



ROZDĚLENÍ ANTIMIKROBIÁLNÍCH LÁTEK, VYŠETŘOVÁNÍ CITLIVOSTI

M.Hanslianová
Antibiotické středisko
OKM FN Brno

Antimikrobiální látky

- I. **Antibiotika**
- II. Antimykotika
- III. Antiparazitika
- IV. Antivirotika

Antibiotika

- = léčiva používaná k profylaxi a terapii infekčních onemocnění vyvolaných baktériemi
- Mají jedinečné postavení ve skupině léčiv- ovlivnění nejen léčeného jedince

Antibiotika

Léčiva používaná k profylaxi a terapii infekčních onemocnění

- 1) Účinek na mikroorganismus (baktérie)
- 2) Účinek na makroorganismus
- 3) Účinek na prostředí

1) Účinek na mikroorganismus

Zástava růstu nebo usmrcení mikroorganismu

➤ **Antibiotika
bakteriostatická**

- Zastavují růst a množení mikrobů
- Účinek reverzibilní
- Klinický efekt pomalejší
- Tetracykliny, makrolidy, linkosamidy

➤ **Antibiotika
baktericidní**

- Usmrcení mikrobiální buňky
- Účinek ireverzibilní
- Rychlý klinický efekt
- Betalaktamy, aminoglykosidy, chinolony

2) Účinek na makroorganismus

- Selektivní toxicita, **ale** - vždy je ovlivněn i makroorganismus - nežádoucí účinky
- NÚ alergické
- NÚ toxické
- NÚ biologické





➤ **NÚ alergické**

- Při alergii na peniciliny existuje asi 5-10% pravděpodobnost zkřížené reakce i na karbapenemy a cefalosporiny
- Opačně se alergie na peniciliny předpokládá a jejich podání je konrtaindikované bez předchozích testů


➤ NÚ toxické

- jsou závislé na druhu použité látky, její dávce, způsobu aplikace a současném stavu makroorganismu
- Neurotoxicita (aminoglykosidy-ototoxicita)
- Hepatotoxicita (tetracykliny)
- Nefrotoxicita (aminoglykosidy, vankomycin, amfotericin B)
- Hematotoxicita (chloramfenikol)
- Lokální toxicita (Synercid-flebitidy)...



➤ **NÚ biologické**

- Ovlivnění fyziologické mikroflóry organismu
- Neexistuje antibiotikum, které by cíleně zasáhlo **pouze** určitého patogena a nemělo současně vliv na mikroorganismy těla vlastní!!

- 
-
- ❑ Přemnožení endogenních potenciálních patogenů (postantibiotická kolitida *Clostridium difficile*, kandidové superinfekce)
 - ❑ Exogenní superinfekce (polyrezistentní nozokomiální patogeny)



Poruchy fyziologické mikroflóry mohou vést k závažným onemocněním, často těžším, než byla základní choroba

3) Účinek na prostředí= ekologický účinek antibiotik

- Vznik a šíření rezistentních bakteriálních kmenů!!!!
- Antibiotika mají ve skupině léčiv unikátní postavení- jejich podání ovlivňuje nejen makroorganismus, jehož infekce je léčena, ale celou populaci

Vznik a šíření rezistence

Podání antibiotika



Možnost selekce rezistentních mutant mikrobů i při adekvátní léčbě (původce infekce i fyziologická mikroflóra)




Přenos genů rezistence mezi rody a druhy mikrobů

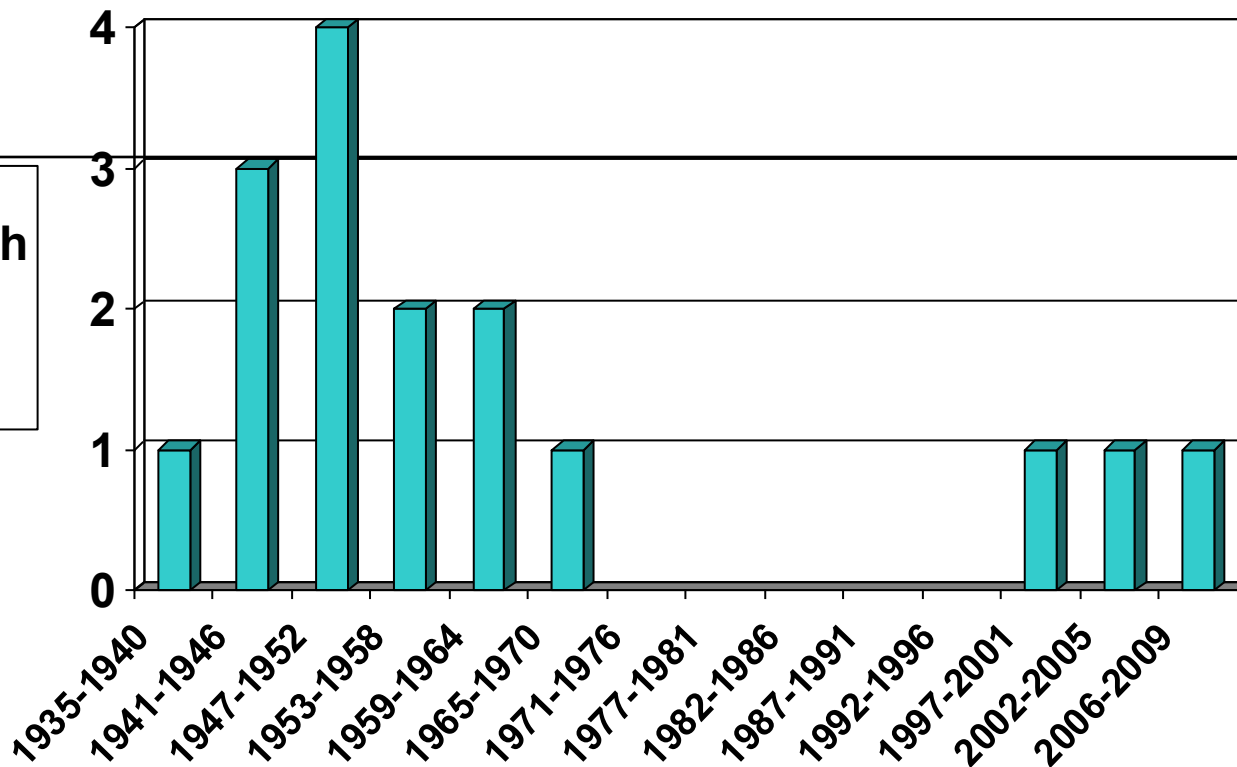


Přenos mikrobů mezi lidmi



- 
-
- Největším rizikem pro vznik rezistence je neadekvátní podávání antibiotik
 - Nesprávné indikace podání (respirační virózy)
 - Nesprávné dávkování (velikost dávky, dávkovací interval...)

■ počet nových skupin antibiotik



1935-1940: sulfonamidy

1941-1946: peniciliny, aminoglykosidy, cefalosporiny

1947-1952: chloramfenikol, tetracykliny,
makrolidy, linkosamidy

1953-1958: glykopeptidy, rifamyciny

1959-1964: nitroimidazoly, chinolony

1965-1970: trimetoprim


1997-2001: oxazolidinony

2002-2005: lipopeptidy

2006-2009: glycylycykliny

Betalaktamová antibiotika

- Obsahují betalaktamový kruh
- Inhibice syntézy buněčné stěny-
baktericidní
- Zanedbatelná toxicita (Ize podávat i
novorozencům, těhotným a lidem s
poruchami orgánových funkcí)
- Alergické reakce, zkřížené alergie

- 
-
- 1) Peniciliny
 - 2) Cefalosporiny
 - 3) Karbapenemy
 - 4) Monobaktamy



○ Peniciliny:

- Stále 100% účinnost vůči *Streptococcus pyogenes*
- Rozšířené antimikrobiální spektrum u preparátů s inhibitorem betalaktamázy (Augmentin, Unasyn, Tazocin)



- Cefalosporiny:

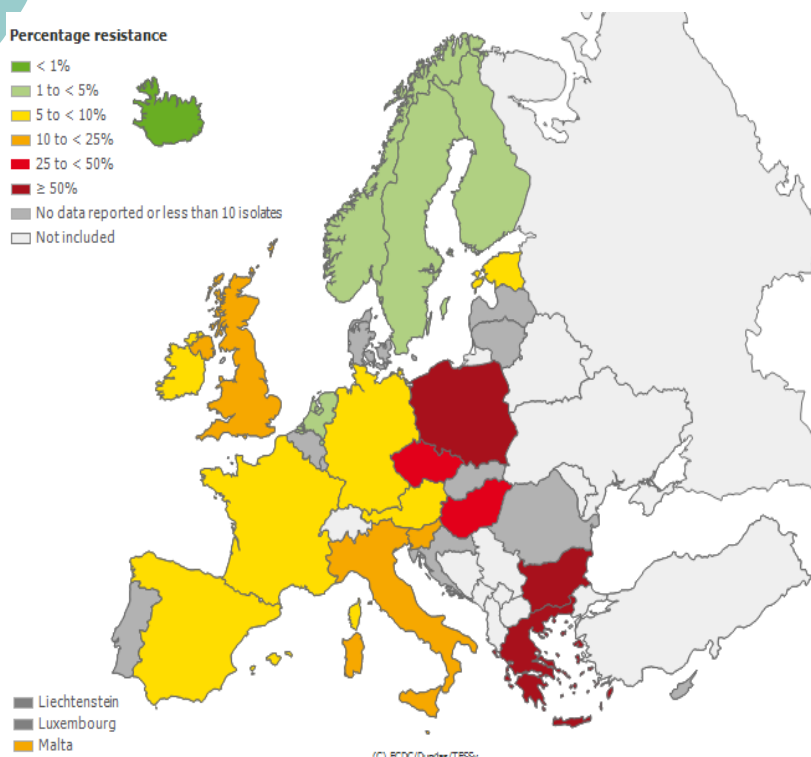
- I-IV generace

- Od I do III generace klesá účinnost na grampozitivní bakterie a stoupá účinnost na gramnegativní bakterie

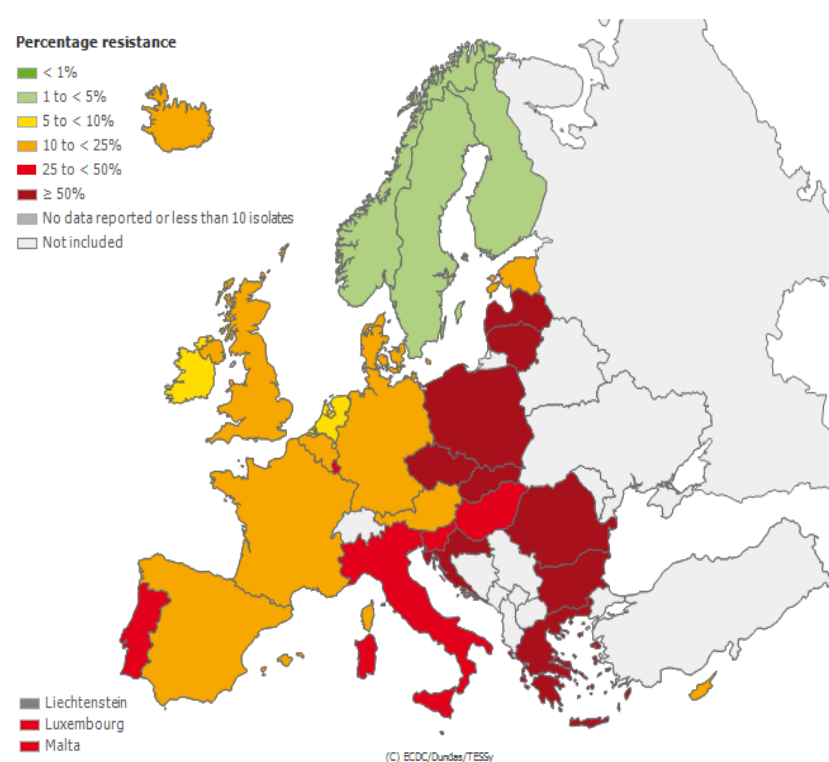
- IV generace- G+ i G-

Rezistence *Klebsiella pneumoniae* k CEF III, EARS-net, srovnání let

2005



2012



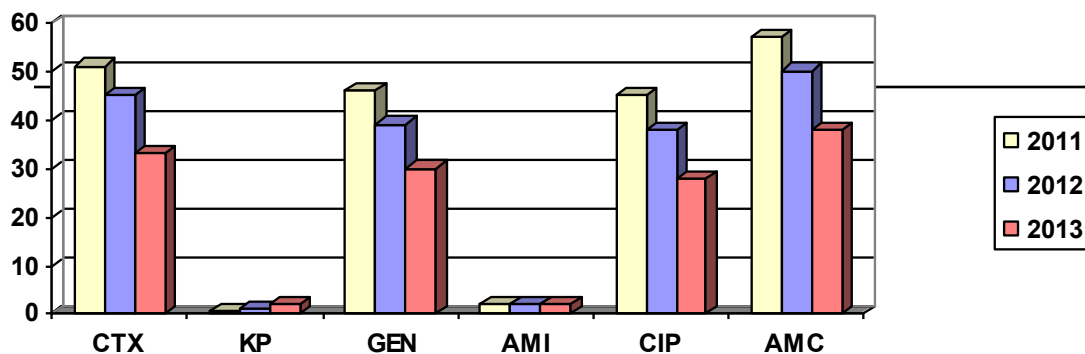
Rezistence

- = necitlivost mikroorganismů k antimikrobiálním látkám
 - 1) Primární (přirozená)
 - 2) Získaná
 - Změna cílové molekuly
 - Zhoršený průnik antibiotika do buňky
 - Aktivní eflux
 - **Inaktivace vlivem bakteriálních enzymů (betalaktamázy)**

Betalaktamázy

- Betalaktamázy úzkého spektra
- Betalaktamázy širokého spektra (**ESBL**, AmpC, KPC, MBL)

Rezistence *Klebsiella sp.* k vybraným antibiotikům, PMDV



	CTX /CTZ*	KP**	GEN	AMI	CIP	AMC /PPT** *
ESCO	15	0	6	<1	19	17
KLSP	33	2	30	2	28	38
PSAE	22	20/19	25	8	31	24

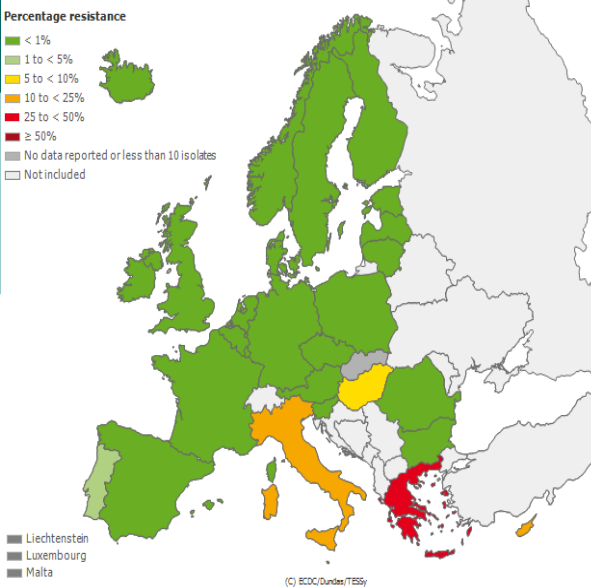
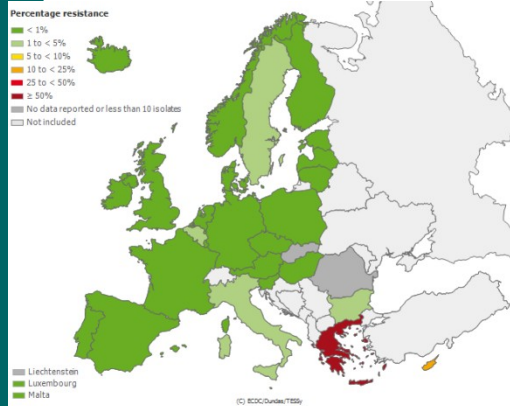
CTX=cefotaxim, KP=karbapenemy, GEN=gentamicin, AMI=amikacin, CIP=ciprofloxacin, AMC=amoxicilin/klavulanová kys.



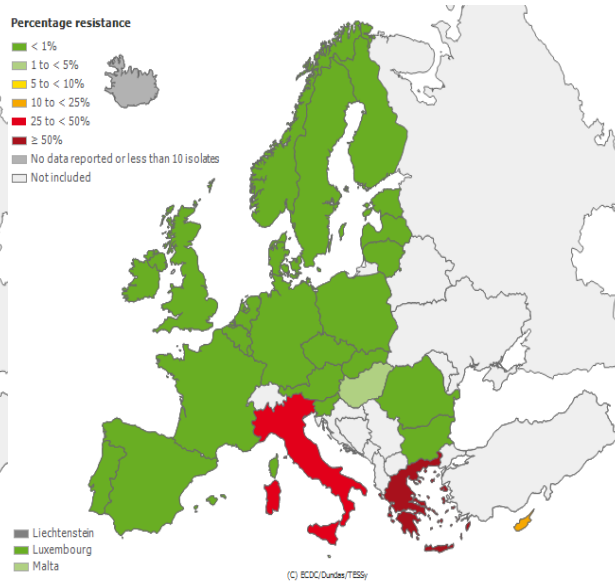
- Karbapenemy:

- Rezervní antibiotika zejména u infekcí vyvolaných enterobaktériemi!!

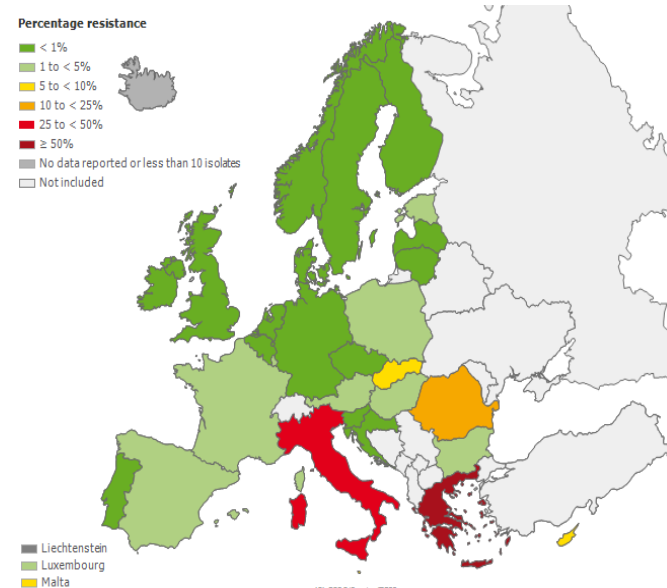
Rezistence *Kl.pneumoniae* ke karbapenemùm, EARS-net, 2010-2012



2010



2011



2012

Makrolidy

- Erythromycin, klarithromycin, azithromycin
- Inhibice proteosyntézy-bakteriostatické
- Lék volby u alergiků na penicilinová antibiotika
- Účinek na tzv. „atypické mikroby“ (mykoplasmata, ureoplasmata, chlamydie, legionely)

Linkosamidy

- Linkomycin, klindamycin
- Inhibice proteosyntézy-
bakteriostatické
- Výborný průnik do kostní tkáně
- Možnost vzniku
pseudomembranózní kolitidy
vyvolané *Clostridium difficile*

Tetracykliny

- Tetracyklin, doxycyklin
- Inhibice proteosyntézy-
bakteriostatické
- Účinek na tzv. „atypické
patogeny“ (mykoplasmata,
ureoplasmata, chlamydie, legionely)
- KI u dětí do 8 let
- Glycylcykliny- nová řada
tetracyklinů- **tigecyklin**

Aminoglykosidy

- gentamicin, tobramycin, amikacin
- Inhibice proteosyntézy- baktericidní!
- Pouze parenterální
- Nefrotoxické, ototoxické- nutnost měření hladin
- Prokázaná synergie s betalaktamy

Amfenikoly

- chloramfenikol
- Inhibice proteosyntézy-
bakteriostatický
- Výborné průniky do tkání včetně
likvoru
- Toxicita, zejména útlum kostní
dřeně (reverzibilní, ireverzibilní)
- Omezený pouze na některé indikace

Polypeptidy

- Kolistin
- Porucha funkce buněčné membrány- baktericidní
- Toxické- nefrotoxicita
- V současné době **jediné** fungující antibiotikum u polyrezistentních kmenů gramnegativních bakterií

Glykopeptidy

- Vankomycin, teikoplanin
- Inhibice syntézy buněčné stěny-
baktericidní
- Rezervní antibiotika pro rezistentní
stafylokoky a enterokoky
- Nefro-, ototoxicita

Chinolony

- Ciprofloxacin, ofloxacin, norfloxacin
- Inhibice syntézy nukleových kyselin- baktericidní
- Antibiotika ohrožená v současné době výrazným vzestupem rezistence
- Selektory rezistentních kmenů
- **Kolitida vyvolaná *Cl.difficile***

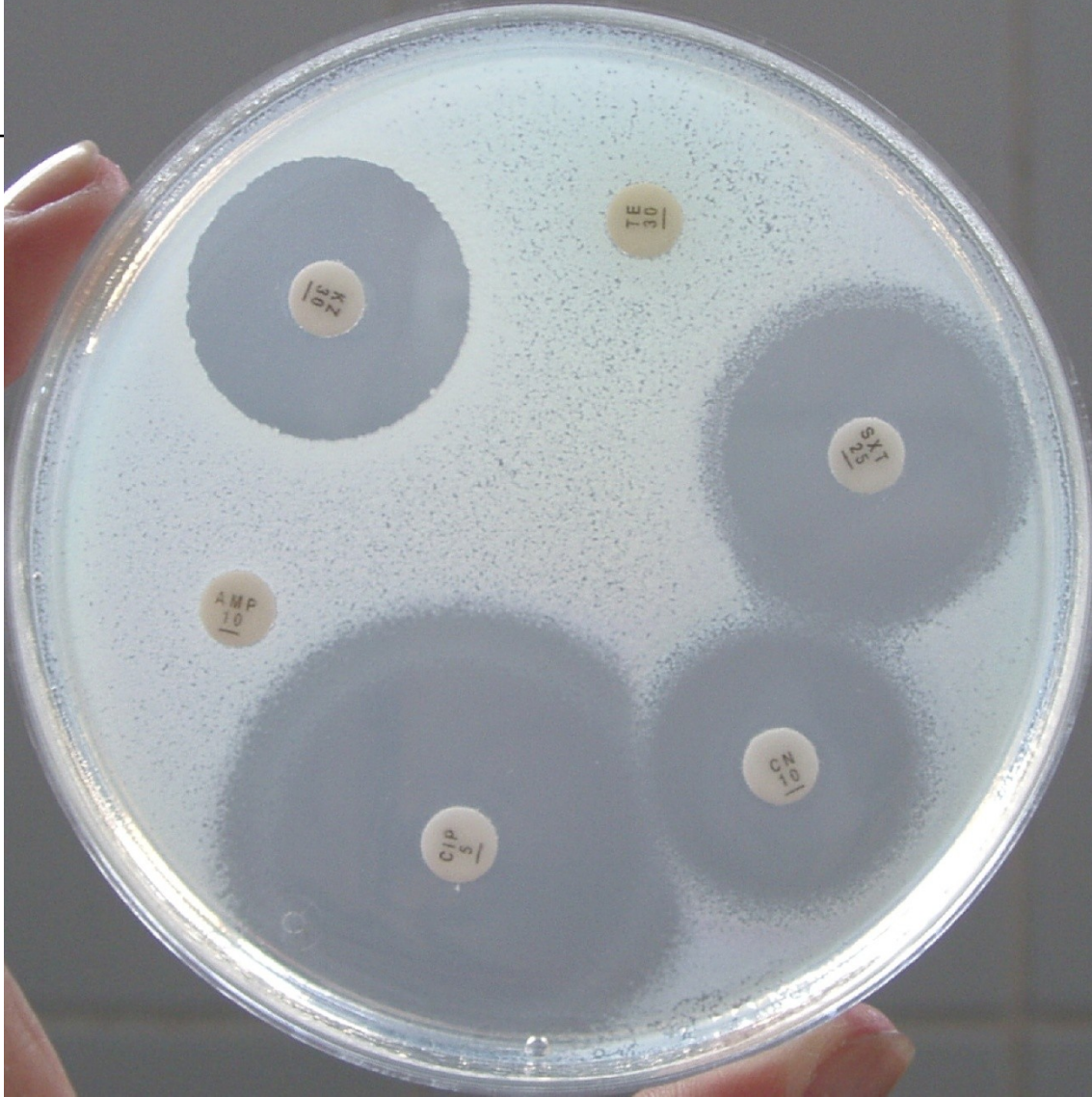
Ostatní antibiotika

- 1) Ansamyciny- rifampicin
- 2) Sulfonamidy- kotrimoxazol
- 3) Nitroimidazoly- metronidazol
- 4) Nitrofurany- nitrofurantoin
- 5) Streptograminy- Synercid
- 6) **Oxazolidinony- Zyvoxid**

Vyšetřování citlivosti k antibiotikům

1) **Disková difuzní metoda**


Stanoví se citlivost nebo rezistence podle toho, zda vyšetřovaná bakterie ve stanovené koncentraci buněk na agarové půdě vytvoří nebo nevytvoří přípustnou inhibiční zónu kolem disku s určitou koncentrací antibiotika po předepsané době inkubace



1) Půdy


- Mueller Hinton agar (MHA)-
nejpoužívanější, nízký obsah
antagonistů antibiotik
- MHA+ 5% ovčí krve- pro náročnější
baktérie (pneumokoky,
streptokoky, meningokoky)
krev- ovlivňuje výsledky citlivosti!



- 
-
- Obohacené půdy pro některé náročnější bakterie- haemofily- HTM, gonokoky
 - Ph půdy, výška půdy

2) Inokulum

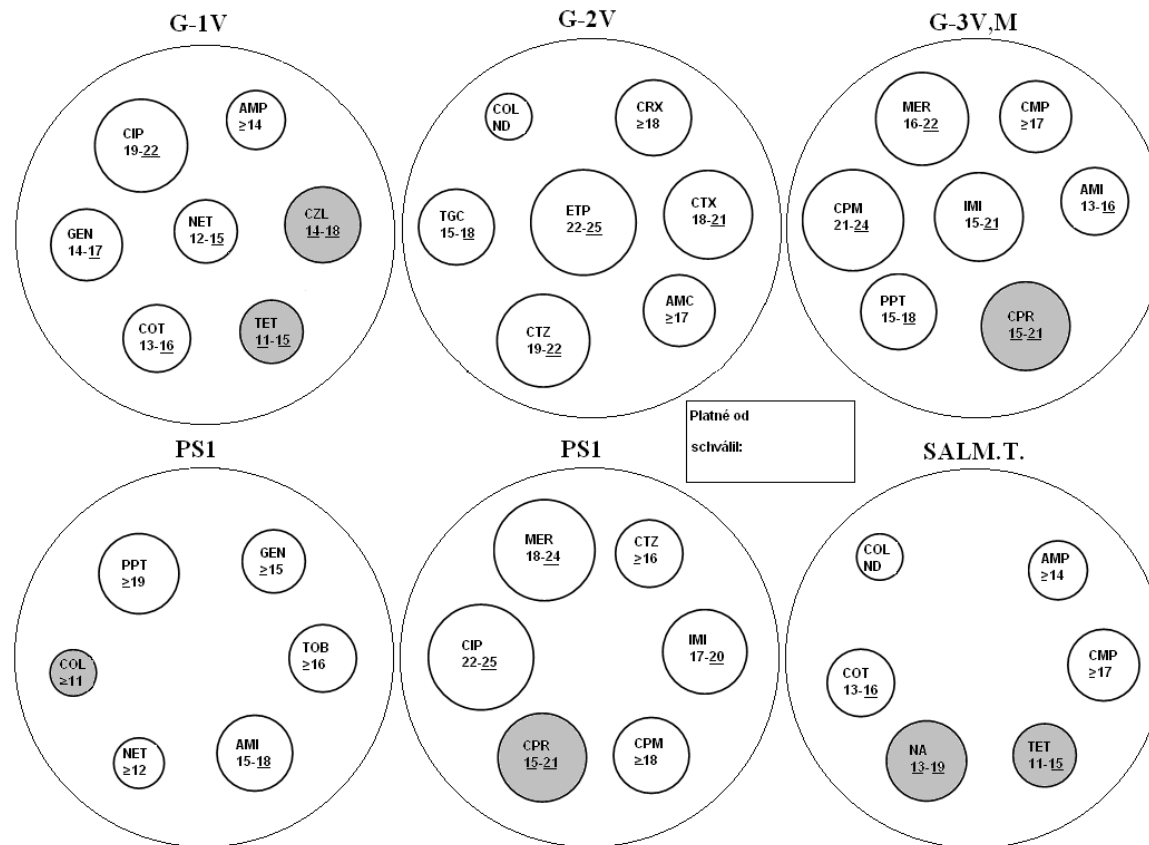
- Zásadním způsobem ovlivňuje výsledek diskové difuzní metody
- Koncentrace inokula- 0,5-1 McFarlandova zákalového standardu (1,5-3x 10 na 8 buněk/ml)
- Správné inokulum= splývavý růst kmene


- 
-
- Očkování na suché půdy vytemperované na pokojovou teplotu
 - Očkování přelitím
 - Očkování roztěrem

3) Antibiotické disky

- Sestavy antibiotik podle vyšetřované bakterie (doporučené sestavy-NRL pro antibiotika)
- Základní a rozšířené řady
- Sestavy antibiotik podle klinického materiálu
- Terapeutické disky, diagnostické disky

Sestavy antibiotik



- 
-
- Inkubace 18-24 hodin při 36 st.C
 - Aerobní, anaerobní, mikroaerofilní (5% CO₂) prostředí
 - Hodnocení inhibiční zóny- porovnání s hraničními hodnotami pro citlivé kmeny
 - Kvalitativní a **kvantitativní** hodnocení

EUCAST breakpoint

Guidance on reading EUCAST Breakpoint Tables

EUCAST Clinical Breakpoint Table v. 4.0, valid from 2014-01-01

The intermediate category is not listed but is inferred as the values between the S and the R breakpoints. If the S and R breakpoints are the same value there is no intermediate category.

Agent A: No intermediate category
 Agent B: Intermediate category: 4 mg/L, 23-25 mm
 Agent G: Intermediate category: 1-2 mg/L, 24-29 mm

Disk diffusion (EUCAST standardised disk diffusion method)
 Medium:
 Inoculum:
 Incubation:
 Reading:
 Quality control:

EUCAST method for antimicrobial susceptibility testing by disk diffusion and recommendations for quality control

Breakpoints with a species name apply only to that particular species (in this example *S. aureus*)

Antimicrobial agent	MIC breakpoint (mg/L)		Disk content (µg)	Zone diameter breakpoint (mm)		Notes Numbers for comments on MIC breakpoints Letters for comments on disk diffusion
	S ≤	R >		S ≥	R <	
Antimicrobial agent A	1 ¹	1 ¹	X	20 ^A	20 ^A	1. Comment on MIC breakpoints A. Comment on disk diffusion
Antimicrobial agent B, <i>S. aureus</i>	2	4	Y	26	23	
Antimicrobial agent C	IE	IE		IE	IE	
Antimicrobial agent D	-	-		-	-	
Antimicrobial agent E	IP	IP		IP	IP	
Antimicrobial agent F (screen)	NA	NA		25	25	
Antimicrobial agent G	0.5	2	Z	30	24	

Screening breakpoint to differentiate between isolates without and with resistance mechanisms

Link to MIC distribution if highlighted in blue

Link to rationale document if highlighted in blue

Insufficient evidence that the species in question are a good target for therapy with the drug

Not Applicable

In Preparation

Changes from previous version highlighted in yellow

No breakpoints. Susceptibility testing is not recommended

Link to zone diameter distribution if highlighted in blue

EUCAST breakpoint

Enterobacteriaceae

EUCAST Clinical Breakpoint Table v. 4.0, valid from 2014-01-01

Disk diffusion (EUCAST standardised disk diffusion method)
 Medium: Mueller-Hinton agar
 Inoculum: McFarland 0.5
 Incubation: Air, 35±1°C, 18±2h
 Reading: Read zone edges as the point showing no growth viewed from the back of the plate against a dark background illuminated with reflected light.
 Quality control: *Escherichia coli* ATCC 25922

Penicillins ¹	MIC breakpoint (mg/L)		Disk content (µg)	Zone diameter breakpoint (mm)		Notes Numbers for comments on MIC breakpoints Letters for comments on disk diffusion
	S ≤	R >		S ≥	R <	
Benzylpenicillin	-	-	-	-	-	
Ampicillin	8 ¹	8	10	14 ^{A,B}	14 ^B	1A. Wild type Enterobacteriaceae are categorised as susceptible to aminopenicillins. Some countries prefer to categorise wild type isolates of <i>E. coli</i> and <i>P. mirabilis</i> as intermediate. When this is the case, use the MIC breakpoint S ≤ 0.5 mg/L, and the corresponding zone diameter breakpoint S ≥ 50 mm. B. Ignore growth that may appear as a thin inner zone on some batches of Mueller-Hinton agars.
Ampicillin-sulbactam	8 ^{1,2}	8 ²	10-10	14 ^{A,B}	14 ^B	2. For susceptibility testing purposes, the concentration of sulbactam is fixed at 4 mg/L.
Amoxicillin	8 ¹	8	-	Note ^C	Note ^C	C. Susceptibility inferred from ampicillin.
Amoxicillin-clavulanate	8 ^{1,3}	8 ³	20-10	19 ^{A,B}	19 ^B	3. For susceptibility testing purposes, the concentration of clavulanate is fixed at 2 mg/L.
Amoxicillin-clavulanate (uncomplicated UTI only)	32 ^{1,3}	32 ³	20-10	16 ^{A,B}	16 ^B	
Piperacillin	8	16	30	20	17	
Piperacillin-tazobactam	8 ⁴	16 ⁴	30-6	20	17	4. For susceptibility testing purposes, the concentration of tazobactam is fixed at 4 mg/L.
Ticarcillin	8	16	75	23	23	
Ticarcillin-clavulanate	8 ³	16 ³	75-10	23	23	
Phenoxymethylpenicillin	-	-	-	-	-	
Oxacillin	-	-	-	-	-	
Cloxacillin	-	-	-	-	-	
Dicloxacillin	-	-	-	-	-	
Flucloxacillin	-	-	-	-	-	
Mecillinam (uncomplicated UTI only)	8 ⁵	8 ⁵	10	10 ^{A,B}	10 ^{A,B}	5E. Mecillinam (pivmecillinam) breakpoints relate to <i>E. coli</i> , <i>Klebsiella</i> spp. and <i>P. mirabilis</i> only. F. Ignore isolated colonies within the inhibition zone for <i>E. coli</i> .

-
- U některých kmenů a některých materiálů je disková difuzní metoda nedostačující, nutno vyšetřit MIC-
minimální inhibiční koncentraci!
 - **MIC**= nejnižší koncentrace
antimikrobiální látky, která je schopna
zastavit růst bakterie
 - **MBC**= nejnižší koncentrace
antibiotika, která je schopna usmrtit
bakterii


Vyšetřování citlivosti k antibiotikům

2) **Diluční mikrometoda**

hodnotí se MIC v jamkách
mikrotitrační destičky, které
obsahují zvolené koncentrace
antibiotik v bujónu

MIC= první nezkalená jamka
mikrotitrační destičky



- 
-
- Inokulum (ředění 1:10)
 - Očkování
 - Inkubace
 - Sestavy antibiotik

MIC- výhody

- Hodnota MIC důležitá pro některé kmeny a diagnózy
- Klinické breakpointy:
Streptococcus pneumoniae-
meningitis x pneumonie

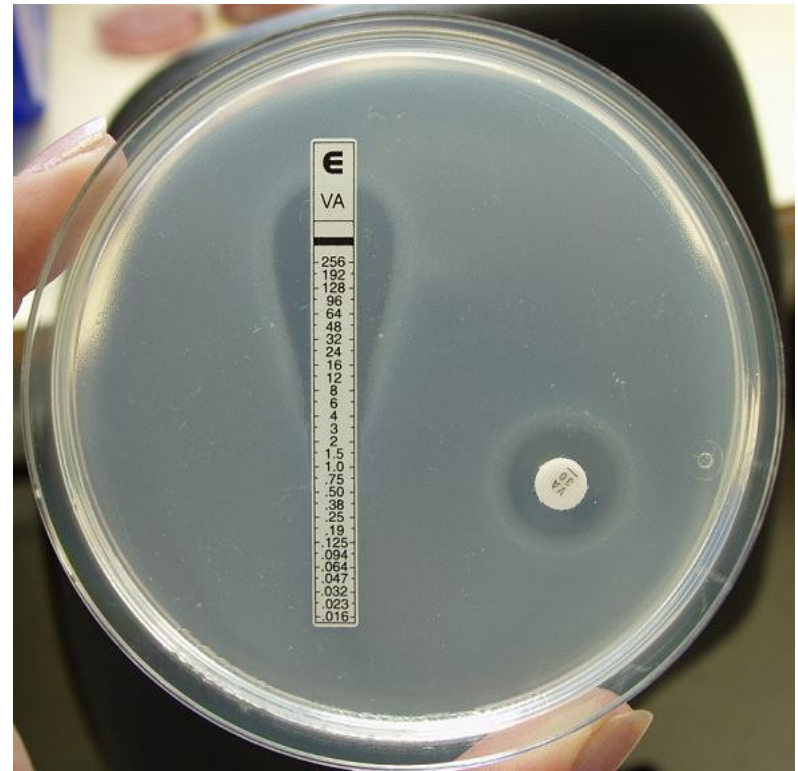
MIC- nevýhody


- Obtížné stanovení různých typů rezistence a produkce betalaktamáz



E test

- Plastikový proužek napuštěný antibiotikem ve stoupající koncentraci
- MIC- odečítá se v místě, kde inhibiční zóna protíná proužek



- 
-
- Vyšetření citlivosti resp. rezistence k antibiotikům má řadu úskalí a vyžaduje erudici a přesnost
 - Ideální je kombinace více metod v laboratoři