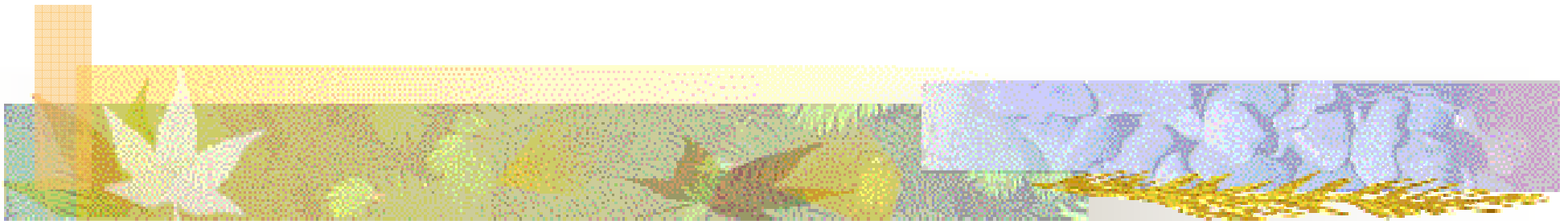


Lékařská mikrobiologie pro ZDRL



Týden 6: Testování citlivosti na antibiotika

Ondřej Zahradníček 777 031 969

zahradnicek@fnusa.cz ICQ 242-234-100

Než začneme

- Z praktických důvodů se antibiotik týkají dvě přednášky. Zatímco tato přednáška se týká více testování citlivosti, přednáška na konci letního semestru se bude týkat spíše antibiotické politiky, práce antibiotických středisek a podobně
- Naučit se názvy aspoň hlavních antibiotik a jejich charakteristiku bude spíše na vaše samostudium, na tom totiž není co vysvětlovat a zvládnete to i sami.

Postavení v systému metod

■ CÍL 1: ODHALIT PATOGENA

■ Přímé metody (mikrob – část – produkt):

- Mikroskopie – průkaz ve vzorku i id.
- Kultivace – průkaz ve vzorku i identifikace
- Biochemická identifikace – jen identifikace!
- Průkaz antigenu – průkaz ve vzorku i id.
- Průkaz nukleové kyseliny – zpravidla jen průkaz ve vzorku
- Pokus na zvířeti – zpravidla průkaz ve vzorku

■ Nepřímé metody (protilátky)

■ CÍL 2: ZJISTIT CITLIVOST PATOGENA NA ANTIMIKROBIÁLNÍ LÁTKY




U kterých mikrobů se provádí?

- **U virů** se zatím neprovádí, i když u některých se léčí antivirotiky. Testování citlivosti na antivirotika je zatím v experimentální fázi.
- **U bakterií** se provádí nejběžněji, i když jen u těch, které lze kultivovat (potřebujeme KMEN)
- **Z hub** se provádí jen u kvasinek, u vláknitých hub testovat citlivost na antimykotika nelze
- **U parazitů** se citlivost na antiparazitární látky netestuje



Možnosti „boje“ s mikrobny

- **Imunizace** – využívá přirozených mechanismů makroorganismu
- **Dekontaminační metody** – hrubé fyzikální a chemické vlivy, působení vně organismu
- **Antimikrobiální látky** – jemné, cílené působení uvnitř organismu s cílem maximálního zásahu mikroba a minimálního vlivu na makroorganismus



Ještě dekontaminace, nebo už antimikrobiální látka?

- Hranice mezi dekontaminačními metodami a antimikrobiálními látkami je **neostrá**.
- Zpravidla se za dekontaminaci ještě považuje působení na neporušenou kůži.
- Aplikace do rány už znamená užití antimikrobiální látky (antiseptika)
- Důsledky i **legislativní**: dekontaminační prostředky schvaluje hlavní hygienik, antimikrobiální látky stejně jako ostatní léky SÚKL

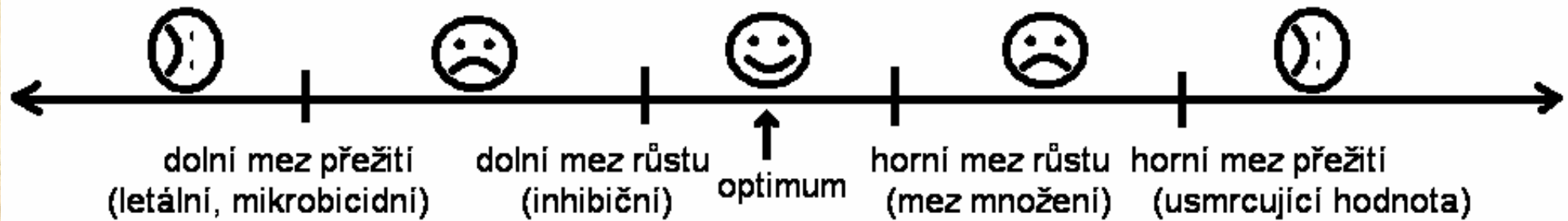
Druhy antimikrobiálních látek

- Látky působící celkově:
 - Antiparazitární látky proti parazitům
 - Antimykotika proti kvasinkám a vláknitým houbám
 - Antivirotika proti virům
 - Antituberkulotika proti mykobakteriím
 - Antibiotika proti bakteriím (přírodního původu)
 - Antibakteriální chemoterapeutika také proti bakteriím, ale syntetická

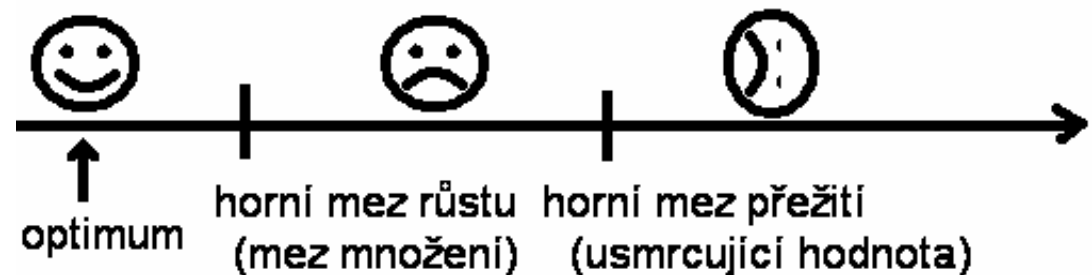
V poslední době se stírají rozdíly mezi posledními dvěma

- Látky působící lokálně: **antiseptika**

Působení určitých vlivů na mikroby I



- Při působení vlivu jako je pH má osa působení horní i dolní extrém



- Při působení antimikrobiálních látek má logický smysl pouze pravá polovina osy



Působení vlivů na mikroby II

- Při dekontaminaci trváme na usmrcení mikrobů (mikrobicidní efekt)
- Při užití antimikrobiálních látek můžeme počítat se spoluprací pacientovy imunity, proto obvykle stačí i mikrobistatický (inhibiční) účinek
- Toto však neplatí u akutních stavů či imunokompromitovaných pacientů, kde se snažíme o mikrobicidní působení vždy



MIC, MBC, MBEC

MIC – minimální inhibiční koncentrace je pojem, který se u antibiotik používá pro označení meze růstu (množení) mikroba

MBC – minimální baktericidní koncentrace se používá pro mez přežití bakterie. U virů by se použil pojem „minimální virucidní“ a podobně.

MBIC, MBEC – minimální biofilm inhibující/eradikující koncentrace, nové pojmy reflektující růst bakterií ve formě biofilmu



Primárně baktericidní a primárně bakteriostatická atb

Primárně baktericidní jsou atb, kde MIC a MBC jsou si téměř rovny

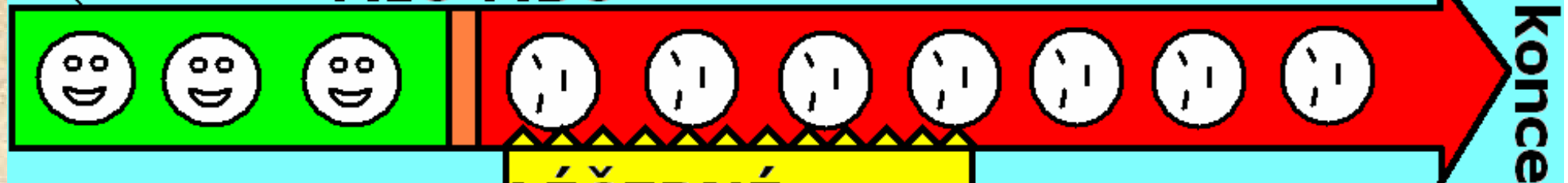
Primárně bakteriostatická jsou atb, u kterých se využívá hodnoty nad MIC, ale nikoli nad MBC

Více k používání baktericidních a bakteriostatických antibiotik si povíme v přednášce v letním semestru

Primárně baktericidní a primárně bakteriostatická atb

Primárně baktericidní atb

MIC MBC



LÉČEBNÉ KONCENTRACE

MIC

MBC



toxicita pro makroorgs.

Primárně bakteriostatické atb



Mechanismy působení antibiotik

- Na buněčnou stěnu (baktericidní)
 - Betalaktamová antibiotika
 - Glykopeptidová antibiotika (částečně)
- Na cyt. membránu – polypeptidy (baktericidní)
- Na nukleovou kyselinu – chinolony (baktericid.)
- Na proteosyntézu: aminoglykosidy (baktericidní); makrolidy, tetracykliny, linkosamidy, amfenikoly (bakteriostatické)
- Na metabolismus – sulfonamidy, bakteriostatické



Betalaktamová antibiotika

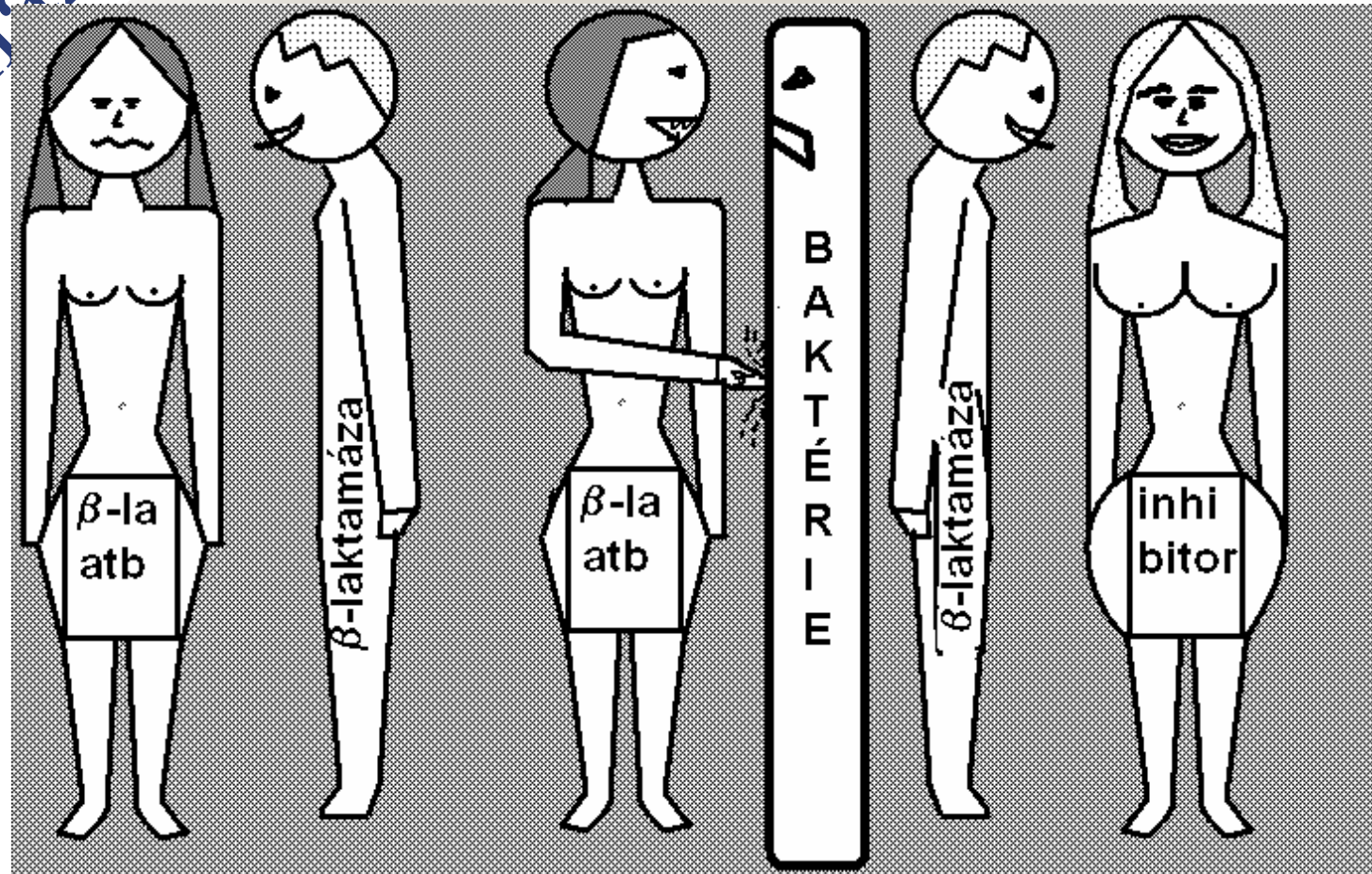
- Působení na buněčnou stěnu
- Jsou baktericidní, působí však jen na rostoucí bakterie, které si budují stěnu
- Jsou téměř netoxické (lidské buňky stěnu nemají), ale mohou alergizovat
- Patří sem:
 - Peniciliny
 - Cefalosporiny
 - Monobaktamy
 - Karbapenemy

Penicilinová antibiotika

- Klasický „Flemingův penicilin“ je stále dobrý např. na angíny. Existuje injekční (G-penicilin) a tabletová (V-penicilin) forma
- Oxacilin – na stafylokoky
- Ampicilin a amoxicilin – na některé enterobakterie, enterokoky a další mikroby
- Další rozšíření spektra: piperacilin, tikarcilin apod.
- Peniciliny potencionované inhibitory betalaktamáz (viz dále): amoxicilin + kyselina klavulanová, ampicilin + sulbaktam

Inhibitory betalaktamáz

- Jak působí inhibitory betalaktamáz?



- Působíme-li samotným antibiotikem, útočí naň betalaktamáza. Má-li však laktamáza na výběr atraktivnější substrát, zvolí si ho, a antibiotikum pak může nerušeně působit.

Ukázky penicilinů



Cefalosporiny

- Příbuzné penicilinům, přesto nebývají zkřížené alergické reakce, i když je nutná opatrnost.
- I. generace: na G⁺ bakterie, např. cefalexin
- II. generace: více na enterobakterie, např. cefuroxim (ZINNAT, ZINACEF)
- III. generace: i na některé rezistentní G⁻ bakterie (ceftriaxon, cefotaxim)
- IV. generace: cefepim (MAXIPIME), rezervní na velmi rezistentní mikroby

Ukázky cefalosporinů



„Nové betalaktamy“

- Monobaktamy – nejvýznamnějším zástupcem je aztreonam (AZACTAM). Neúčinkují na G+.
- Karbapenemy – imipenem (TIENAM) a meropenem (MERONEM) – na pseudomonády a producenty betalaktmáz



Glykopeptidová antibiotika





- Působí také na syntézu buněčné stěny, nejsou však příbuzná s betalaktamy. Jsou jen na G+.
- Používají se jako rezervní, např. u methicilin rezistentních stafylokoků (MRSA)
- Patří sem vankomycin (EDICIN) a méně toxický, ale dražší teikoplanin (TARGOCID)



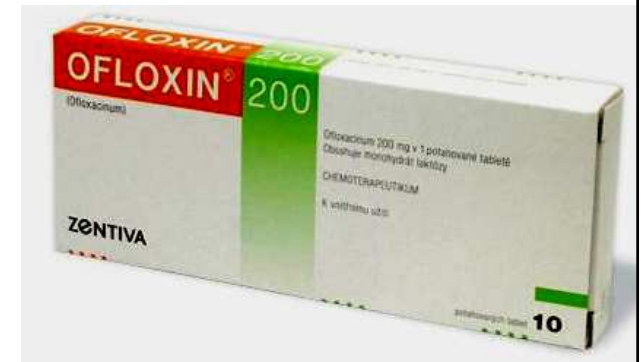
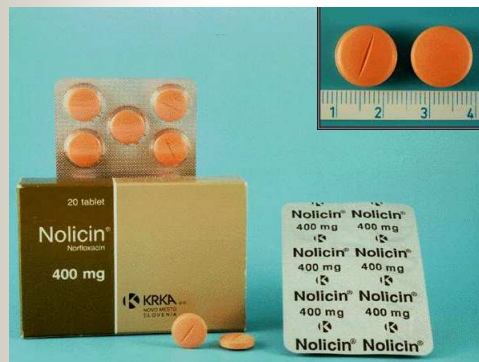
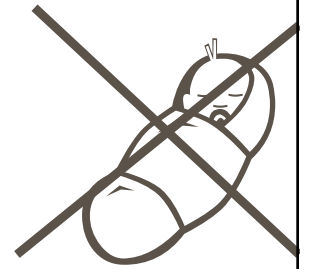
Polypeptidová antibiotika



- Působí na cytoplasmatickou membránu 
- Jsou vysoce toxická: ototoxická, nefrotoxická 
- Polymyxin B se používá jen lokálně (např. součást ušních kapek Otosporin)
- Polymyxin E – kolistin se ve výjimečných případech užívá celkově
- Působí i na nerostoucí bakterie
- Rezistentní jsou všechny grampozitivní bakterie a všechny protey, providencie, morganelly a serratie

Chinolonová chemoterapeutika I

- Působí na nukleové kyseliny (inhibice gyrázy)
- Od 2. generace jsou baktericidní
- Nepodávat do 15 let (růstové chrupavky)
- I. generace (kyselina oxolinová) a II. generace (norfloxacin – NOLICIN) jen pro močové infekce
- Hodně používaná III. generace – ofloxacin (TARIVID), ciprofloxacin (CIPLON), pefloxacin (ABAKTAL) – i pro systémové infekce






Aminoglykosidy

- Působí baktericidně v úvodu proteosyntézy
- Jsou ototoxické a nefrotoxické
- Synergie s betalaktamy – snížení toxicity
- Streptomycin už jen antituberkulotikum. Užívá se gentamicin, netilmicin, amikacin
- Neomycin s bacitracinem = framykoin (neomycin je příliš toxický, proto jen lokálně)

Už ve starých dílech „Nemocnice na kraji města“ se léčí „gentlemanovými kouličkami“ ... vlastně gentamicinovými kuličkami 😊

Ukázky aminoglykosidů





Makrolidy, linkosamidy, tetracykliny, amfenikoly

- Působí na proteosynézu, avšak nikoli na její počáteční fázi. Všechny jsou bakteriostatické
- Makrolidy a linkosamidy jsou vhodné jen pro grampozitivní bakterie (až na výjimky, jako jsou hemofily a některé G- anaeroby)
- Tetracykliny a amfenikoly mají široké spektrum
- Tetracykliny a amfenikoly patří k starším antibiotikům, dnes se pro toxicitu užívají spíše méně. Naopak makrolidy se dnes až nadužívají.

Makrolidy (a azalidy)



- I. generace: erythromycin, v praxi se užívá málo.
- II. generace: roxithromycin (RULID); josamycin (WILPRAFEN) a spiramycin se příliš nepoužívají
- III. generace: klarithromycin (KLACID), azithromycin (SUMAMED). Azithromycin je vlastně azalid, od ostatních se liší lepším intracelulárním průnikem a dlouhodobým účinkem

Linkosamidy

- Používá se linkomycin (LINCOCIN) a klindamycin (DALACIN C)
- Rezervní antibiotika určená zejména pro použití v ortopedii a chirurgii
- Velmi dobrý účinek na většinu anaerobů
- Výjimkou je *Clostridium difficile* – riziko pseudomembranósní enterokolitidy



Ukázky makrolidů a linkosamidů



Tetracyklinová antibiotika

- Poměrně široké spektrum, ale mohou být sekundární rezistence
- Nesmějí se podávat do deseti let (vývoj zubů)
- Používají se dnes méně než dříve, ale občas jsou stále nenahraditelné

Chloramfenikol (amfenikoly)

- Široké spektrum a nepříbuznost s jinými atb
- Vynikající průnik do likvoru
- Avšak: je výrazně hematotoxický (ovlivnění krvetvorby)

Analoga kyseliny listové

- Nejběžnější je sulfametoxazol v kombinaci s pyrimidinovým chemoterapeutikem trimetoprimem – ko-trimoxazol – BISEPTOL...
- Bakteriostatická, špatný průnik do tkání

Nitrofurantoin

- Působí na metabolismus cukrů. Je bakteriostatický. Má poměrně široké spektrum
- Na močové infekce, lokálně v gynekologii.
- Je poměrně levný
- Barví na žluto jednak moč, jednak i agar

Nitroimidazoly

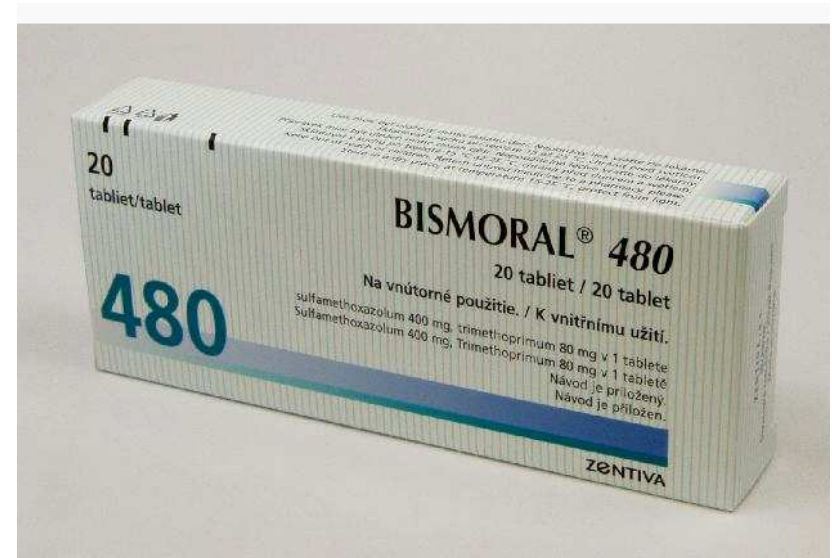
- Působí na syntézu nukleových kyselin u anaerobních bakterií. Kromě nich ale působí také na prvoky (*T. vaginalis*, *E. histolytica*)
- Používá se metronidazol (KLION, ENTIZOL, EFLORAN) a ornidazol (AVRAZOR, TIBERAL)

Další skupiny antibakteriálních látek

Stále jsou vyvíjeny nové látky. Např.:

- Linezolid – perspektivní protistafylokokové atb

Ukázky co-tromoxazolu a nitroimidazolů



Rezistence mikrobů na antimikrobiální látky

- **Primární rezistence:** všechny kmeny daného druhu jsou rezistentní. Příklad: betalaktamová atb nepůsobí na mykoplasmata, která vůbec nemají 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)
- Primární rezistence jednotlivých druhů jsou známy. Sekundární je nutno zjistit in vitro testováním!

Mechanismy rezistence

- Mikrob zabrání vniknutí antibiotika do buňky
- Mikrob aktivně vypuzuje atb z buňky
- Mikrob nabídne antibiotiku falešný receptor
- Mikrob enzymaticky štěpí antibiotikum (například betalaktamázy štěpí betalaktamová antibiotika)

Více v letní přednášce



Epidemiologicky významné rezistence - 1

- **MRSA** – methicilin rezistentní stafylokoky.
Nevpouštějí do svých buněk oxacilin ani jiné betalaktamy. Mnohé MRSA jsou rezistentní také na další atb (makrolidy, linkosamidy). Citlivé zůstávají glykopeptidy (vankomycin, teikoplanin).
- **VISA, VRSA** - stafylokoky částečně nebo úplně rezistentní i na glykopeptidy
- **VRE** – vankomycin rezistentní enterokoky. Snadno se šíří - enterokoky má spousta lidí ve stolici

Epidemiologicky významné rezistence - 2

- **Producenti ESBL** (Extended Spectrum Beta Lactamase). G- bakterie (klebsiely, ale i *E. coli* aj.) mohou tvořit širokospektré betalaktamázy, kde ani účinek inhibitorů není dostatečný. Účinné bývají jen karbapenemy a někdy některá ne-betalaktamová atb.
- **MLS rezistence** je sdružená rezistence na makrolidy a linkosamidy (a streptograminy), u streptokoků a stafylokoků. U *S. aureus* zatím naštěstí vzácné.

Metody zjišťování citlivosti in vitro

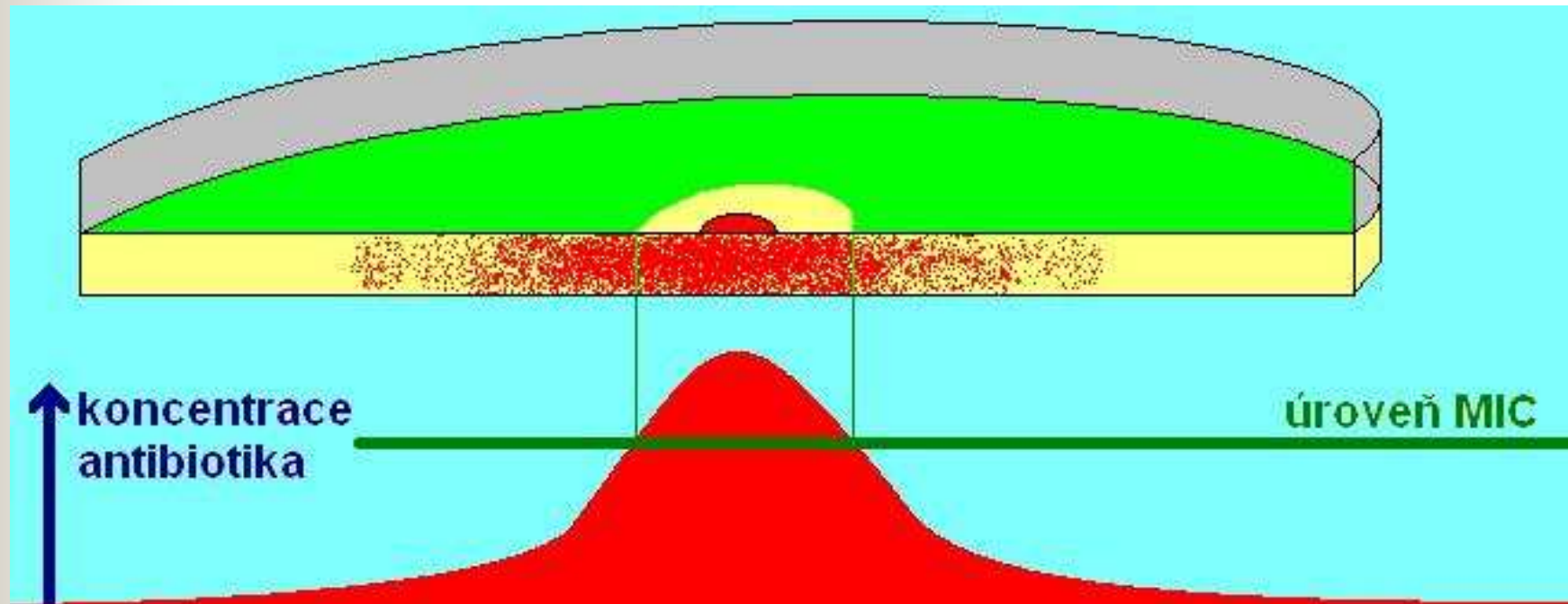
- Zjišťování citlivosti in vitro = v laboratoři
- Nezaručí stoprocentní účinnost léčby
- Přesto vhodné u většiny nálezů kultivovatelných patogenních bakterií
 - V běžných případech kvalitativní testy (citlivý - rezistentní)
 - U závažných pacientů kvantitativní (zjišťujeme MIC)



Difúzní diskový test

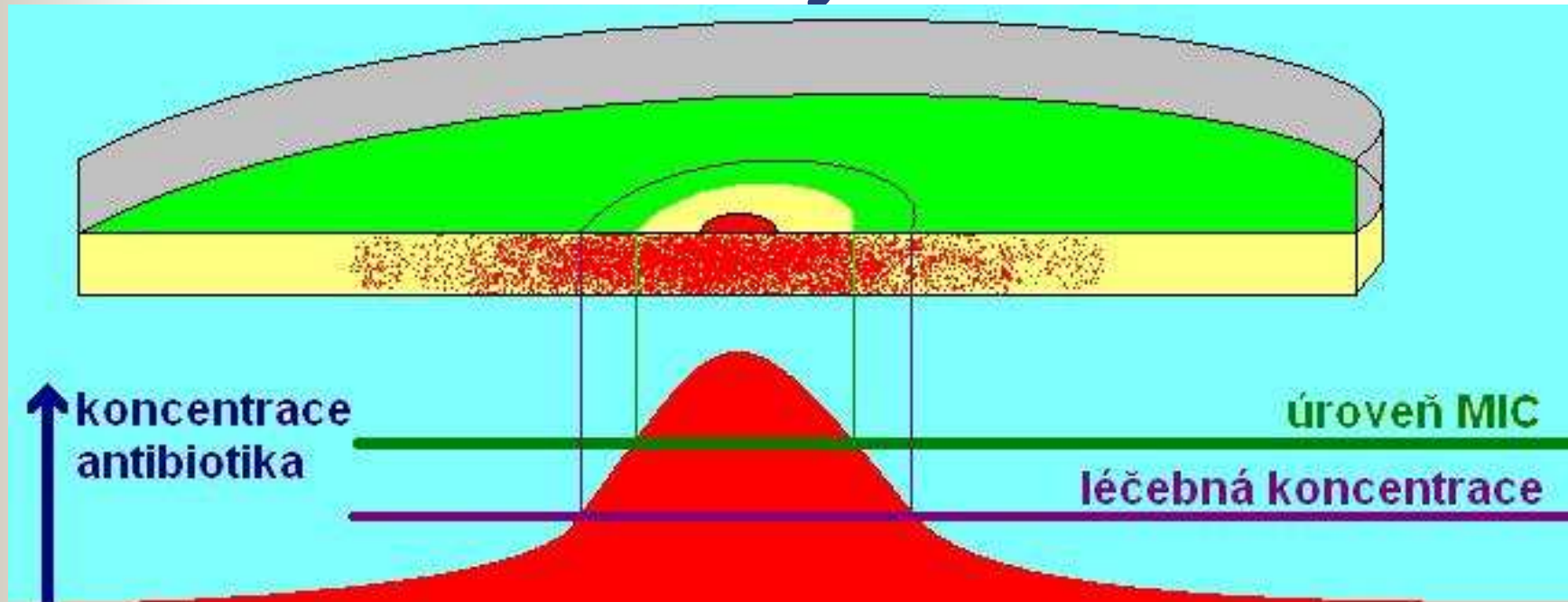
- Na MH (nebo jiný) agar se štětičkou plošně naočkuje suspenze bakterie
- Pak se nanášejí tzv. antibiotické disky – papírky napuštěné antibiotikem
- Atb difunduje (prostupuje) z disku agarem dál
- Koncentrace atb klesá se vzdáleností od disku
- Pokud mikrob roste až k disku, nebo má jen malou zónu, je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

Difúzní diskový test učeně - 1



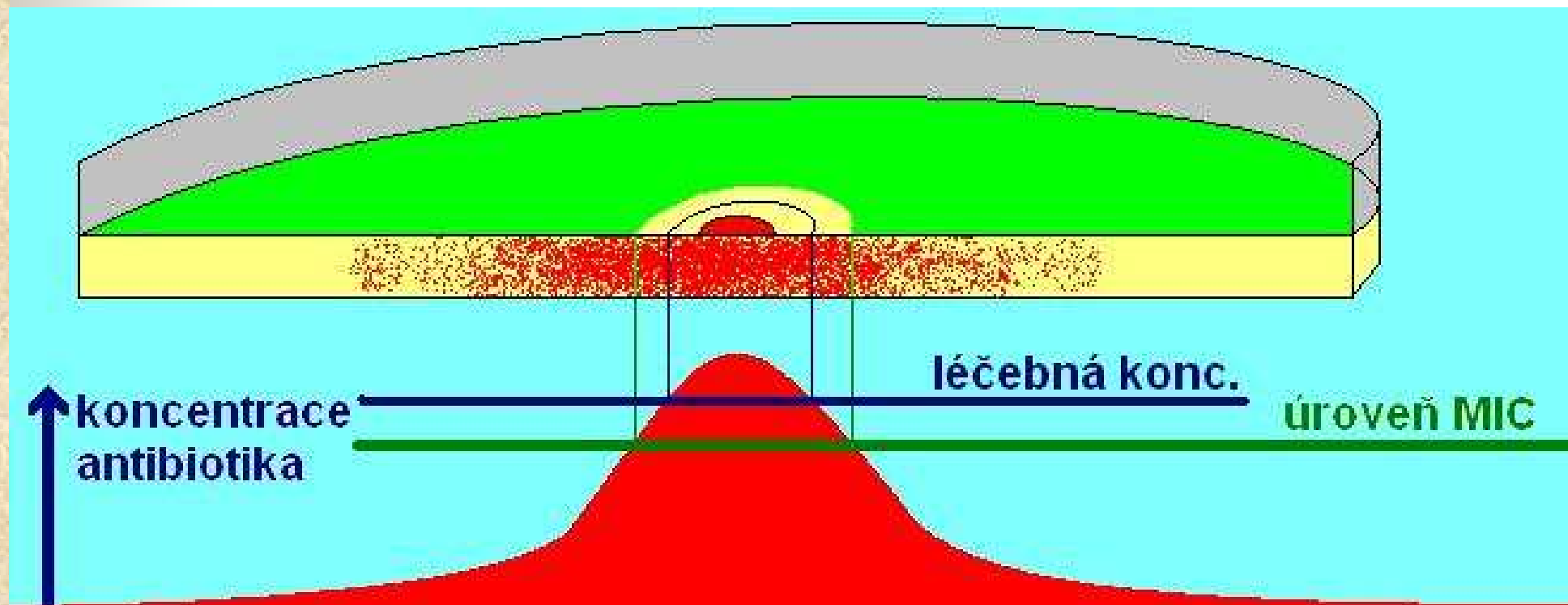
- Antibiotikum difunduje z disku, který je jím napuštěn, agarem. Čím dále od disku, tím je menší koncentrace antibiotika. V určitém bodě je koncentrace rovna MIC – to znamená, že antibiotikum přestává být schopno inhibovat růst dané bakterie.

Difúzní diskový test učeně - 2



- **Možnost A:** Léčebná koncentrace neinhibuje růst mikrobů. Růst mikrobů by inhibovala až vyšší koncentrace. Léčebná koncentrace $<$ MIC. Mikrob je rezistentní, ledaže zvýšíme koncentraci (to ale může poškodit pacienta)

Difúzní diskový test učeně - 3



- **Možnost B:** Léčebná koncentrace spolehlivě inhibuje růst mikrobů. Léčebná koncentrace $>$ MIC. Mikrob je citlivý na dané antibiotikum.

Pamatujte si:

- V praxi sice porovnáváme zóny (měříme zónu v milimetrech a porovnáváme s hodnotou referenční zóny), ale nepřímo vlastně porovnáváme koncentrace: **MIC** versus **léčebná koncentrace** (zvaná také **breakpoint**)

Difusní diskový test po lopatě



- 1 Bakterie se bojí antibiotika. Velká zóna – někdy dokonce tak velká, že se ani nedá změřit.
- 2 Bakterie se nebojí antibiotika, jsou na ně rezistentní. Malá, anebo vůbec žádná zóna kolem atb disku.

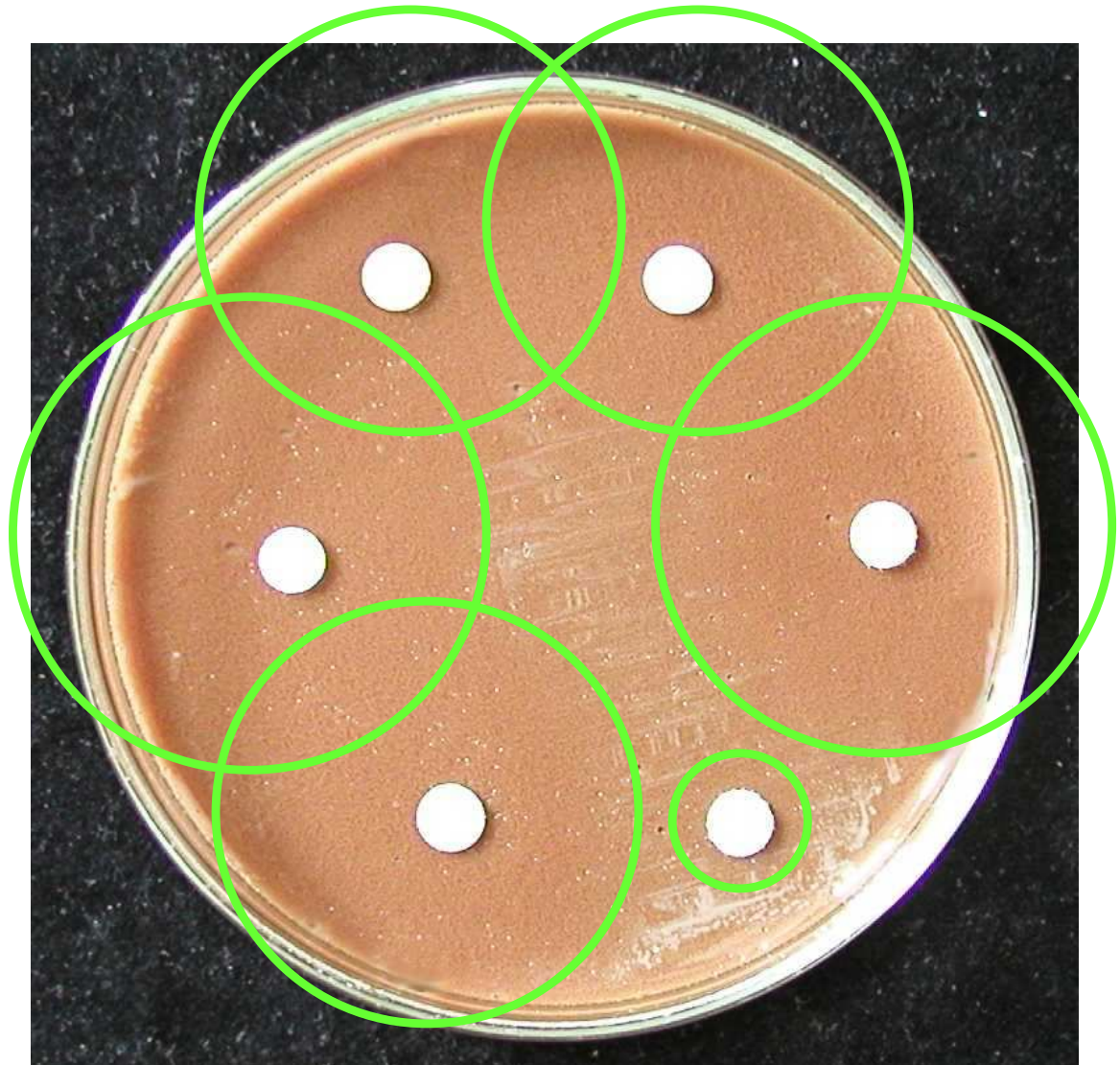
Difúzní diskový test v praxi: zóny se změří a porovnají s referenčními



Někdy jsou příliš velké zóny

Jsou-li zóny tak velké, že se nedají změřit, tak je neměřte a prostě rovnou napište, že kmen je na dané antibiotikum citlivý.

Zeleně jsou vyznačeny teoretické okraje zón – všimněte si, že z naprosté většiny buď splývají, nebo jsou mimo miskou



E-testy

- Podobné difúznímu diskovému testu
- Místo disku se však použije proužek
- V proužku stoupající koncentrace atb od jednoho konce ke druhému (speciální technologie, proto taky je to drahé jak prase).
- Zóna není kruhová, ale vejčitá.
- Test je kvantitativní
- Na papírku je stupnice →
→ jednoduché odečítání

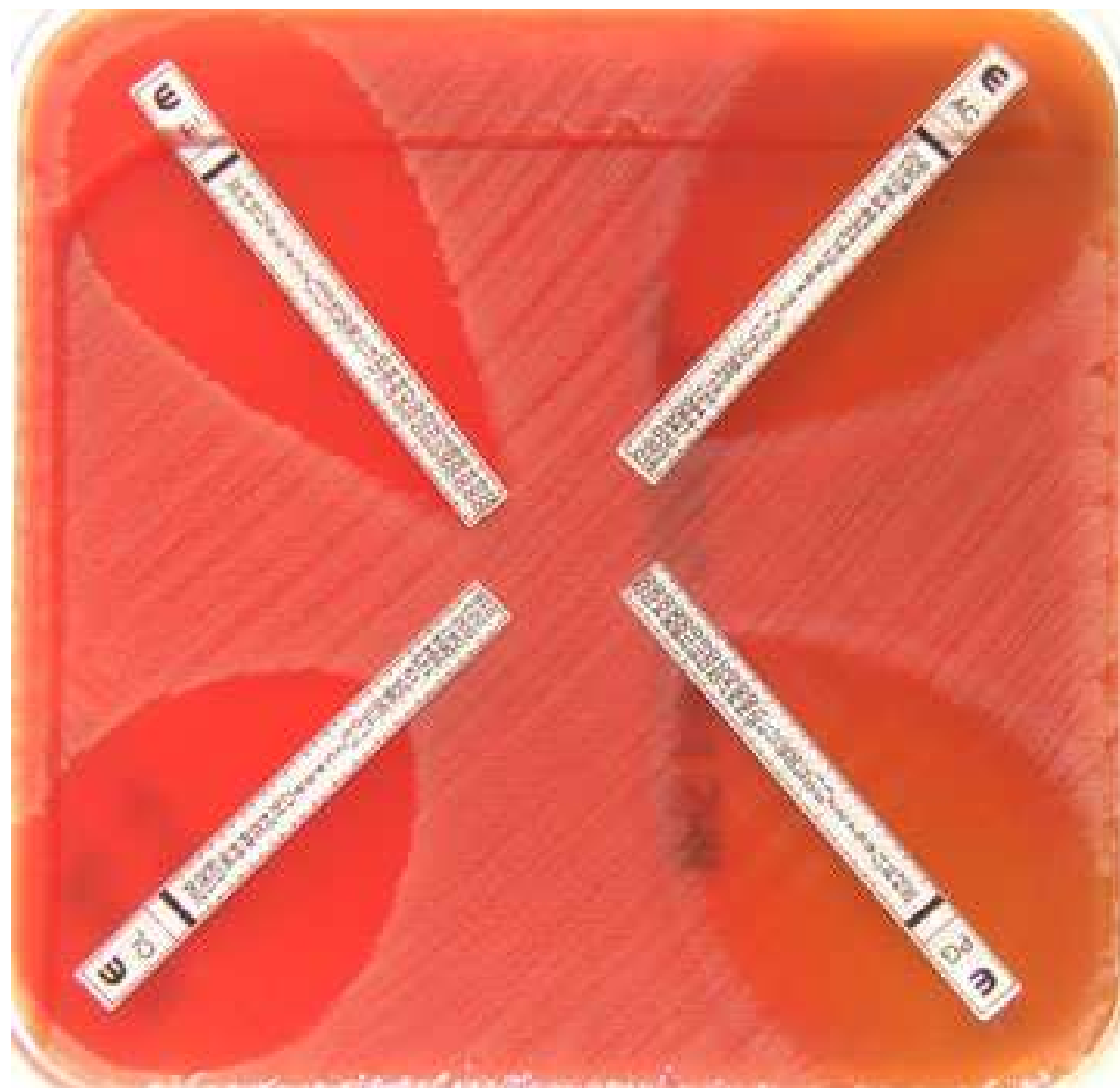


E-testy – vyhodnocení

Hodnota MIC se odečítá přímo na proužku – v místě, kde okraj zóny protíná daný proužek



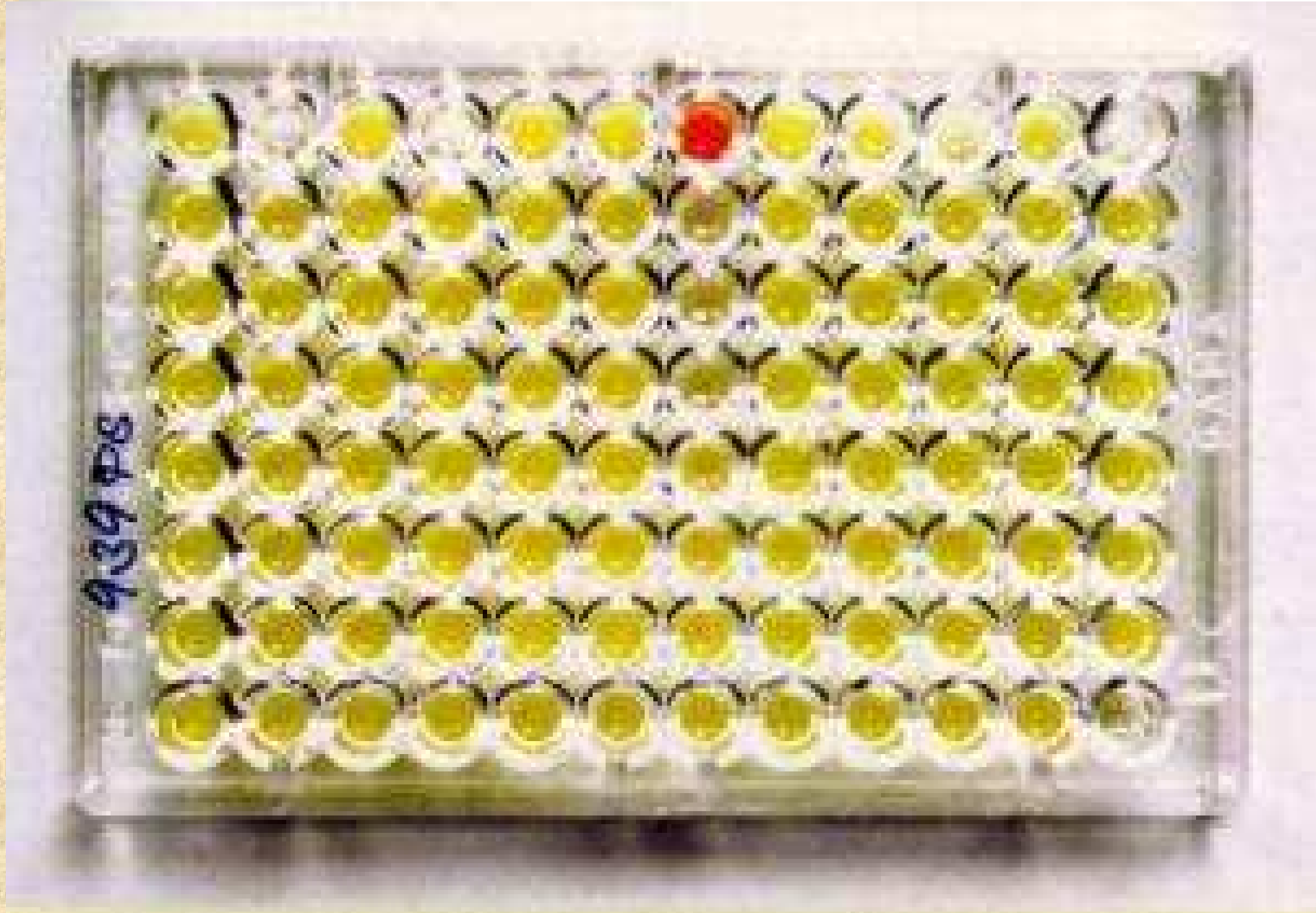
Někde
používají
speciální
čtvercové
misky



Mikrodiluční test

- Antibiotikum 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



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



Interpretace testu II



Kdy nestačí „citlivost“

- U močových infekcí je důležitý breakpoint odvozený od koncentrací dosažitelných v moči, nikoli v séru. (U většiny močových infekcí se ovšem MIC nezjišťuje)
- U abscesů, infekcí kostí a zejména u meningitid: breakpointy jsou vyjádřením koncentrace atb především v séru, jenže 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 zviditelní 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) β -laktamázy.



Děkuji za
pozornost

Příště budeme pokračovat
povídáním o molekulárních
metodách a o pokusu na
zvířeti

