

## Patogenita, virulence a rezistence bakterií k antimikrobiálním látkám

### Patogenita

- schopnost vyvolat onemocnění
- vlastnost druhová – týká se celého mikrobiálního druhu

Patogen – mikroorganismus, který je za určitých okolností schopen vyvolat onemocnění

Faktory patogenity (virulence) – dědičné znaky mikroorganismů, které jim umožní proniknout do makroorganismu (hostitele) a udržet se v něm

### Přirozená patogenita

- její součástí je přenosnost, která je nutná k šíření přirozeného onemocnění v populaci
- mikrobiální druhy patogenní x nepatogenní

Patogenní mikroorganismy

- primární (obligátní) – vyvolávají onemocnění i u zdravých osob (např. *Salmonella Typhi*, *Yersinia pestis*, virus planých neštovic)
- oportunní (fakultativní) – vyvolávají onemocnění jen za určitých podmínek, obvykle u osob se sníženou odolností, např. po lékařských zákrocích, u osob s potlačenou specifickou imunitou (např. *Listeria monocytogenes*)

### Experimentální patogenita

- schopnost vyvolat onemocnění u pokusných zvířat např. po injekčním podání mikroorganismu

### Patogenita mikroorganismu vs. hostitel

Hostitel – může být vůči mikroorganismu více či méně vnímavý (mikroorganismus je pro něj obligátně nebo oportunně patogenní) nebo téměř či zcela rezistentní (mikroorganismus je pro něj nepatogenní)

- některé mikroorganismy mohou nakazit široký okruh hostitelů (*Staphylococcus aureus*, *Francisella tularensis*, virus vztekliny)
- jiné jsou specializované jen na jeden hostitelský druh (*Treponema palidum*)

### Virulence

- vlastnost individuální, vyjadřuje stupeň patogenity určitého kmene mikroorganismu
- jednotlivé kmeny patogenního druhu mohou být různě virulentní, případně avirulentní
- stanovuje se např. na pokusných zvířatech – po aplikaci mikroorganismu se zjišťuje letální dávka
- LD50 – 50% letální dávka, množství mikroorganismu, které usmrtí 50 % infikovaných zvířat

### Složky patogenity (virulence)

#### Kontagiosita

- schopnost mikroorganismu přenášet se mezi hostiteli

#### Invazivita

- schopnost překonávat obranu
- zahrnuje schopnost vstoupit do hostitele (adherencí, penetrací)
- množit se ve vnitřním prostředí hostitele
- šířit se uvnitř organismu hostitele

#### Toxicita

- schopnost poškozovat hostitele
- přímo (vlivem mikroorganismu)
- obrannou reakcí hostitele na něj

## Výsledek kontaktu mikroorganismu s hostitelem

Infekce – vznik, průběh, projevy závisí na mikroorganismu, hostiteli, i okolnostech vzniku infekce

### Mikroorganismus

- patogenita mikroorganismu
- virulence kmene
- infekční dávka (počet MO)

### Hostitel

- vnímavost hostitele jako druhu
- stupeň nespecifické odolnosti napadeného jedince
- přítomnost/kvalita jeho specifické imunity

Výsledkem může být: onemocnění až smrt – perzistentní infekce, trvalé následky – likvidace mikroba (uzdravení, příp. se infekce nerozvine)

## Základní rysy nespecifické a specifické imunity

### Nespecifická imunita

- zaměřená proti širokým skupinám mikroorganismů
- vrozená, dědí se
- existuje u všech příslušníků druhu
- nepůsobí proti obligátním patogenům
- chybí imunologická paměť
- hlavní nástroje: bariéry (kůže, sliznice, normální mikroflóra), fagocyty, komplement

### Specifická imunita

- přizpůsobená jen určitému agens
- získává se během života, nedědí se
- vzniká jen u určitého jedince
- chrání i před obligátními patogeny
- přítomná imunologická paměť
- hlavní nástroje: T-buňky, protilátky (imunoglobuliny)

## Faktory patogenity a virulence

**Kontagiozita (přenositel)** závisí na

- počtu mikroorganismů vylučovaných z organismu
- jejich rezistenci vůči podmínkám okolního prostředí
- infekční dávce
- chování hostitele – využití obranných mechanismů hostitele k vlastnímu šíření (např. kýčání, kašel, průjem, změna chování)

**Adherence** – přichycení na povrch epitelů v ústech, tenkém střevě, močovém traktu

Adherenční faktory:

- fimbrie (pili) – např. *E. coli*, *P. aeruginosa*
- nefimbriální adhesiny – např. hemaglutininy yersinií, protein A u *S. aureus*, intimin u EPEC
- výběžky obalu virů - obvykle hemaglutininy např. vir chřipky
- přísavné disky u parazitů –např. tasemnic
- glukany a mannany u kvasinek

## Penetrace do hostitelského prostředí

### 1. Přímá

- vzácně aktivní přenos neporušenou kůží (např. leptospiry)
- drobnými trhlkami v pokožce, sliznici (např. *S. aureus*, pyogenní streptokoky, HIV)
- pokousáním (např. virus vztekliny)
- bodnutím členovcem (např. virus klíšťové encefalitidy)
- pomocí enzymů (lecithinasy, hyaluronidasy, např. u *C. perfringens*, *Str. pyogenes*)

### 2. Nepřímá

- vynucenou fagocytózou jinými buňkami než fagocyty – pomocí invazinů: internaliny u *L. monocytogenes*
- z rozpadajících se buněk - u virových infekcí

Dle interakce s eukaryotickými buňkami hostitele se MO dělí na:

- extracelulární
- fakultativně intracelulární
- obligátně intracelulární

### Schopnost množit se ve tkáních hostitele

- bakterie jsou závislé na získávání železa z prostředí

Mohou jej získávat pomocí:

- hemolysinů (rozrušením membrány)
- sideroforů, které váží Fe u enterobakterií
- získáváním Fe z laktoferinu, transferinu přes vazbu se specifickými receptory

### Schopnost šířit se organismem

- bakterie se mohou v hostitelském organismu šířit na místo jejich působení

Způsoby šíření mohou být:

- lymfou – *Mycobacterium tuberculosis*, pyogenní koky, viry
- krví – *Salmonella Typhi*, generalizované infekce
- přímým přestupem – *Str. pyogenes*, *C. perfringens*,
- podél nervů – virus vztekliny, tetanický toxin

### Schopnost překonat obranné mechanismy hostitele (příklady)

- tvorbou pouzdra (např. stafylokoky)
- pokrytím protilátkami IgA (např. meningokoky)
- zabíjením fagocytů leukocidiny (např. stafylokoky, klostridia)
- indukci fagocytózy u neprofesionálních fagocytů (např. chlamydie)
- únik z fagosomu (např. *L. monocytogenes*)
- rychlým pomnožením – než se stačí rozvinout imunita (např. respirační viry)
- oklamáním imunních lymfocytů – např. skrývání mikroorganismu (v nervových gangliích, infekčních ložiscích apod.)
- potlačením imunitní reakce – např. tvorbou superantigenů (stafylokoky, streptokoky)

**Toxicita** – schopnost poškozovat hostitele

- nejčastěji působením mikrobiálních toxinů (exotoxiny, endotoxiny)

Výsledkem může být

- Buněčná smrt – zničení buněk v infikované tkáni
- Metabolická postižení – farmakologickým vlivem bakteriálních toxinů
- Mechanické poškození – vzácné, působením parazitů, např. při masivním napadení škrkavkami

**Exotoxiny**

- průnikové faktory: hyaluronidasa, Dnasa, koleganasa
- cytolysiny: lecithinasa, sfingomyelinasa, hemolysiny (např. listeriolysin O)
- inhibitory proteosyntézy: shigatoxin
- neurotoxiny: tetanický toxin, botulotoxin
- superantigeny: stafylokový exfoliatin, enterotoxin

**Endotoxiny**

- Lipopolysacharid G- bakterií
- Teichoové kyseliny spolu s fragmenty peptidoglykanu G+ bakterií

### **Antibiotika a rezistence bakterií k antimikrobiálním látkám**

**Antibiotika**

- látky které inhibují růst mikroorganismů (bakteriostatické), nebo je usmrcují (baktericidní)
- přírodní látky produkované převážně mikroorganismy, nebo podobné látky připravené semisynteticky popř. synteticky
- produkty sekundárního metabolismu

**Antibiotika pro klinické použití**

- nesmí poškozovat eukaryotní buňky
- účinek již v nízkých koncentracích
- této hladiny má dosáhnout přiměřeně brzy
- výhodou post-antibiotický efekt – určitý časový interval, ve kterém přetrvává potlačení metabolické aktivity bakterií a jejich množení i když ATB není v těle přítomno

### **Rozdělení antibiotik**

**Původ**

- přírodní,
- semisyntetická
- syntetická (chemoterapeutika)

**Biologické účinky**

- bakteriostatická x baktericidní
- úzkospektrá x širokospektrá

**Biosyntetická dráha**

**Mechanismus účinku**

**Chemická struktura**

- $\beta$ -laktamy, aminoglykosidy, linkosamidy, makrolidy, tetracykliny, chinolony atd.

### **Mechanismus účinku antibiotik**

- Inhibice syntézy buněčné stěny
  - např.  $\beta$ -laktamy, vankomycin
- Porušení buněčné membrány
  - např. polymyxin B, kolistin (polymyxin E)
- Inhibice syntézy bílkovin
  - např. tetracykliny, streptomycin (a další aminoglykosidy), erytromycin (a další makrolidy)
- Inhibice syntézy nukleových kyselin
  - např. chinolony, novobiocin
- Inhibice metabolismu kys. listové (antimetabolity)
  - např. sulfonamidy, trimethoprim

### **Rezistence bakterií k antimikrobiálním látkám**

- schopnost bakteriální populace přežít účinek inhibiční koncentrace dané antimikrobiální látky

### **Co je to multirezistence bakterií**

Multirezistence (MDR):

- necitlivost alespoň k jedné látce ve třech různých skupin antibiotik

Extenzivní rezistence (XDR):

- necitlivost alespoň k jedné látce u téměř všech skupin antibiotik (antibiotika z pouze jedné maximálně dvou skupin zůstávají v citlivé kategorii)

Panrezistence (PDR):

- necitlivost ke všem skupinám antibiotik

### **Rezervoáry antibiotické rezistence**

- zdravotnická zařízení
- komunita
- farmy
- potraviny
- domácí mazlíčci
- divoce žijící zvířata
- prostředí

### **Rozdělení rezistence bakterií k AML**

Přirozená (primární) rezistence

- vnitřní - vždy dochází k její expresi nezávisle na vystavení antibiotiku
- indukovaná - geny rezistence se přirozeně vyskytují u bakteriálního druhu, ale k expresi rezistence dochází až po vystavení antibiotiku

Získaná (sekundární) rezistence

- v důsledku mutací vlastní chromosomální DNA
- horizontálním přenosem genů rezistence - mobilní genetické elementy

### **Přenos genetické informace rezistence**

- během dělení z buňky mateřské do buněk dceřiných – vertikální přenos
- různými mechanismy i do buněk bakterií různých druhů - horizontální přenos
  - mobilní genetické elementy- plazmidy, transpozony, integrony

### **Mechanismy přenosu:**

- transdukce (virovou částicí)
- konjugace (spájení přes pilus)
- transformace (DNA z volného prostředí, např. mrtvé b.)

### **Obecné mechanismy rezistence**

- změna cílové struktury
- omezená penetrace ATB do buňky (poriny)
- zvýšené vylučování ATB z buňky (eflux)
- enzymatická inhibice/inaktivace antibiotika

### **Rezistence – změna cílové struktury, příklady**

Penicilin vázající proteiny (PBP)

- přítomnost genu *mecA* pro pozměněný PBP → rezistence na methicilin (MRSA)

Modifikace prekurzorů peptidoglykanu

- přítomnost genů *vanA*, *vanB* → rezistence na vankomycin

Modifikace DNA gyrázy

- mutace v genu *gyrA* a *gyrB* → rezistence na fluorochinolony

Změna RNA polymerázy

- bodové mutace, inserce a delece v oblasti *rpoB* (gen pro  $\beta$ -podjednotku RNA polymerázy) → rezistence k rifampicinu

Mutace v syntéze ribosomálních proteinů

- rezistence k aminoglykosidům a makrolidům

### **Rezistence – změna propustnosti**

LPS v membráně G- (lipid A + polysacharid + O-antigen)

- bariéra proti účinkům ATB
- modifikace lipidu A → snížení vnějšího záporného náboje membrány → rezistence k polymyxinům a aminoglykosidům

Poriny

- rychlost difuze ATB závisí na velikosti, počtu a selektivitě porinů
- OprD – porin pro malé  $\beta$ -laktamy (imipen)
- OprE – porin pro chinolony a cefalosporiny
- absence nebo snížení počtu porinů, popř. mutace vedoucí k zúžení porinů → rezistence

## Rezistence – eflux

Eflux = mechanismus, kterým se bakterie zbavuje široké škály chemicky a strukturně odlišných sloučenin

- transmembránové proteiny – „efluxní pumpy“
  - úzce specifické (tetracyklin)
  - nespecifické - „multidrug transportéry“
  - schopné odstraňovat celou řadu ATB
  - multirezistentní fenotyp
  - rezistence s omezenou kapacitou, při zvýšení koncentrace ATB buňka opět citlivá

## Rezistence – inaktivace ATB

Enzymy modifikující aminoglykosidy

- acetyltransferázy (*aac*) - acetylace aminosk. (acetyl-CoA)
- fosfotransferázy (*aph*) - fosforylace hydroxylové sk. (ATP)
- adenyltransferázy (*ant*) - adenylace hydroxylové sk. (ATP)
- geny většinou na plasmidech a transpozonech

Enzymatická inaktivace chloramfenikolu

- acetyltransferáza (*cat*) – acetylace hydroxylové skupiny, modifikovaný derivát není schopen vazby na ribosom
- geny většinou na plasmidech a transpozonech

Enzymy hydrolyzující  $\beta$ -laktamová antibiotika

- $\beta$ -laktamázy - přerušení  $\beta$ -laktamového kruhu hydrolýzou amidové vazby
- široká skupina enzymů (více než 340 typů)
- penicilinázy, cefalosporinázy, metalo- $\beta$ -laktamázy (závislé na iontu kovu, obvykle  $Zn^{2+}$ )
- na chromosomech i plasmidech

## Stanovení citlivosti bakterií k antimikrobiálním látkám

Metody kvantitativní

- Agarová diluční metoda
- Mikrodiluční metoda
- E-test
  - výsledek: stanovení minimální inhibiční koncentrace (MIC)

Metody semikvantitativní

- Disková difúzní metoda
  - výsledek: C (S) - I - R

## Minimální inhibiční koncentrace (MIC)

- nejnižší množství (koncentrace) sledovaného antibiotika, které inhibuje viditelný růst mikroorganismu
- obvykle vyjadřuje v mg/l
- kvalita výsledků závisí na přesném dodržení metody a ověřuje se systémem kontrol

### Agarová diluční metoda

- hodnota MIC se hodnotí na agarových půdách, které obsahují zvolené koncentrace antibiotik
- obvykle se připravuje 12 – 15 koncentrací jednoho antibiotika řaděných dvojnásobně geometrickou řadou
- inokulum se očkuje formou **spotů** speciálním vzorkovačem
- na jedné Petriho misce (tj. jedné koncentraci antibiotika) můžeme testovat až 20 různých kmenů bakterií (1 PM: 1 koncentrace ATB pro více kmenů)
- soubor vyšetřovaných kmenů takto naočkujeme na všechny připravené Petriho misky
- po příslušné době inkubace odečteme pro každý testovaný bakteriální kmen hodnotu MIC

#### Výhody:

- vysoká standardizovanost - referenční metoda
- lze jí vyšetřit velký soubor kmenů za standardních podmínek
- spolehlivá při hodnocení účinku nových antibiotik
- lze jí odhalit kontaminaci kmene i heterorezistentní populaci

#### Nevýhody:

- pracná, časově a ekonomicky náročná, proto není praktická pro vyšetření citlivosti malého počtu nebo jednotlivých kmenů

### Mikrodiluční metoda

- MIC se hodnotí v jamkách mikrotitrační destičky, které obsahují zvolené koncentrace antibiotik v bujónu
- média s antibiotiky se rozplňují mechanickými rozplňovači do jamek mikrotitrační destičky s 96 jamkami s kulatým nebo kónickým dnem (100  $\mu$ l/jamku)
- obvykle se připravuje 8 koncentrací jednoho antibiotika v dvojnásobně geometrické řadě (1 destička: 12 antibiotik pro 1 kmen)
- do jamek se očkuje standardní inokulum vyšetřovaných bakterií
- po příslušné době inkubace se odečítá MIC
- MIC = nejnižší koncentrace zřetelně inhibující růst mikroorganismu

#### Výhody:

- vysoká shoda s výsledky agarové diluční metody
- pružná a snadná příprava velkého množství destiček s různými půdami, antibiotiky a jejich koncentracemi
- destičky lze dlouhodobě uchovávat (obvykle 6 měsíců při -80 °C)
- jednoduché provedení a možnost automatizace odečítání výsledků a jejich vyhodnocení

#### Nevýhody:

- omezené sestavy AML v komerčních destičkách
- obtížné rozpoznání případné kontaminace
- neschopnost detekce rezistentní subpopulace
- metodu nelze použít u kmenů, které v tekutém prostředí autolyzují



### **E-test**

- metoda kombinuje principy diskové difúzní metody a diluční metody
- E-test je inertní plastický proužek, který na jedné straně obsahuje exponenciální gradient koncentrací stabilizované antimikrobiální látky v suchém stavu
- na druhé straně proužku je vyznačen kód antimikrobiální látky a kontinuální stupnice, obvykle odpovídající rozmezí 15 ředění antibiotika dvojnásobně geometrickou řadou
- stupnice slouží k odečítání MIC
- na povrch agarů naočkovaných inokulem se přiloží E-test stranou, která obsahuje antimikrobiální látku
- po inkubaci se vytváří kolem proužku E-testu elipsa inhibovaného růstu
- MIC se odečítá v místě, kde elipsa přetíná okraj proužku

#### **Výhody:**

- jednoduchost provedení
- test lze provádět na různých půdách, proto je vhodný pro mikroorganismy s různými růstovými nároky
- spolehlivěji než mikrodiluční metoda odhaluje kontaminaci kmenů, lépe detekuje heterorezistenci

#### **Nevýhody:**

- vysoká cena
- výsledky mohou být ovlivněny koncentrací inokula a výškou agarů

### **Disková difúzní metoda**

- umožňuje stanovení citlivosti nebo rezistence vyšetřovaného MO k testovaným AML
- hodnotí se, zda vyšetřovaná bakterie vytvoří nebo nevytvoří na agarové půdě přípustnou zónu inhibice kolem disku s určitou koncentrací antibiotika
- po ukončení inkubace změříme průměr vzniklých inhibičních zón včetně disku
- naměřené hodnoty porovnáme s hraničním průměrem inhibiční zóny pro citlivé kmeny
- vyšetřovaný kmen označíme jako: citlivý x intermediálně rezistentní x rezistentní

#### **Výhody:**

- snadná a jednoduchá příprava, nízké náklady a dostatečně spolehlivé výsledky
- metoda nevyžaduje speciální přístrojové vybavení
- dostupnost kvalitních antibiotických disků umožňuje pružnost ve volbě vyšetřovaných antibiotik

#### **Nevýhody:**

- metodu nelze použít pro mikroby s nízkou rychlostí růstu a se speciálními kultivačními nároky
- výsledky jsou významně ovlivněny koncentrací inokula a výškou agarů

### **Kritéria pro vyhodnocení rezistence k AML**

- CLSI (Clinical & Laboratory Standards Institute)
- EUCAST (The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing)

## **Významné typy rezistence v humánní a veterinární medicíně**

Rezistence k methicilinu

- MRSA – methicilin rezistentní *S. aureus*

Rezistence k vankomycinu

- VRE – vankomycin rezistentní enterokoky, VRSA – vankomycin rezistentní *S. aureus*

ESBL (extended spectrum beta-lactamases)

- *Enterobacteriaceae*

Rezistence ke karbapenemům

- *Enterobacteriaceae*

Plazmidově vázaná rezistence ke kolistinu

- *Enterobacteriaceae, Acinetobacter, Pseudomonas aeruginosa*

PMQR (plasmid mediated fluoroquinolone resistance)

- *Enterobacteriaceae*