nižší než</b>
1	<input type="radio"/>	<b>break-</b>
0,5	<input type="radio"/>	<b>point</b>

64	<input type="radio"/>	<b>Kmen</b>
32	<input type="radio"/>	<b>sice</b>
16	<input type="radio"/>	<b>citlivý,</b>
8	<input type="radio"/>	<b>ale je-li</b>
4	<input checked="" type="radio"/>	<b>mikrob</b>
2	<input checked="" type="radio"/>	<b>ve tkáni,</b>
1	<input checked="" type="radio"/>	<b>nemusí</b>
0,5	<input checked="" type="radio"/>	<b>to stačit</b>

# Příklady interpretace MIC (2)





# 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.

# MIC versus MBIC a MBEC

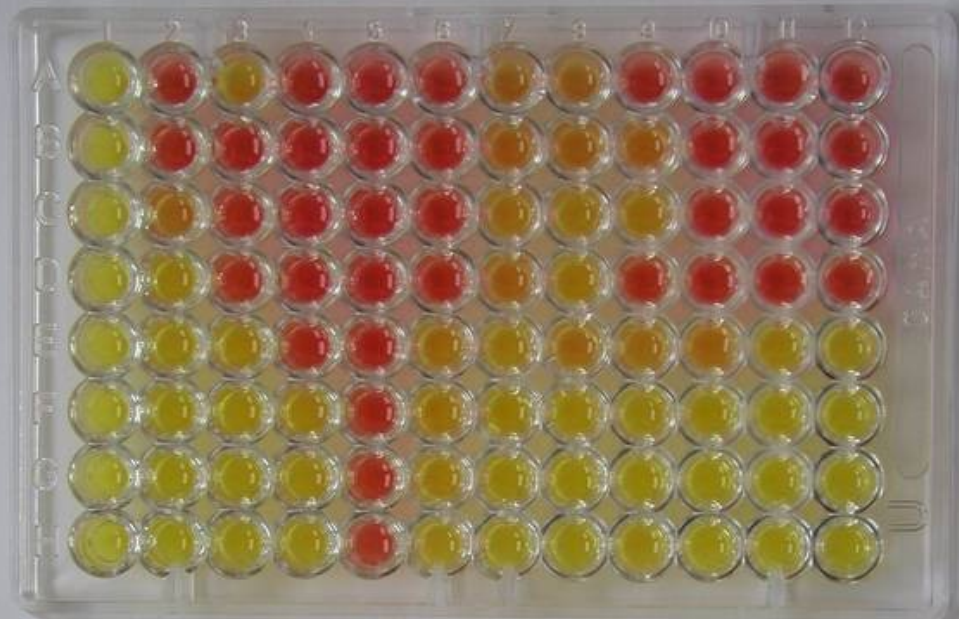
- Zatímco MIC je metoda určující minimální inhibiční koncentraci ATB u planktonické formy, **MBIC zjistí inhibici a MBEC eradikaci bakteriálního biofilmu.**

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.



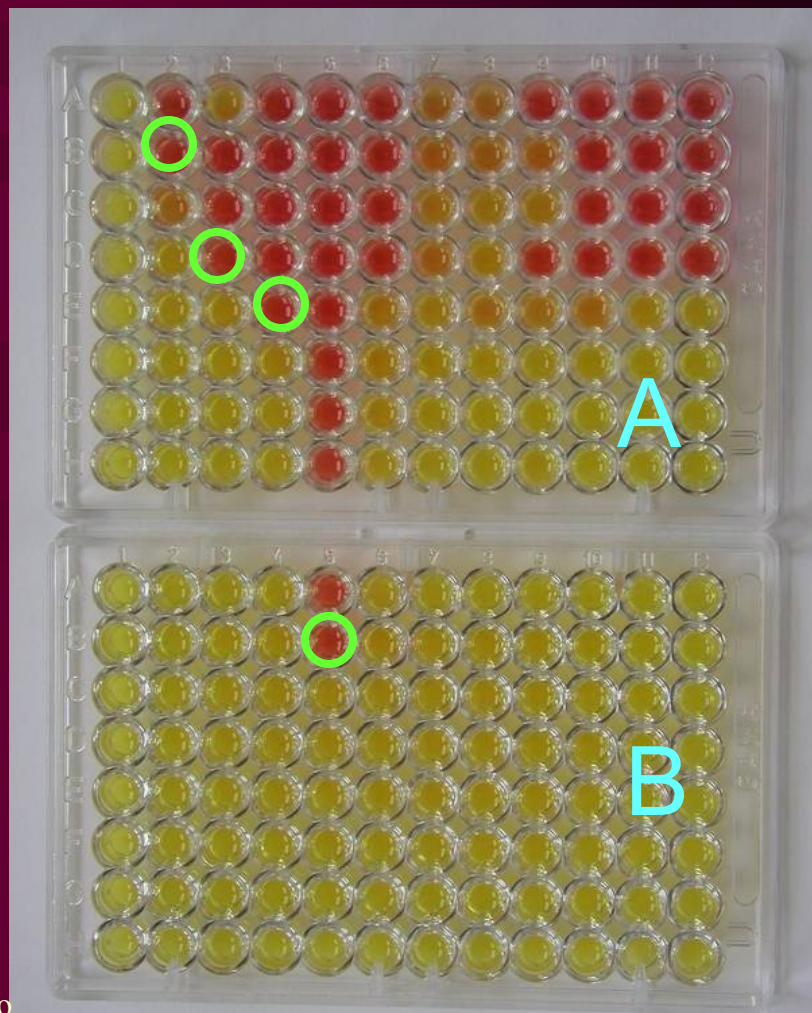
# Jak se odečítá MBEC I

**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)  $\beta$ -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  
průvodce léčbou  
antibiotiky a  
chemoterapeutiky

