

Pátráme po mikrobech
Díl VI.

Testování citlivosti mikrobů a jejich faktorů rezistence

Ondřej Zahradníček

K praktickému cvičení pro VLLM0421c

Kontakty na mne:

777 031 969

zahradnicek@fnusa.cz

ICQ 242-234-100

Co už umíme

- Umíme používat **tři diagnostické metody**
 - **mikroskopii** jako nativní preparát, jednoduché a Gramovo barvení a barvení pouzder
 - **kultivaci** mikrobů na tekutých a pevných půdách (na pevných půdách získáme **kmen**)
 - **biochemickou** (a jinou) **identifikaci** vykultivovaných kmenů mikrobů
- Víme, **jak bojovat s mikroby pomocí dekontaminačních metod** a umíme otestovat, zdaje určitá metoda v daném případě dostatečně účinná

Pohádka

- Bylo jednou jedno **antibiotikum**, říkejme mu třeba ampicilin. A to se rozhodlo vyrazit do světa a pomáhat lidem bojovat s mikroby.
- Bylo to statečné antibiotikum, odhodlané vyzrát na každého mikroba, který by se naskytl v dohledu. Ale ouha...

Ampicilin potkává mikroby...

- První mikrob se jmenoval *Proteus mirabilis* a opravdu se nechal ampicilinem zničit. Ampicilin to povzbudilo, a tak šel dál
- Jenže potkal mikroba jménem *Klebsiella pneumoniae*, a to ho vyděsilo. Ampicilin otráveně řekl: Ach jo, na tebe nemám, **klebsiello, ty jsi na mě primárně rezistentní**, s ním nic nenadělám... no nic, půjdu radši zase dál, a na tebe pošlu nějakého účinnějšího brášku...

Do třetice

- Ampicilin potkal mikroba *Escherichia coli*. To je dobré, řekl si, tu by se mi mohlo podařit zničit. Ale ouha... jak se do ní pustil, vysmekla se mu, utekla a chechtala se: Chi chi, ty si myslíš, že na mě vyzraješ, já jsem sice kdysi byla na tebe citlivá, ale postupně jsem na tebe získala **sekundární rezistenci**, a tak teď se mnou nic nepořídíš!

Pláč ampicilinův

- se rozléhal tkání. Ale přišel k němu mikrobiolog a řekl: neboj, ampiciline, příště to uděláme lépe. **Každého mikroba, který by na tebe mohl být citlivý, ale mohl by být i rezistentní, otestujeme**, abychom se přesvědčili, jak na tom jsme. A když nebudeš co platný ty, pomůže někdo z tvých brášek.
- I zaradoval se ampicilin, a rozběhl se pomáhat lidem dál.

Poučení z naší pohádky

- Některé mikroby jsou na některé antibiotika primárně rezistentní. Nemá ani cenu jejich citlivost na ně testovat, je vždycky nulová.
- Jiné mikroby mohou (ale nemusí) získat **sekundární rezistenci**. Potom
 - se buď otestuje **citlivost mikroba** in vitro na danou antimikrobiální látku
 - nebo se zjistí, zda příslušný mikrob obsahuje určitý **faktor, zodpovědný za rezistenci**

Možnosti „boje“ s mikroby

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

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

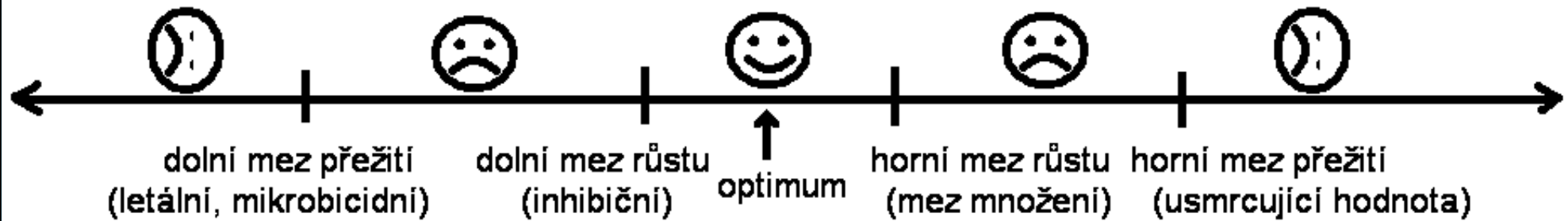
V poslední době se stírají rozdíly mezi posledními dvěma

- **Látky působící lokálně:** antiseptika

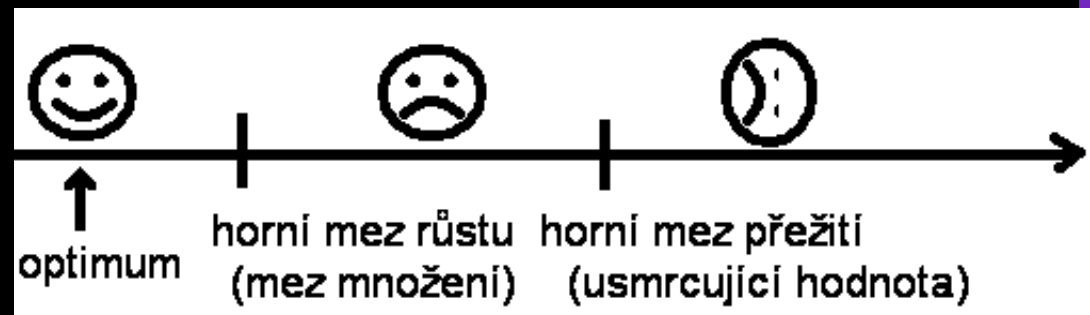
Ještě dekontaminace, nebo už antimikrobiální látka?

- **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 (jako ostatní léky) SÚKL

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 a MBC

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. (Mluvíme pro jednoduchost jen o bakteriích. U virů by se použil pojem „minimální virucidní“ apod.)

Později se ještě setkáte s pojmy MBIC a MBEC, které se týkají působení na antibiotika v biofilmu

Primárně baktericidní a primárně bakteriostatická atb

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

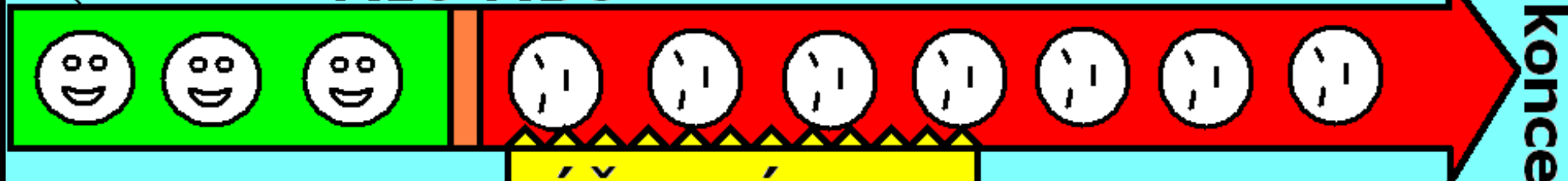
Primárně bakteriostatická jsou atb, u kterých se využívá hodnoty nad MIC, ale nikoli nad MBC (svou podstatou bakterie jen inhibují)

V praxi je třeba vyvarovat se použití bakteriostatických antibiotik u závažných akutních stavů, imunosuprimovaných pacientů apod.

Primárně baktericidní a primárně bakteriostatická atb

Primárně baktericidní atb

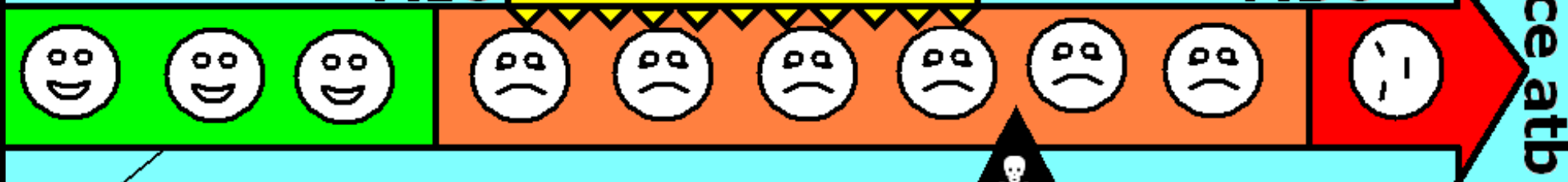
MIC MBC



LÉČEBNÉ
KONCENTRACE

MIC

MBC



toxicita pro makroorgs.

Primárně bakteriostatické atb

Mechanismy působení antibiotik

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

Proč je neprobíráme podrobněji

- Podrobnosti o jednotlivých skupinách a jejich použití se dozvíte **na přednášce** nebo se je dočtete **v učebnici**
- Přehled antibiotik vám dále nabízím **ve studijních materiálech na IS MUNI.**
- Dále si antibiotika proberete **v rámci výuky farmakologie**
- Můžete si také zapsat **předmět „Základy antimikrobiální terapie“ VSAT081** – předmět je jednosemestrální a je povinně volitelný ve 4. nebo 5. ročníku studia

Rezistence mikrobů na antimikrobiální látky

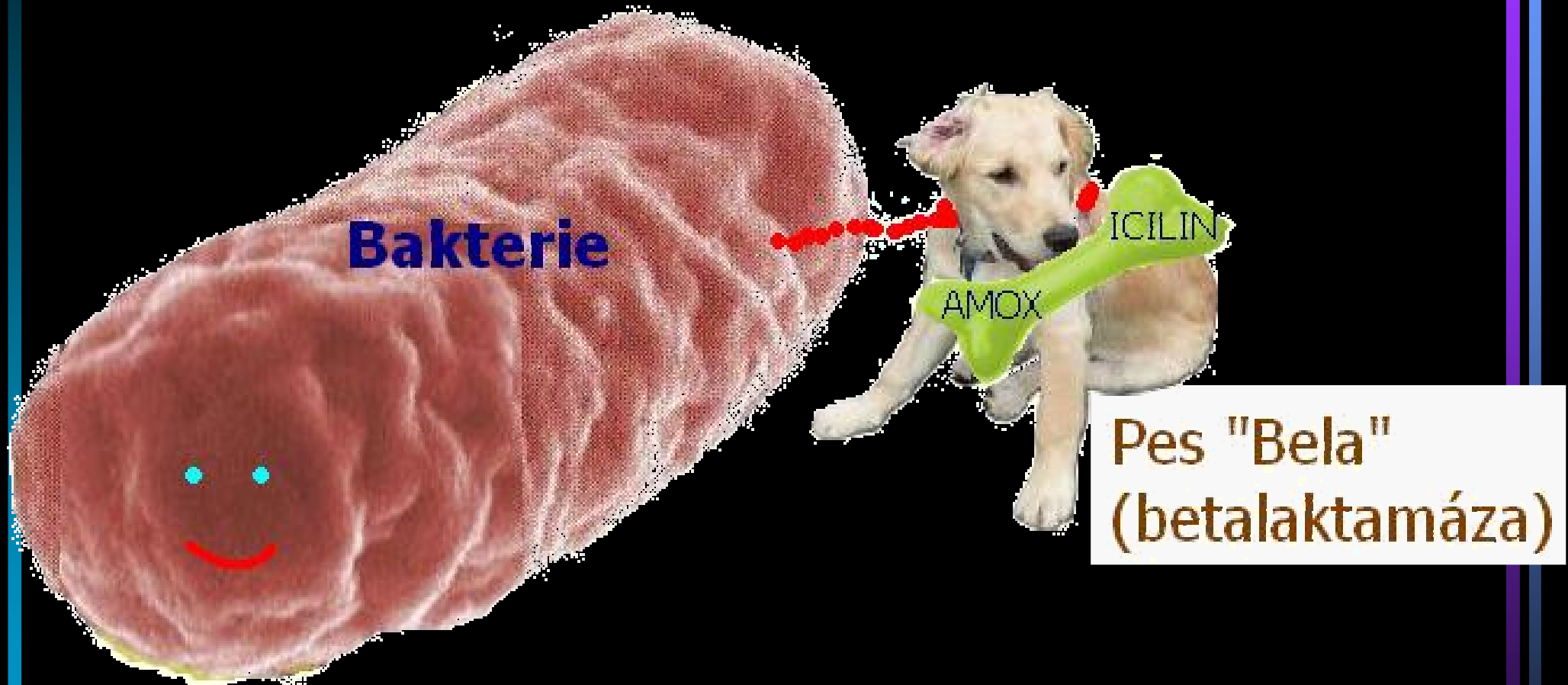
- **Primární rezistence:** všechny kmeny daného druhu jsou rezistentní. Příklad: betalaktamová atb nepůsobí na mykoplasmata, která vůbec nemají stěnu.
- **Sekundární rezistence:** vznikají necitlivé mutanty, a ty při selekčním tlaku antibiotika začnou převažovat. (Escherichie mohou být citlivé na ampicilin, ale v poslední době výrazně přibývá rezistentních kmenů)

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)

Znalost příslušného mechanismu nám umožňuje pokusit se na mikroba vyzrát

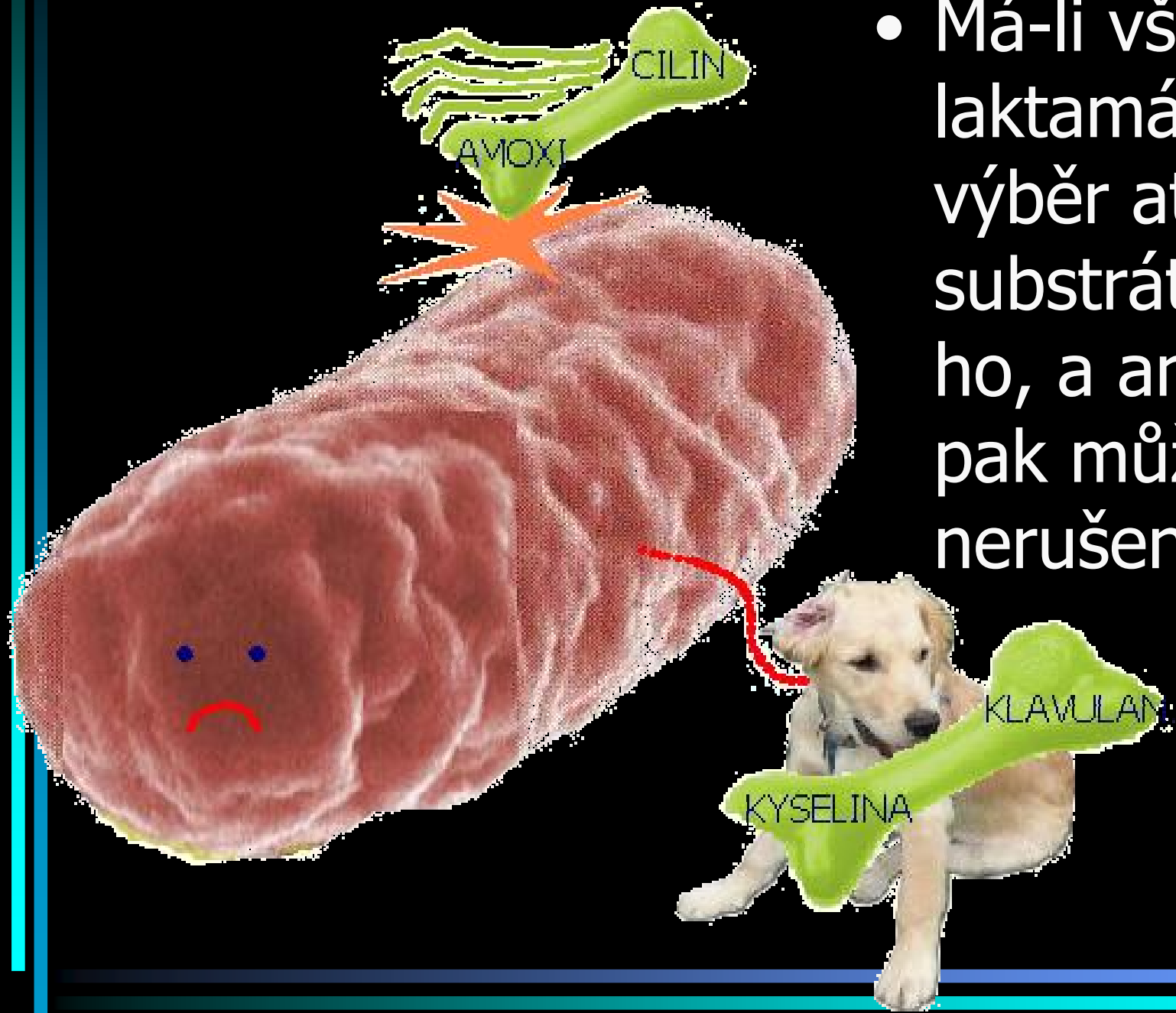
Inhibitory betalaktamáz – 1



- Působíme-li samotným antibiotikem, je inaktivováno bakteriální betalaktamázou.

Inhibitory betalaktamáz – 2

- Má-li však laktamáza na výběr atraktivnější substrát, zvolí si ho, a antibiotikum pak může nerušeně působit.



Příklady antibiotik potencovaných inhibitory betalaktamáz



Epidemiologicky významné rezistence – 1

- **MRSA** – methicilin rezistentní stafylokoky. Nevypouštějí 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 steptograminy), u streptokoků a stafylokoků. U *S. aureus* zatím naštěstí vzácné.

„Antibiotická politika“, atb střediska

- Používání širokospektrých antibiotik představuje **selekční tlak** – přežívají rezistentní kmeny bakterií
- V zemích, kde se antibiotika používají volně, bývají **vysoké počty rezistencí na antibiotika**
- U nás existují „**volná antibiotika**“, která mohou lékaři předepisovat volně, a „**vázaná atb**“, jež musí schvalovat antibiotické středisko
- **Atb střediska** bývají zřizována při velkých nemocnicích. Dělají i poradenskou činnost.

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)
- **V indikovaných případech kvantitativní** (zjišťujeme MIC). *Jde zpravidla o rizikové kmeny u rizikových pacientů.*

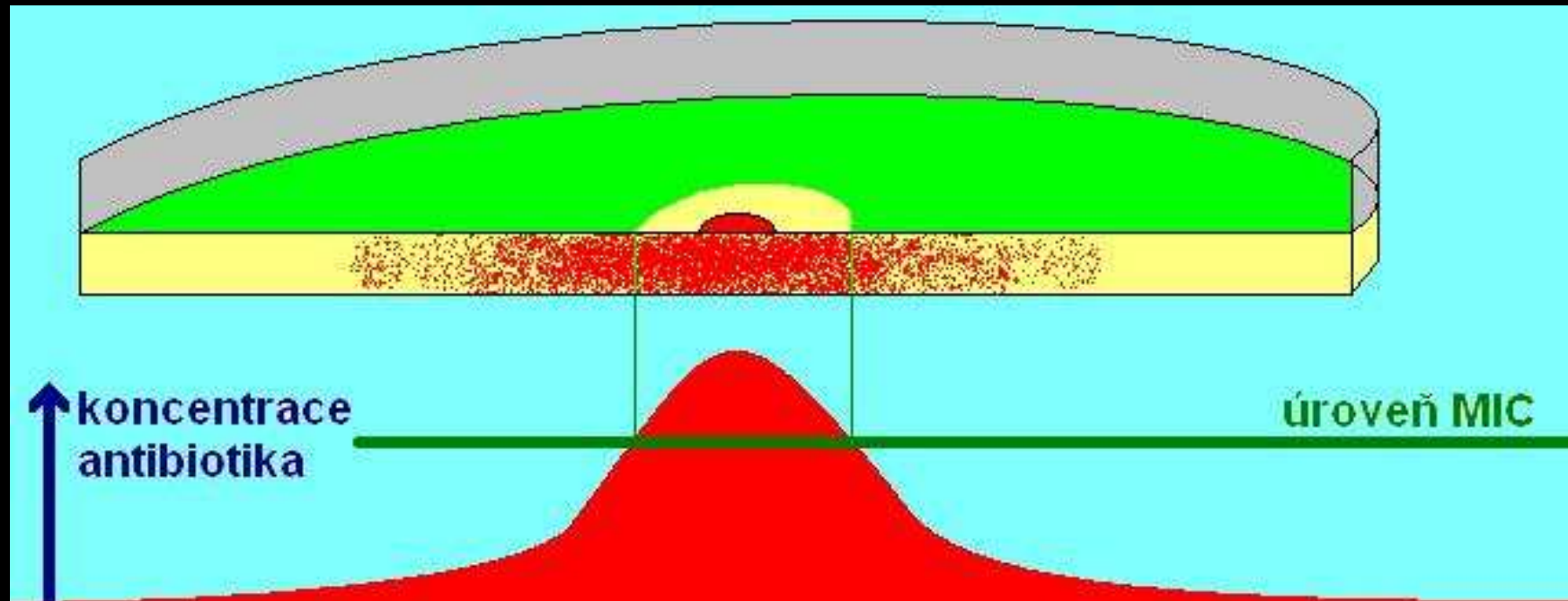
Difúzní diskový test – 1

- Na MH (nebo jiný) agar se štětičkou **plošně naočkuje suspenze bakterie**
- Pak se nanášejí tzv. **antibiotické disky** – papírky napuštěné antibiotikem
- **Atb difunduje** z disku agarem dál
- U standardní Petriho misky se používá zpravidla **šest disků**, někdy se dává ještě **sedmý doprostřed**

Difúzní diskový test – 2

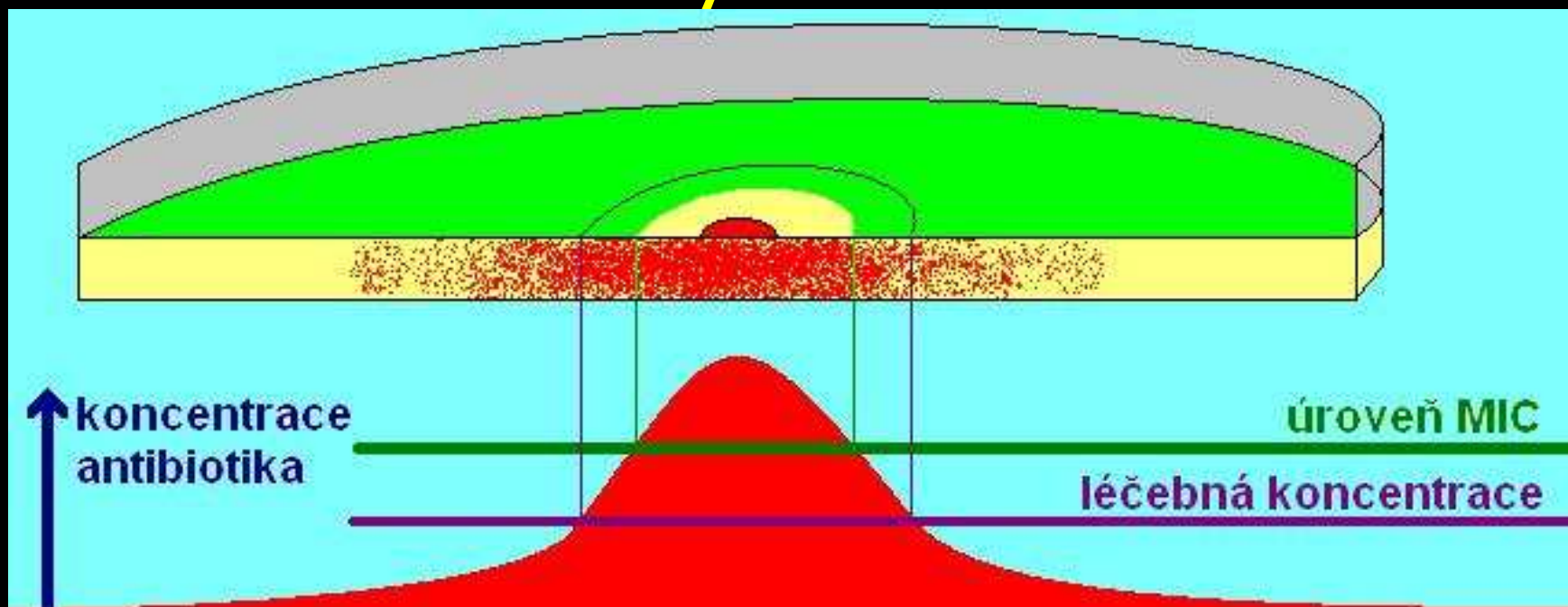
- **Koncentrace atb klesá** se vzdáleností od disku (a tedy i jeho schopnost inhibovat)
- Pokud mikrob roste až k disku, nebo má jen malou zónu, je **rezistentní** (necitlivý)
- Je-li kolem disku dost velká zóna citlivosti (větší než stanovená hranice), je **citlivý**.

Difúzní diskový test učeně - 1



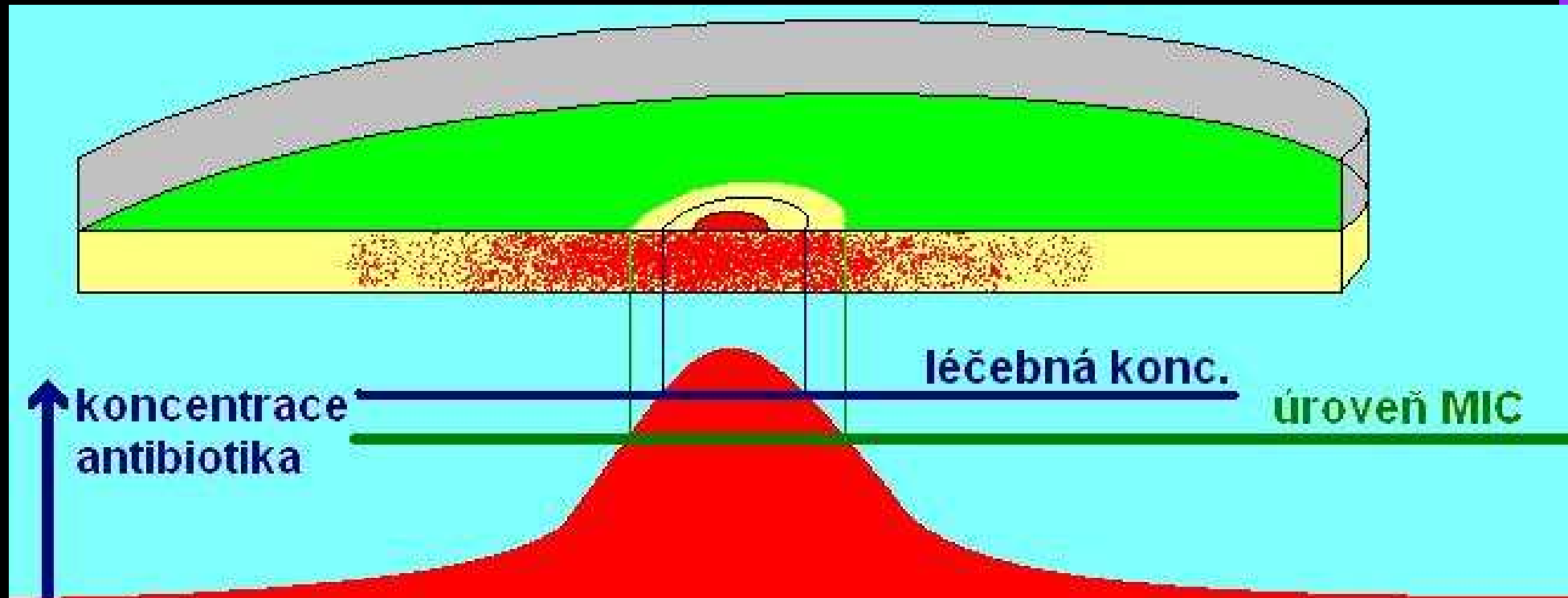
- Antibiotikum difunduje z disku, který je jím napuštěn, agarem. Čím dále od disku, tím je menší koncentrace antibiotika. V určitém bodě je koncentrace rovna MIC – to znamená, že antibiotikum přestává být schopno inhibovat růst dané bakterie.

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 též breakpoint)**

*Poznámka pro zvědavé: ve skutečnosti se zpravidla nepoužívá tzv. **přirozený breakpoint** (odvozený z léčebné koncentrace), nýbrž jsou zohledněny různé další faktory tak, aby in vivo bylo antibiotikum skutečně účinné a aby byl včas odhalen vznik rezistentní subpopulace kmenů (**mikrobiologický breakpoint, klinický breakpoint**). Více viz DOPLNIT.*

Difusní diskový test po lopatě

1

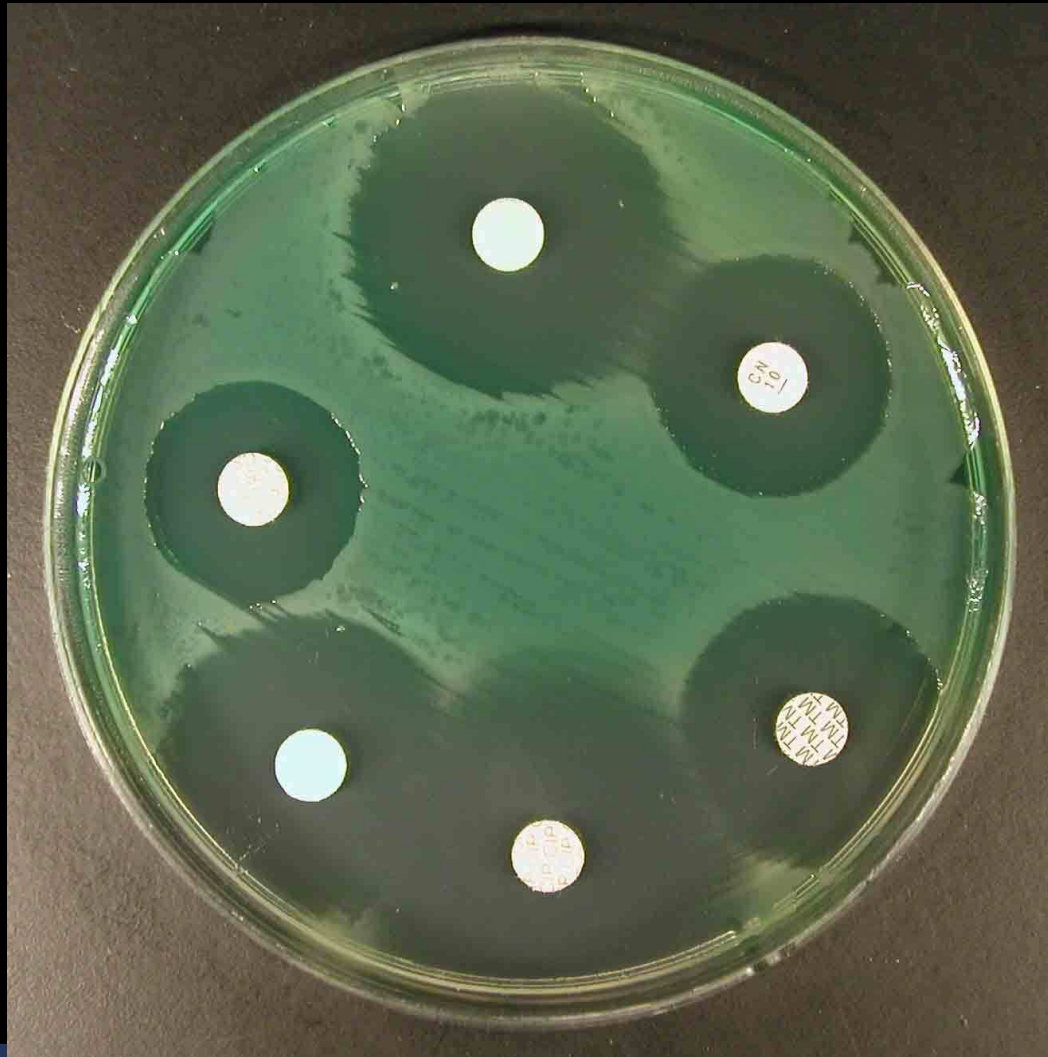


2



- **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.

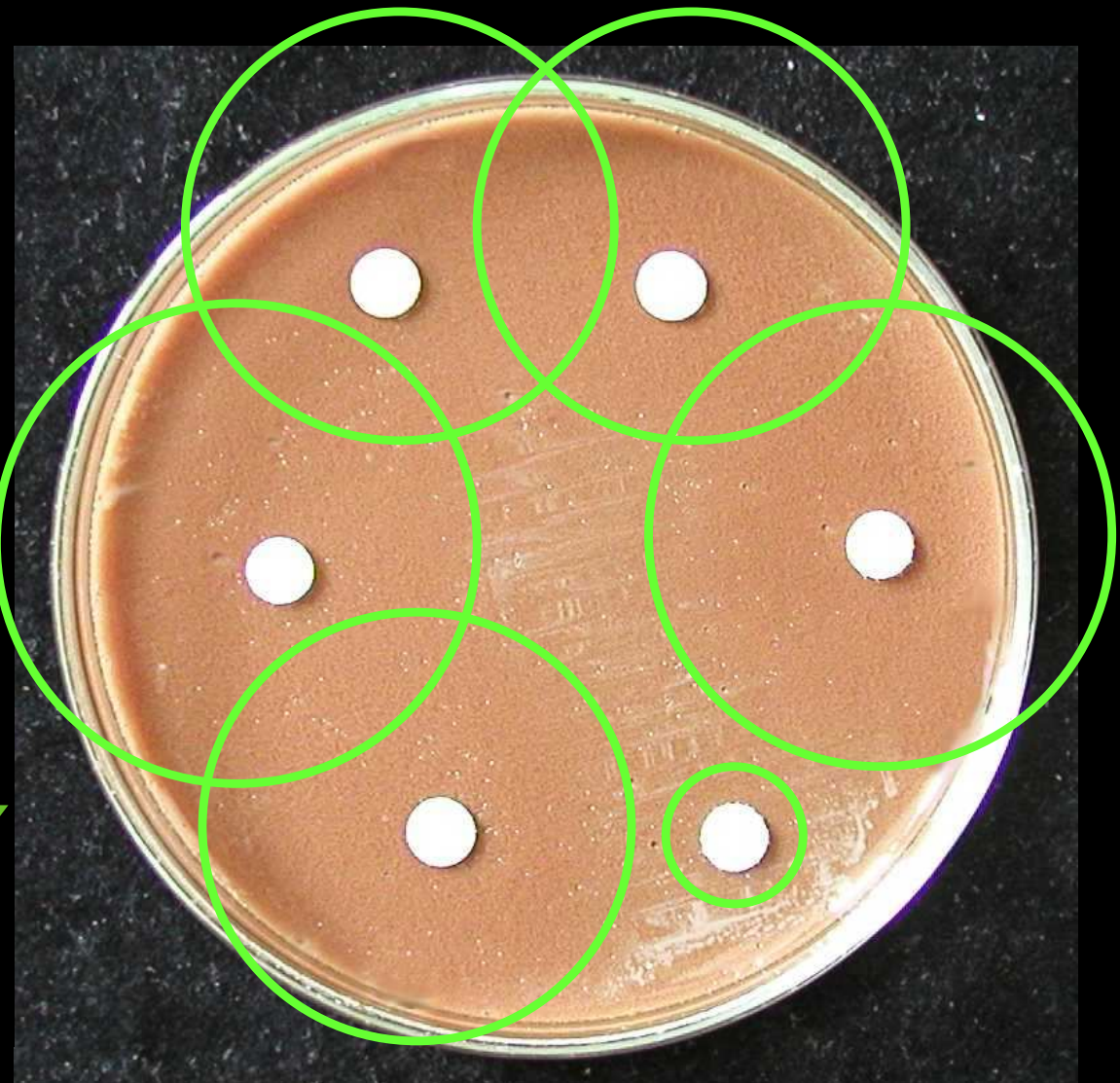
Difúzní diskový test v praxi: zóny se změří a porovnájí s referenčními



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 misku



E-testy

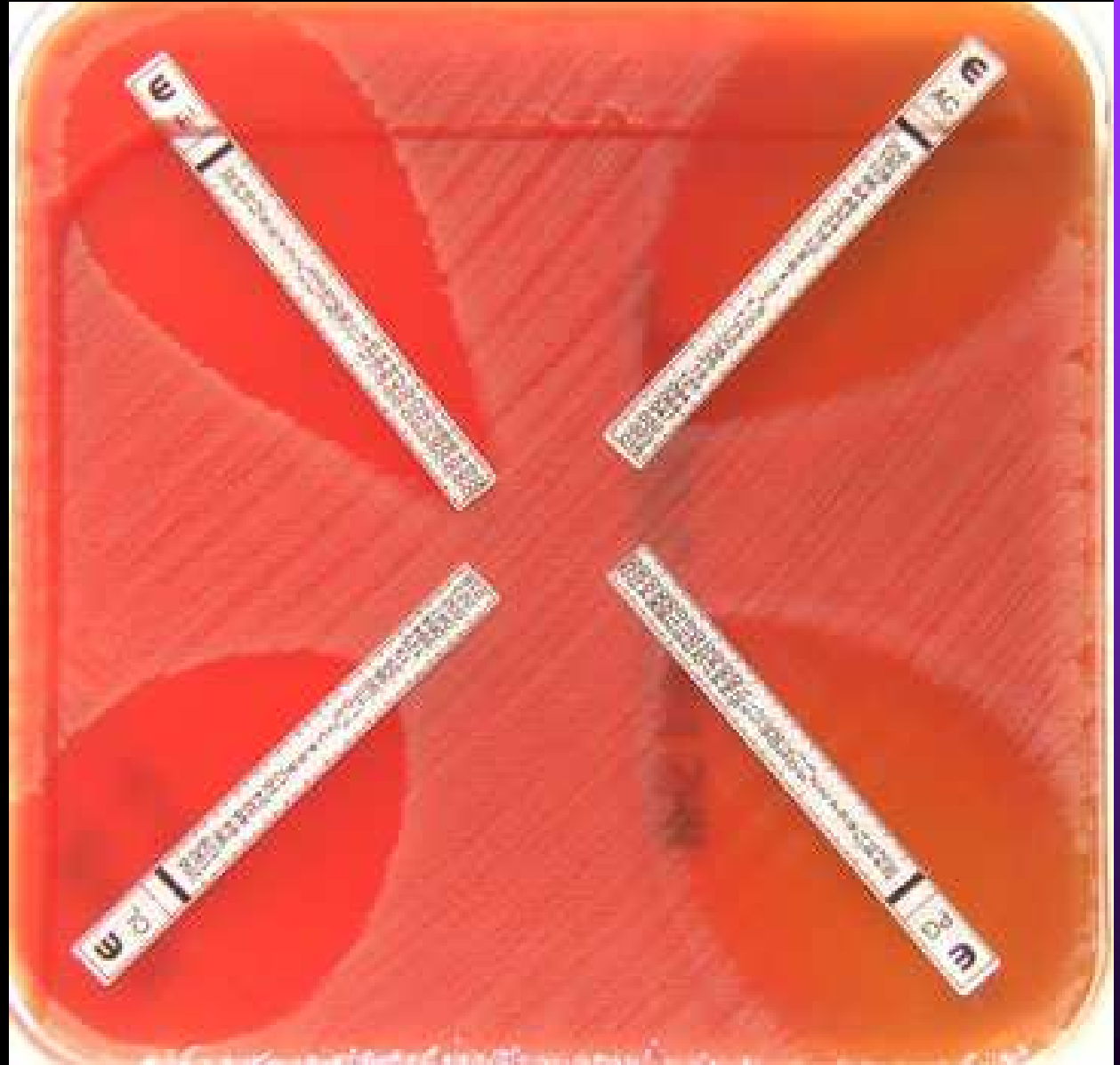
- **Podobné** v principu difúznímu diskovému testu
- Místo disku se však použije **proužek**
- V proužku **stoupající koncentrace atb** od jednoho konce ke druhému (získáno díky speciální technologii – proto jsou tak drahé)
- Zóna **není kruhová, ale vejčitá.**
- Test je **kvantitativní**
- Na papírku je **stupnice** – jednoduché odečítání (*viz obrázek na další obrazovce*)

E-testy – vyhodnocení

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



Někde používají speciální čtvercové
misky



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*)

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.

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 vivo. Lze ho však **využít** pro diagnostiku.

Úkol 1: Naočkování difusního testu

- Připravte suspenzi bakterie ve fyziologickém roztoku s glukózou
- Suspenzi rovnoměrně naneste na misku s MH agarem
- Po zaschnutí suspenze rozmístěte opatrně a rovnoměrně po povrchu agaru antibiotické disky

Úkol 2: Odečtení testů citlivosti

- Odečtete **tři sady testů** citlivosti u **dvou kmenů** bakterií
- Předpokládaný výsledek:

	G+ mikrob	G- mikrob
Sestava pro G+	většinou citlivé	větš. rezistentní
Sestava pro G-	větš. rezistentní	většinou citlivé
Širokospektrá sestava	většinou citlivé	většinou citlivé

Úkol 3: Odečtení testů citlivosti pro případ močové infekce

- Odečtěte **obdobným způsobem** jako u předchozího úkolu testy u dvou kmenů (*Escherichia coli* a *Enterococcus faecalis*)
- Povšimněte si **látek, které se nepoužívají při léčbě systémových infekcí**, například **nitrofurantoinu**

Úkol 4: Odečtení mikrodilučního testu

- Zjistěte a zapište hodnoty MIC pro dvanáct testovaných antibiotik
- **Zakalený důlek = roste to tam**
- **Nezakalený důlek = neroste to tam**
- **Neroste to tam = je to inhibováno**
- Nejmenší koncentrace, která inhibuje je **minimální inhibiční koncentrace**

Úkol 5: Odečtení E-testu

- Odečtete E-test, a zapište, zda je kmen citlivý či rezistentní, pomocí přiloženého breakpointu

- Tam, kde okraj zóny kříží proužek, je hodnota MIC

Z technických důvodů je v pondělním praktiku jen jeden demonstrační E-test + obrázky k proměření.



Úkol 6: Betalaktamáza u hemofilů

- U dvou kmenů **ověřte produkci betalaktamázy** pomocí diagnostického proužku
- Produkce betalaktamázy se projeví změnou reakční plošky – tedy stejně jako např. u oxidázového testu

Úkoly 7 a 8: Detekce širokospektrých betalaktamáz (ESBL) dvěma způsoby

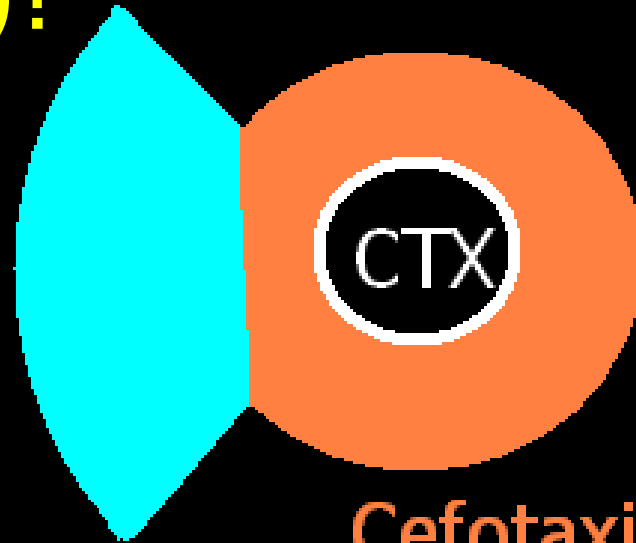
- Oba testy jsou založeny na porovnání účinku téhož antibiotika (cefotaximu, ceftazitimu) bez pomoci kyseliny klavulanové a s pomocí této látky
- U **testu synergismu** se využívá difúze klavulanové kyseliny od disku obsahujícího ko-amoxicilin (tj. amoxicilin plus právě kyselinu klavulanovou)
- U **druhého testu** již máme přímo disky téhož atb bez kyseliny klavulanové a s ní

Úkol 7: Je přítomno rozšíření disku CTX (CTZ) ve směru k disku AMC (ko-amoxicilin)?

Na obrázku je pozitivní výsledek – zóna je širší na levé straně



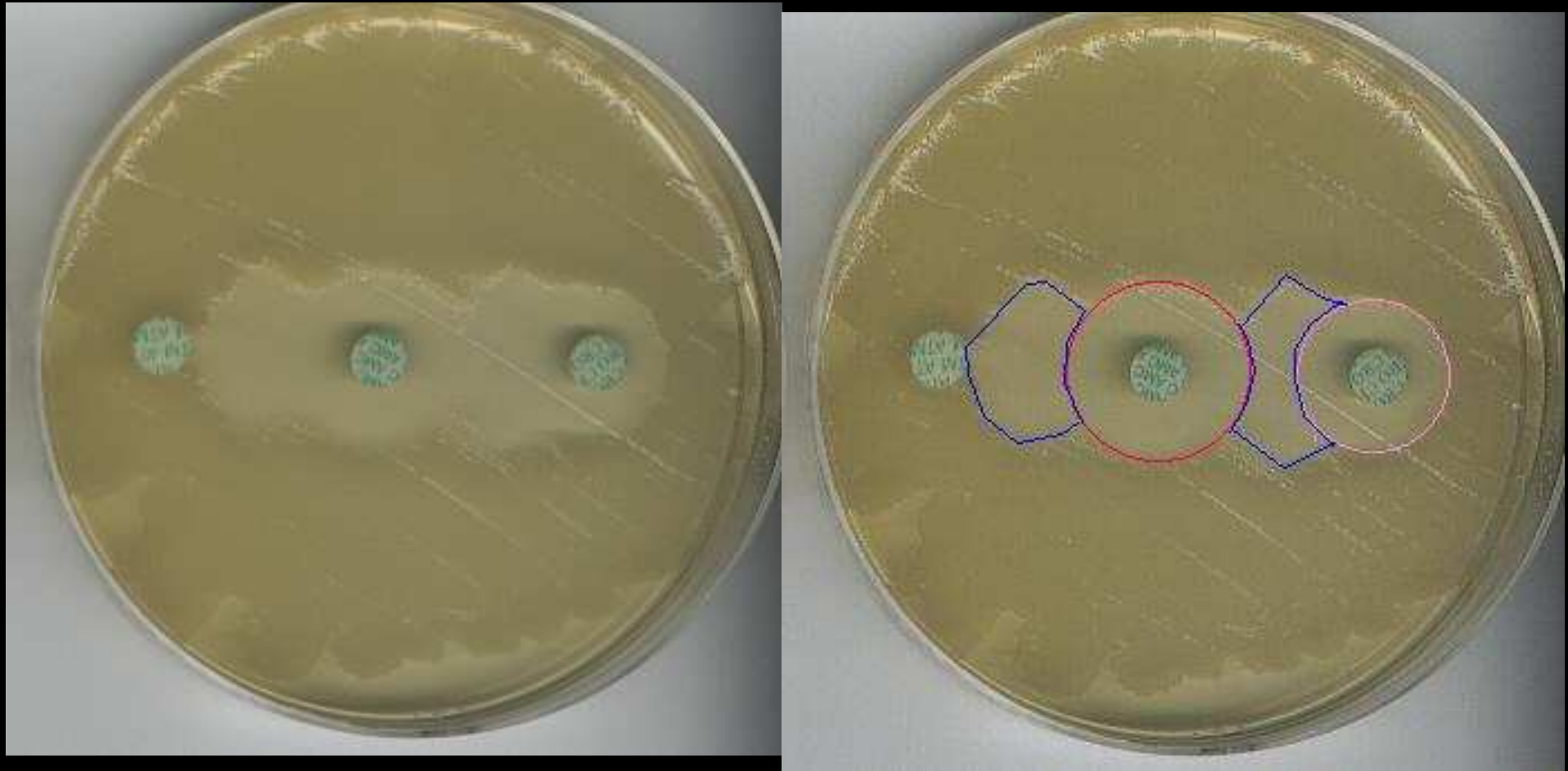
Efekt cefotaximu je umocněn kys. klavulanovou, difundující od disku AMC (rozšíření zóny)



Cefotaxim působí sám (úzká zóna)

Příklad pozitivního výsledku (T7)

Důležitá je modře ohraničená oblast



K úkolu 8

Činí-li rozdíl mezi zónami kolem disků cefotaximu bez inhibitoru : cefotaximu s klavulanátem s ním více než pět milimetrů, je kmen považován za producenta (širokospektré) β -laktamázy. Totéž platí pro ceftazitim.



Přeji Vám
hezký zbytek
dne...

