



TESTOVÁNÍ CITLIVOST MIKROBŮ A JEJICH FAKTORŮ REZISTENCE

Lékařská mikrobiologie – cvičení, jarní semestr 2017
Mikrobiologický ústav LF MU

Osnova

- ▶ Antimikrobiální látky – dělení, mechanismy účinku
- ▶ Mechanismy rezistence na ATB
- ▶ Zjišťování citlivosti/rezistence na ATB *in vitro*
- ▶ Fágová terapie



Možnosti kontroly počtu mikrobů

- ▶ **Dekontaminační metody** – nejedná se o léčiva! Působí vně organismu (viz. praktikum J04).
- ▶ **Antimikrobiální látky** – působí uvnitř organismu (možná také zevní aplikace).
- ▶ **Imunizace** – využívá přirozených imunitních mechanismů makroorganismu (pasivní imunizace, aktivní imunizace).



Druhy antimikrobiálních látek

► Celkově působící:

- ❑ Antiparazitika (paraziti)
- ❑ Antimykotika (kvasinky, vláknité houby)
- ❑ Antivirotika (viry)
- ❑ Antituberkulotika (mykobakterie)
- ❑ Antibiotika (bakterie)

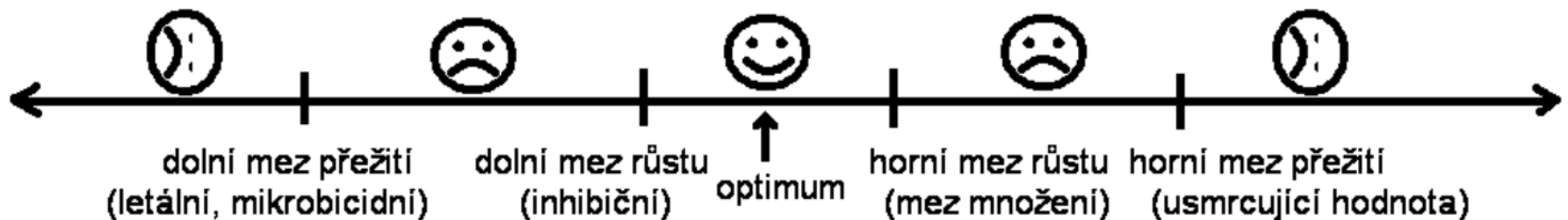
► Lokálně působící:

- ❑ Antiseptika



Mikroorganismy a vnější prostředí

- ▶ Pozn. antimikrobiální látky (zjednodušeně ATB – antibiotika)
- ▶ **Působení vlivů prostředí – mezní hranice**
- ▶ **Působení antimikrobiálních látek – dvě horní meze:**
 - **MIC** (minimální inhibiční koncentrace) – mez růstu



Dělení antimikrobiálních látek

- ▶ **Mikrobistatický efekt** (baktericidní efekt) – inhibice růstu + nutná účast imunitního systému pacienta. Využití u neakutních stavů.
 - **Primárně mikrobistatický efekt:** koncentrace nad MIC (MBC nedosažitelná – koncentrace toxická pro pacienta).
- ▶ **Mikrobicidní efekt** (baktericidní efekt) – usmrcují mikroby. U akutních stavů, u imunokompromitovaných pacientů.
 - **Primárně baktericidní efekt:** $MBC \approx MIC$ (toxická koncentrace vyšší než MBC).



Mechanismy účinku ATB – přehled

inhibice syntézy buněčné stěny (baktericidní)

beta-laktamy (peniciliny, cefalosporiny, monobaktamy, karbapenemy)

glykopeptidy (vankomycin)

antituberkulotika (isoniazid, bakteriostatický ethambutol)

inhibice syntézy nukleových kyselin (baktericidní)

inhibice DNA-gyrasy (chinolony)

inhibice syntézy mRNA (rifampicin)

inhibice syntézy DNA kvasinek (flucytosin)

inhibice syntézy DNA dermatofytů (griseofulvin)

destrukce bakteriální DNA (nitroimidazoly)

poškození buněčné membrány (baktericidní)

bakterií (polypeptidy – kolistin, polymyxin B)

mikromycet (fungistatické azoly – ketokonazol, flukonazol, a polyeny – amfotericin B)

inhibice proteosyntézy

účinek na 30S-jednotku ribosomu (baktericidní aminoglykosidy, bakteriostatické tetracykliny)

účinek na 50S-jednotku ribosomu (bakteristatické makrolidy, linkosamidy a chloramfenikol)

nově vyvíjené (streptograminy, oxazolidinony)

antimetabolity (většinou bakteriostatické)

sulfonamidy, trimethoprim, kyselina *p*-aminosalicylová, baktericidní kotrimoxazol

ATB podrobněji

- ▶ **Přednášky nebo učebnice**
- ▶ Detailně ve **farmakologii**
- ▶ **Povinně volitelný předmět „Základy antimikrobiální terapie“ – VSAT081 (MUDr. Renata Tejkalová)**



Rezistence na ATB

► **Primární rezistence:**

- ❑ Kódovaná geneticky (původní vlastnost), nemuselo dojít k předchozímu kontaktu s ATB.
- ❑ Zcela chybí nebo je necitlivá cílová struktura (modifikace funkční nebo strukturální).
- ❑ Např. betalaktamová ATB působící na buněčnou stěnu nepůsobí na mykoplasmata, která buněčnou stěnu vůbec nemají



Rezistence na ATB

► **Sekundární rezistence:**

- ❑ Nutný kontakt MO s ATB – vznik v průběhu léčby či jako následek léčby předchozí → vznikají necitlivé mutanty.
- ❑ Rezistence specifická pro určité kmeny jednoho druhu (nebývá rezistentní celý druh jak tomu bylo u primární rezistence).
- ❑ **Dělení dle rychlosti vzniku a stupně rezistence:**
 - **Penicilinový typ** (vícestupňová rezistence) – vzniká postupně, lze prokázat laboratorně na médiích se zvyšující se koncentrací ATB. Reverzibilní typ rezistence.
 - **Streptomycinový typ** (jednostupňová rezistence) – rychlý vznik vysoce rezistentních kmenů. Ireverzibilní.



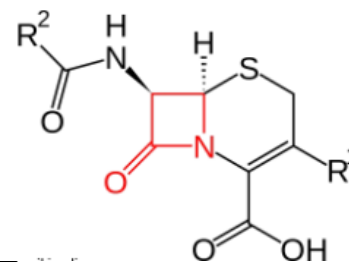
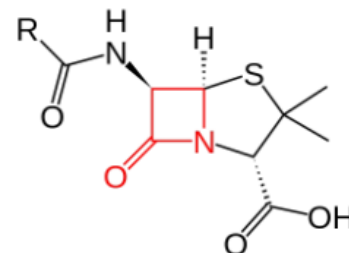
Mechanismy rezistence na ATB

- ▶ **Změna cílové struktury:** změna v místě působení ATB
- ▶ **Hyperprodukce cílové struktury:** bakterie produkuje cílový enzym v takovém množství, že jej nelze danou koncentrací ATB vyblokovat)
- ▶ **Aktivní eflux:** aktivní vypuzení ATB pryč z buňky
- ▶ **Impermeabilita:** změna propustnosti → ATB se do buňky vůbec nedostane
- ▶ **Enzymatická inaktivace ATB:** štěpení ATB, přenos funkční skupiny



β – laktamová ATB

- ▶ **Inhibují syntézu buněčné stěny** (nepůsobí tedy na MO bez buněčné stěny nebo na bakterie, které nemetabolizují). Působí na G⁺ i G⁻.
- ▶ **Vazebné místo** – transpeptidáza (PBP = penicilin binding protein)
- ▶ Peniciliny, cefalosporiny všech
- ▶ generací, monobaktamy,
- ▶ karbapenemy.
- ▶ β – laktamázy – enzymy štěpící
- ▶ β – laktamový kruh \rightarrow inaktivace ATB



β – laktamázy

- ▶ **Geneticky podmíněno** (jak chromozomálně, tak na plasmidech).
 - ▶ **Produkce G+ i G-.**
 - ▶ **Penicilinázy:** specifické pro peniciliny.
 - ▶ **Širokospektré β – laktamázy (ESBL = Extended-spectrum beta-lactamases):** jsou inhibovány inhibitory β – laktamáz, rezistentní k PNC, CEF, monobaktamům. Účinné zůstávají karbapenemy.
 - ▶ **ampC β – laktamázy:** rezistentní k PNC, PNC+inhibitory, CEF, monobaktamům, cefamycinu. Účinné zůstávají karbapenemy.
-



Inhibitory β – laktamáz

- ▶ Váží se na aktivní centrum enzymu, čímž inhibují jeho hydrolytickou aktivitu.
- ▶ Samotné mají zanedbatelnou antimikrobiální aktivitu.
- ▶ Používají se v kombinaci s β – laktamovými ATB (amoxicilin, ampicilin, piperacilin, cefoperazin,...).
- ▶ Kyselina klavulanová, sulbaktam, tazobaktam.



Epidemiologicky významné typy rezistence (1)

- ▶ **MRSA** – methicilin rezistentní stafylokoky. Oxacilin ani žádná další β – laktamová ATB nepronikají dovnitř buněk. Často zkřížená rezistence na další ATB (makrolidy, linkosaminy). Citlivé na glykopeptidy.
- ▶ **VISA, VRSA** – stafylokoky částečně/úplně rezistentní na glykopeptidy.
- ▶ **VRE** – vankomycin rezistentní enterokoky. Snadno se šíří díky přítomnosti enterokoků v přirozené mikroflóře.



Epidemiologicky významné typy rezistence (2)

- ▶ **ESBL** – G- bakterie (nejčastěji klebsiely, ale prokázáno i u *E.coli* aj.).
- ▶ **ampC β – laktamázy** – citlivé zůstávají karbapenemy a cefalosporiny 4. generace
- ▶ **MLS** – sdružená rezistence na makrolidy a linkosamidy a streptograminy u streptokoků a stafylokoků. U *Staphylococcus aureus* zatím vzácný výskyt.



Antibiotická střediska, ATB politika

- ▶ **Používání širokospektrých ATB** – selekční tlak, přežívají rezistentní kmeny bakterií.
- ▶ V některých zemích s volným užíváním ATB je velmi vysoký počet rezistencí.
- ▶ **U nás:**
 - ❑ **ATB volná** – lékaři je mohou předepisovat zcela volně a dle svého uvážení
 - ❑ **ATB vázaná** – nutno schválení ATB střediska.
- ▶ **ATB střediska** – zřizována při mikrobiologických laboratořích, slouží mimo jiné jako poradenská centra. Sledují vývoj ATB rezistencí.



Metody zjišťování citlivosti *in vitro* (1)

- ▶ *in vitro* = v laboratoři
- ▶ Nezaručuje 100% účinnost léčby, ale mohou indikovat citlivost/rezistenci daného kmene na ATB.
- ▶ **Běžné případy** – dostačují **kvalitativní testy** (citlivý x rezistentní; **difúzní diskový test**).
- ▶ **Specifické případy** (rizikové pacienti, rizikové kmeny) – **kvantitativní testy** (nutno zjistit MIC; **E-test, mikrodiluční test**).



Metody zjišťování citlivosti *in vitro* (2)

► *in vitro* neodpovídá *in vivo*:

- ❑ **U močových infekcí** – nutno breakpoint určovat od koncentrace ATB v moči a ne v séru.
- ❑ **U abscesů, infekcí v kostech, u meningitid** – breakpointy vyjádřením koncentrace v séru.
- ❑ **Infekce ve formě biofilmu** – nutno pracovat s hodnotami eradikujícími biofilm, není stejné jako u planktonních forem buněk.



Difúzní diskový test – provedení

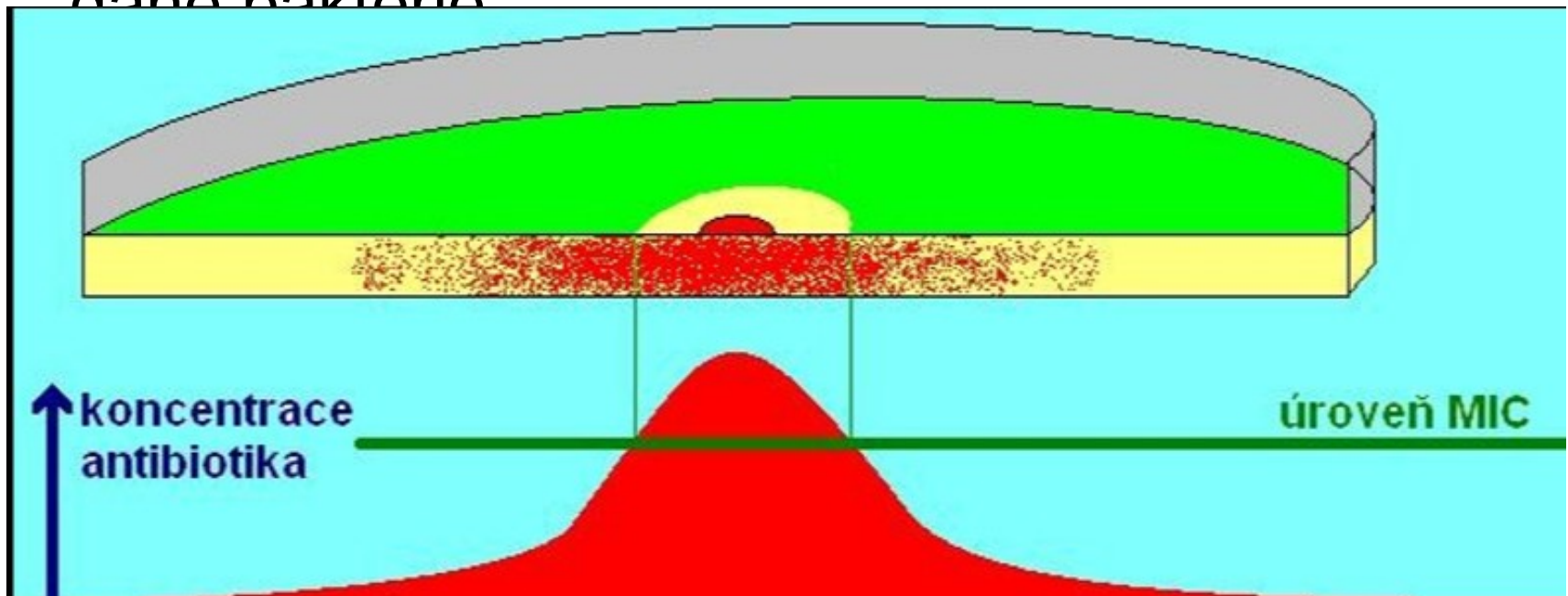
► Nejčastěji na MH agaru:

- ❑ Plošně se vyočkuje suspenze bakterií a následně se nanášejí ATB disky (papírky napuštěné ATB) – většinou 6 disků na běžnou Petriho misku, maximálně sedmý doprostřed.
- ❑ Misky i s disky se inkubují v termostatu
- ❑ Probíhá difundace ATB z disku agarem do okolí
- ❑ Druhý den – odečet tzv. inhibičních zón
- ❑ Citlivost/rezistence se stanovuje na základě velikosti inhibičních zón (pro každé ATB specifická velikost)
- ❑ Průměr zóny je menší než stanovená hranice → kmen je rezistentní → podání ATB je neúčinné



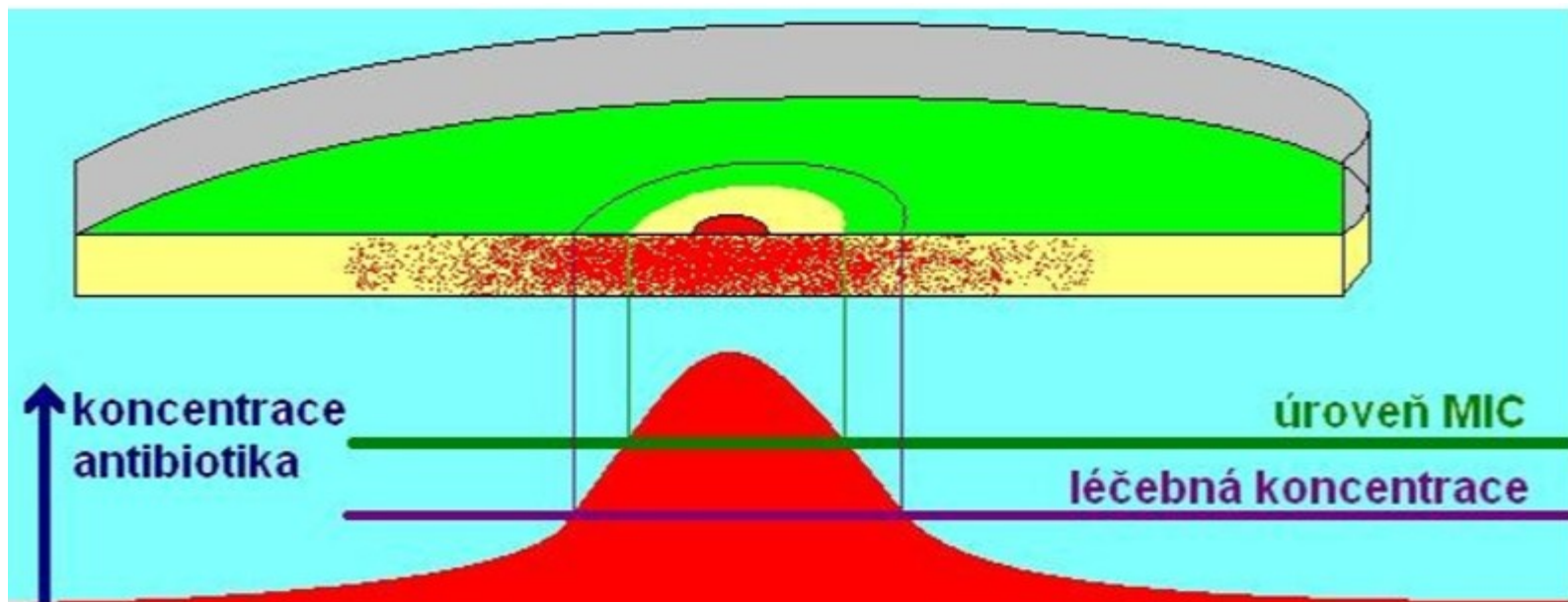
Difúzní diskový test – princip

- ▶ ATB difunduje z disku agarem a tvoří gradient. Čím dál je od disku, tím menší koncentrace ATB. V určitém bodě je koncentrace přibližně rovna MIC = ATB přestává být schopno inhibovat růst dané bakterie



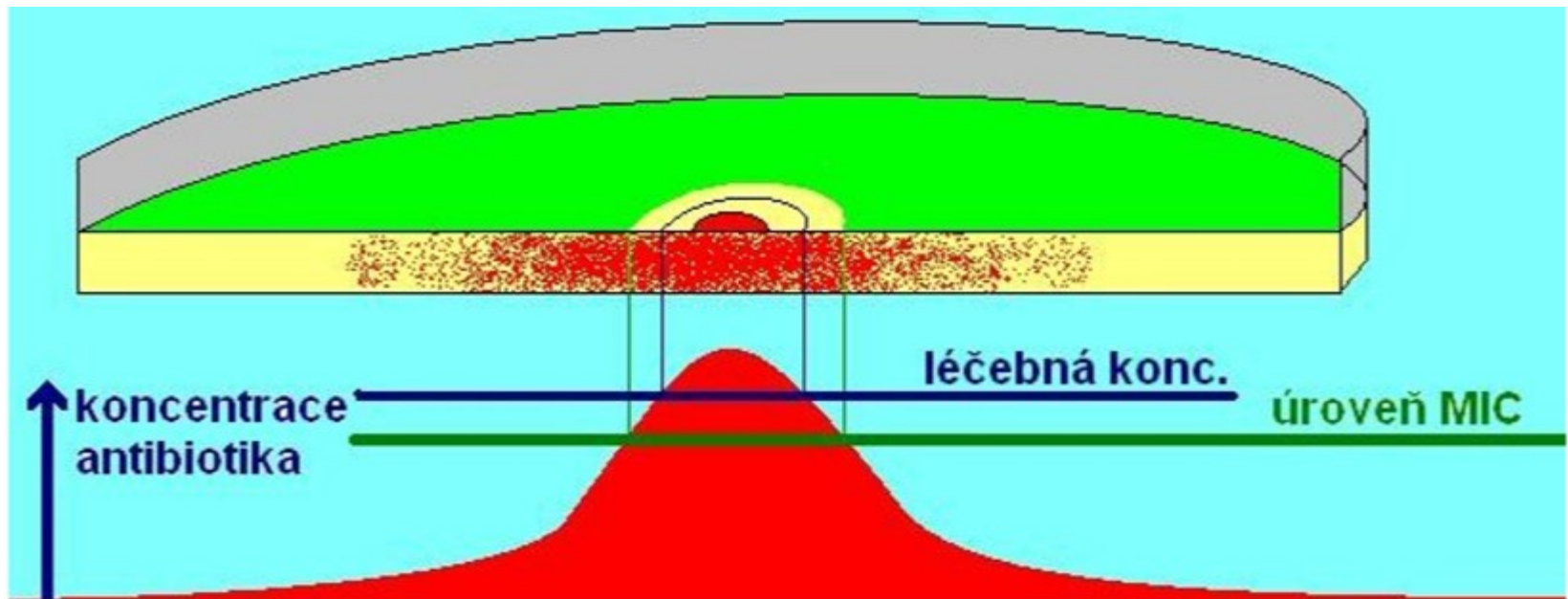
Difúzní diskový test – rezistence

- ▶ Maximální dosažitelná léčebná koncentrace je nižší než MIC → nedochází k inhibici růstu mikrobů → mikrob je rezistentní na dané ATB



Difúzní diskový test – citlivost

- ▶ Maximální dosažitelná léčebná koncentrace je vyšší než MIC → dochází k inhibici růstu mikrobů → mikrob je citlivý na dané ATB

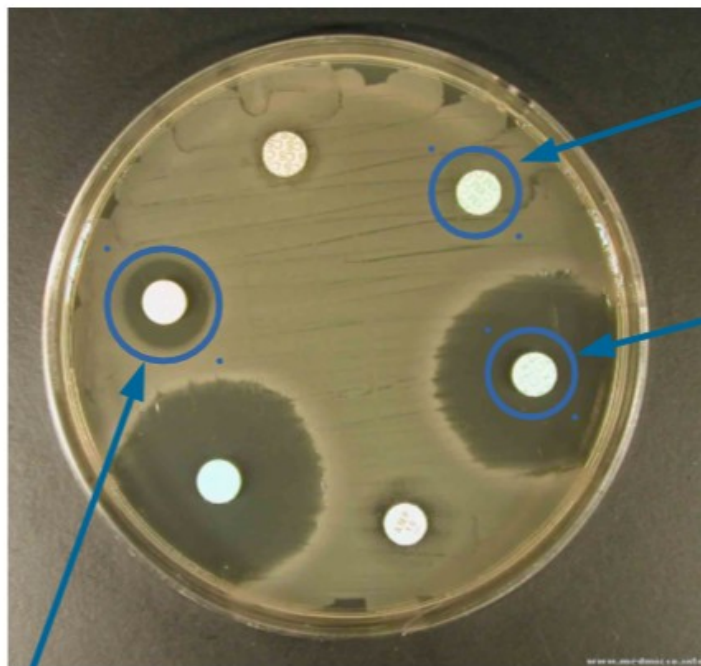


Difúzní diskový test – hodnocení (1)

- ▶ **Kvalitativní metoda.**
- ▶ Srovnáváme velikost naměřené zóny inhibice s hodnotou referenční zóny (vše v mm) → v podstatě dochází k porovnávání MIC vs. léčebná koncentrace (breakpoint).
- ▶ MIC nelze přesně určit pomocí diskového difúzního testu.
- ▶ Breakpointy:
 - ❑ mikrobiologický BP, farmakologický BP, klinický BP
 - ❑ **klinický BP** = průměrná koncentrace ATB dosažitelná v moči/likvoru/séru po podání látky obvyklým způsobem
 - ❑ BP jsou vytvářeny CLSI, EUCAST



Difúzní diskový test – hodnocení (2)

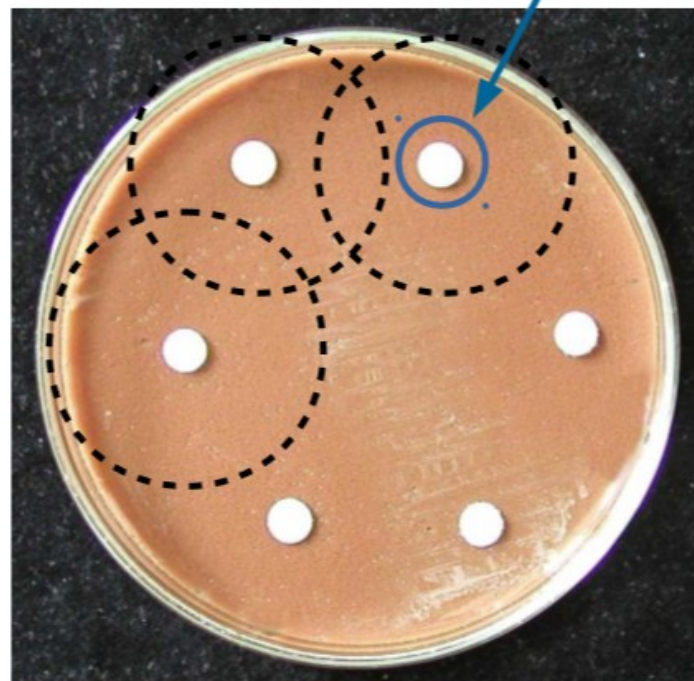


Žádná zóna:

Mikrob je rezistentní

Zóna je větší než hraniční: **Mikrob je citlivý**

Zóna existuje, ale je menší než hraniční: **Mikrob je rezistentní**

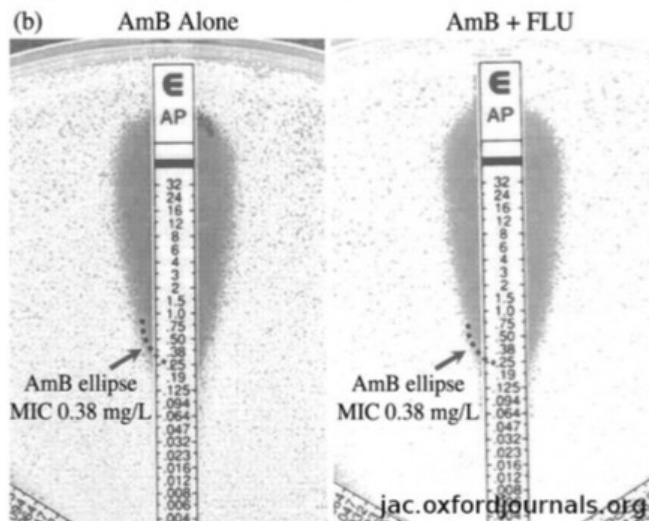
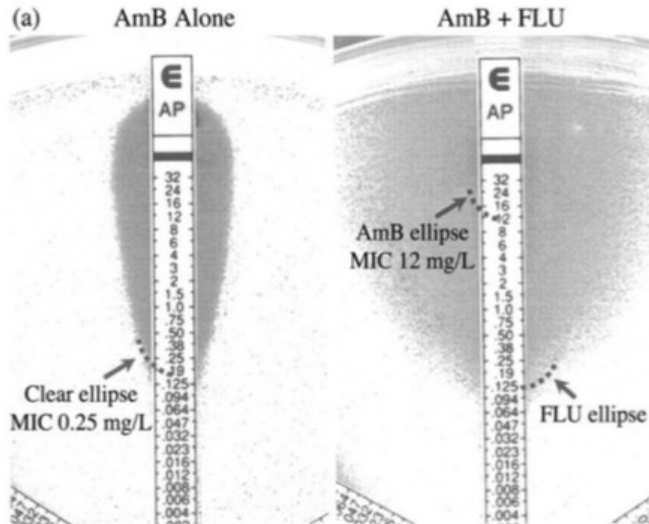


E-test (1)

- ▶ **Kvantitativní test.**
- ▶ Princip podobný jako difúzní diskový test, ale místo disků je zde **proužek**.
- ▶ V proužku je napuštěna **stoupající koncentrace ATB** od jednoho konce k druhému.
- ▶ **Zóna** není kruhová jako difúzního diskového testu, ale **vejčitá**.
- ▶ Na papírku znázorněna **stupnice** s koncentrací ATB – jednoduchý odečet.



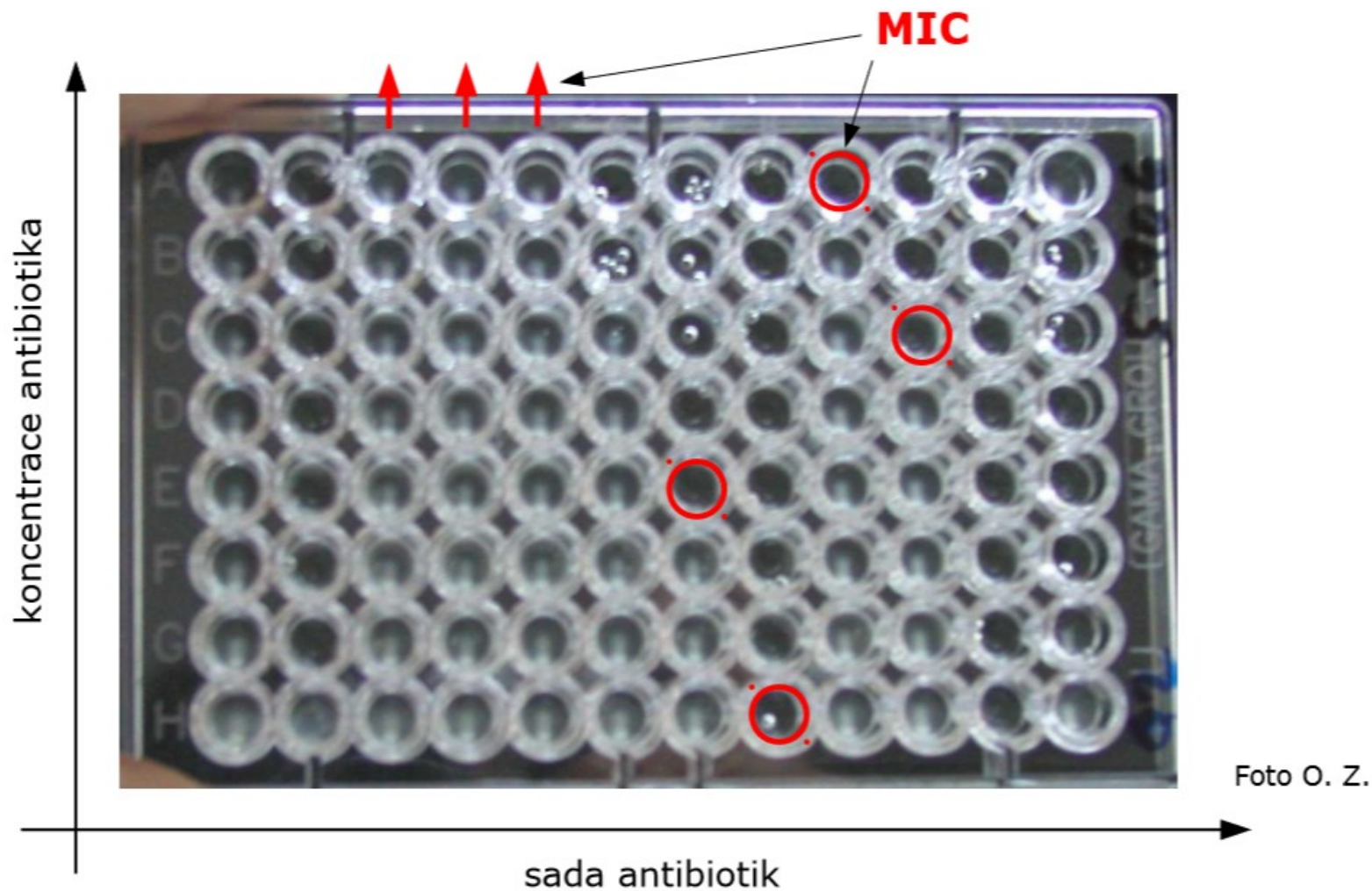
E-test (2)



Mikrodiluční test (1)

- ▶ **Kvantitativní test.**
- ▶ **Růst v tekutém médiu** – sledujeme zákal/čirost média.
- ▶ **Gradient ATB je vytvořen v řadě důlků v mikrotitrační destičce.**
- ▶ Nejnižší koncentrace inhibující růst = MIC (MIC je tedy tam, kde zůstal důlek čirý jako první).
- ▶ Srovnání s šablonou s danými breakpointy.
- ▶ Většinou je obsazena celá destička, tedy testováno je 12 různých ATB v 8 různých koncentracích.
- ▶ $MIC \leq \text{breakpoint} \rightarrow$ kmen citlivý
- ▶ $MIC > \text{breakpoint} \rightarrow$ kmen rezistentní

Mikrodiluční test (2)



Zjišťování faktorů rezistence

- ▶ Lze zjistit přítomnost rezistentního kmene vůči konkrétním ATB, tedy přítomnost konkrétního faktoru rezistence – např. produkce betalaktamáz.
- ▶ **Proč tyto testy?**
 - ❑ Testy citlivosti nejsou vždy dostatečně spolehlivé (špatná difúze, atd.)
 - ❑ Potřebujeme vědět, o jaký typ rezistence se jedná (ampC, MRSA,...)



Nitrocefinový test pro detekci běžné betalaktamázy

- ▶ Výsledky difúzního i mikrodilučního testu není jednoznačně jasný → nitrocefinový test.
- ▶ Použití u:
 - ❑ *Neisserií* (náhrada testu citlivosti na penicilin)
 - ❑ *Haemophilus influenzae* (náhrada testu citlivosti na ampicilin)
 - ❑ *Moraxella catarrhalis* (náhrada testu citlivosti na ampicilin)
- ▶ Proužkový test
- ▶ Dobré výsledky jen u skutečně čerstvých kmenů



Testování produkce širokospektrých β -laktamáz (ESBL) (1)

- ▶ **Principem je posílení účinku ATB klavulanovou kyselinou.**
- ▶ Dostatečné pro diagnostiku, ale ne pro praxi.
- ▶ **„Test dvojí synergie“** – deformace zóny betalaktamového ATB na straně přivráceného disku s co-amoxicilinem.
- ▶ **„CLSI test“** – porovnání účinku stejného ATB s/bez klavulanové kyseliny.



Test dvojité synergie; CLSI

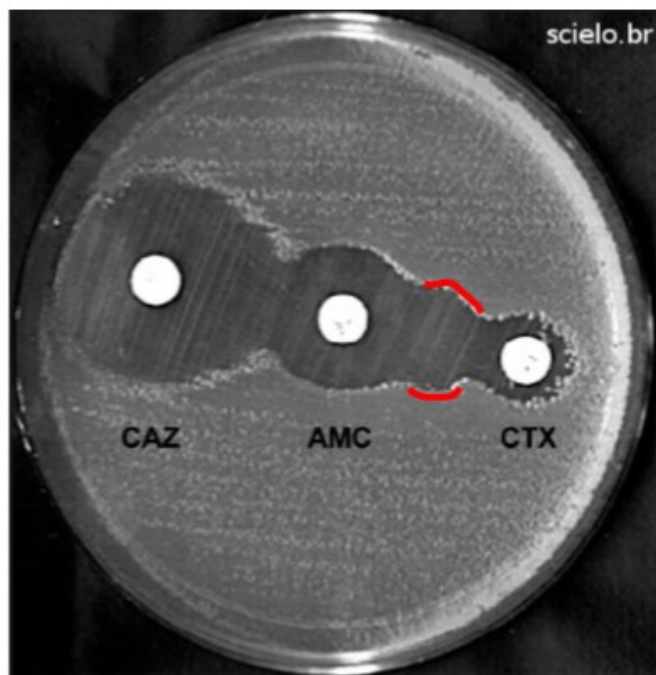


FIGURE 1- Double-disk synergy test for ESBL detection.

cefotaxim (CTX),
ceftazidim (CAZ),
ko-amoxicillin (amoxicilin s
klavulanovou kys.) (AMC)



Foto O. Z.

CCTX = CTX+CLA
CCAZ = CAZ+CLA

Testování produkce širokospektrých β -laktamáz (ESBL) (2)

- ▶ **testování konstitutivní ampC** – porovnáváme zóny citlivosti betalaktamů na MH agaru s inhibitory ESBL a ampC → tedy na půdě bez oxacilinu a s oxacilinem
- ▶ **testování indukované ampC** – projeví se pouze v případě, že bakterie je drážděna klavulanovou kyselinou či jiným aktivátorem
- ▶ **nové typy betalaktamáz** – metalobetalaktamázy (hlavně u G⁻ nefermentujících) a karbapenemázy (u různých G⁻ bakterií)



Testování indukované MLS_B rezistence (1)

- ▶ **MLS_B** = 14- a 16-členné makrolidy (erytromycin, klaritromycin, spiramycin), 15-členný azalid azitromycin, linkosamidy (linkomycin a klindamycin), a streptograminy skupiny B
- ▶ MLS_B mají stejný nebo velmi podobný mechanismus účinku na G+ koky (50S podjednotka ribosomů)
- ▶ Testování vzorků stafylokoků a streptokoků
- ▶ Nevyšetření indukované rezistence ke klindamycinu může být příčinou selhání klindamycinu v léčbě
- ▶ Klindamycin = špatný inductor ribozomální metylázy, erythromycin však produkci tohoto enzymu indukuje

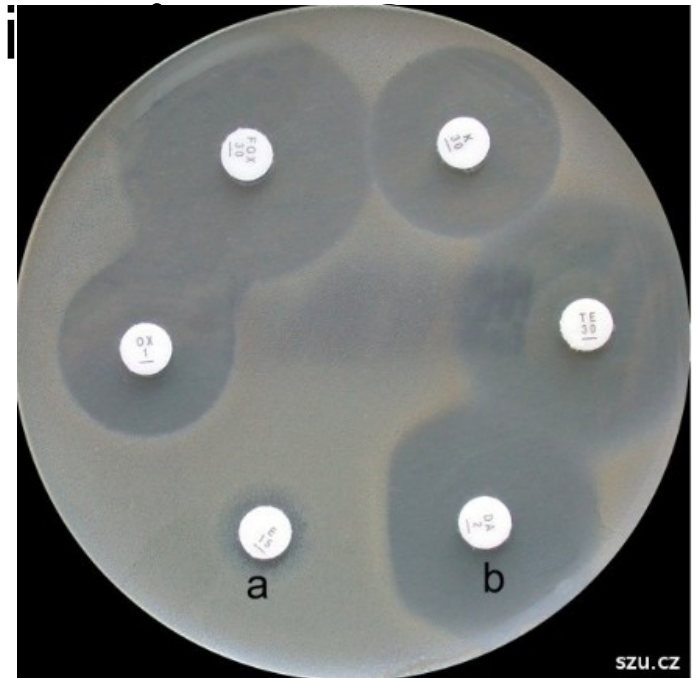
Testování indukované MLS_B rezistence (2)

- ▶ Klindamycin je alternativa oxacilinu u některých infekcí, způsobených citlivými kmeny stafylokoků, zejména u osob přecitlivělých k penicilinu
- ▶ U infekcí kůže a měkkých tkání, způsobených komunitními kmeny MRSA, je klindamycin (vedle kotrimoxazolu) jednou z prioritních terapeutických alternativ
- ▶ Klindamycin je alternativa penicilinu (případně aminopenicilinu) u některých infekcí, způsobených citlivými kmeny streptokoků, zejména u osob přecitlivělých k penicilinu

Testování indukované MLS_B rezistence: D-test

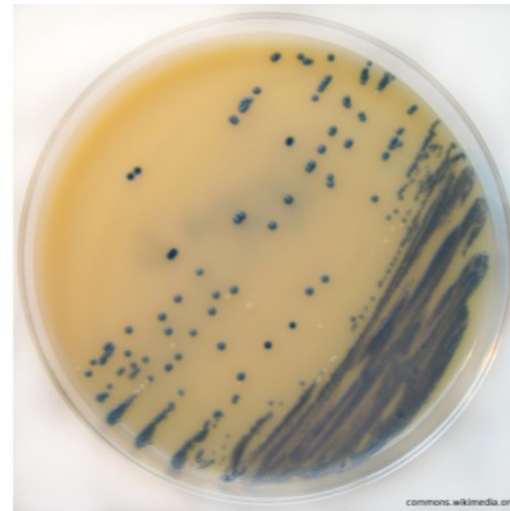
- ▶ D-test pro kmen stafylokoka na MH agaru
- ▶ Vytvoření deformované inhibiční zóny ve tvaru písmene D (D zóny) kolem klindamycinu v oblasti sousedící s diskem erytromycinu svědčí o indukované rezistenci k antibi

a) erytromycin (15μg),
b) klindamycin (2μg)



Testování MRSA a VRE kmenů

- ▶ Použití **speciálních screeningových půd**, zpravidla chromogenních, specifických pro určitý rod a druh bakterie
- ▶ Obsahují takové ATB, které inhibují růst citlivých kmenů (např. vankomycin – rezistentní kmeny vyrostou, citlivé nikoliv).



Fágová terapie

- ▶ Ztráta ATB účinnosti motivuje k hledání jiných způsobů léčby.
- ▶ Možné účinky fágů či fágového lyzátu (směs bílkovin produkovaných fágem) na kulturu mikrobů (v místě aplikace fágového lyzátu bakterie buďto rostou nebo nerostou).
- ▶ Fágy jsou vysoce specifické vůči bakteriím, které napadají.
- ▶ Případně používáme preparáty, obsahující jak lyzát, tak i živé fágy (např. preparát STAFAL).



Úkol 1: Naočkování difúzního testu

- ▶ Připravte suspenzi bakterie ve fyziologickém roztoku s glukózou.
- ▶ Suspenzi naneste rovnoměrně na misku s MH agarem.
- ▶ Nechte zaschnout.
- ▶ Rozmístěte ATB disky opatrně (nepropíchněte agar) a rovnoměrně (nedávejte disky příliš blízko k sobě) po povrchu agaru.



Úkol 2: Odečtení testů citlivosti

- ▶ Proveďte odečet dvou sad testů citlivosti.
- ▶ Referenční hodnoty najdete ve žluté tabulce (čísla na discích znamenají obsah ATB v μg).
- ▶ Předpokládaný výsledek:

	G+ mikrob <i>S. aureus</i>	G- mikrob <i>E. coli</i>
Sestava pro G+	většinou citlivé	větš. rezistentní
Sestava pro G-	větš. rezistentní	většinou citlivé
<i>Širokospektrá sestava</i>	<i>většinou citlivé</i>	<i>většinou citlivé</i>



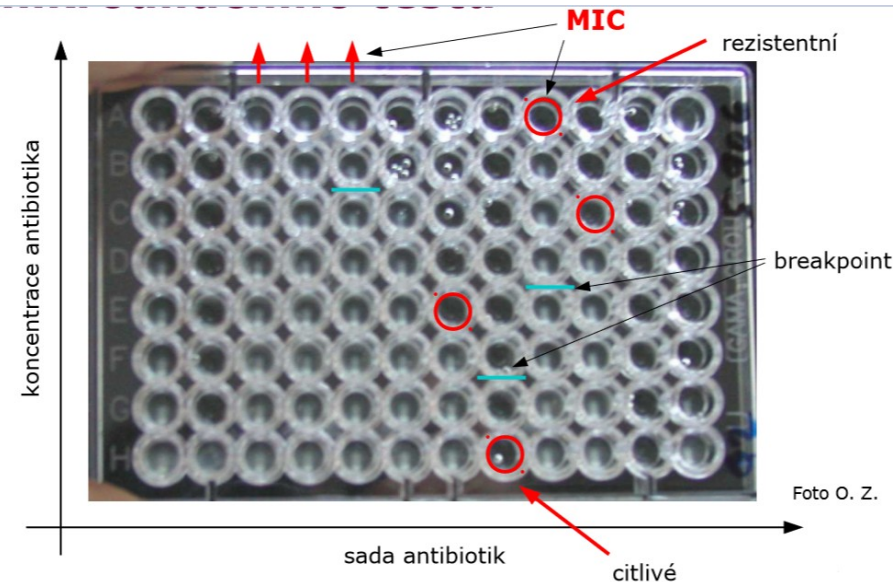
Úkol 3: Antibiotika k léčbě močových infekcí

- ▶ některá ATB (např. oxacilin či erythromycin) se nehodí k léčbě močových infekcí, protože jsou z těla vylučovány žlučí a jejich koncentrace v moči jsou zpravidla nízké
- ▶ některá ATB, která jsou k léčbě močových infekcí vhodná (dokonce některá dosahují dostatečné terapeutické koncentrace pouze v moči)
- ▶ Příklady (tučné = pouze k léčbě cystitid):
cefuroxim, ko-trimoxazol, doxycyklin,
norfloxacin, nitrofurantoin



Úkol 4: Odečtení mikrodilučního testu

- ▶ zjistěte a запиšte hodnoty MIC pro 12 testovaných ATB
- ▶ zakalený důlek = růst
- ▶ čirý důlek = inhibice růstu



- ▶ $MIC \leq \text{breakpoint} \rightarrow$ kmen citlivý
- ▶ $MIC > \text{breakpoint} \rightarrow$ kmen rezistentní

Úkol 5: Odečtení E-testu

- ▶ odečtěte E-test, a zapište, zda je kmen citlivý či rezistentní, pomocí přiloženého breakpointu
- ▶ opět platí, že $MIC \leq \text{breakpoint}$ znamená, že kmen je citlivý, kdežto $MIC > \text{breakpoint} \rightarrow$ rezistence
- ▶ tam, kde okraj zóny kříží proužek, je hodnota MIC (pozor na nesymetrické a nepřesně ohraničené zóny)

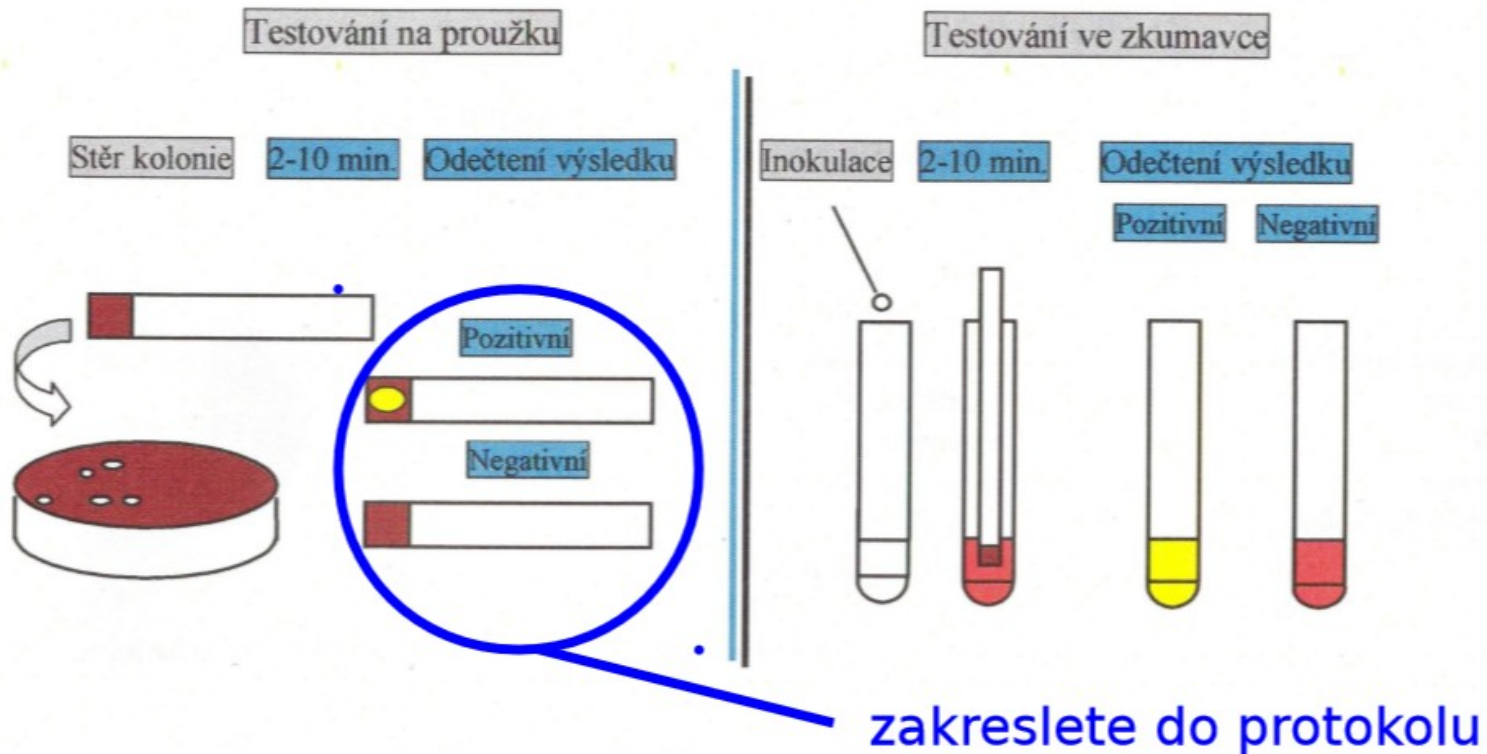


Úkol 6: Betalaktamáza u hemofilů

- ▶ produkce β -laktamázy se projeví změnou reakční plošky (stejně jako např. u oxidázového testu, jen jiná barva)
- ▶ z technických důvodů (test spolehlivě funguje jen u čerstvých kmenů) neprovádíme prakticky, obkreslíte si obrázek z této prezentace



Úkol 6: Betalaktamáza u hemofilů



9. Hodnocení testu:

Negativní reakce: roztok zůstal červený nebo v místě nanesené kolonie nedošlo k barevné změně

Pozitivní reakce: roztok zežloutl nebo v místě nanesené kolonie došlo ke vzniku žlutě zbarvené skvrny

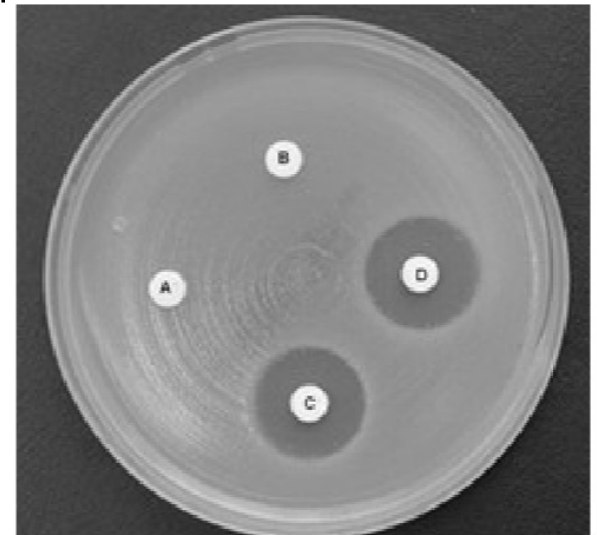
Úkol 7a: Testování produkce širokospektrých betalaktamáz typu ESBL

- ▶ činí-li rozdíl mezi zónami kolem disků cefotaximu bez inhibitoru a cefotaximu s klavulanátem více než pět milimetrů, je kmen považován za producenta (výroce) betalaktamázy
- ▶ totéž platí pro ceftazidim



Úkol 7b: „ABCD“ test

- ▶ u tohoto testu ověřujeme přítomnost dvou typů betalaktamáz najednou
- ▶ rozdíly mezi jednotlivými antibiotiky jsou typické buď pro β -laktamázu typu ESBL, nebo pro ampC betalaktamázu konstitutivního typu



Úkol 8: Detekce MLS_B rezistence u stafylokoků: D-test

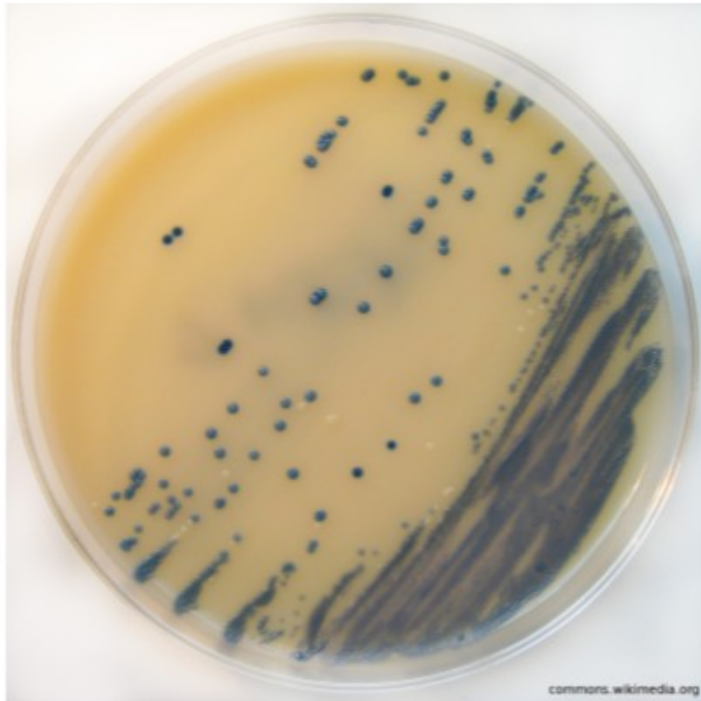
- ▶ klindamycin je špatný induktor ribozomální metylázy, erythromycin však produkci tohoto enzymu indukuje
- ▶ ačkoli velikost inhibiční zóny je dostačující, vydává se výsledek “rezistentní”



Foto: O. Z.

Úkol 9: Screening kmenů na MRSA a VRE

- ▶ chromogenní půdy s ATB



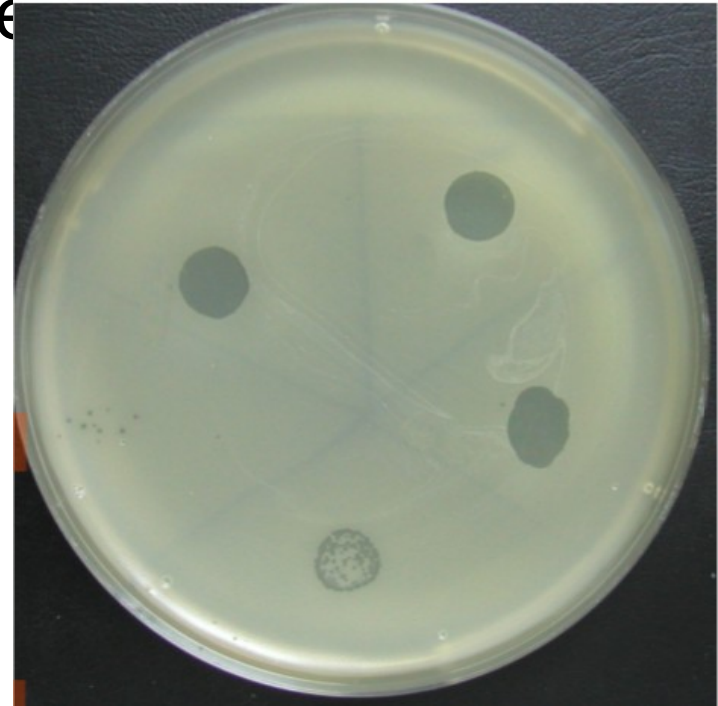
MRSA na chromogenní půdě



VRE na chromogenní půdě

Úkol 10: Bakteriofágová terapie v praxi

- ▶ Na obrázku kmen stafylokoka, naočkovaný tak, že pokrývá celý povrch média
- ▶ Fágový preparát způsobil přítomnost zón lýzy → kmen je citlivý k danému fágovému preparátu (zde STAFAL).
- ▶ Nepřítomnost zón lýzy → rezistentní vůči danému fágovému preparátu.



Po tomto cvičení byste měli umět

- ▶ Vědět, co jsou ATB včetně mechanismů působení.
- ▶ Popsat mechanismy rezistence ATB včetně konkrétních příkladů.
- ▶ Znat obsah pojmů ATB středisko a ATB politika.
- ▶ Rozumět principu jednotlivých metod používaných pro testování citlivosti na ATB, znát jejich výhody a nevýhody.
- ▶ Posoudit výhody a nevýhody fágové terapie.

