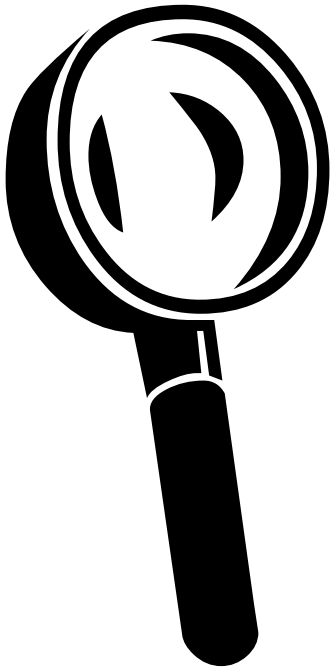


Mikrobiologický ústav uvádí

NA STOPĚ PACHATELE



Díl první: (1) Přehled
vybraných metod přímého
průkazu. (2) Pachatelem je
stafylokok

Autor prezentace: Ondřej Zahradníček (kontakt:
zahradnicek@fnusa.cz). K praktickému cvičení pro Bi7170c

Hlavní obsah

Úvod + mikroskopie v klinické mikrobiologii

Kultivační metody v klinické mikrobiologii

Metody testování antibiotické citlivosti

Diagnostika a diferenciální diagnostika stafylokoků

Bonusy (přístup k bonusům též přímo z kapitol)

ÚVOD +

MIKRO-

SKOPIE

Hypertextové odkazy na jednotlivé části

Bezpečnost v laboratoři a praktické rady

Opakování morfologie bakterií

Diagnostika bakterií

Mikroskopie

Nativní preparát (opakování)

Barvený preparát (opakování)

Gramovo barvení (opakování)

Další barvicí metody v klinické mikrobiologii

Praktické poznámky k mikroskopii

Bezpečnost v laboratoři a praktické rady

Praktické rady

- **Šatní skříňky pro studenty** jsou 1., 2. a 4. od okna. **Nepoužívejte 3. skříňku, i kdyby byla otevřená.** Je to skříňka studentů střední zdravotnické školy.
- **Klíče od šatních skříněk** nechávejte vždy na háčcích vedle dveří
- **Nad tímto stolem** vždy visí klíček od WC. Když si ho půjčíte, vždy ho tam vraťte.
- **Vstup studentů do prostor ústavu za praktikárnou je zakázán.**

Co s odpady a odpadky

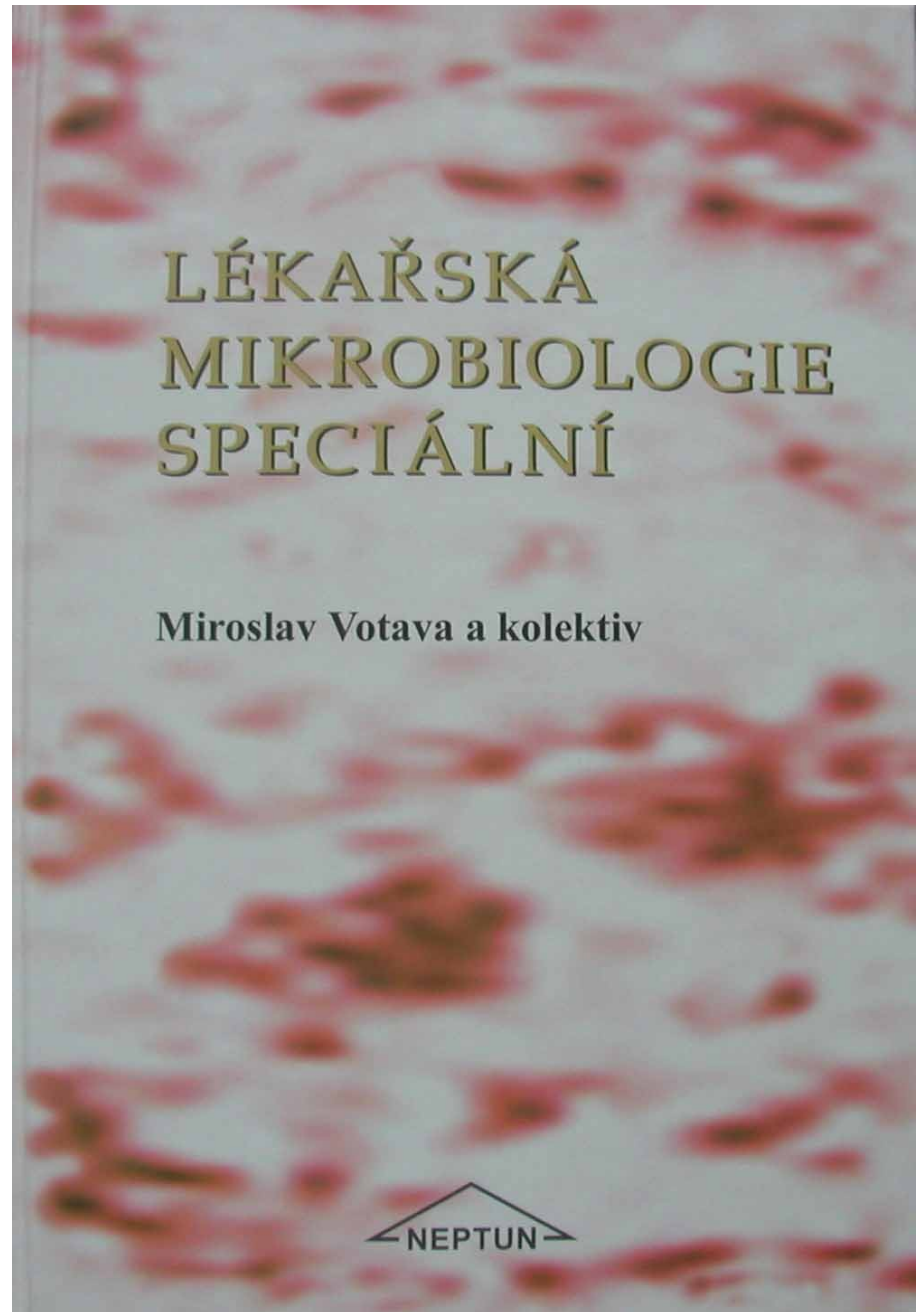
- **Malé kousky** můžete dát do nádobek na svých stolech
- **Použité zápalky** mají své vlastní krabičky
- **Větší odpadky** vyhazujte do koše vedle umyvadel
- **Rozbité sklo** patří do žluté nádoby vedle koše
- Mikroskopické **preparáty** připravené přímo vámi patří po použití do desinfekce
- Prosíme, **nenechávejte na stolech nepořádek** (zbytky z gumování a ořezávání tužek apod.)

Literatura

- Bezpodmínečně potřebujete **Protokoly k praktickým cvičením** (IS MU)
- Časem budete potřebovat **Lékařskou mikrobiologii obecnou** a **Lékařskou mikrobiologii speciální**
- Hodí se i **Lékařská mikrobiologie II – vyšetřovací metody**, ale není nezbytná (a je hrozně drahá)

Učebnice Lékařská
mikrobiologie
speciální (obecná je
tenčí a modrá)

Foto: archiv MÚ



Podmínky zápočtu

- Účast v praktiku by měla být **pokud možno stoprocentní**
 - Podle nového SaZŘ máte právo na jednu absenci, která není oficiálně omluvena. Snažte se toho nezneužívat
 - Pokud výjimečně máte omluvenou absenci, nezabavuje vás to povinnosti **doplnit si příslušný protokol a kontrolní otázky** a případně si i praktikum nahradit (zvláště u > 2 absencí)
- Pro zápočet je také nutno mít vyplněny všechny **kontrolní otázky na IS MU**
- Další podmínkou zápočtu je **zápočtový test**

Další pokyny

- **Obrázky opravdu kreslete** (nakreslete koky, nepište „vidím koky“)
- **Obrázky kreslete barevně**, noste pastelky
- **Kreslete to, co vidíte** (pokud se vám koky v mikroskopu dotýkají, kreslete je tak, nekreslete jen obrysy, ale probarvujte)
- **Pokud nevidíte to, co máte vidět, upozorněte asistenta**
- *Protokoly jsou kontrolovány u zkoušky a mají vliv na výslednou známku!*

Důkaz, že na protokoly se opravdu hledí (zde karta medika, ale může se týkat i vás)

Semestr: jarní

Započteno: 22.5.2006

Vyučující: [signature]

Poznámky: 8/8

Semestr: podzimní

Započteno: 22.12.2006

Vyučující: [signature]

Poznámky: 12/12

Zkouška dne: 14.2.2007

Termín: řádný

Otázka	Dílčí známka
Praktikum <i>Ukážte, kdo pán tu endokrin.</i>	B
A: <i>Malabsorpce a enteropneust</i>	A
B: <i>Q. difficile</i>	A-B
C: <i>Difent. vrbny</i>	A
<i>Protokoly: + (velmi pěkné!)</i>	
Výsledek: <i>Výborně (A)</i>	Examinátor: [signature]

Koky se v mikroskopu opravdu dotýkají





ISový odpovědník

Po prostudování této prezentace si ověřte, zda víte odpovědi na následující otázky, případně hledejte odpovědi na ně jinde. Až budete odpovědi vědět, vyplňte odpovědník.

1. V jakých situacích používáme v mikroskopii nativní preparát?
2. Jaké jsou základní tvary bakteriálních buněk?
3. Jaké je možné uspořádání koků?
4. Jak se nazývá mikroskopie, při níž je objekt osvětlen šikmo?
5. Jaké jsou rozdíly mezi nativním a barveným preparátem?
6. Jak po sobě následují chemikálie v Gramově barvení?
7. Které bakterie se Gramem nebarví anebo barví špatně?
8. Jakou barvu mají různé mikroorganismy v Gramově barvení?
9. Jaké další barvicí metody se používají v lékařské mikrobiologii?
10. Jak se Gramem obarví epitelie či bílé krvinky?

A možná ještě nějaké překvapení navíc 😊

Podobně budete vyplňovat odpovědník ke všem dalším praktikům.

Opakování morfologie bakterií

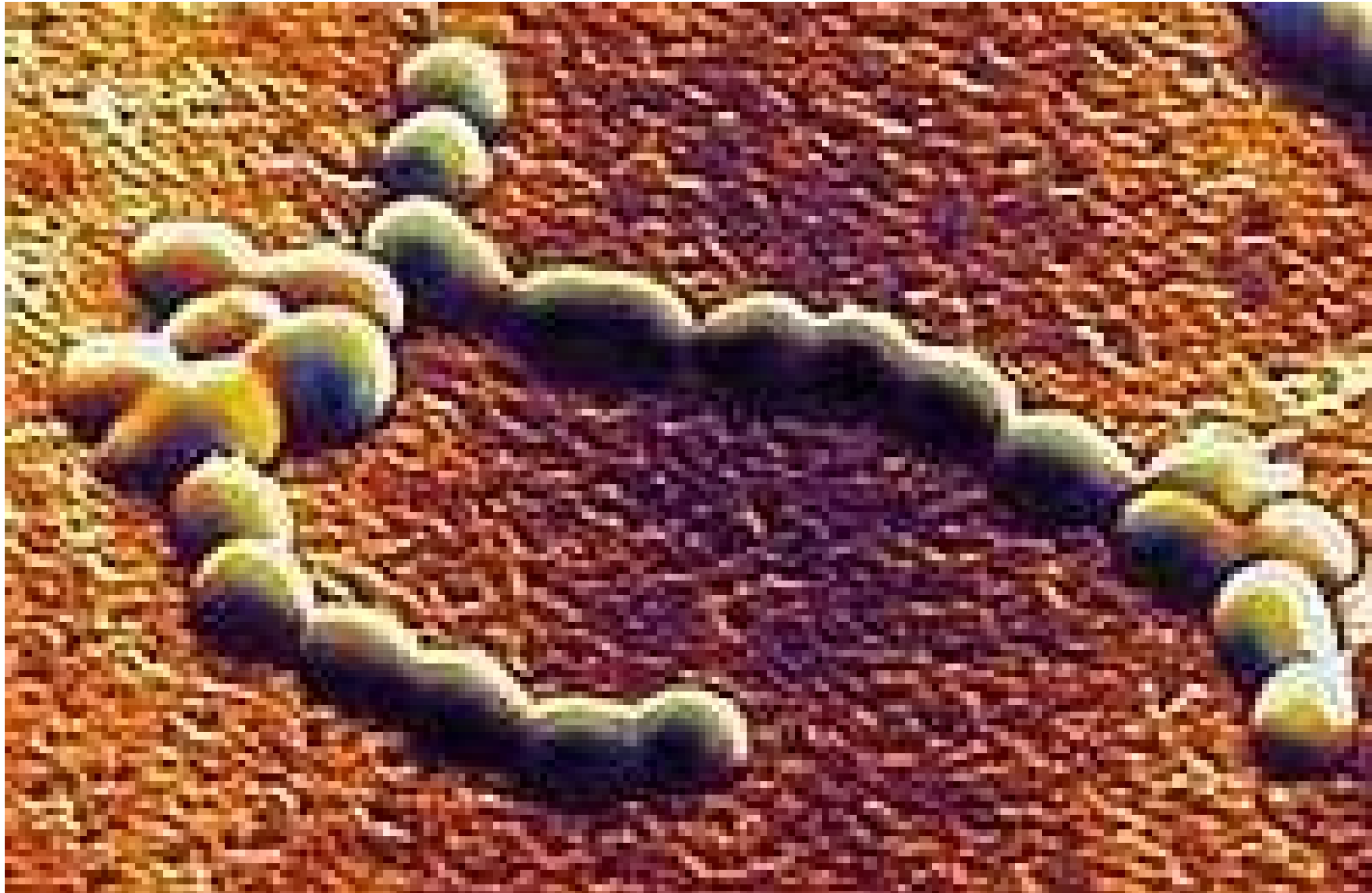
Morfologie vybraných klinicky významných mikroorganismů

- **Viry** se skládají z **DNA** či **RNA** a **proeinů**; některé viry obsahují i obal „ukradený“ hostitelské buňce
- **Viry** mají **kubickou** nebo **šroubovicovou symetrii**. Některé z nich jsou schopny tvořit „pseudokrystaly“
- **Kvasinky** mají tvar vajíčka, mohou pučet a tvořit tzv. pseudomycelia. Na svém povrchu mají **buněčnou stěnu**. Jsou **eukaryotní**.
- **Vláknité houby** a **parazité** mají velmi rozmanité tvary, a také rozličná **vývojová stádia**. I ony jsou **eukaryotní**.

Morfologie bakterií

- **Koky ve dvojicích** (diplokoky), **v řetězcích** a **ve shlucích** (neříkejme raději „streptokoky“ a „stafylokoky“ – tyto pojmy se dnes používají téměř výhradně pro **zástupce daných rodů**)
- **Tyčinky** rovné či zahnuté (vibria), případně několikrát zahnuté (spirily), krátké nebo dlouhé, tvořící až vlákna či rozvětvená vlákna; konce mohou být oblé či špičaté a i tyčinky mohou být různě uspořádané
- **Kokobacily** (někdo říká i kokotyčinky)
- **Spirochety** – tenké spirálovité bakterie
- **Beztvaré bakterie**, například mykoplasmata (nemají buněčnou stěnu, jejich tvar je proto proměnlivý)

Koky v řetízcích (elektronová mikrofotografie *Enterococcus* sp.)



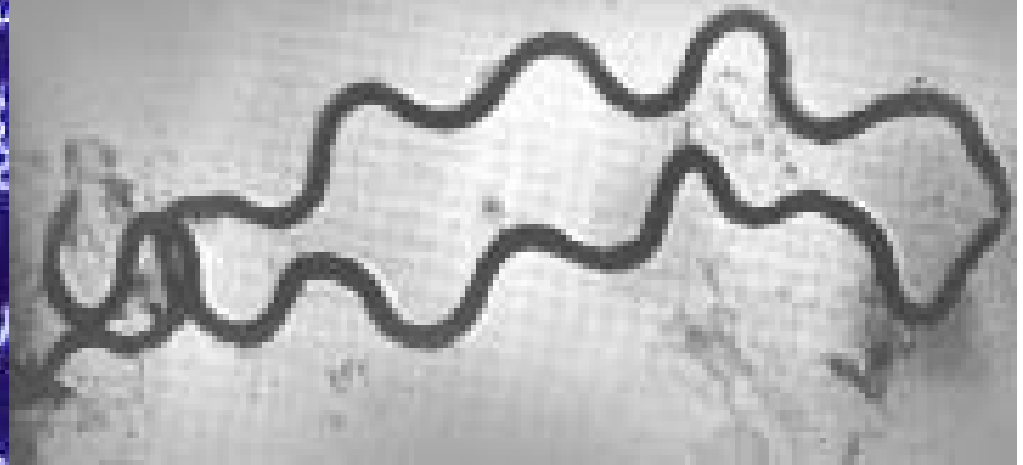
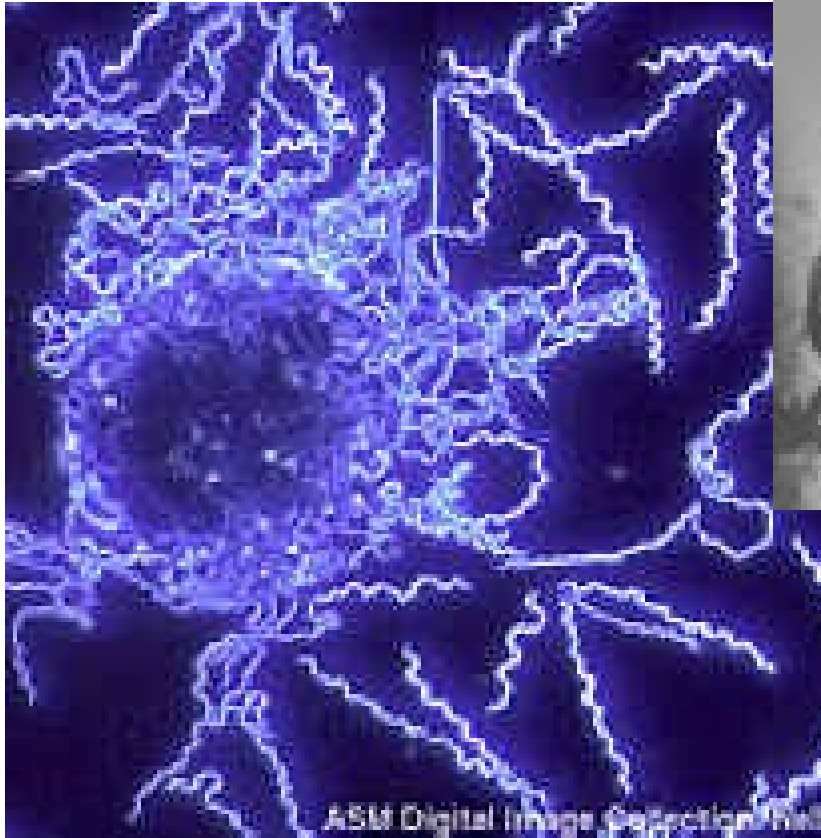
<http://www.morgenwelt.de/typo3temp/5ce14d39b5.jpg>

Zprohýbaná tyčinka – helikobakter

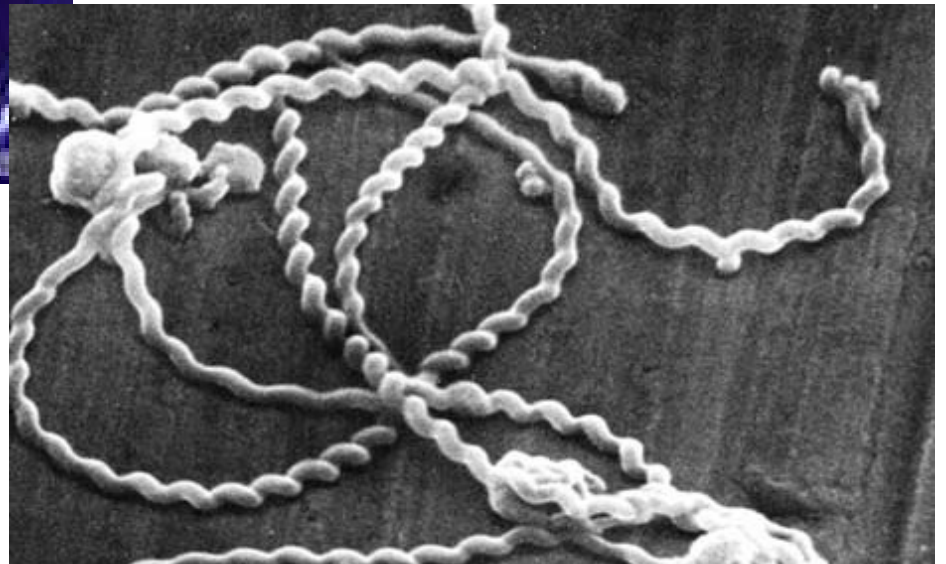


<http://vietsciences.free.fr/nobel/medecine/images/helicobacter%2520pylori.JPG>

www.primer.ru/std/gallery_std/treponema.htm

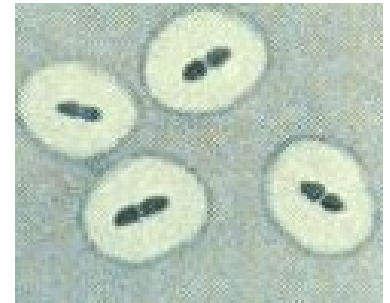


Spirochety

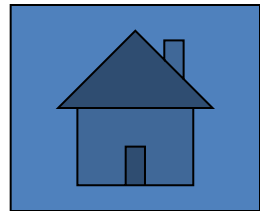


<http://nl.wikipedia.org/wiki/Afbeelding:TreponemaPallidum.jpg>

Pouzdro a biofilm



- **Pouzdro** obklopuje jednotlivou bakterii, popř. dvojici. Není to už integrální součást bakteriální buňky, spíš nánosy molekul (většinou polysacharidů), které buňku chrání. Barví se většinou negativně (jako světlé místo na obarveném pozadí)
- **Biofilm** je souvislá vrstva, vzniklá z bakterií, jejich pouzder a dalšího materiálu. Biofilm je mnohem odolnější než jednotlivá bakterie, žijící v tzv. planktonické formě



Diagnostika bakterií

Diagnostika: průkaz a určování bakterií

- **Klinická mikrobiologie v praxi** spočívá v tom, že **lékař** (ať už je to obvodní lékař, ambulantní specialista či lékař z kteréhokoli oddělení nemocnice) **pošle do laboratoře vzorek**
- **Úkolem klinickomikrobiologické laboratoře** je **prokázat** v takovém vzorku případnou **přítomnost mikrobů** a pokud tam jsou, tak je také **určit**.
- Určení nemusí být přesné, ale musí poskytnout **dostatek informací pro léčbu**. To je podstatný rozdíl proti přístupu základního mikrobiologického výzkumu, kdy diagnostika musí být přesná, bez ohledu na čas

Co je to vzorek v klinické mikrobiologii

(Klinický) vzorek, v laboratorní praxi také často slangově nazývaný **materiál**, je to, co je odebráno pacientovi a přichází na vyšetření do laboratoře:

- **kusový či tekutý materiál ve zkumavce** či jiné nádobce (krev, sérum, moč...)
- **stěr či výtěr na vatovém tamponu**, obvykle zanořeném do transportního média.

Při diagnostice někdy pracujeme s celým vzorkem. Jindy je nutno získat ze vzorku kmen nebo kmeny patogenních mikrobů.

Vzorek tedy často obsahuje více různých mikrobů, a také buňky i nebuněčné struktury hostitele.

Zatímco kmen...

Kmen je čistá kultura („výpěstek“) jednoho druhu mikroba

Kmen získáme jedině kultivací (pěstováním) mikroba na pevné půdě.

Kochův objev, že bakterie lze takto pěstovat, měl zásadní význam v dějinách bakteriologie.

S kmeny se kromě bakteriologie pracuje také v mykologii, naproti tomu ve virologii a parazitologii je jejich využití omezené.

Přehled metod

- **Metody přímé: Hledáme mikroba, jeho část či jeho produkt** (produktem může být například nějaký bakteriální jed – toxin). Patří sem:
 - **Přímý průkaz ve vzorku** – pracujeme s celým vzorkem (močí, krví, výtěrem z krku a podobně)
 - **Identifikace kmene** – určení vypěstovaného izolátu
- **Metody nepřímé: Hledáme (zpravidla) protilátky.** Protilátka není součástí ani produktem mikroba – je produktem makroorganismu, odezvou na činnost mikroba

Přehled metod přímého průkazu

Metoda	Průkaz ve vzorku	Identifikace
Mikroskopie	ano	ano
Kultivace	ano	ano
Biochemická identifikace	ne	ano
Průkaz antigenu	ano	ano
Pokus na zvířeti	ano	v praxi ne
Molekulární metody	ano	v praxi ne*

*netýká se molekulární epidemiologie – sledování příbuznosti kmenů

Laboratoř klinické mikrobiologie



Foto O. Z.

Mikroskopie

Co vidíme v mikroskopu na klinickomikrobiologické laboratoři

- **V případě mikroskopování kmene** vidíme jeden typ mikrobiálních buněk
- **V případě mikroskopování klinického vzorku** můžeme vidět
 - **mikroby** – nemusí tam být žádné, a může tam být i klidně deset druhů
 - **buňky makroorganismu** – nejčastěji epitelie a leukocyty, někdy erytrocyty
 - **jiné struktury**, např. fibrinová vlákna, buněčnou drť (detritus) a podobně

Typy mikroskopie

- **Elektronová mikroskopie** – u virů; spíše výzkum než při běžném průkazu virů
- **Optická mikroskopie**
 - **Nativní preparát** – na velké a/nebo pohyblivé mikroby (parazity, houby, pohyblivé bakterie)
 - **Nativní preparát v zástinu** (hlavně spirochety)
 - **Fixované a barvené preparáty**, například:
 - **Barvení dle Grama** – nejdůležitější bakteriologické
 - **Barvení dle Ziehl-Neelsena** – např. u bacilů TBC
 - **Barvení dle Giemsy** – na některé prvoky
 - **Barvení Gomoriho trichromem** – na některé jiné prvoky
 - **Fluorescenční barvení** – k lepšímu zvýraznění

Shrnutí k mikroskopii

- Mikroby mají různou **velikost**. Kvasinky jsou větší než bakterie, ty zase než viry
- Bakterie mají různý **tvar** (koky, kokobacily, tyčinky různých tvarů, spirochety)
- Bakterie mají různé **uspořádání** (shluky, řetízky, dvojice); kokům v řetízcích raději obecně neříkáme „streptokoky“, protože by to mohly být třeba enterokoky.
- Některé bakterie tvoří **endospory**, jež se nebarví.

Porovnání velikosti: kvasinka rodu *Candida* a bakterie rodu *Staphylococcus*

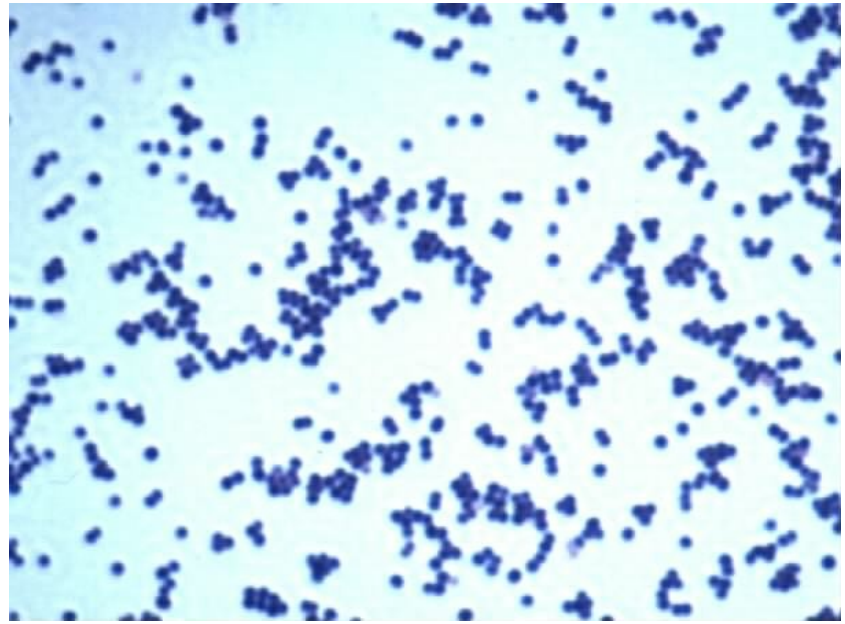
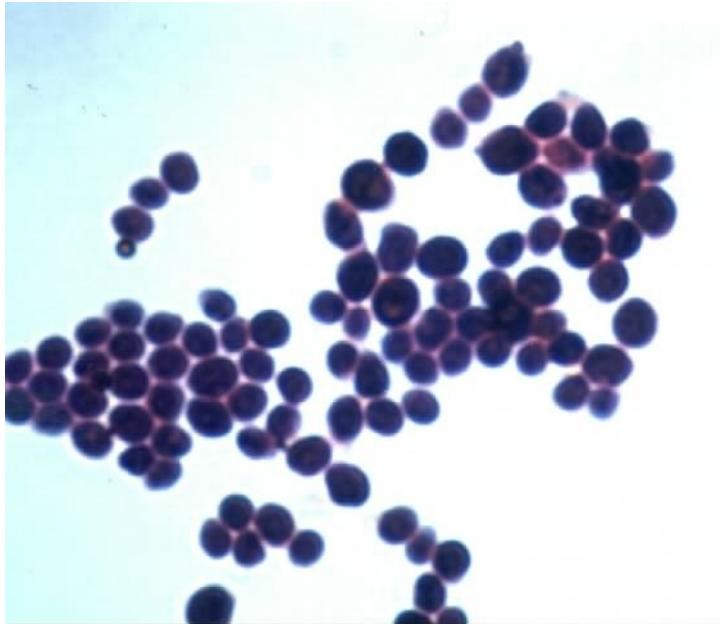
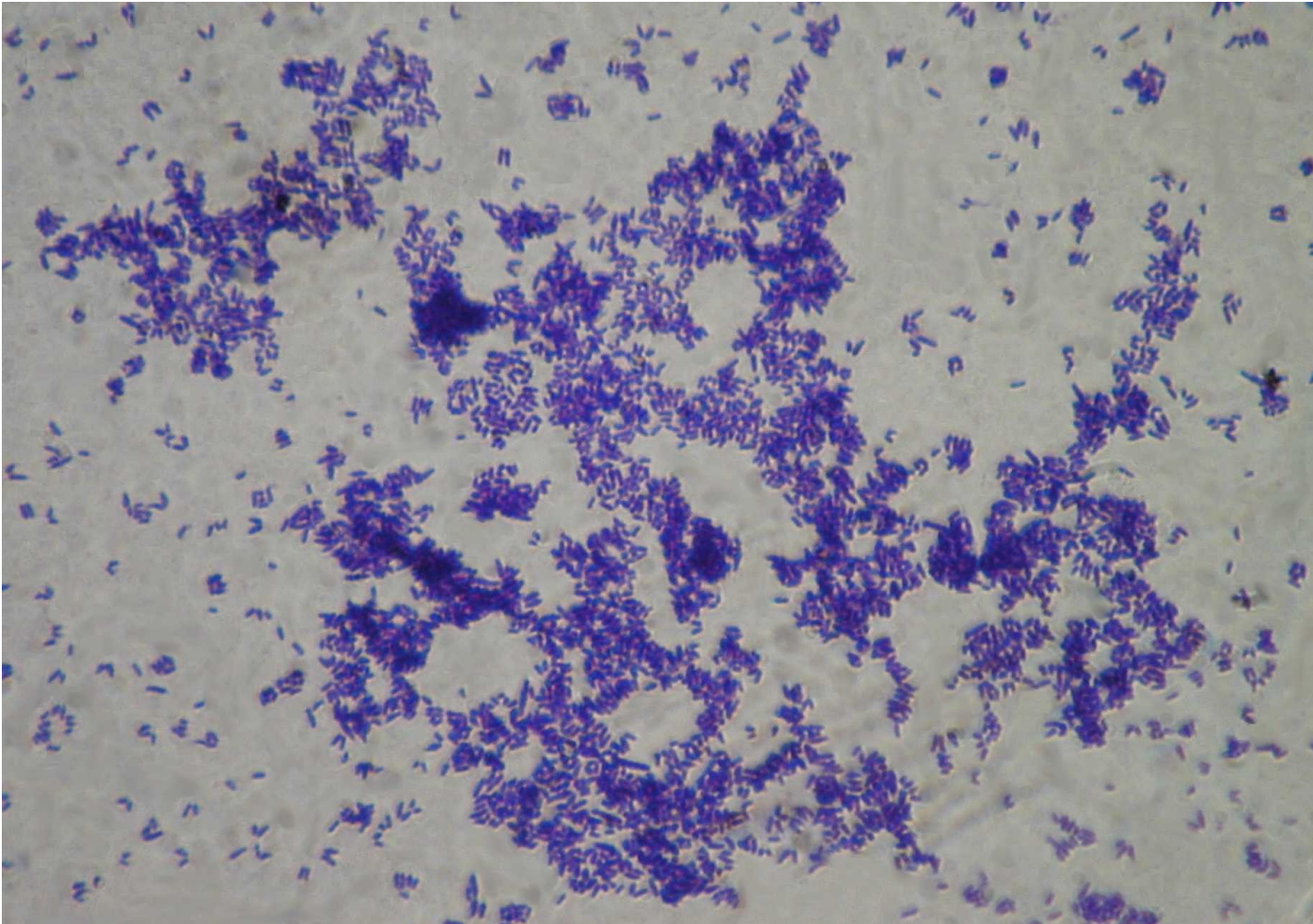


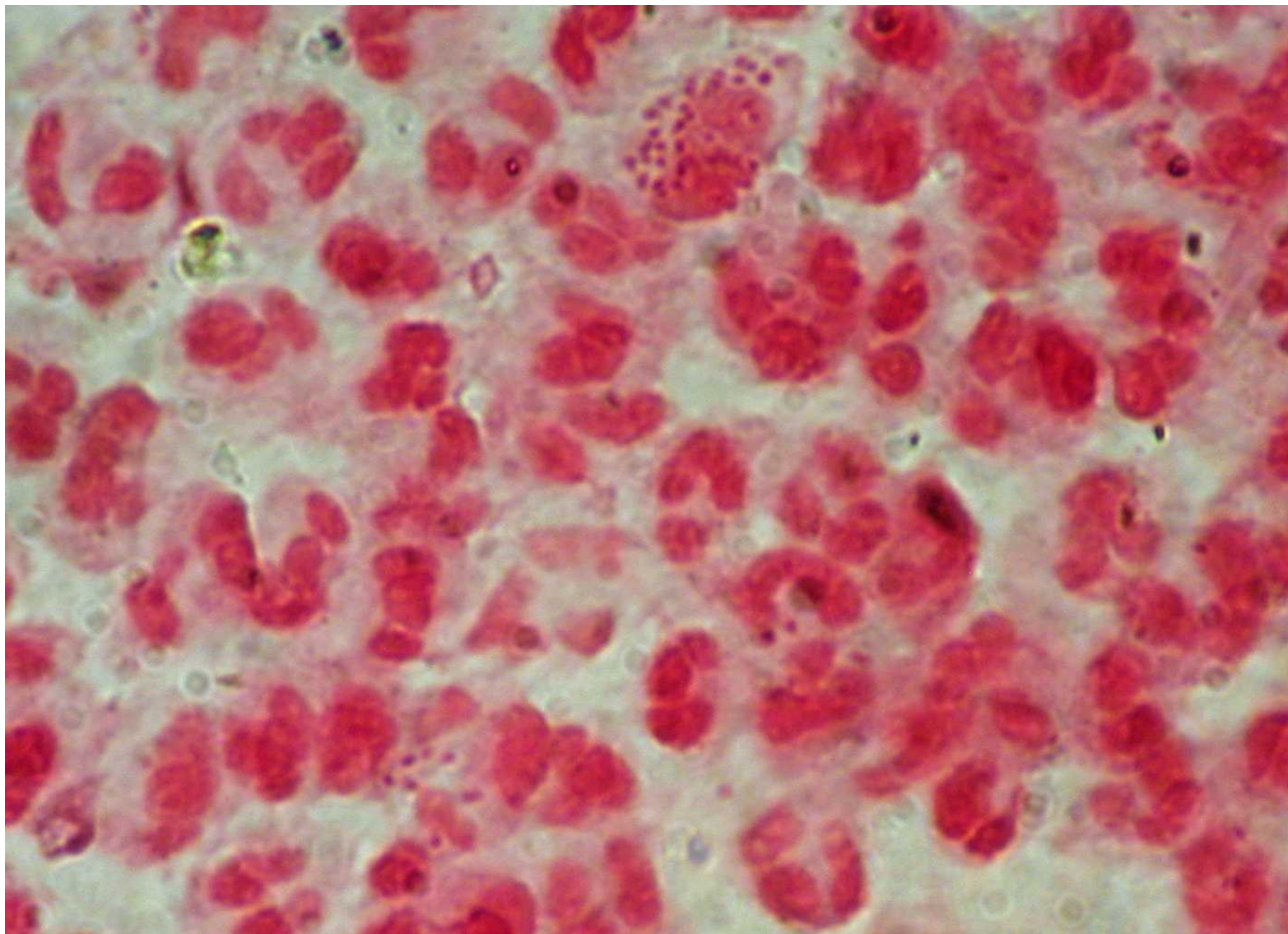
Foto: archiv ústavu, převzato z www.medmicro.info

Mikroskopie kmene (grampozitivní tyčinky)

Foto O. Z.



Mikroskopie vzorku (leukocyty, G- koky)



Hlavní mikroskopické metody v klinické mikrobiologii (zjednodušeně)

	Sušení a fixace	Krycí sklíčko	Imerzní systém
Nativní preparát	NE	ANO	NE
<i>Nativní zástinový preparát</i>	NE	ANO	ANO
Barvené preparáty	ANO	NE	ANO

Nativní × barvené preparáty

- U **nativního preparátu** je mezi podložním a krycím sklíčkem vrstva terkutiny. Je obtížné na tu vrstvu zaostřit. Je proto doporučeníhodné začít zvětšením objektivu 4× a pak pokračovat objektivy, které zvětšují 10×, (20×) a 40×.
- U **barvených preparátů** jsou všechny objekty v jedné rovině (na povrchu sklíčka). Je vcelku jednoduché zaostřit. Používejte pouze imerzní objektiv zvětšující 100×. Nikdy zde nepoužívejte neimerzní objektivy, dokonce ani ne před kápnutím oleje!

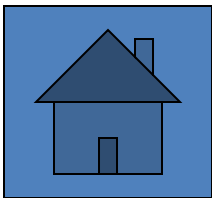
Příprava mikroskopického preparátu

- **Pokud máme kmen:**

- kápneme na podložní sklíčko **kapku fyziolog. roztoku.**
- vyžeháme mikrobiologickou drátěnou **kličku v plameni**
- po zchladnutí nabereme **trochu hmoty bakterií**
- hmotu **rozmícháme** v připravené kapce

- **Pokud máme vzorek:**

- **tekutý vzorek** na podložní sklíčko **kápneme**
- **nátěr na špejli** buď rozmícháme ve fyziologickém roztoku, nebo (pouze u barvených preparátů) přímo natřeme na sklíčko

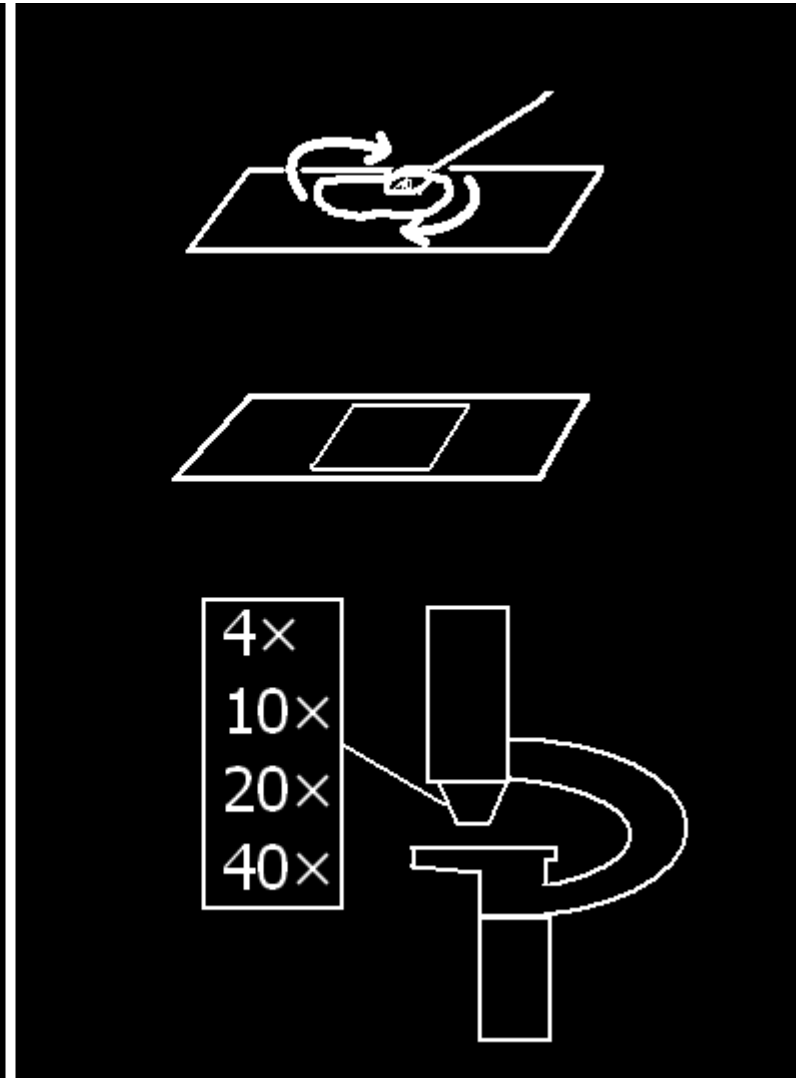
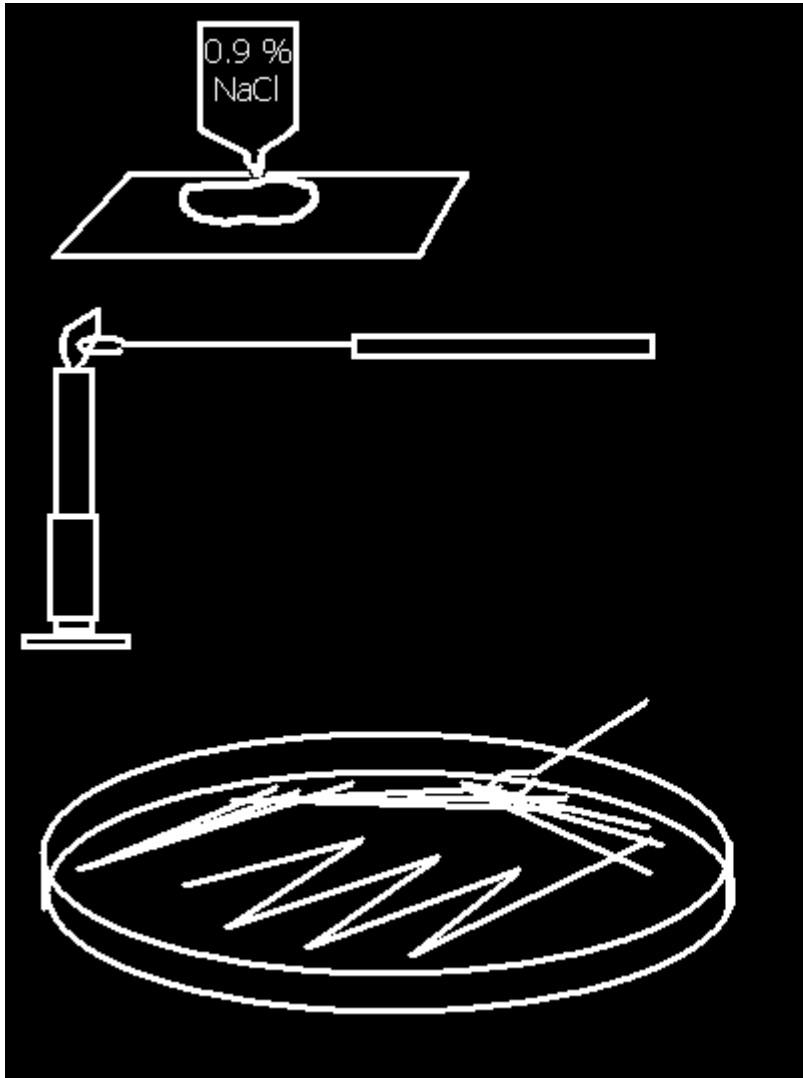


Nativní
preparát

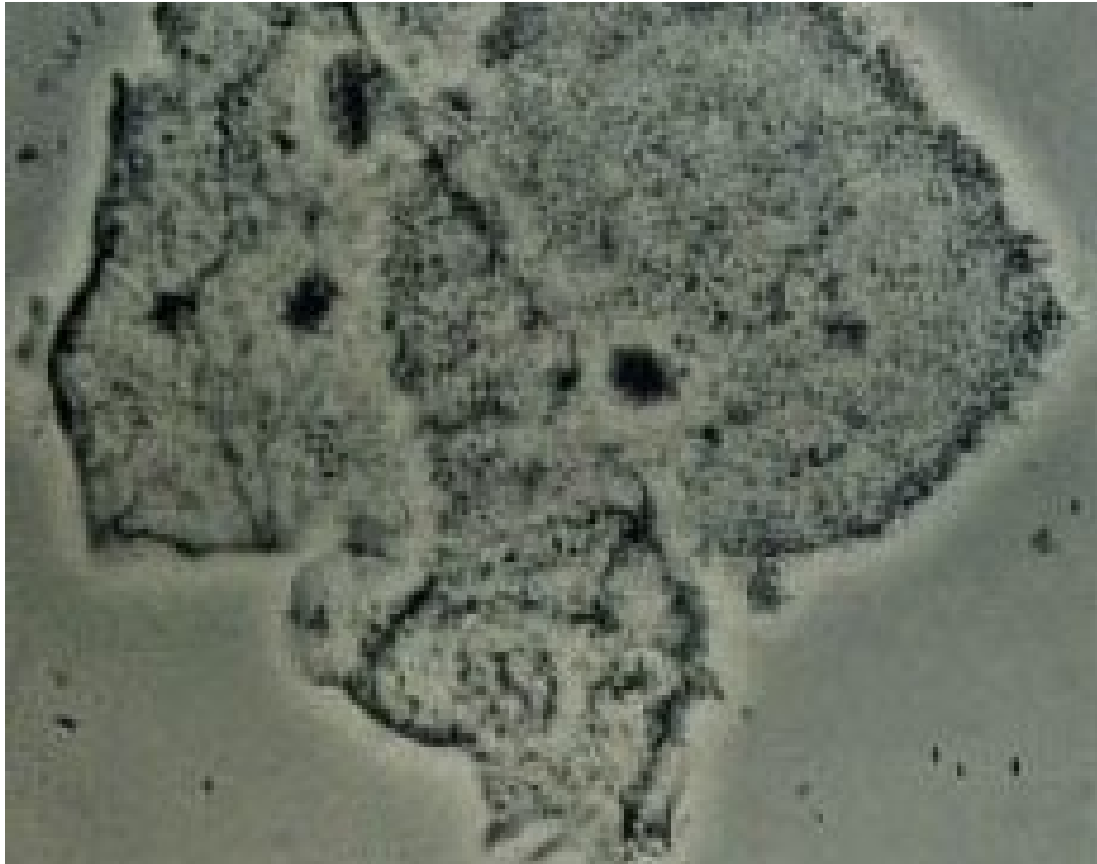
Příprava nativního preparátu

- V případě nativního preparátu kapku, ve které je vzorek či rozmíchaný kmen, **nesušíme**. Pouze **přikryjeme krycím sklíčkem** a pozorujeme objektivy, které zvětšují např. 4 ×, 10 × či 40 ×.
- **Nepoužíváme imerzní olej**
- Používá se např. u soupravy C. A. T., kde do laboratoře přichází zkumavka s výtěrem rozmíchaným v médiu. Kápne se na sklíčko a pozorují se epitelie, popř. leukocyty, a mezi nimi mikroby.

Nativní preparát – postup (u kmene)



Ukázka nativního preparátu C. A. T.



Vidíme epitelie,
malé tečky jsou
možná mikroby,
možná
artefakty (z
obrázku se to
nedá spolehlivě
poznat)

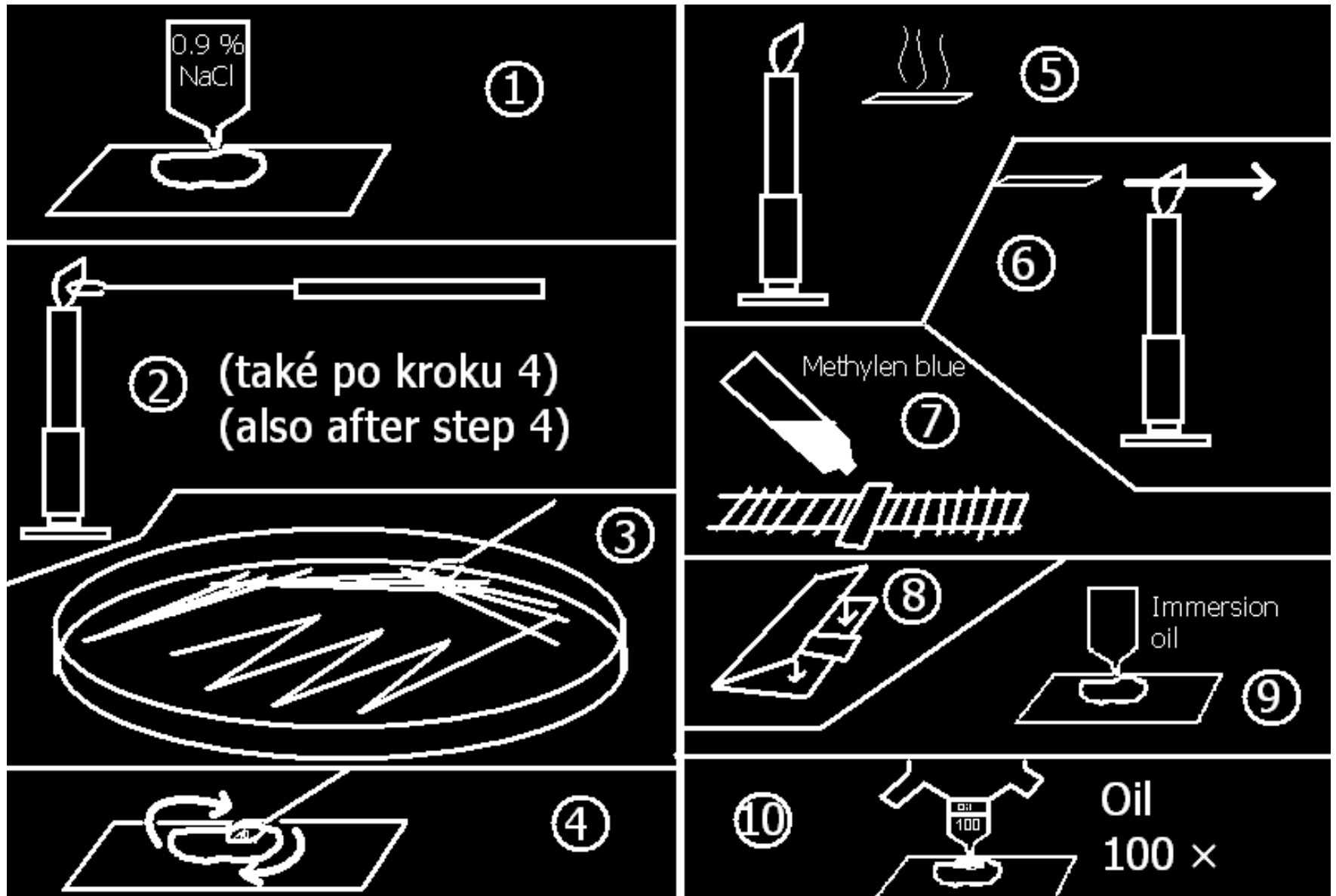


Barvený preparát

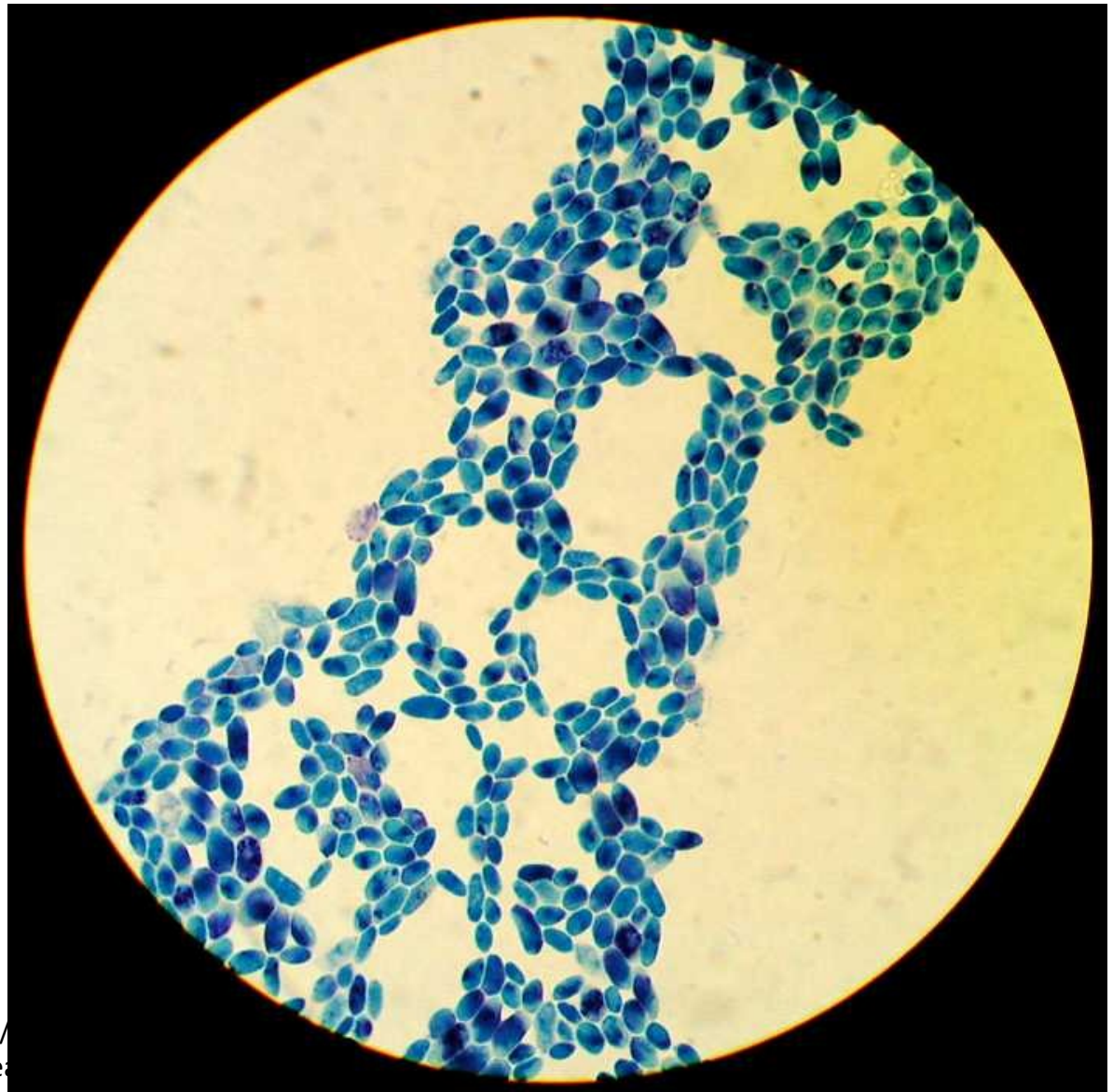
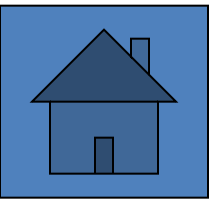
Příprava barveného preparátu

- Vycházíme opět z kapky vzorku nebo kmene rozmíchaného ve fyziologickém roztoku. V tomto případě je lépe, když je kapka malá.
- Kapku necháme zaschnout. Můžeme tomu pomoci umístěním **poblíž** kahanu.
- Po zaschnutí vzorek fixujeme tím, že sklíčko několikrát protáhneme **skrz** plamen kahanu, kontrolující hřbetem ruky teplotu.

Jednoduché barvení (např. metylenovou modří)



Takhle může vypadat výsledek (kvasinky):



http://biology.clc.uc.edu/fankhauser/microbiology/Yeast_Plate_Count/09_Yeast_Plate_Count/09_Yeast_Plate_Count_h_Blue_P7201177.jpg

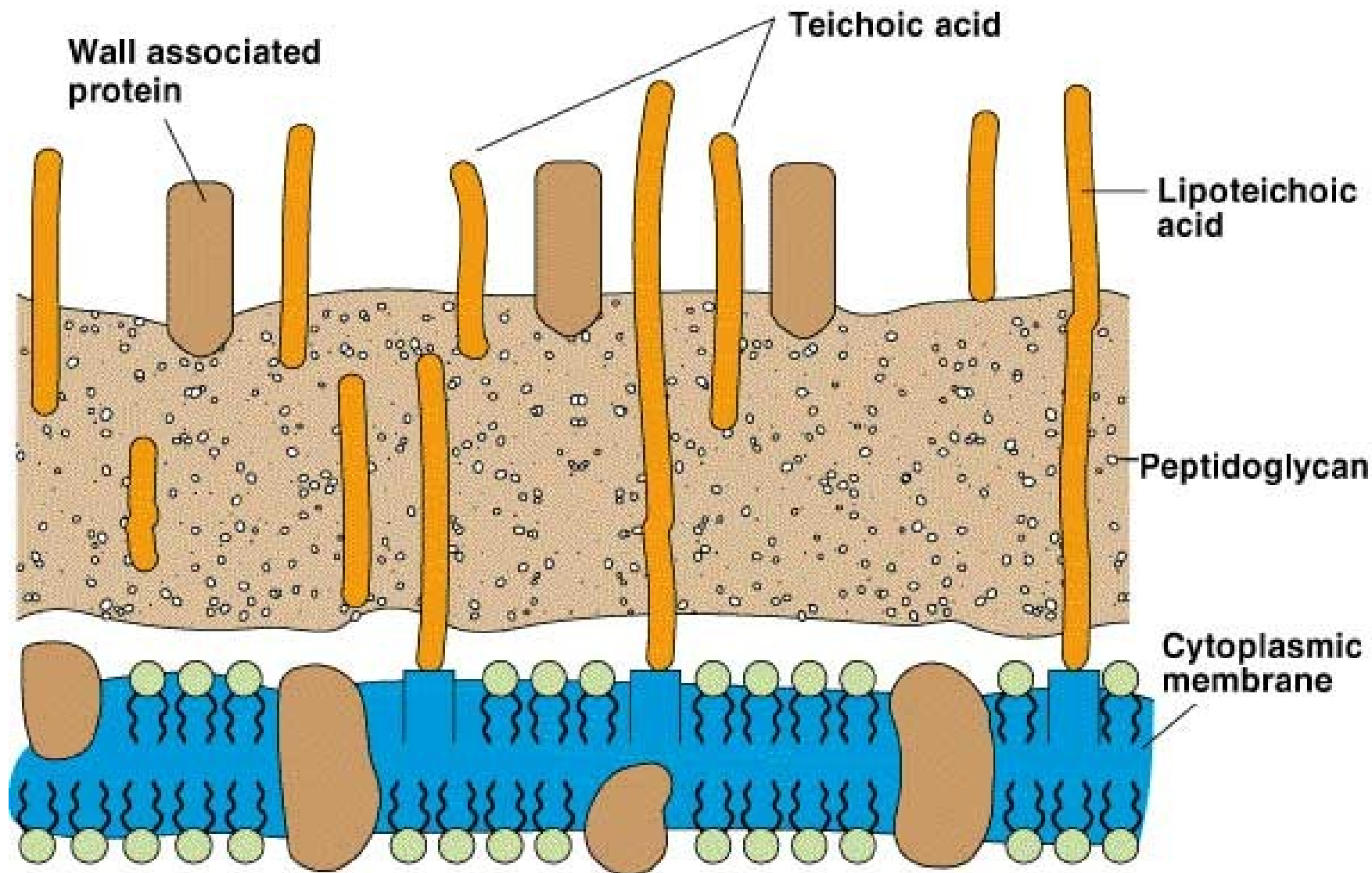
Gramovo barvení

Buněčná stěna bakterií

- Na světě jsou bakterie, které jsou **mechanicky odolné**, jejich buněčná stěna je **silná a jednoduchá**. Říkáme jim **grampozitivní**.
- Na světě jsou ale také bakterie, které jsou spíše **chemicky odolné**, jejich buněčná stěna je **tenčí, ale složitější**. Říkáme jim **gramnegativní**.
- Kromě těch i oněch existují ještě takzvané **Gramem se nebarvící bakterie**.

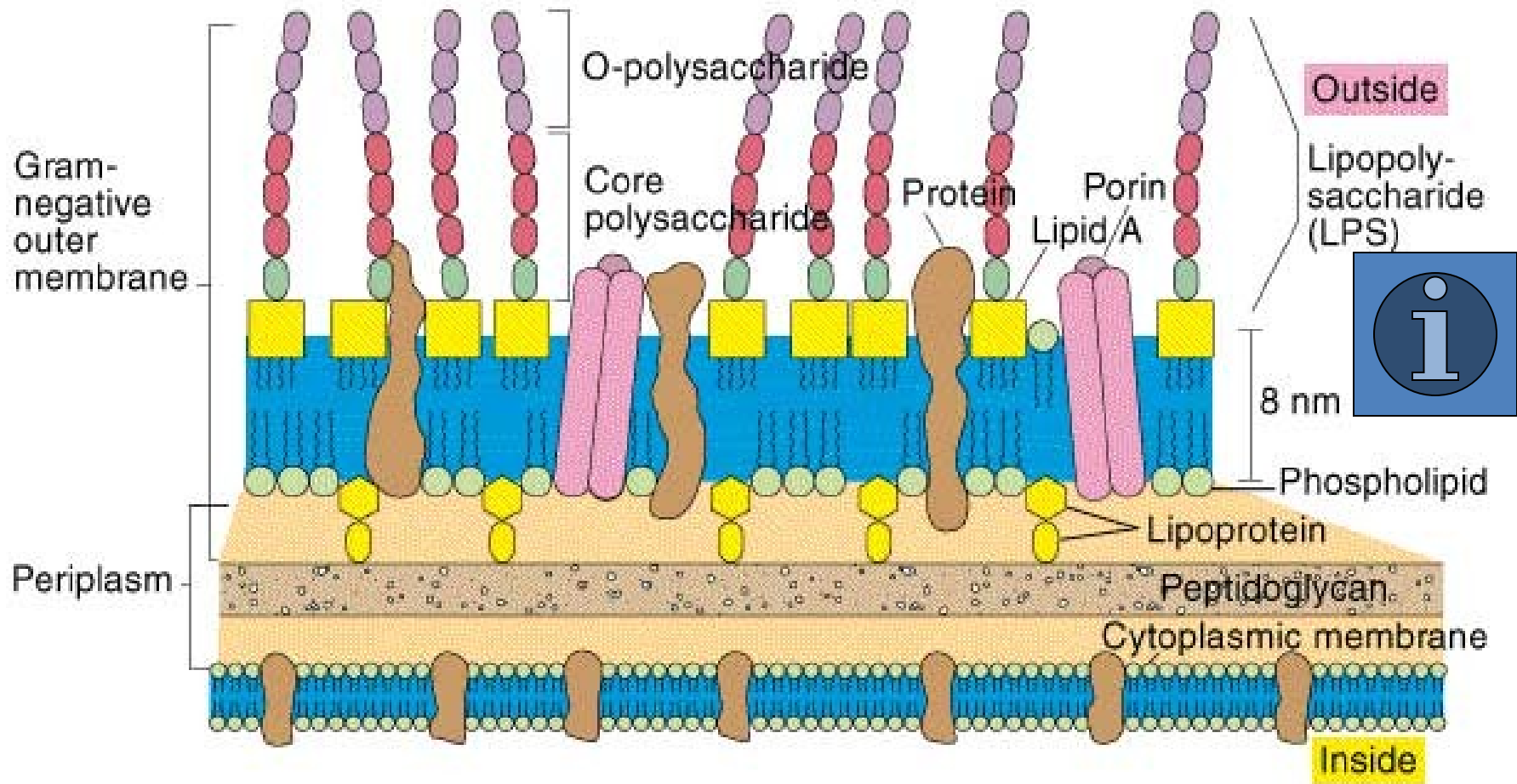
Grampozitivní stěna

www.arches.uga.edu





Gramnegativní stěna

www.arches.uga.edu



Gramovo barvení – princip 1

- **Gram**  **pozitivní bakterie** mají ve své stěně tlustší vrstvu peptidoglykanu mureinu.
 - Díky tomu se na ně pevněji váže krystalová nebo genciánová violet'...
 - ...a po upevnění této vazby Lugolovým  roztokem...
 - ...se neodbarví ani alkoholem.
- **Gramnegativní bakterie** se naopak odbarví alkoholem a dobarví se pak na červeno safraninem.

Gramovo barvení – princip 2

Chemikálie	Grampozitivní	Gramnegativní
Krystal. violet'	Obarví se fialově	Obarví se fialově
Lugolův roztok	Vazba se upevní	Upevní se méně
Alkohol	Neodbarví se	Odbarví se
Safranin	Zůstanou fialové	Obarví se červeně

Jiné bakterie než klasické G+ a G– bakterie:

Mykobakteria jsou acidorezistentní. Jejich stěna je hydrofobní. Nebarví se ani fialově, ani červeně; nebarví se vůbec. Někdy je **označujeme jako „gramem se nebarvící bakterie:“**

Mykoplasmata nemají buněčnou stěnu vůbec, avšak jejich cytoplasma se barví slabě na červeno. Nicméně jsou mizerně viditelná (také protože jsou velmi malá) a Gramovo barvení se pro ně nepoužívá.

Spirochety mají gramnegativní typ buněčné stěny, ale jsou tak tenké, že jsou špatně vidět a Gramovo barvení se u nich zpravidla také nepoužívá.

A jak se barví to ostatní, co nejsou bakterie?

- **Kvasinky** se většinou barví fialově jako G+ bakterie. Mají specifickou buněčnou stěnu, ale v Gramově barvení se chová podobně jako stěna grampozitivních bakterií
- **Lidské buňky** se barví většinou červeně, ale jádra mohou být i trochu do modra

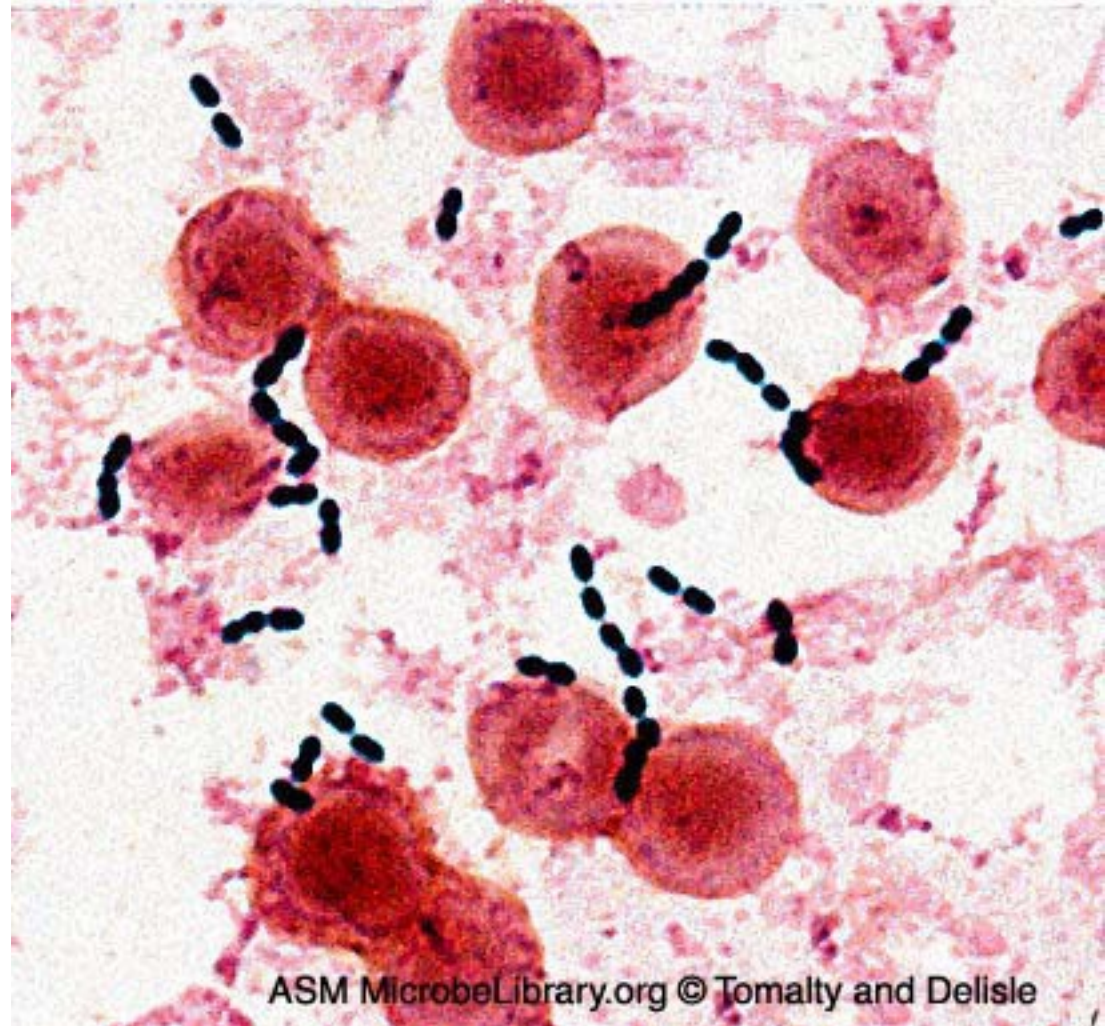
Nezapomeňte, že preparáty vzorků mohou obsahovat různá vlákna, buněčnou drť apod., a všechny preparáty navíc mohou obsahovat artefakty vzniklé při barvení. Někdy jsou velmi matoucí a mohou být nezkušeným pozorovatelem zaměněny za bakterie!



Gramem barvený preparát

<http://textbookofbacteriology.net/Enterococcus.jpeg>

Koky v řetězcích
Streptokoky rodu
Enterococcus



ASM MicrobeLibrary.org © Tomalty and Delisle

Gramovo barvení – postup

I. Příprava fixovaného preparátu

1. Na sklíčko kápněte malou kapku fyziologického roztoku
2. Vyžíhejte si kličku a nechte chvíli zchladnout
3. Kličkou opatrně seberte trošičku hmoty mikrobů (kmeny A – E)
4. Rozmíchejte v kapce
5. Kličku opět vyžíhejte a uložte zpět do stojanu
6. Kapku nechte uschnout nebo sušte KOLEM plamene kahanu
7. Sklíčko se zaschlou kapkou fixujte protažením plamenem
8. Sklíčko přeneste do dřezu k barvení

II. vlastní Gramovo barvení

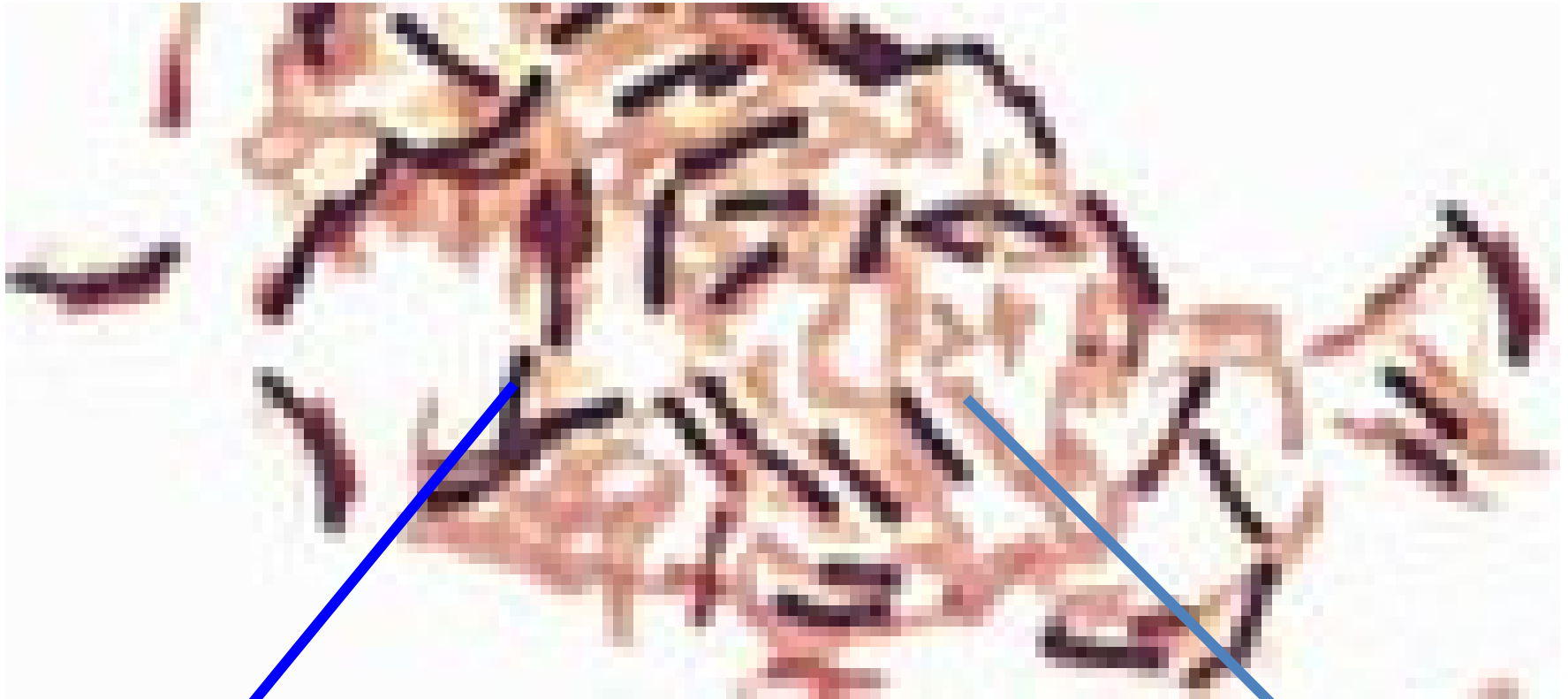
- **Genciánová violeť (20 –) 30 vteřin**
- opláchnout vodou – lze vynechat
- **Lugol (20 –) 30 vteřin**
- opláchnout vodou – lze vynechat
- **Alkohol 15 (– 20) vteřin**
- opláchnout vodou – nezbytné!!!
- **Safranin 60 – 120 vteřin**
- opláchnout vodou
- osušit sušítkem* z filtračního papíru
- mikroskopovat jako v prvním úkolu

**Inovativní termín
„sušítko“ vynalezla
Iveta Hanušová,
laborantka našeho
ústavu 😊*



Vzhled směsi grampozitivních a gramnegativních bakterií

www.arches.uga.edu



G+

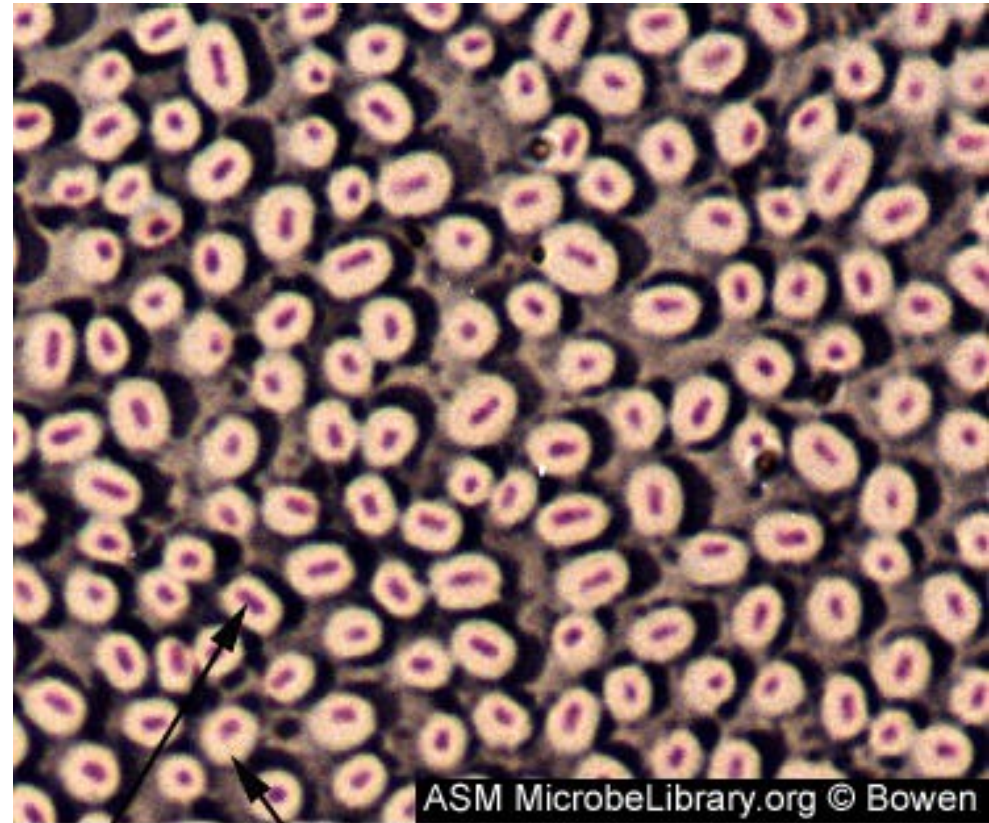
G-

Další barvicí metody

Barvení pouzder dle Burriho

pathmicro.med.sc.edu

V barvení dle Burriho byly nabarveny bakterie na červenou a pozadí dobarveno tuší; mikroskopista pak tuší pouzdro tam, kde se nic neobarvilo.



Cell

Capsule

Giemsovo barvení

- **Giemsovo barvení** je barvení, u kterého se používá metylalkoholová fixace (nikoli fixace plamenem) a poté barvení modrým barvivem dle Giemsy-Romanowského. Používá se k barvení vaginálních sekretů a nátěrů na malárii

Poševní nátěr

Giemsovo barvení



Barvení dle Ziehl-Neelsena

- Barvení dle Ziehl-Neelsena se používá u tzv. acidoresistentních bakterií, které mají hydrofobní buněčnou stěnu. Mezi takové bakterie patří zejména mykobakteria, částečně také nokardie a aktinomycety

Mykobakteria

Barvení Ziehl-Neelsen





Barvení Gomoriho trichromem

- **Barvení Gomoriho trichromem** se používá pro střevní prvoky (*Giardia intestinalis*, *Entamoeba histolytica* atd.)
- Je velmi složité s mnoha kroky
- Používá se k rozlišení mezi patogenními a nepatogenními druhy střevních měňavek
- Jako alternativu lze použít také barvení **Heidenheimovým hematoxylinem**

Praktické
poznámky
k mikroskopii

Praktické poznámky k mikroskopii

- Objektivy se utírají **zásadně gázou**. Jednou použitá gáza se vyhodí a nepoužívá znovu.
- Mikroskopický stolek lze otřít **buničitou vatou**. I ta se po použití vyhodí.

Po skončení mikroskopování se vždy učiní následující kroky:

- Pokud pracujete imerzí, **očistěte imerzní objektiv gázou s benzínem**
- Případně takto očistěte **i další objektivy**, pokud jste je znečistili
- Mikroskopický stolek **otřete buničínovým čtverečkem**, případně také s benzínem
- Mikroskop **vypněte a zakryjte**



Zpět na hlavní obsah prezentace

KULTIVACE

Přehled částí této prezentace

Množení bakterií, růstová křivka

Podmínky nezbytné ke kultivaci bakterií a hub

Kultivace bakterií – úvod

Tekuté půdy v klinické mikrobiologii

Pevné půdy: očkování vzorku a kmene

Pevné půdy: třídění a příklady

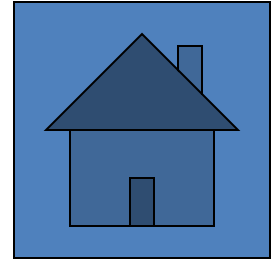
Otázky pro odpovědník

Množení
bakterií,
růstová křivka

Množení bakterií

- Každá bakterie má svou **generační dobu**
- Za jednu generační dobu jsou **z jedné dvě**, za desetinásobek je z jedné 1024 bakterií (teoreticky) a podobně
- Ideální množení by existovalo pouze kdybychom neustále přidávali živiny a popř. kyslík a odebírali odpadní produkty

Reálná růstová křivka

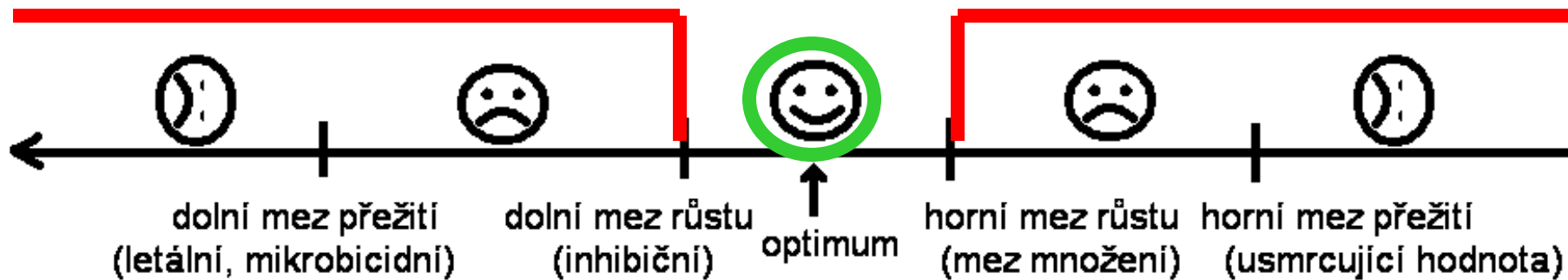


- **Fáze latence** – bakterie jsme nechali kultivovat, ale ještě jich nepřibývá
- **Fáze exponenciální** – růst se zrychluje
- **Fáze stacionární** – rostou pořád stejně rychle
- **Zpomalení a zastavení růstu** – došly živiny, je příliš mnoho odpadů, nebo bakterie samy regulují svůj počet pomocí „quorum sensingu“

Podmínky
nezbytné ke
kultivaci
bakterií a hub

Je jedno, za jakých podmínek bakterie pěstujeme?

Samozřejmě, že není! Pro většinu bakterií musíme teplotu, vlhkost, koncentrace solí a řadu dalších vlastností vtěsnat do poměrně úzkého rozmezí.



Pro pěstování nestačí hodnoty, za kterých mikroby přežívají. Musí být schopny se množit.

Požadavky různých mikrobů se vzájemně liší!

Klinicky významné bakterie

- **Teplotu** zpravidla vyžadují kolem 37 °C
 - ale ptačí patogeny více (42 °C), mikroby pocházející zvenčí méně (30 °C)
- **Hodnotu pH** vyžadují kolem pH 7
 - ale žaludeční helikobakter mnohem méně
- **Koncentraci NaCl** vyžadují kolem 0,9 % (fyziologický roztok)
 - ale stafylokoky, které musí být schopny množit se i na zpocené kůži, se množí i při 10 % soli!

V praxi je část parametrů (např. teplota) dána nastavením termostatu, a zbytek (např. koncentrace NaCl) složením kultivačního média.

Kultivační termostat

Kromě skříňových
termostatů, jako je tento,
máme na ústavu i jeden
termostat komorový, tedy
celou místnostku o 37 °C.

**Většina bakterií se
kultivuje v termostatu
přes noc, tedy cca 24 h.**



Foto O. Z.

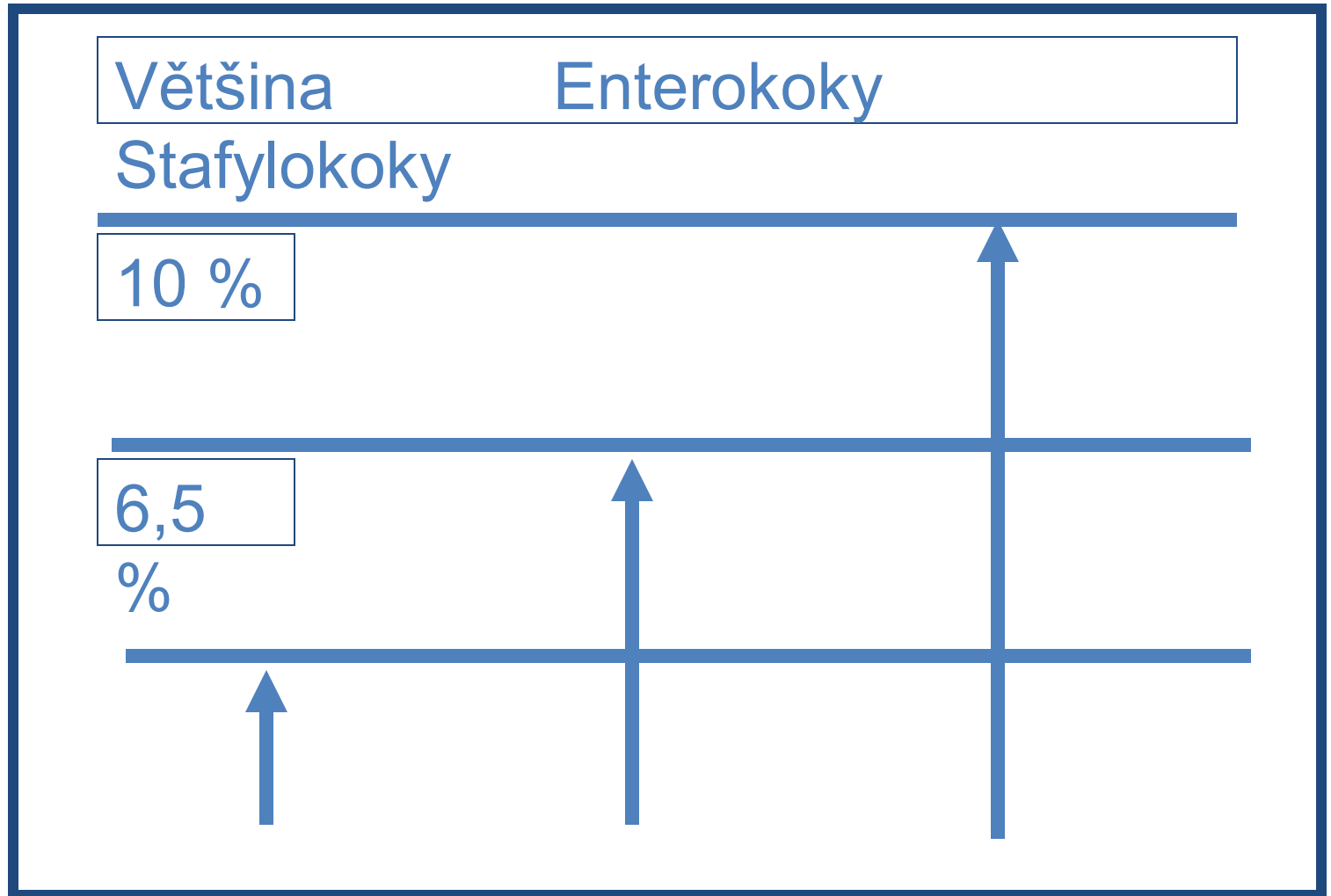
Příklad využití rozdílu v teplotě v diagnostice bakterií

- *Pseudomonas aeruginosa* roste při teplotách 37 °C a 42 °C.
- Naopak *Pseudomonas fluorescens* roste při 4 °C a 37 °C.

Kromě pseudomonád rostou při nízkých teplotách dobře také např. listerie a také kvasinky a plísně

Vyšší teploty vyhovují např. kampylobakterům

Vliv koncentrace NaCl na růst některých druhů bakterií



Kromě různých koncentrací NaCl

- **Přidání azidu sodného** umožňuje růst enterokoků, avšak ani streptokoky, ani stafylokoky nerostou.
- **Amikacin** umožňuje růst streptokoků a enterokoků, zato stafylokoky nerostou.

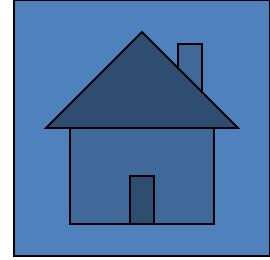
Něco málo o bakteriálním katabolismu

- Katabolismus může být trojí:
 - **Fermentace** – štěpení bez potřeby kyslíku. Málo energeticky výhodný, ale nepotřebuje kyslík. Produktem např. kyselina mléčná, etanol apod.
 - **Aerobní respirace** – z mála živin se získá hodně energie, je ale nutný kyslík. Produktem CO_2 a H_2O
 - **Anaerobní respirace** – jiný akceptor elektronů
- Typ katabolismu je **úzce spjat se vztahem ke kyslíku**. **Fermentující bakterie** jsou zpravidla fakultativně nebo **striktně anaerobní**. Naopak **aerobně respirující bakterie** bývají **striktně aerobní**.

Závislost na kyslíku

- **Striktní aeroby** rostou jen v přítomnosti kyslíku
- **Striktní anaeroby** rostou jen tam, kde kyslík není
- **Fakultativní anaeroby** a od nich nerozeznatelné aerotolerantní bakterie rostou za všech podmínek
- **Mikroaerofilní bakterie** rostou jen tam, kde jsou stopy kyslíku
- **Kapnofilní bakterie** vyžadují více CO₂

Pěstování anaerobních bakterií



www.medmicro.info




www.medmicro.info



Kultivace bakterií – úvod

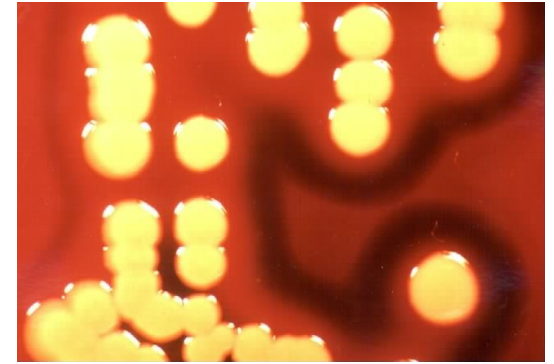
Smysl kultivace bakterií

- Proč vlastně v laboratoři bakterie pěstujeme?
 - Abychom je **udrželi při životě a pomnožili**. K tomu slouží kultivace na tekutých půdách i na „pevných“ půdách (to jsou půdy, které netečou, jejich základem je většinou agarová řasa)
 - Abychom získali **kmen** – pouze pevné půdy (objev Roberta Kocha) 
 - Abychom je vzájemně **odlišili a oddělili** – používají se diagnostické a selektivní půdy, sloužící k identifikaci

Vzorek a kmen

- **Vzorek** je to, co se odebírá pacientovi. Vzorek obsahuje buňky makroorganismu, různý počet druhů mikrobů (nula až třeba dvacet) a další příměsi
- **Kmen – izolát** – je populace jedné bakterie, izolovaná ze vzorku na pevné půdě
- Abychom získali kmen, **musíme bakterii pěstovat na pevné půdě a dobře rozočkovat**

Pojem kolonie



www.medmicro.info

- Kolonie je **útvár na povrchu pevné půdy**. Pochází z jedné buňky nebo malé skupinky buněk (dvojice, řetízku, shluku)
- V některých případech můžeme z počtu kolonií **odhadnout počet mikrobů** ve vzorku – nebo přesněji počet „kolonii tvořících jednotek“ (CFU)
- Popis kolonií má významné místo v bakteriální diagnostice

Takhle vypadají pevné půdy

www.medmicro.info



Je to dobře, nebo špatně, že různé bakterie jsou různě náročné?

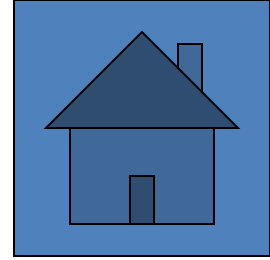
- **Je to špatně**, protože se špatně definují podmínky, které by vyhověli většině (neřkuli všem) klinicky významným bakteriím
- **Je to dobře**, protože díky tomu můžeme i kultivaci využít v diagnostice (např. schopnost růst na půdě s 10 % NaCl dobře odliší stafylokoky

Půdy obecně versus půdy v klinické mikrobiologii

- **V průmyslové mikrobiologii** či v některých jiných aplikacích se zpravidla používají chemicky přesně definované půdy. Víme, kolik je v nich čeho, a můžeme taky sledovat, kolik čeho přibylo nebo ubylo.
- **V klinické mikrobiologii** nepotřebujeme vědět přesné složení. Často i složky půd jsou nedefinované (krvinky, extrakt z kvasnic).

Tekuté půdy a pevné půdy

- Základem **tekutých půd** je masopeptonový bujon (hovězí vývar + bílkovinný hydrolyzát). Používají se především k pomnožení. Výsledek se špatně hodnotí: v podstatě jen čirý bujon / zakalený bujon (roste /neroste)
- Základem většiny **pevných půd** je tentýž bujon, ale doplněný výtažkem z agarové řasy. Bakterie na pevných půdách rostou pomaleji, ale zato velmi rozmanitě, a lze je rozočkovat.



Různé vzorky – různá kultivace

- Jak ovlivňuje typ vzorku typ kultivace?
 - Vzorky, kde **je obvykle málo mikrobů** se dávají jen do tekutých půd, kde se mikroby rychle pomnoží. **Příklad: výtěr ze spojivového vaku**
 - Vzorky, kde **může být hodně i málo mikrobů a i málo mikrobů je významných** očkujeme na pevné i tekuté půdy. **Příklad: stěry z ran**
 - Vzorky, kde **je většinou hodně mikrobů, popř. i fyziologická běžná flóra** se očkují pouze na pevné půdy. **Příklad: výtěry z krku**

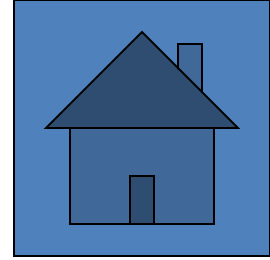
Tekuté půdy
v klinické
mikrobiologii

Tekuté půdy

www.medmicro.info



Rozdělení tekutých půd



- Tekuté půdy mnoho kategorií nemají. Vlastně jen dvě:
- **Půdy pomnožovací** jsou nejběžnější a univerzální. Příkladem je **bujón** pro aerobní kultivaci a **VL-bujón** pro anaerobní kultivaci (VL = viande-levure, z francouzštiny – obsahuje masokvasničný extrakt)
- **Půdy selektivně pomnožovací** mají za úkol pomnožit určitou bakterii a potlačit množení jiných. Příkladem je **selenitový bujón** pro salmonely

Pevné půdy:
očkování
vzorku a
kmene

Pevné půdy

www.medmicro.info



Pevné (agarové) půdy

- Abychom využili všech výhod, které pevné půdy nabízejí, musíme vzorek (kultivace vzorek → kmen), ale i kmen (kultivace kmen → kmen) dobře rozočkovat. Klasickým způsobem rozočkování je tzv. **křížový roztěr**. V praxi se zpravidla natře např. na polovinu misky tamponem a pak se rozočkovává kličkou. Někdy se ještě doplňují různé čáry a disky – o nich jindy.

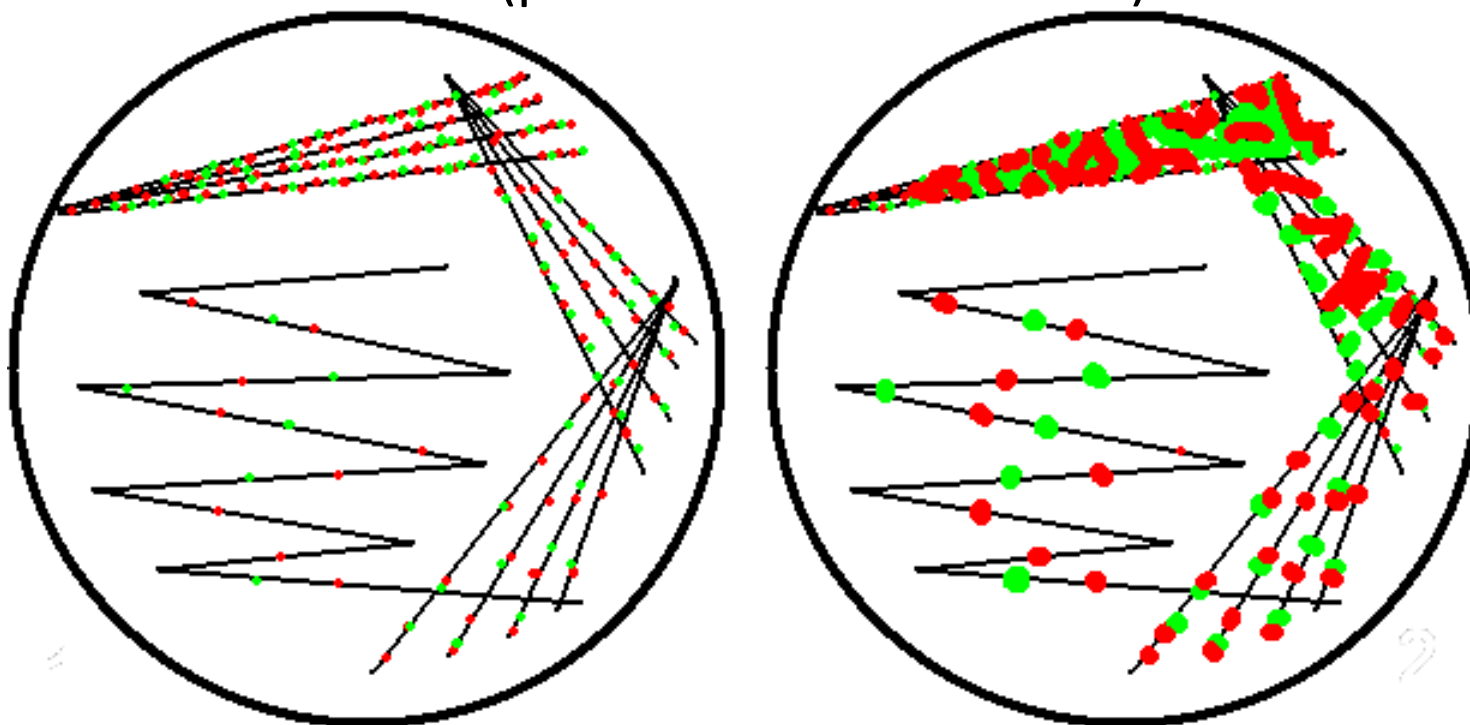
Proč je potřeba mít izolované kolonie

- Protože jen v tom případě **lze identifikovat větší počet patogenů**, které jsou ve směsi
- Ale také proto, že **pouze jednotlivé kolonie umožňují pozorovat typické vlastnosti** kolonie.

Sebelepší klaun vám nepředvede nic ze svého umění, držíte-li ho v kamrlíku nahečmaného na spoustu dalších klaunů.

V případě směsi vytvoří každá bakterie svoje kolonie

(při dobrém rozočkování)



1 – očkování směsi bakterií (naznačeny tečkami), 2 –
výsledek kultivace: v prvních úsecích směs, až na konci
izolované kolonie

Jak naočkovat vzorek na agarovou půdu

Naneste tamponem vzorek na část
misky (asi tak do jedné třetiny
průměru misky)

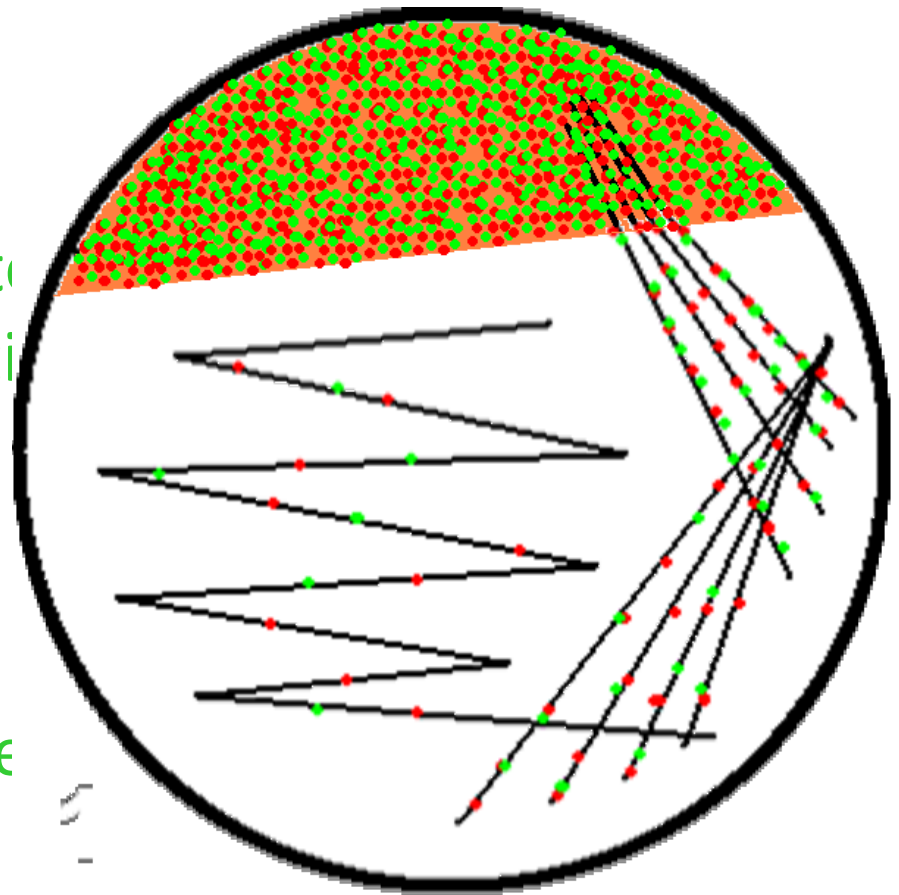
Vyžíhejte kličku

Rozočkujte z plochy, kam jste
nanesli vzorek, do další části

Vyžíhejte kličku

Rozočkujte z čar, kde jste
rozočkovali minule (už se
nedotýkejte plochy, kam jste
očkovali tamponem)

Vyžíhejte kličku



Jak přeočkovat agarovou kulturu

Vyžíhejte kličku

Naberte kmen

Naočkujte první úsek

Vyžíhejte kličku

Už znovu nenabírejte kmen

Naočkujte druhý úsek

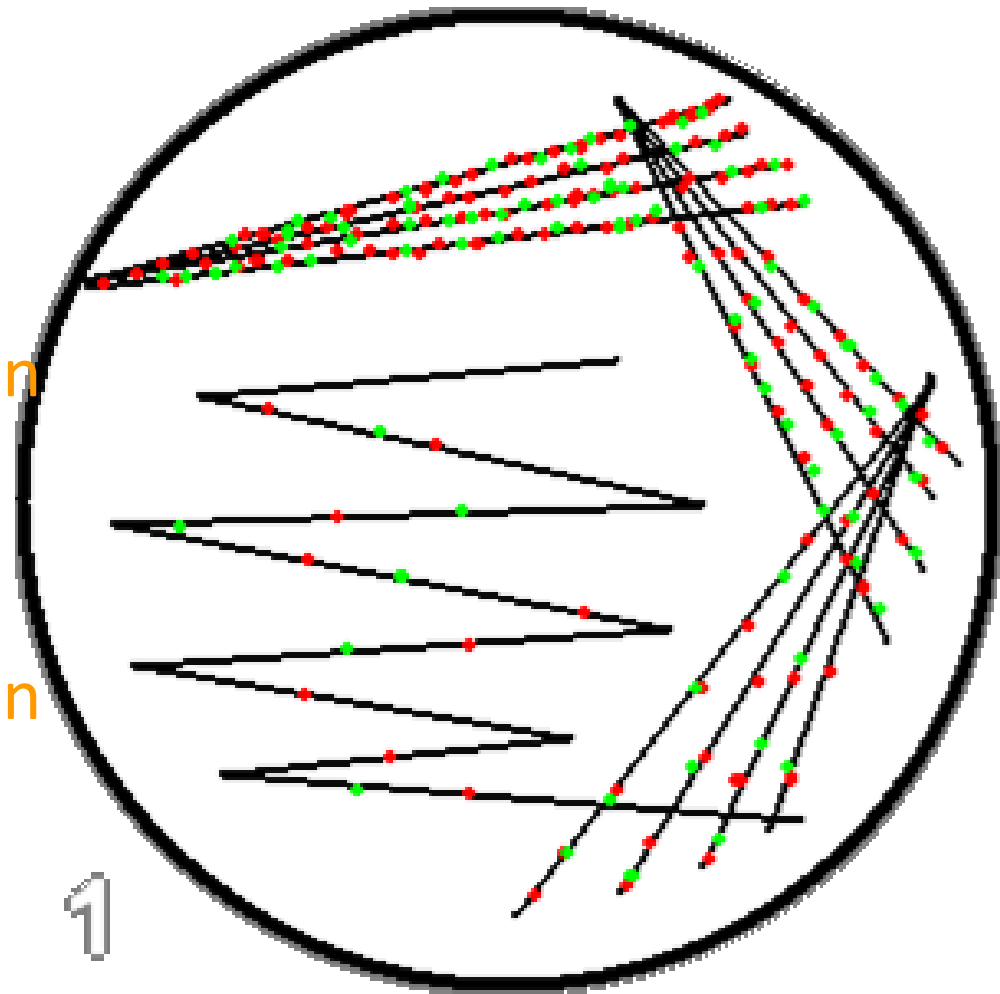
Vyžíhejte kličku

Už znovu nenabírejte kmen

Naočkujte třetí úsek

Vyžíhejte kličku

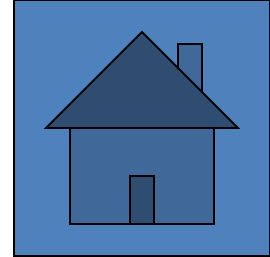
Už znovu nenabírejte kmen



Co lze popisovat u kolonií

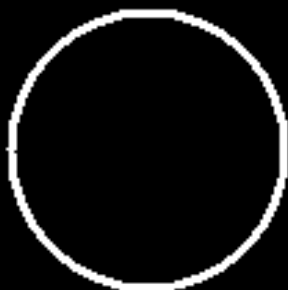
- Velikost
- Barva
- Tvar (okrouhlý...)
- Profil (vypouklý...)
- Okraje (výběžky..)
- Povrch (hladký, drsný)
- Konzistence (suchá...)
- Průhlednost
- Vůně/zápach
- Okolí kolonie*

**Přesný význam tohoto pojmu záleží na druhu půdy. Například u půd s krvinkami se hodnotí narušení krvinek v okolí kolonie*



Rozdíl mezi tvarem a profilem

Tvar



okrouhlý



nepravidelný

Profil



konvexní



plochý



miskovitý

Pevné půdy: třídění a příklady

Pevné selektivní půdy

- Účelem je **selektovat (vydělít) ze směsi bakterií** pouze určitou skupinu nebo skupiny
- Příkladem je **agar pro stafylokoky s 10 % NaCl**
- Někdy je selektivnosti dosaženo přidáním antibiotika. **Krevní agar s amikacinem** je selektivní pro streptokoky a enterokoky

Půdy diagnostické

- Nepotlačují růst žádného mikroba
- Zato díky svému složení **rozlišují mikroby podle určité vlastnosti**
- Příkladem je **krevní agar** ke sledování hemolytických vlastností a **VL krevní agar** (podobný, ale na anaeroby)
- Zvláštním případem půdy chromogenní a fluorogenní



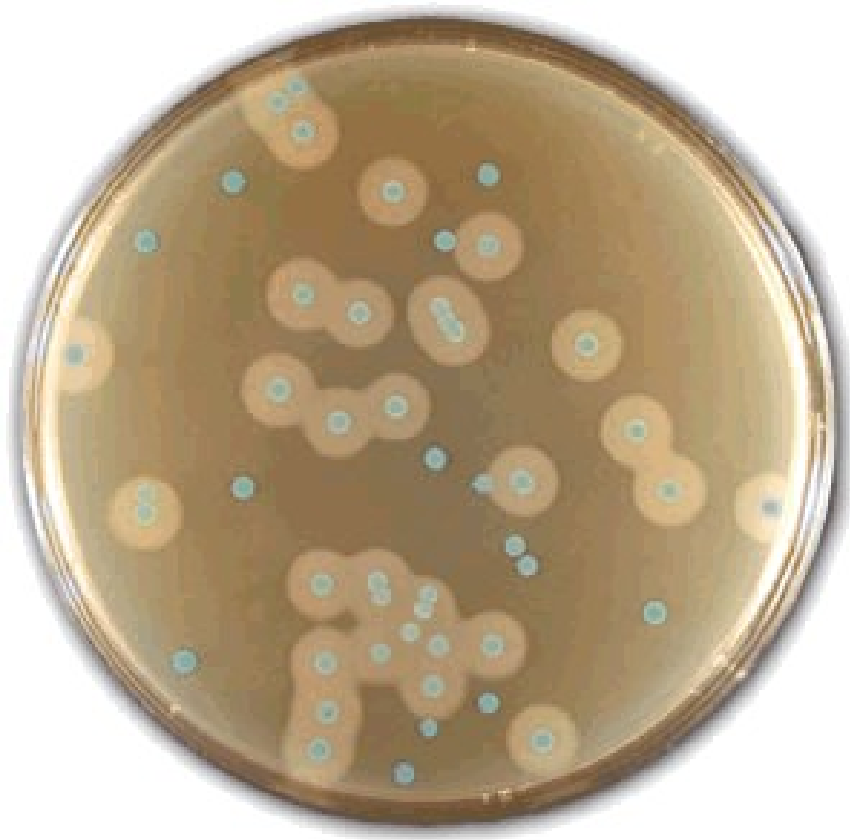
Změny na krevním agaru

- Všechny půdy s krvinkami (krevní agar, VL krevní agar, agar s pranými erytrocyty apod. – netýká se ale krevního agaru s 10 % NaCl, kde jsou krvinky lyzovány) jsou schopny rozlišit:

- **Úplnou hemolýzu**
- **Částečnou hemolýzu**
- **Nepřítomnost hemolýzy**
- **Viridaci** (zezelenání)



Půdy chromogenní a fluorogenní



- **Chromogenní** půdy obsahují barvivo, na které je navázaný specifický substrát → barevnost se ztrácí, není to už barvivo, ale **chromogen**
- Bakterie schopná štěpit specifický substrát **změní chromogen zpět na původní barvivo**
- **Půda může obsahovat i více chromogenů (pro více druhů)**
- **Fluorogenní** půdy podobné, s fluorescenčním barvivem

Ukázka chromogenní půdy na kvasinky



Čtyři různé kvasinky rostou v typických koloniích – jedna v zelených, jedna v modrých, jedna v suchých růžových a jedna v hladkých růžových. Ostatní druhy kvasinek jsou na této půdě bílé.



Půdy selektivně diagnostické

www.medmicro.info

- **Kombinují v sobě selektivní a diagnostické vlastnosti**
- Příkladem **půda Endova**:
 - Rostou pouze některé G-bakterie (selektivita)
 - Ty, co rostou, lze rozlišit na laktóza pozitivní (červené) a negativní (bledé)



- Podobná je **půda McConkeyho**, ve světě běžnější
- Selektivně diagnostické jsou i půdy **XLD**, **CIN** aj.

Vlastnosti Endovy půdy

www.medmicro.info

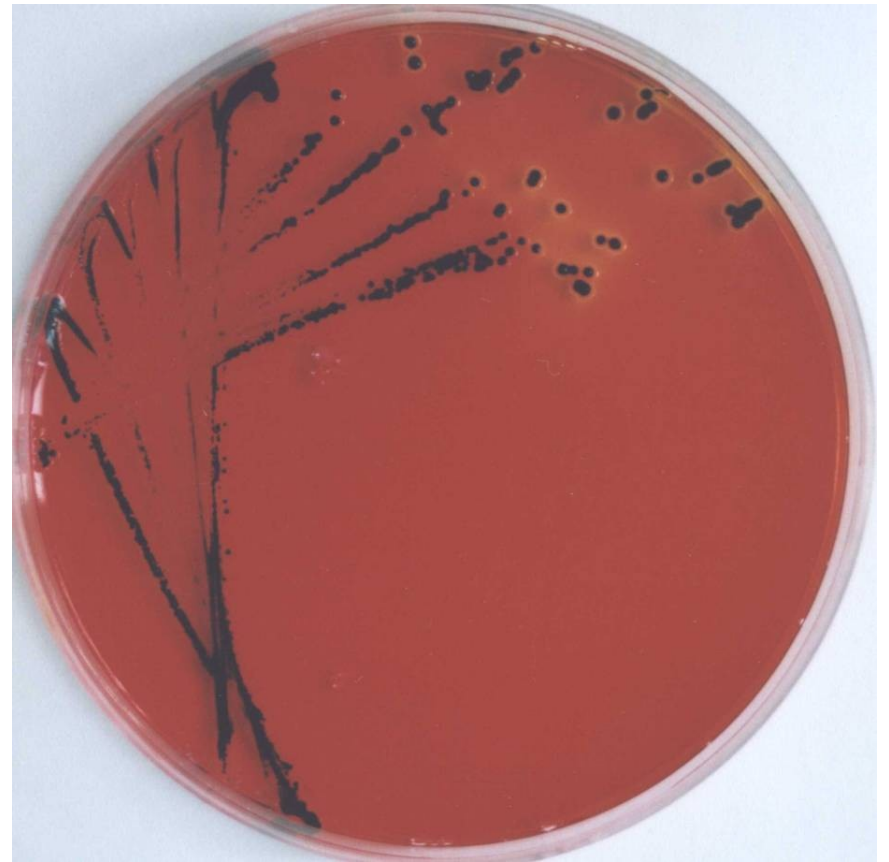
- Zopakujme si z úvodu:
- Na Endově půdě rostou **pouze G- bakterie**, a to ještě jenom některé (selektivita)
- Ty, co rostou, lze rozlišit na **laktóza pozitivní** (červené) a **negativní** (bledé).



Z hlediska klinické mikrobiologie to má význam: laktóza pozitivní bakterie jsou zpravidla mírnějšími patogeny než bakterie laktóza negativní

- Podobná je **půda McConkeyho**, ve světě běžnější
- Selektivně diagnostické jsou i půdy **XLD**, **CIN** aj.

Půdy XLD a MAL na salmonely



Zátiší z naší
komorové
lednice



Půdy selektivní, diagnostické a selektivně diagnostické – shrnutí

Půda selektivní	Kmen A neroste	Kmen B roste	
Půda diagnostická	Kmen C roste, má kolonie makové	Kmen D roste, má kolonie takové	
Půda selektivně diagnostická	Kmen E neroste	Kmen F roste, má kolonie makové	Kmen G roste, má kolonie takové

Půdy obohacené a selektivně obohacené

- Jsou určeny pro náročné mikroby
- Obsahují různé nutriční faktory
- **Obohacenou půdou je i krevní agar**, který jsme ale uvedli mezi půdami diagnostickými (svými vlastnostmi patří do obou kategorií)
- Příkladem „čistých obohacených půd“ jsou **čokoládový agar** pro patogenní neisserie a hemofily a **Levinthalův agar** jen pro hemofily (které ani na krevním agaru nerostou)
- Půdy též mohou být **selektivně obohacené** (např. **GC agar**, což je čokoládový agar s antibiotiky pro kultivaci *Neisseria gonorrhoeae*)

Čokoládový agar



Půdy ke speciálním účelům – 1

Sledování faktorů virulence:

- na obrázku **půda s kongočervení** pro stafylokokový sliz (biofilm)

- dále např. **žlutkový agar** pro histotoxická klostridia

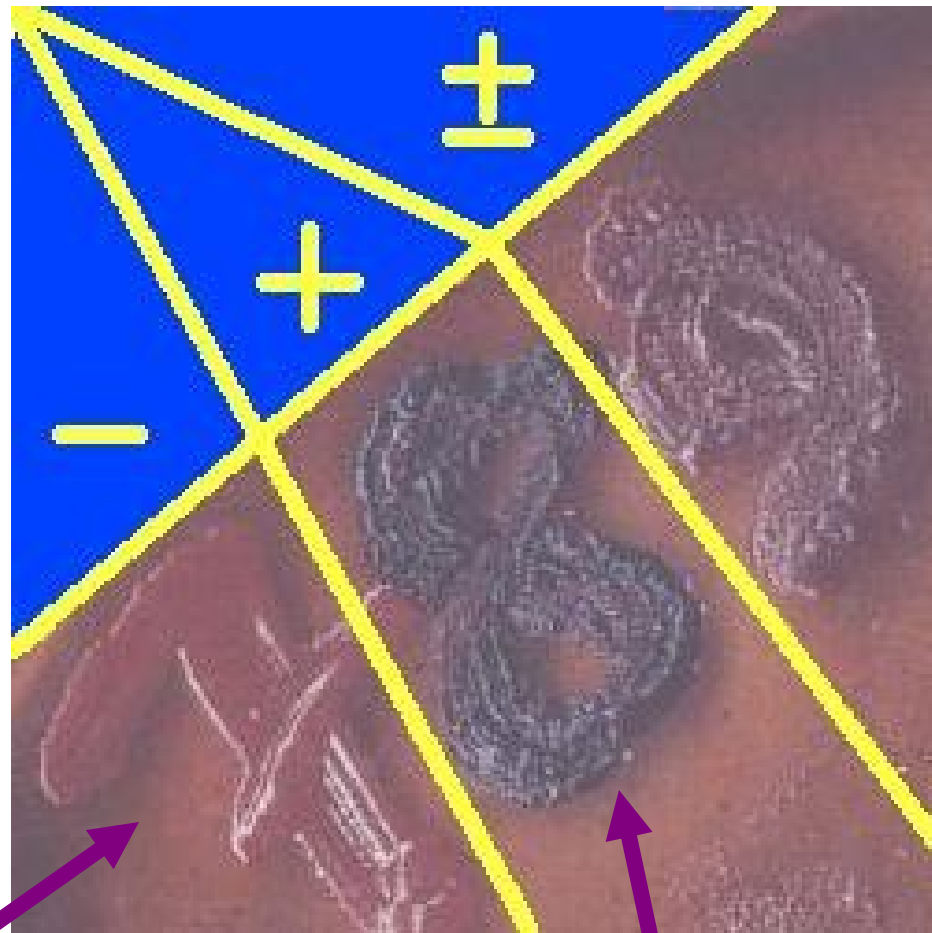


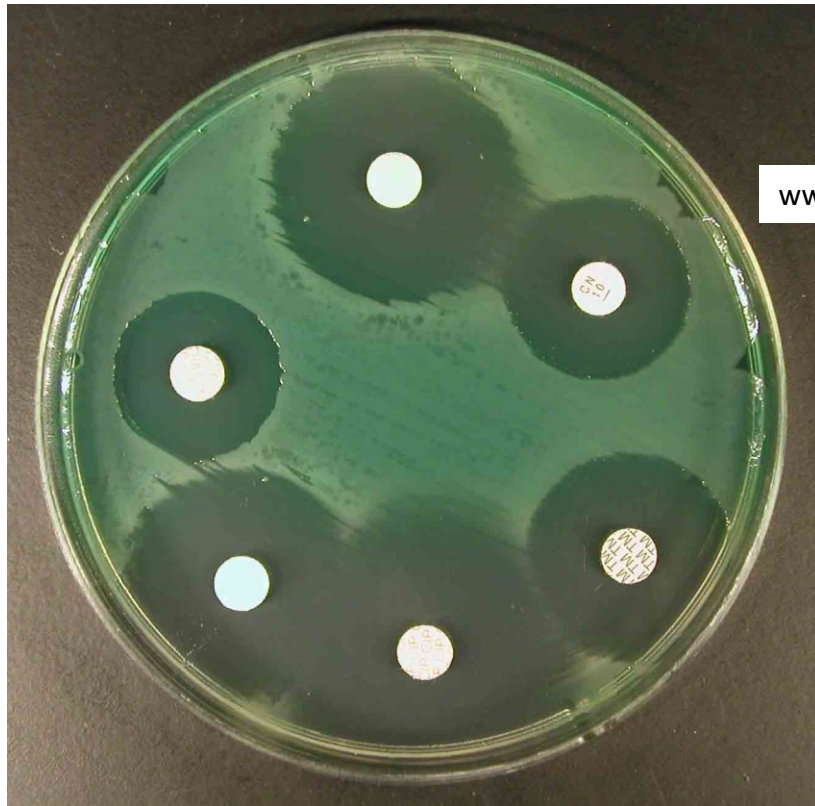
Foto: O. Z.

Červené, vlhké kolonie znamenají negativní

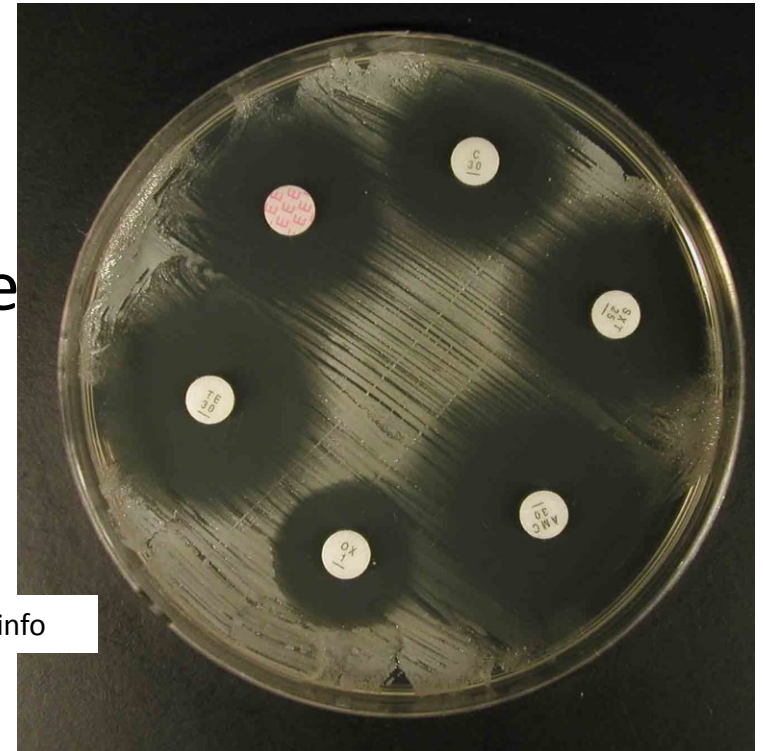
Suché, černé kolonie svědčí o produkci slizu daným kmenem

Půdy ke speciálním účelům – 2

In vitro **testování citlivosti** na antimikrobiální látky: **Müllerův-Hintonové agar**; slouží zároveň ke sledování pigmentů bakterií



www.medmicro.info



*Vpravo nahoře
nepigmentovaný
stafylokok, vlevo dole
zeleně pigmentovaná
Pseudomonáda*

Poznámka



V případě kultivačně náročných bakterií se i testování citlivosti provádí na obohacených půdách.

Současné trendy v kultivaci




- Navzdory rozvoji genetických metod si **kultivace zachovává svou klíčovou úlohu** při diagnostice zejména bakterií
- Standardizace nutí přecházet **od půd vyráběných „na koleně“ k půdám komerčně vyráběným**
- **Chromogenní a fluorogenní půdy** se i přes vyšší cenu zvolna prosazují

Příklady nejdůležitějších pūd

1. bujon
2. VL-bujon
3. selenitový bujon
4. Sabouraud
5. Löwenstein-Jenssen
6. Krevní agar (KA)
7. Endo
8. MH
9. KA + 10 % NaCl
10. VLA (VL KA)
11. XLD (a MAL)
12. ČA
13. Levinthal
14. Slanetz-Bartley

Přehled půd – první část

*pouze jsou-li přidána antibiotika

Název	Druh	Barva	Typ	Pro
bujon	tekuté půdy	nažloutlá	pomno- žovací	aeroby
VL-bujon		tmavší		anaeroby
selenitový bujon		narůžovělá	selektivně pomnož.	salmonely
Sabourau- dův agar	pevné půdy ve zkumavce	bílá	selektivní*	houby
Löwentein- Jensen		zelená	obohacená	TBC
krevní agar	 pevné půdy	červená	obohacená diagnostická	většinu bakterií
Endova půda	 v misce	růžová	selektivně diagnostická	především enterobakterie

Přehled půd – druhá část

Název	Druh	Barva	Typ	Pro
MH	pevné půdy na Petriho miskách	skoro bílá	speciální	atb citlivost
NaCl		hnědá	selektivní	stafylokoky
VL-agar		červená	jako KA	anaeroby
XLD a blízký MAL		oranžová	selektivně diagnostická	salmonely
čokoládový agar		hnědá	obohacená	hemofily, neisserie
Levinthalův agar		nažloutlá	obohacená	hemofily
Slanetz- Bartley		růžová	selektivně diagnostická	enterokoky

Pevné půdy ve zkumavce? Proč?

Mezi uvedenými půdami jsou dvě nalité do zkumavek, ačkoli jsou pevné. Důvodem je, že se používají pro pomalu rostoucí organismy. Jak mykobakteria (**Löwenstein-Jensen**) tak některé plísně (**Sabouraud**) rostou pomalu, takže na Petriho misce by půda vyschla dřív, než by stačily vyrůst.

V případě **Hajnovy** půdy (viz J04) je důvod jiný: půda se používá pro biochemickou identifikaci a pro její funkci je podstatný rozdíl mezi spodní částí (bez kontaktu s kyslíkem) a horní částí (povrch půdy)

Löwenstein Jensenova půda je zajímavá také tím, že ač pevná, neobsahuje agar. Místo toho obsahuje koagulovaná vajíčka.

Krevní agary

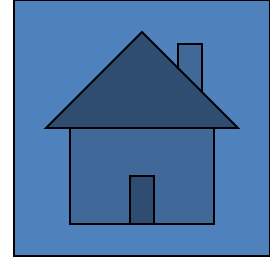
- Lze použít krevní agar s krvinkami různých organismů (koní, kuřat, krav či dokonce lidí). Nicméně zdaleka nejběžnější jsou agary s **ovčími (beraními) erytrocyty**
- Krev je také možno přidávat k různým základům. Například přidáme-li krev k VL bujónu (zjednodušeně), dostaneme VL agar (vlastně VL krevní agar)
- Pro testování hemolytických interakcí (např. CAMP testu, viz P02) se doporučuje používat prané erytrocyty.

Endova půda a její princip

- Endova půda obsahuje jako substrát **laktózu**
- Také obsahuje **basický fuchsin**
- Fuchsin je zodpovědný za **selektivitu půdy**
- Tentýž fuchsin (dohromady s **Na₂SO₃**) také slouží jako **indikátor (Schiffovo činidlo)**. Bakterie tvořící laktaldehyd z laktózy se prozradí tmavočervenou barvou.

Endovu půdu je nutno chránit před světlem, jinak ztmavne i bez bakterií

Otázky pro odpovědník



- Snažte se najít odpovědi na následující otázky
- Poté vyplňte příslušný odpovědník
- Počítejte s tím, že otázky v odpovědníku mohou být formulovány mírně odlišně než zde
 1. Proč se VL bujon přelévá parafinovým olejem?
 2. Kdy se při přípravě krevního agaru přidávají krvinky?
 3. Proč se při výrobě pevných půd zpravidla nepoužívá želatina?
 4. Je mikroaerofilie a kapnofilie totéž?
 5. Stafylokoky jsou adaptované na život na kůži savců. Jak tuto jejich vlastnost využíváme při diagnostice?
 6. Kterou charakteristiku kolonie nelze posoudit zrakem?
 7. Ke které charakteristice kolonie navíc potřebujeme do kolonie „dloubnout“?
 8. Proč je bezpodmínečně nutné při kultivaci získat jednotlivé kolonie?
 9. Krevní agar se vyrábí z tzv. „základu pro krevní agar“ (v podstatě se jedná o živný agar) a defibrinované ovčí krve. Lze však přidávat krev i k jiným základům?

Zpět na hlavní obsah prezentace

TESTOVÁNÍ

CITLIVOSTI

(ANTIBIOTIKA A SPOL.)

Obsah této prezentace

Přehled antimikrobiálních látek (stručný)

MIC, MBC, baktericidní a bakteriostatická antibiotika

Mechanismy účinku atb a mechanismy rezistence

Epidemiologicky významné typy rezistence

Metody testování I: Difusní diskový test

Metody testování II: E-test

Metody testování III: Mikrodiluční test

Metody detekce faktorů rezistence + fágová terapie

Bonus: Podrobnější přehled antimikrobiálních látek

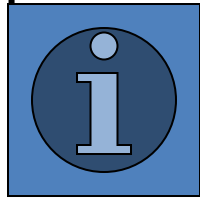
Přehled antimikrobiálních látek

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
- ***A také některé další metody, například použití bakteriofágů (= „biologický boj“)***

Druhy antimikrobiálních látek

První antibiotikum objevil sir Alexander Fleming

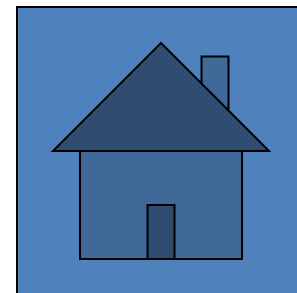


- **Látky působící celkově:**

- **Antiparazitární látky** proti parazitům
- **Antimykotika** proti kvasinkám a vláknitým houbám
- **Antivirotika** proti virům
- **Antituberkulotika** proti mykobakteriím
- **Antibiotika** proti všem ostatním bakteriím (*dnes tedy obvykle zahrnuje i syntetické látky, kdysi vydělované zvláště jako **antibakteriální chemoterapeutika***)

Látky působící lokálně: antiseptika

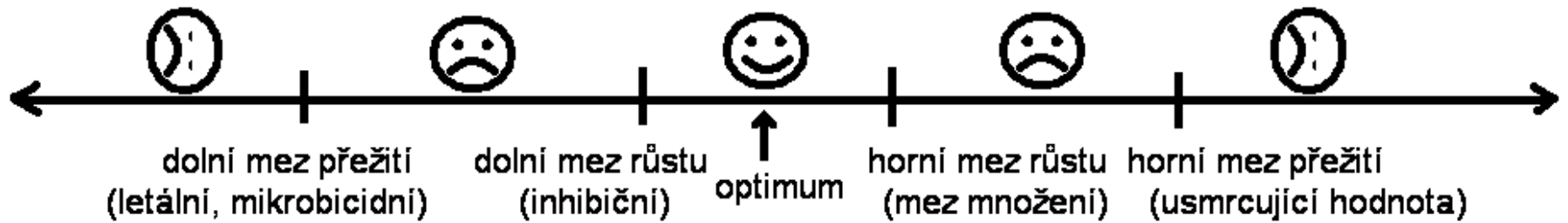
Ještě dekontaminace, nebo už antimikrobiální látka?



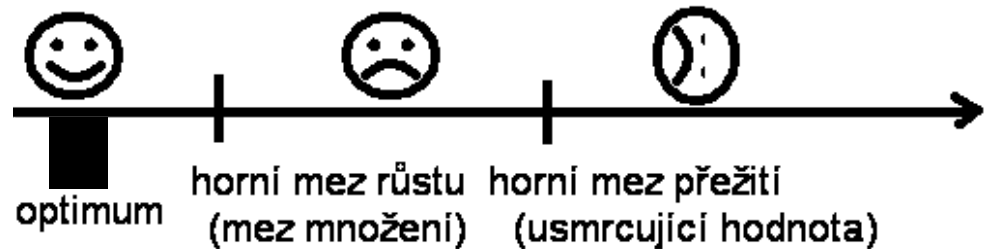
- **Hranice** mezi dekontaminačními metodami a antimikrobiálními látkami je **neostrá**.
- Zpravidla se za dekontaminaci ještě považuje **působení na neporušenou kůži**.
- **Aplikace do rány** už znamená užití antimikrobiální látky (antiseptika)
- Důsledky i **legislativní**: dekontaminační prostředky se na rozdíl od antibiotik nepovažují za léčiva

**MIC, MBC,
baktericidní a
bakteriostatická
antibiotika**

Působení určitých vlivů na mikroby I



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



- Při působení antimikrobiálních látek (ale také například desinfekčních prostředků) 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

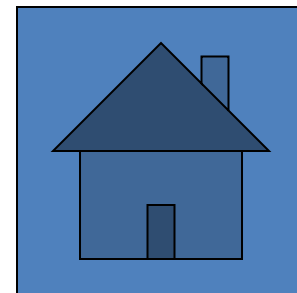
Primárně baktericidní a primárně bakteriostatická atb

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)

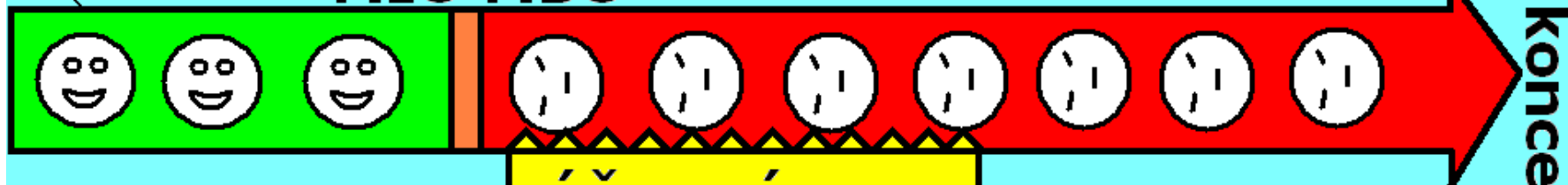
V praxi se snažíme vyvarovat použití bakteriostatických antibiotik u závažných akutních stavů, imunosuprimovaných pacientů apod. *Neplatí ovšem striktně – antibiotika s dobrým průnikem do kostí použijeme u akutní osteomyelitidy navzdory tomu, že jsou bakteriostatická.*

Primárně baktericidní a primárně bakteriostatická atb



Primárně baktericidní atb

MIC MBC

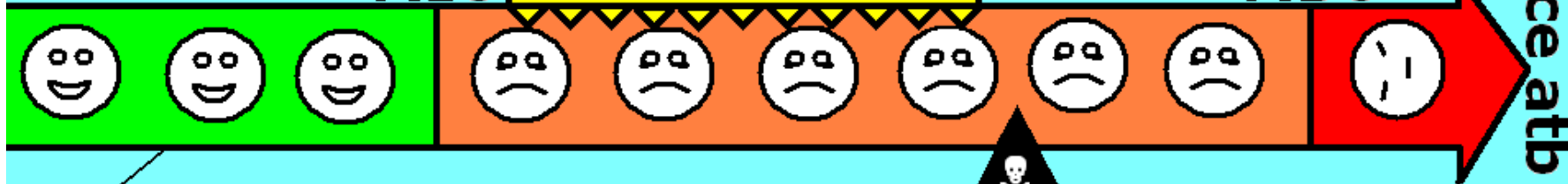


konzentrace atb

LÉČEBNÉ KONCENTRACE

MIC

MBC



toxická pro makroorgs.

Primárně bakteriostatické atb

Mechanismy
účinku a
mechanismy
resistence

Mechanismy působení antibiotik

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

Primárně bakteriostatická antibiotika nejsou vhodná k léčbě akutních stavů, pacientů s poruchou imunity a podobně!

Rezistence mikrobů na antimikrobiální látky

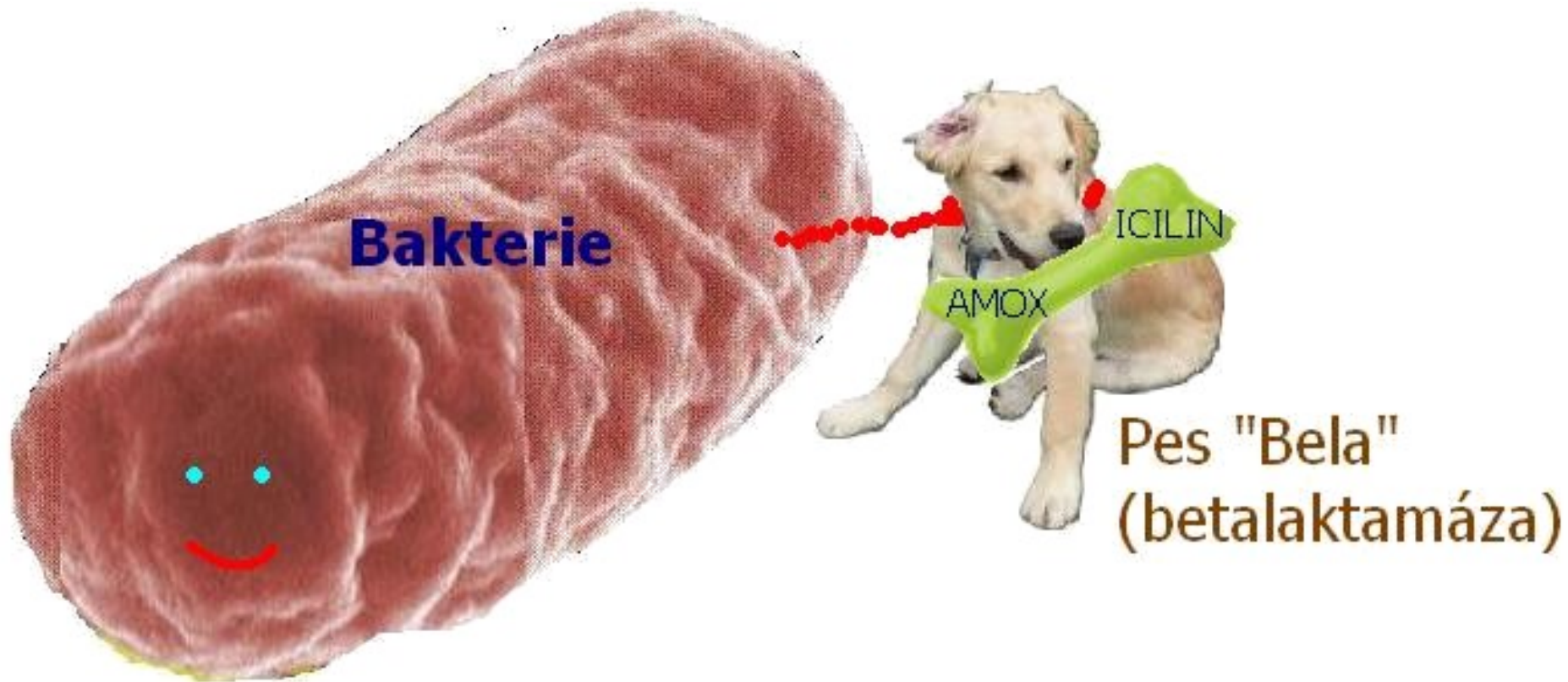
- **Primární rezistence:** všechny kmeny daného druhu jsou rezistentní. **Příklad:** betalaktamová atb nepůsobí na mykoplasmata, která vůbec nemají stěnu.
- **Sekundární rezistence:** vznikají necitlivé mutanty, a ty při selekčním tlaku antibiotika začnou převažovat. (Escherichie mohou být citlivé na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

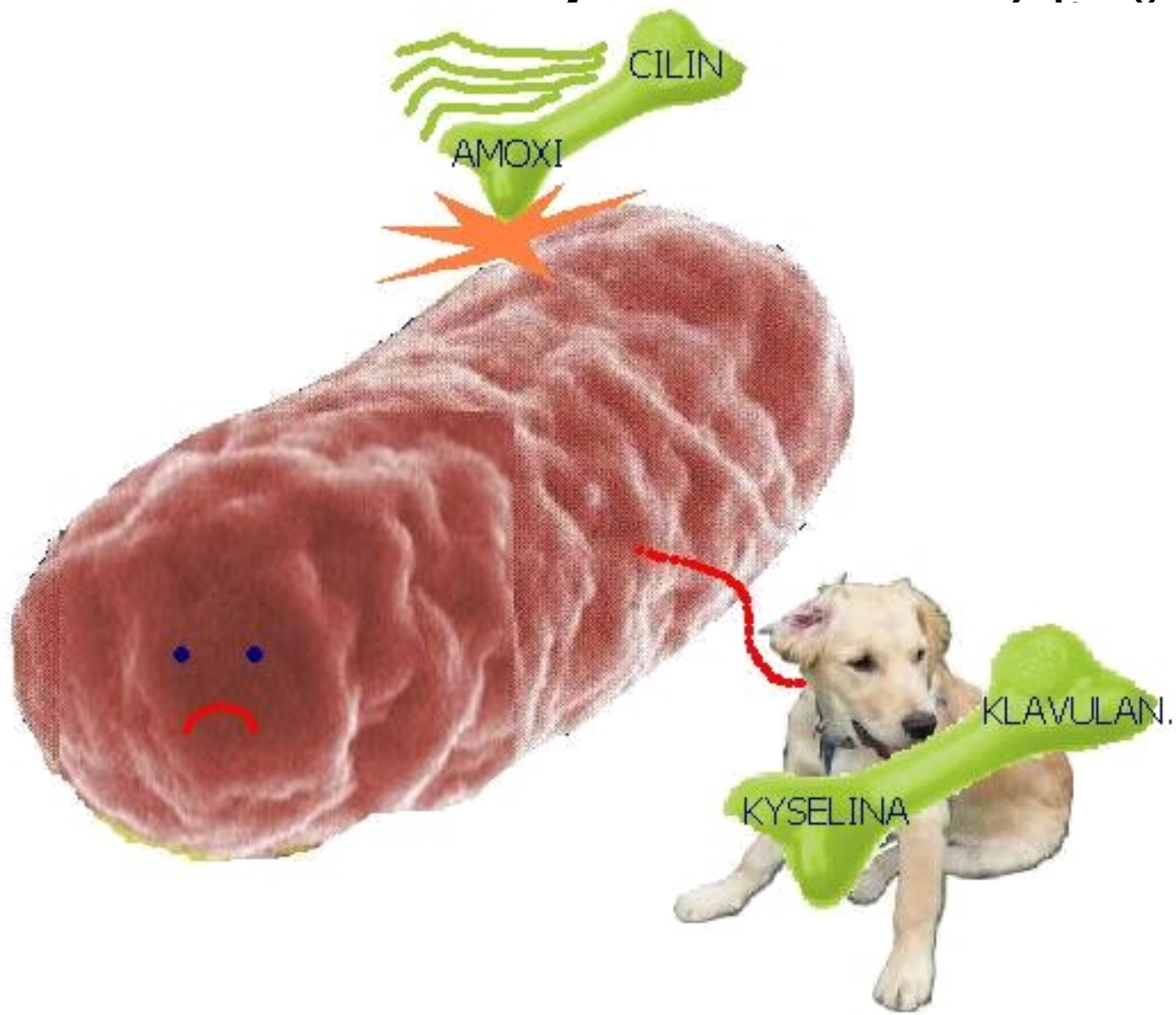
Znalost příslušného mechanismu nám umožňuje pokusit se na mikroba vyzrát

Inhibitory betalaktamáz – 1



- In kombinaci s samostatným antibiotikem, je inaktivováno bakteriální betalaktamáza.

Inhibitory betalaktamáz – 2 laktamáza

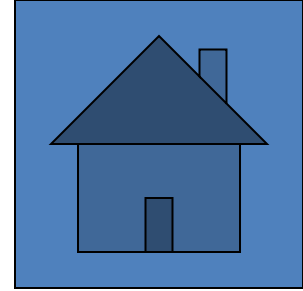


ší
/olí si ho,
cum pak
šeně

Příklady antibiotik potencovaných inhibitory betalaktamáz



Inhibitory betalaktamáz vždycky nestačí



- Bohužel, **inhibitory betalaktamáz** zabírají jen u méně účinných typů betalaktamáz
- Existují velmi silné, **širokospektré betalaktamázy** (viz také dále), u kterých inhibitory nestačí (ani při jejich použití není léčba spolehlivě účinná)
- Určitý **efekt ale lze pozorovat i u těchto betalaktamáz**. To se využívá v diagnostice, kdy se pozoruje rozdíl v účinku určitého antibiotika s inhibitorem a bez něj

Epidemio-
logicky
významné typy
rezistence

Epidemiologicky významné rezistence – 1


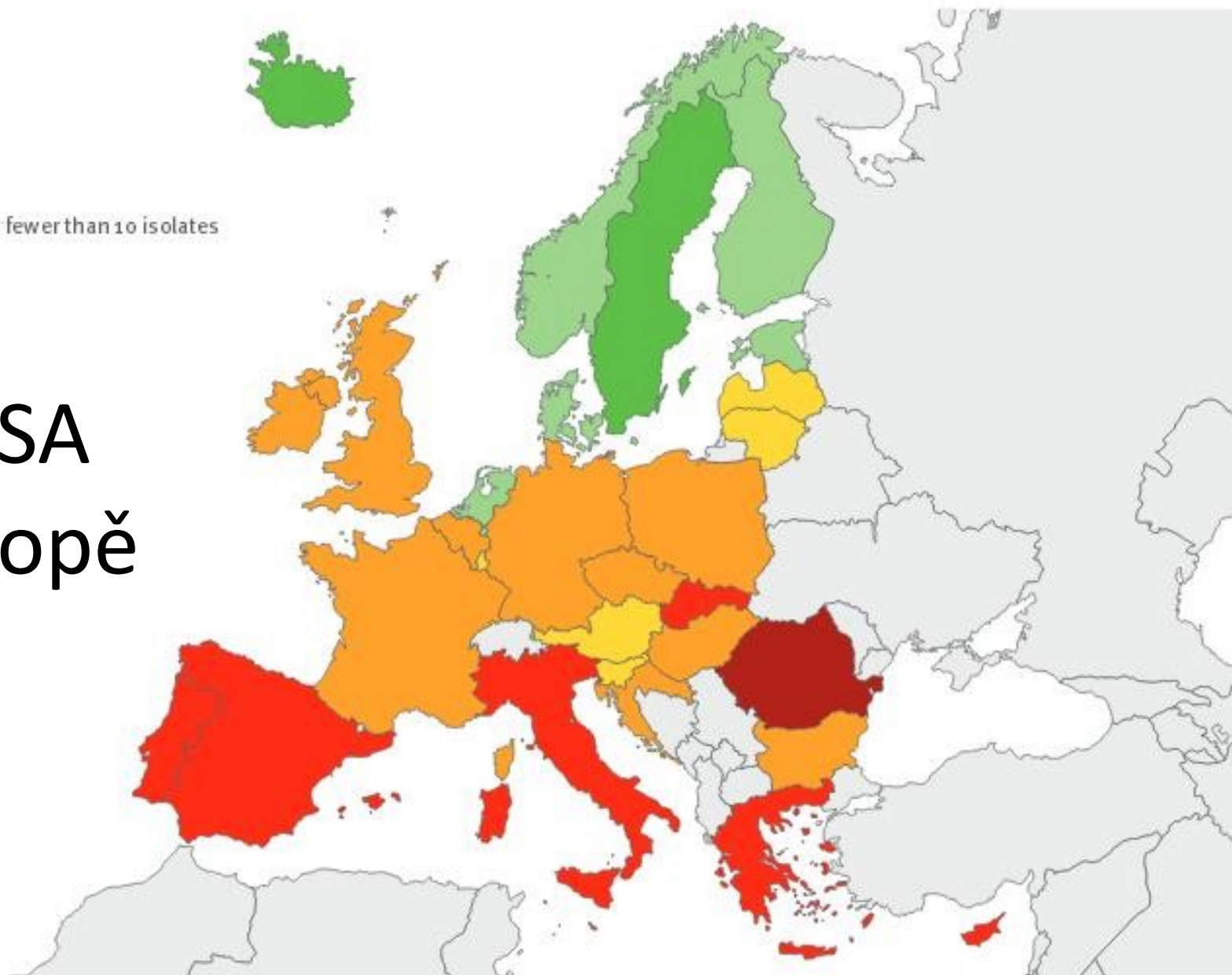
- **MRSA** – methicilin rezistentní stafylokoky.  Nevpouštějí do svých buněk oxacilin ani jiné betalaktamy. Mnohé MRSA jsou rezistentní také na další atb (makrolidy, linkosamidy). Citlivé zůstávají glykopeptidy (vankomycin, teikoplanin).
- **VISA, VRSA** – stafylokoky částečně nebo úplně rezistentní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

Figure 3.22. *Staphylococcus aureus*. Percentage (%) of invasive isolates with resistance to meticillin (MRSA), by country, EU/EEA countries, 2015

- < 1%
- 1% to < 5%
- 5% to < 10%
- 10% to < 25%
- 25% to < 50%
- ≥ 50%
- No data reported or fewer than 10 isolates
- Not included

MRSA v Evropě

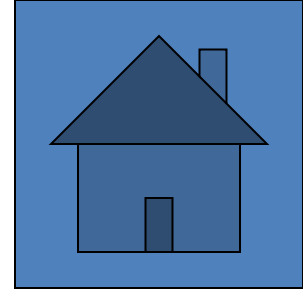
- Non-visible countries
- Liechtenstein
 - Luxembourg
 - Malta



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.
- Podobné jsou také **ampC betalaktamázy**. Kromě karbapenemů zde zůstávají citlivé i cefalosporiny 4. generace.
- **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 mikrobiologických laboratořích velkých nemocnic. Dělají i poradenskou činnost.

Metody testování I: difusní diskový test

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** (zjistíme MIC). *Jde zpravidla o rizikové kmeny u rizikových pacientů.*

Když „in vitro“ neodpovídá „in vivo“

- **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:** breakpoints jsou vyjádřením koncentrace atb především v séru; musíme vzít v úvahu, že koncentrace 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 koncentrace

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**

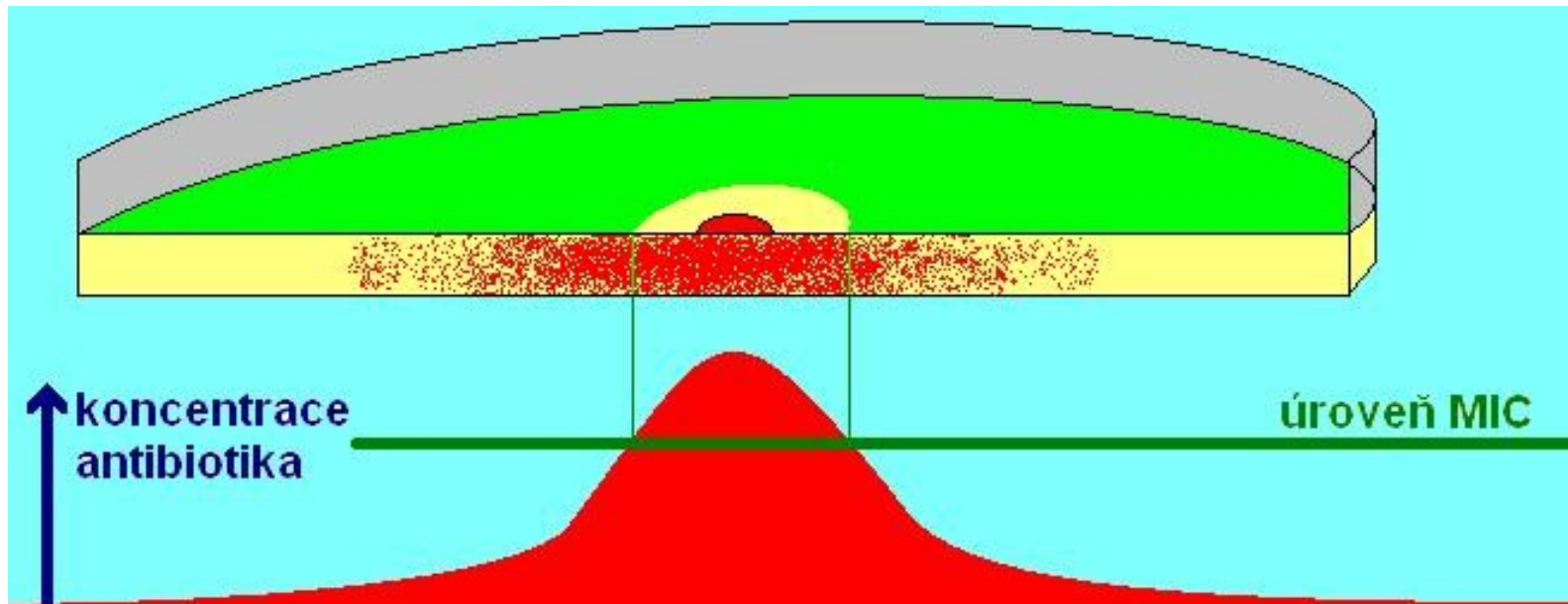
Jak naočkovat difusní diskový test

- 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**

Difúzní diskový test – 2

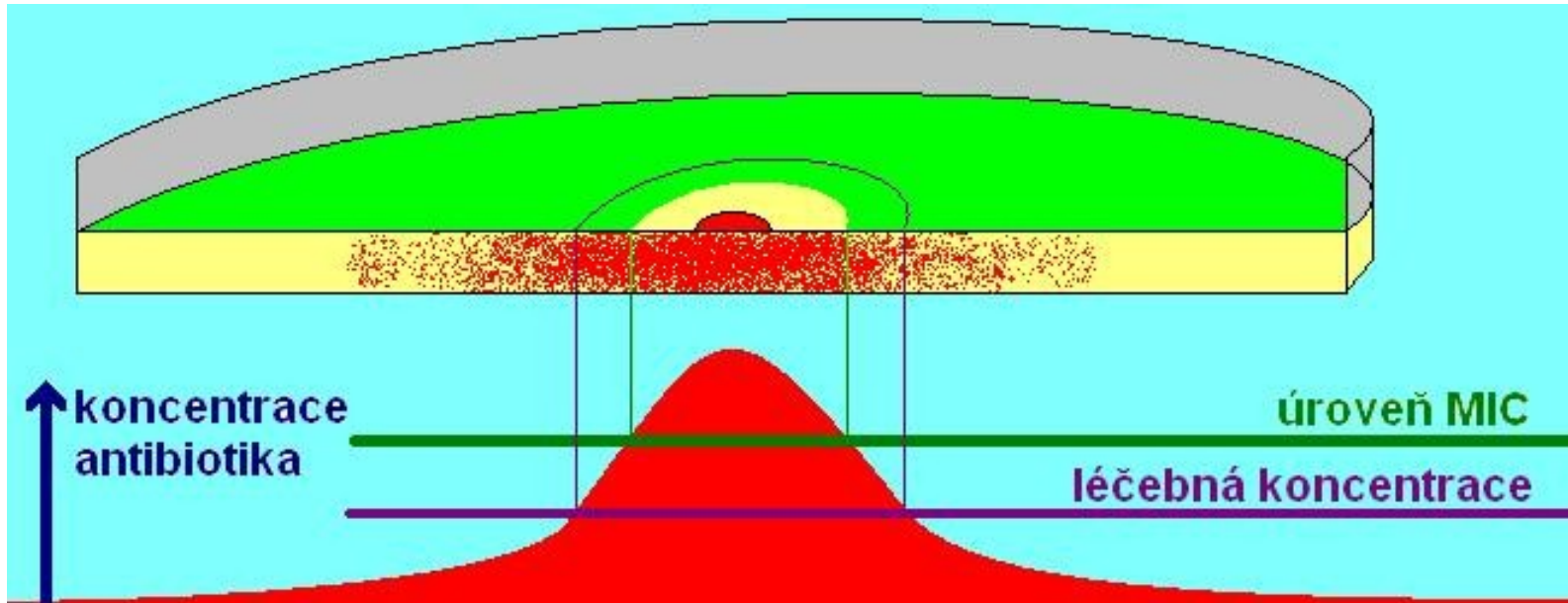
- **Koncentrace atb klesá** se vzdáleností od disku (a tedy i jeho schopnost inhibovat)
- Pokud mikrob roste až k disku, nebo má jen malou zónu, je **rezistentní** (necitlivý)
- Je-li kolem disku dost velká zóna citlivosti (větší než stanovená hranice), je **citlivý**.

Difúzní diskový test učeně – 1



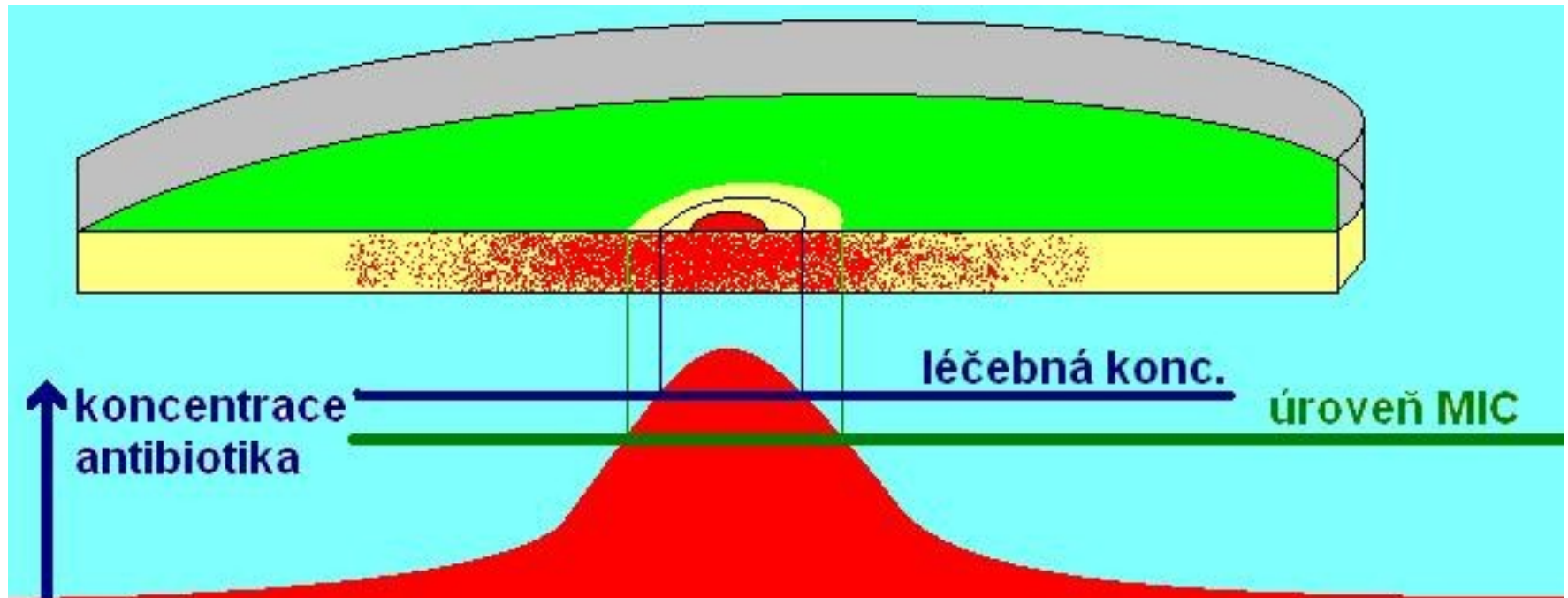
- Antibiotikum difunduje z disku, který je jím napuštěn, agarem. Čím dále od disku, tím je menší koncentrace antibiotika. V určitém bodě je koncentrace přibližně rovna MIC – to znamená, že antibiotikum přestává být schopno inhibovat růst dané bakterie.

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 reálně porovnáváme zóny (měříme **zónu v milimetrech** a porovnáváme s **hodnotou referenční zóny**

- Nepřímo ale vlastně porovnáváme koncentrace: **MIC** versus **léčebná koncentrace (zvaná též breakpoint)**.

To ale neznamená, že bychom mohli reálně určovat MIC difusním diskovým testem – na to je ten test příliš nepřesný.

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 například stránky evropské organizace EUCAST:*

<http://www.eucast.org>

Difusní diskový test po lopatě

1

2

3

4

1 Bakterie se bojí antibiotika. Velká zóna – někdy dokonce tak velká, že se ani nedá změřit.

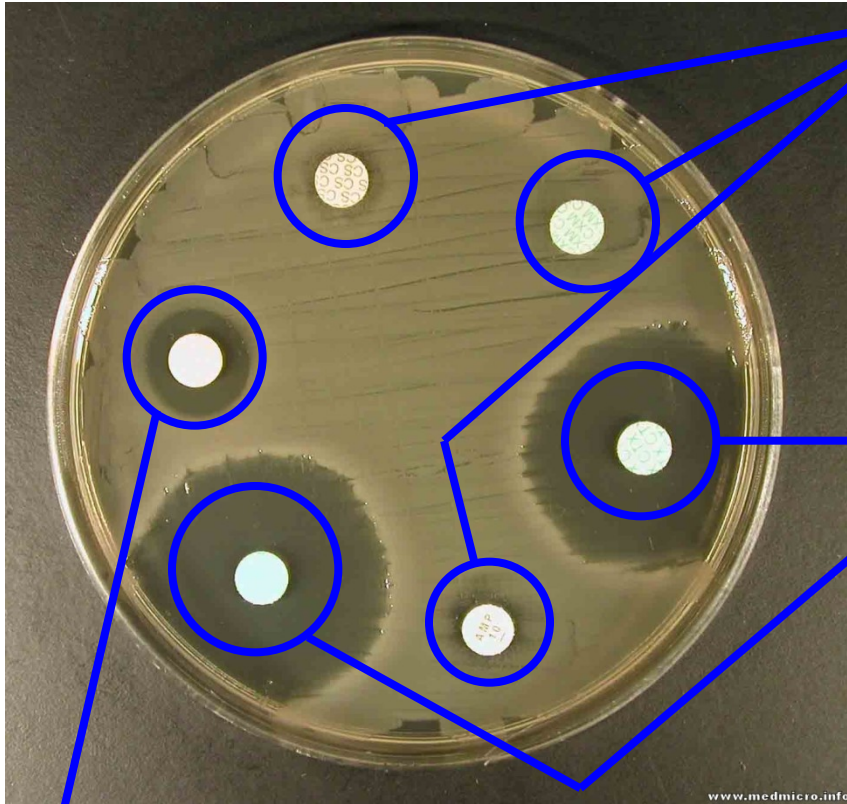
2 Bakterie se nebojí antibiotika, jsou na ně rezistentní. Malá, anebo vůbec žádná zóna kolem atb disku.

Sestavy antibiotik

- Disky se zpravidla používají v určitých daných sestavách. Existují sestavy vhodné spíše pro G+ či spíše pro G- mikroby. Lze ovšem vytvořit i sestavy relativně „univerzálních“ antibiotik. Multirezistentní kmeny ovšem jsou často rezistentní i na takováto antibiotika.

	G+ mikrob	G- mikrob
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>

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



Žádná zóna:

Mikrob je rezistentní

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

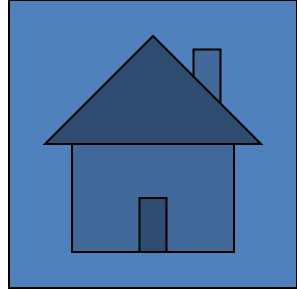
Zóna existuje, ale je menší než hraniční:

Mikrob je rezistentní

Difúzní diskový test u pigmentovaného mikroba (*Pseudomonas aeruginosa*)

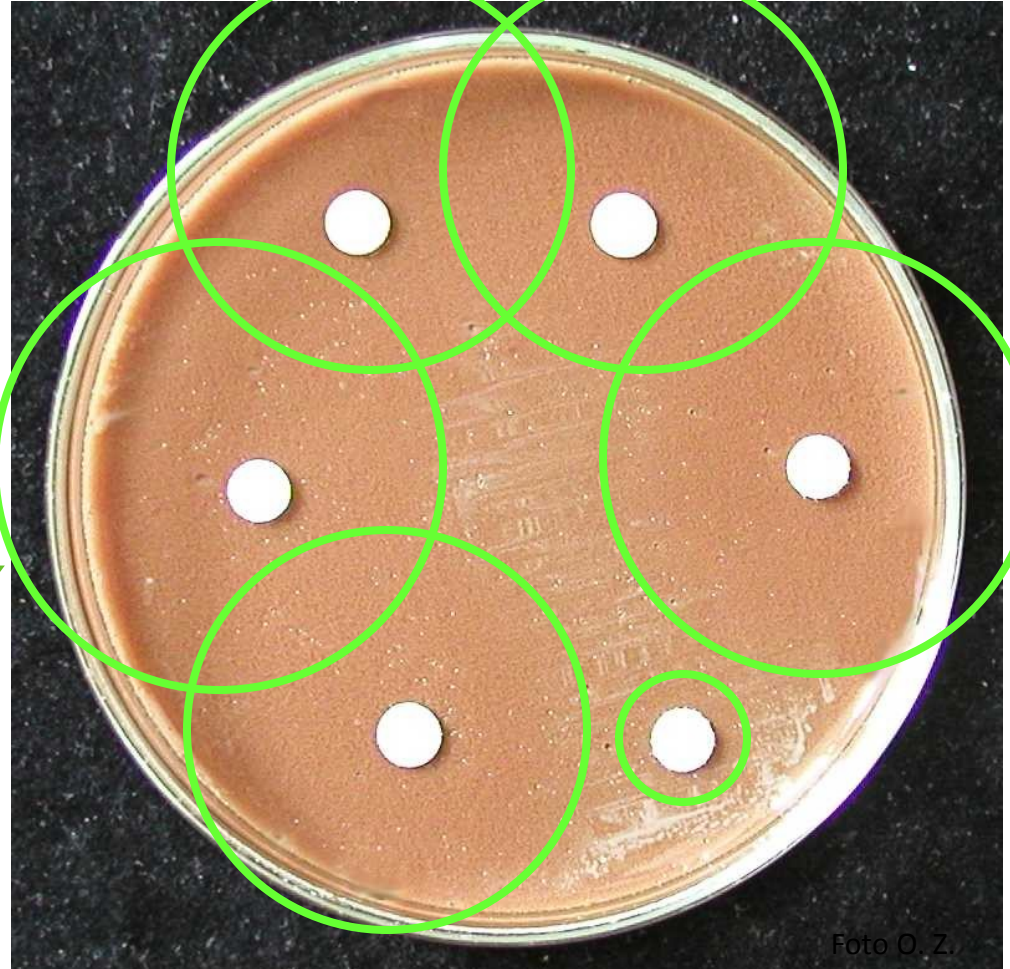


Někdy jsou příliš velké zóny



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



Metody testování II: E-test

E-testy

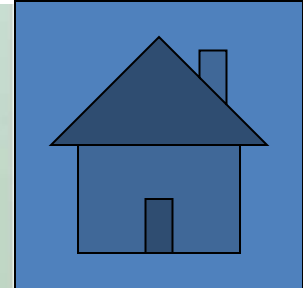
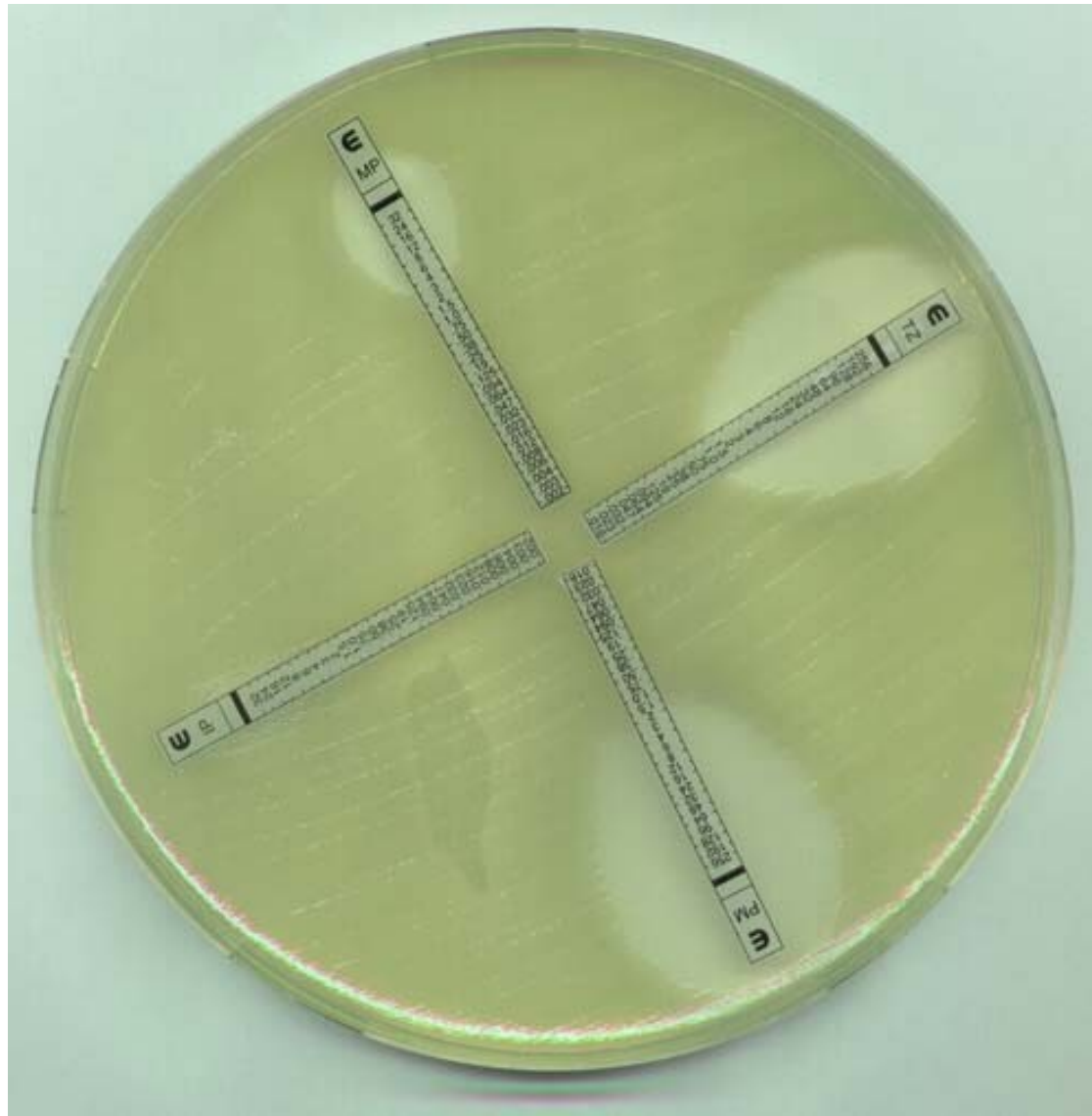
- **Podobné** v principu difúznímu diskovému testu
- Místo disku se však použije **proužek**
- V proužku **stoupající koncentrace atb** od jednoho konce ke druhému (získáno díky speciální technologii – proto jsou tak drahé)
- Zóna **není kruhová, ale vejčitá.**
- Test je **kvantitativní**
- Na papírku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



Metody testování III: mikrodiluční test

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*)

Jak odečíst mikrodiluční test

- 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**
- **MIC \leq breakpoint \rightarrow kmen citlivý**
- **MIC $>$ breakpoint \rightarrow kmen rezistentní**

Mikrodiluční test – ukázka

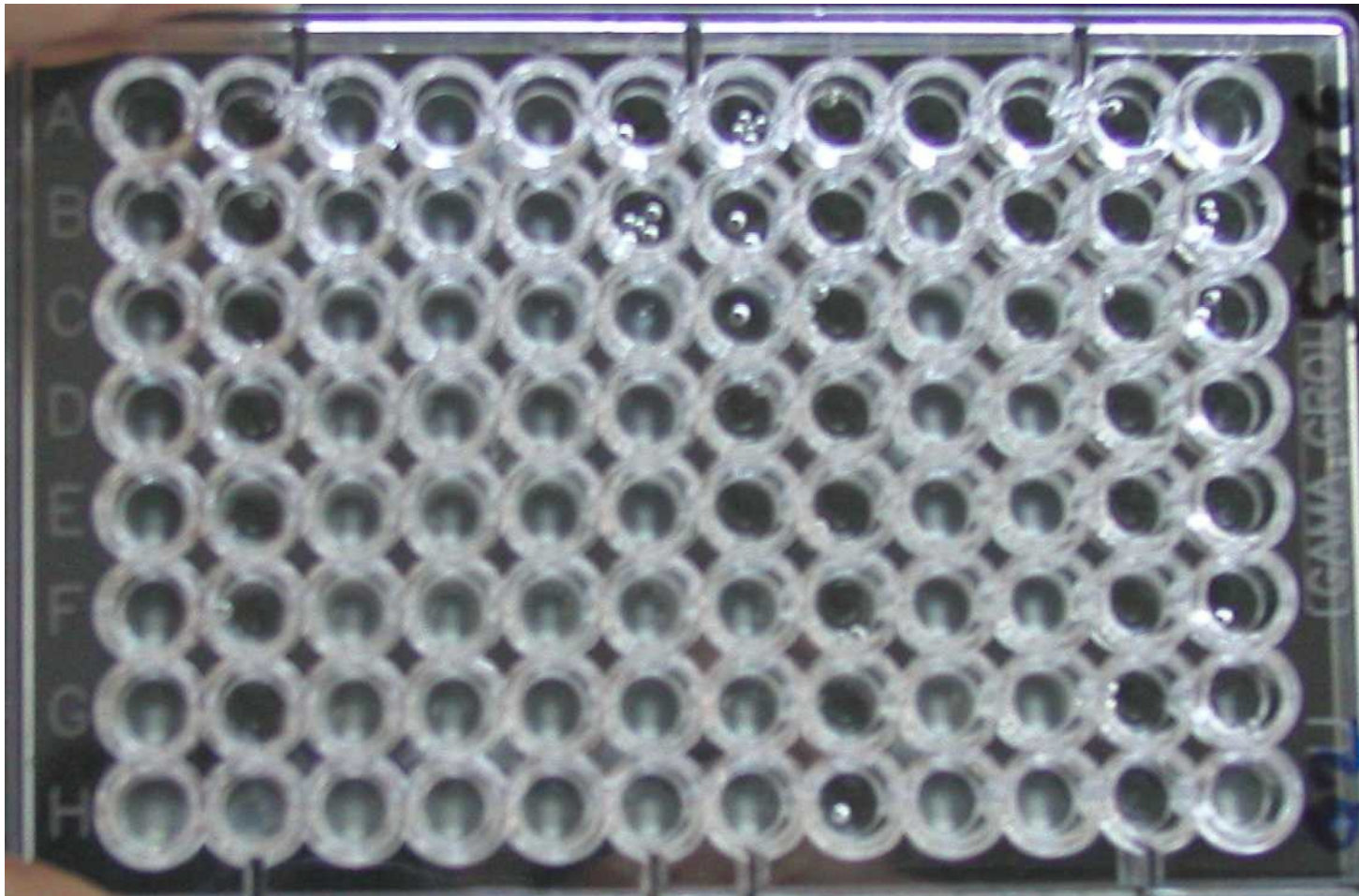
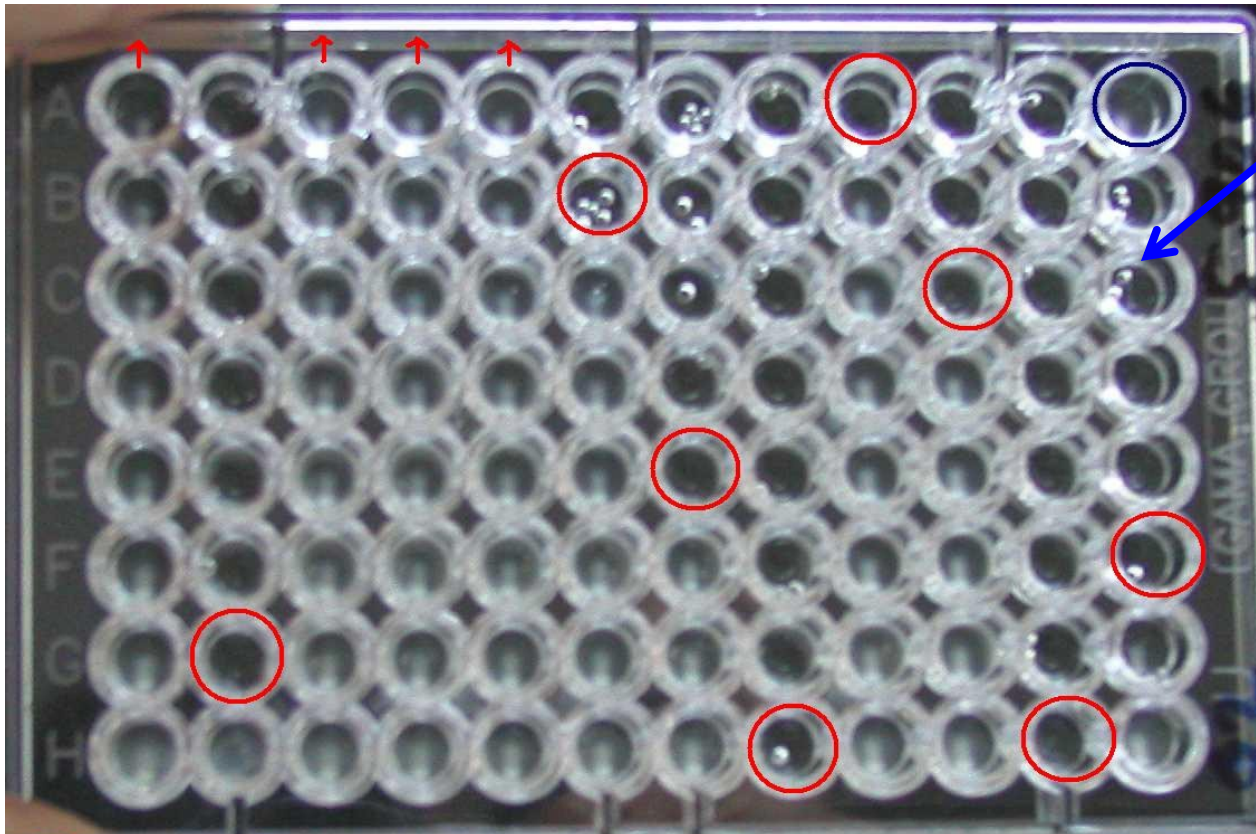


Foto O. Z.

Mikrodiluční test – odečítání

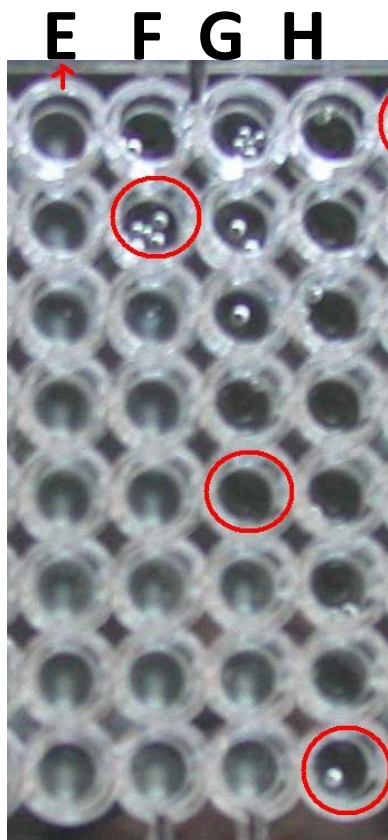
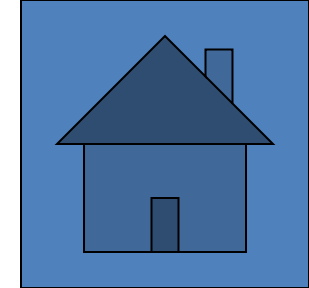


Někdy se v důlcích mohou objevit bublinky – při odečítání si jich nevšímejte

○ **MIC** ○ **growth control – kontrola růstu**

- Ve sloupcích 1, 3, 4 a 5 je hodnota MIC příliš vysoká než aby mohla být změřena. Můžeme ale zapsat „MIC > x“, kde „x“ je koncentrace v horním důlku.

Příklad odečítání



E	F	G	H
32	64	128	64
16	32	64	32
8	16	32	16
4	8	16	8
2	4	8	4
1	2	4	2
0,5	1	2	1
0,25	0,5	1	0,5

- E: MIC > 32, breakpoint = 16, závěr: rezistentní
- F: MIC = 32, breakpoint = 16, závěr: rezistentní
- G: MIC = 8, breakpoint = 32, závěr: citlivý
- H: MIC ≤ 0,1, breakpoint = 8, závěr: citlivý

Metody
detekce
faktorů
rezistence

Zjišťování faktorů rezistence

- Někdy je lépe speciálními metodami **zjišťovat přítomnost konkrétních faktorů** rezistence, např. betalaktamáz.
- Důvody mohou být následující:
 - **testování citlivosti nedává dostatečně spolehlivé výsledky** (špatná difuze v difusním testu, antibiotikum nepracuje přímo, ale přes metabolit...)
 - chceme vědět, zda **jde o resistenci určitého konkrétního typu** (ESBL, ampC)

Nitrocefinový test pro detekci běžné betalaktamázy

- Používá se v situacích, kdy **výsledek difusního**, ale i mikrodilučního testu, **je nejasný**
- Týká se to zejména
 - *neisserií* (nahrazujeme test citlivosti na penicilin)
 - *Moraxella catarrhalis* (nahrazujeme ampicilin)
 - *Haemophilus influenzae* (nahrazujeme ampicilin)
- **V praxi** jde o proužkový test podobný biochemickým identifikačním testům typu oxidázového testu
- Dává **dobré výsledky jen u čerstvých kmenů**, z toho důvodu jej prakticky provádět nebudeme (výsledky nebyly vždy dobré)

Dvě možnosti postupu

Obrázky z letáku výrobce testu

β -LACTAstrip

8a. Pracovní postup při testování na proužku:

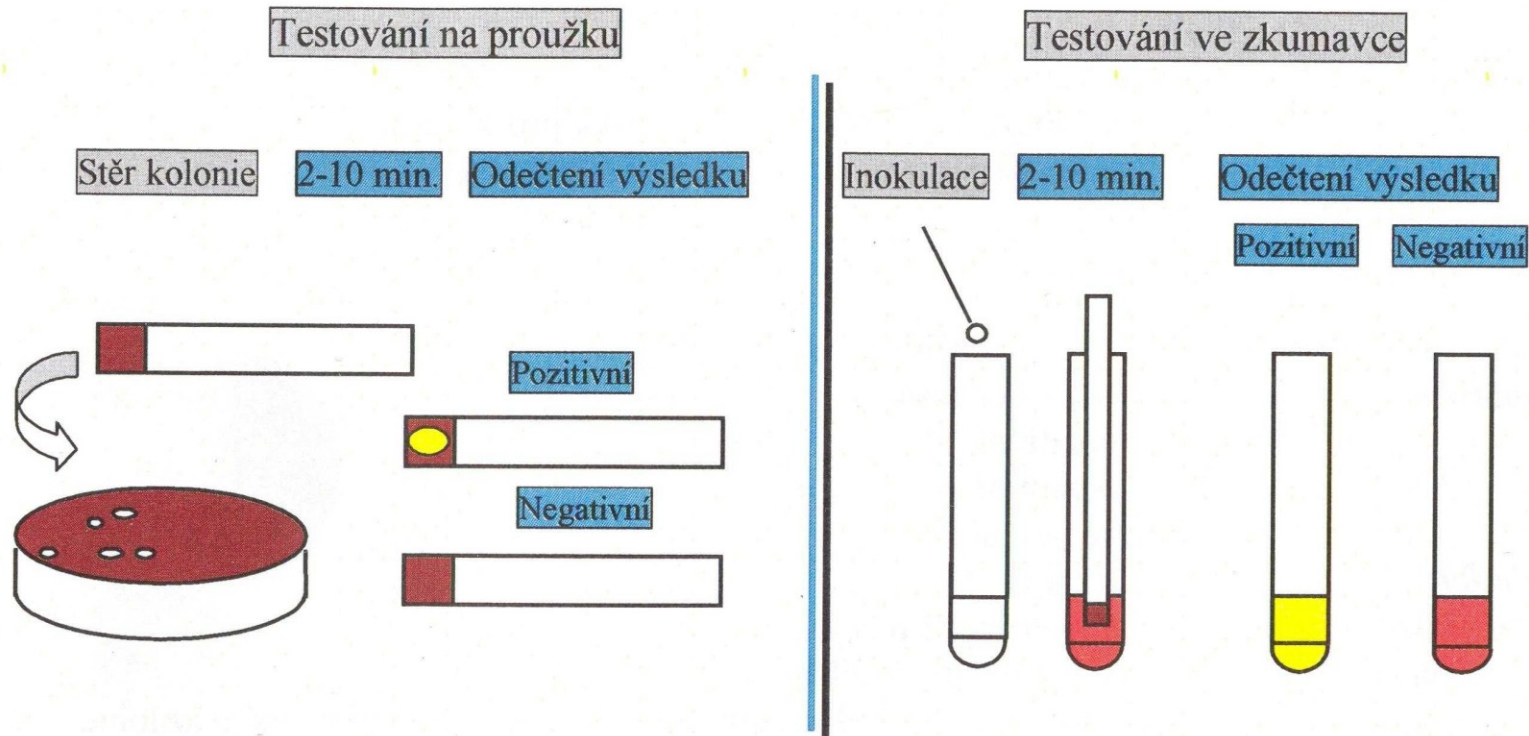
1. funkční zónu diagnostického proužku zvlhčete cca 10 μ l Zvlhčovacího roztoku
2. funkční zónou diagnostického proužku setřete z kultivační misky několik suspektních kolonií
3. proužek popište a inkubujte při laboratorní teplotě
4. po 2 - 10 minutách odečtěte výsledek testu

8b. Pracovní postup při testování ve zkumavce:

1. připravte asi 0,5 - 1 ml bakteriální suspenze vyšetřovaného mikroorganismu ve Zvlhčovacím roztoku (2-4 kličky)
2. do zkumavky s takto připravenou bakteriální suspenzí vložte testovací proužek, protřepejte a inkubujte při laboratorní teplotě
3. po 2 - 10 minutách odečtěte výsledek testu

Vyhodnocení

Obrázky z letáku výrobce testu




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

Testování produkce širokospektrých betalaktamáz typu ESBL

- Širokospektré betalaktamázy jsou horší než „běžné“ betalaktamázy (testované nitrocefinovým testem). Důležitým typem širokospekteré betalaktamázy je **„ESBL“ beta-laktamáza**. Testujeme ji dvěma způsoby. Principem obou je posílení účinku antibiotika klavulanovou kyselinou. *(Efekt tohoto posílení by tu nebyl dostatečný pro léčebné použití, ale pro diagnostiku stačí.)*
- U **„testu dvojité synergie“** (nedělá se v aktuální verzi praktika) si všímáme deformace zóny betalaktamového antibiotika na straně přivrácené k disku s ko-amoxicilinem 
- V **„CLSI testu“** porovnááme účinek stejného antibiotika s / bez klavulanové kyseliny

Metoda CLSI

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) beta-laktamázy. Totéž platí pro ceftazidim.

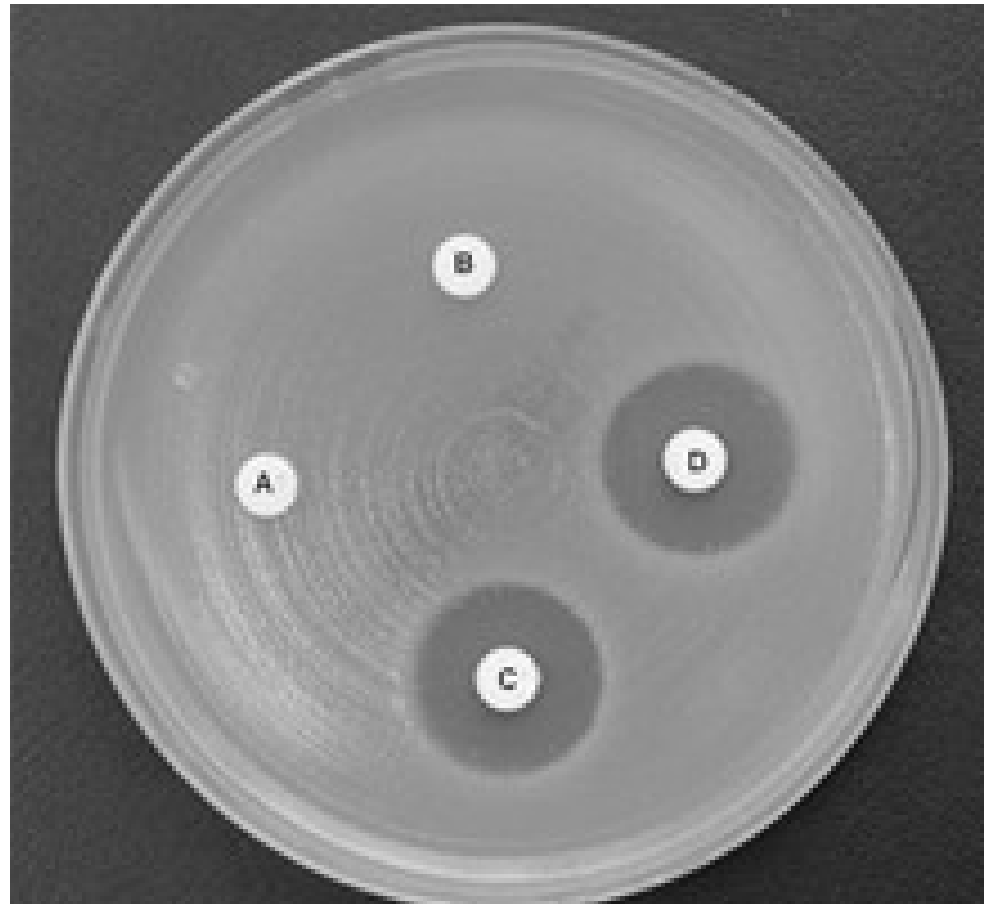


Testy produkce dalších typů betalaktamáz

- U testování **konstitutivní ampC** porovnááme zóny citlivosti čtyř betalaktamů na MH půdě bez oxacilinu a s oxacilinem
- Vedle konstitutivní ampC betalaktamázy existuje také **indukovaný typ ampC betalaktamázy**. Projeví se pouze v případě, že bakterie je provokována klavulanovou kyselinou či jiným aktivátorem
- V poslední době se objevují nové typy betalaktamáz: **metalobetalaktamázy** (hlavně u G⁻ nefermentujících) a **karbapenemázy** (u různých G⁻ bakterií)

„ABCD“ test

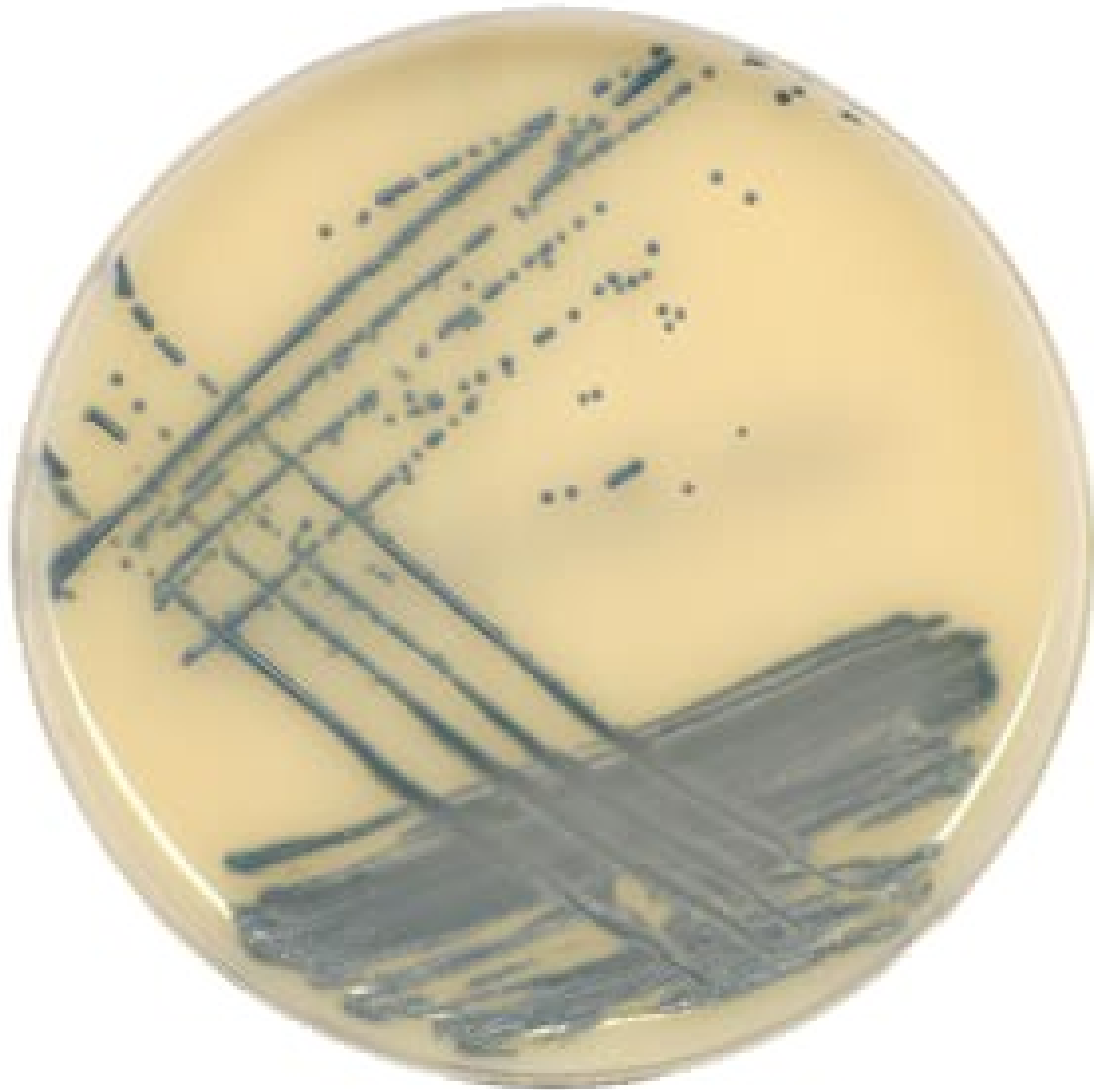
U tohoto testu ověřujeme přítomnost dvou typů betalaktamáz najednou. Rozdíly mezi jednotlivými antibiotiky jsou typické buď pro **betalaktamázu typu ESBL**, nebo pro **ampC betalaktamázu konstitutivního typu** (jak vidíme na obrázku)



Screening kmenů MRSA a VRE

- Při screeningu kmenů MRSA a VRE (ale i producentů ESBL) se používají **speciální screeningové půdy**.
- Jsou zpravidla **chromogenní**, specifické pro určitý rod a druh bakterie, a **obsahují „inkriminované“ antibiotikum** (např. vankomycin u VRE), takže citlivé kmeny tam nerostou.

MRSA (vlevo) a VRE (vpravo) na svých specifických chromogenních půdách

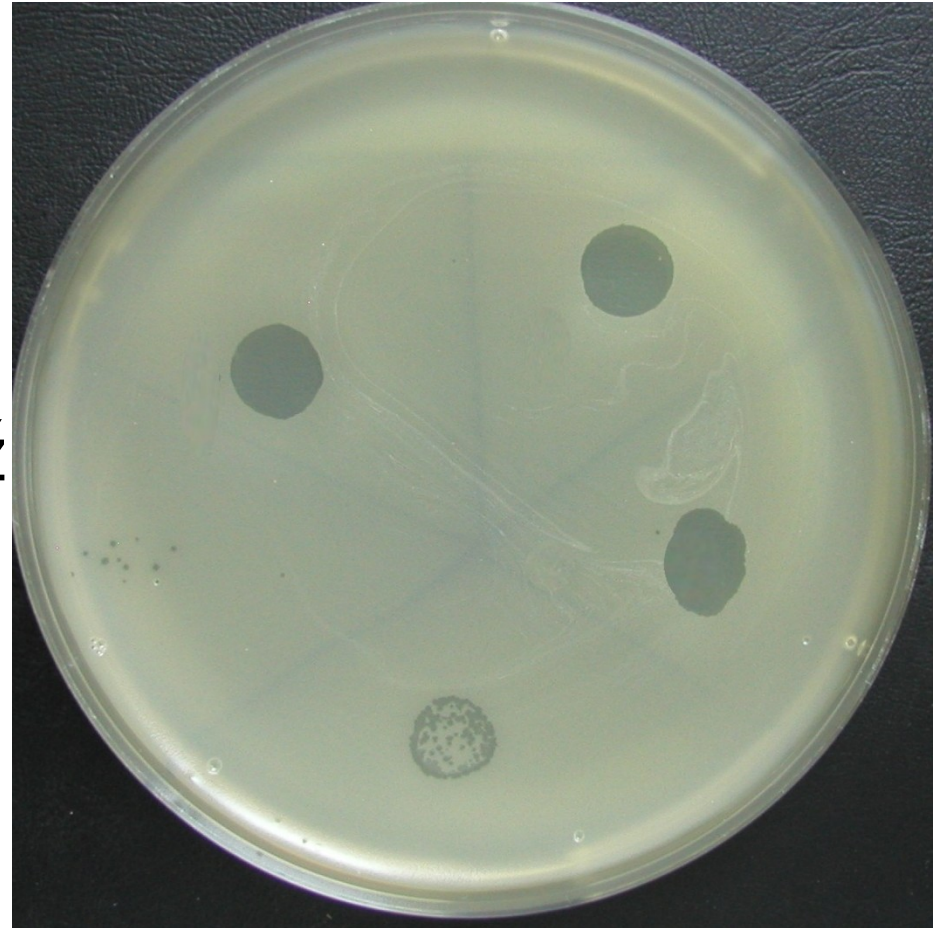


Fágová terapie

- Jak antibiotika ztrácejí účinnost (bakterie jsou rezistentní), dostávají se do zorného pole opět **alternativní způsoby léčby**.
- Je také možné vyzkoušet **účinek fágů či fágového lyzátu** (směs bílkovin produkovaných fágem) na kulturu mikrobů (v místě, kde byl aplikován fágový lyzát, bakterie buď rostou, nebo nerostou). Případně používáme preparáty, obsahující jak lyzát, tak i živé fágy. Příkladem je preparát STAFAL.
- *Později (v J14 va P04) vyzkoušíme také účinnost bakteriofágů na biofilm a jejich využití při takzvané fagotypizaci (zvláštní metoda identifikace bakterií)*

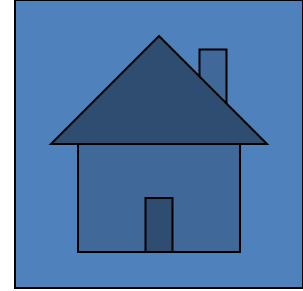
Bakteriofágová terapie v praxi

Na tomto obrázku vidíte kmen stafylokoka, naočkovaného tak, že pokrývá celý povrch média. Avšak fágový preparát **přítomnost zón lýzy** – což znamená, že kmen je **citlivý k danému fágovému preparátu***. **Nepřítomnost zón lýzy** by znamenala, že **kmen je vůči danému fágu rezistentní**.



*Zde STAFAL, výrobce Sevapharma, a. s. (CZE)

Kontrolní otázky



1. Jaký je hlavní rozdíl mezi působením desinfekce a působením antibiotik?
2. Jaký typ léků se používá k léčbě mykóz?
3. Jaký typ léků se používá k léčbě (těžkých) viróz?
4. Jaký typ léků se používá k léčbě tuberkulózy?
5. Jak se nazývají lokální antiinfektiva?
6. Co znamená pojem "breakpoint"?
7. Které skupiny antibiotik patří mezi betalaktamová antibiotika?
8. U které skupiny antibiotik jsou hodnoty MIC a MBC téměř totožné?
9. Co znamenají zkratky ESBL, MRSA, VRE a MLS(B)?
10. Které typy testů citlivosti na antibiotika jsou kvantitativní?
11. Co je to, když se řekne „ampC“?
12. Která je nadějná alternativa antibiotické terapie?

Zpět na hlavní obsah prezentace

STAFYLO-

KOKY

Obsah této části prezentace

Klinická charakteristika: *Staphylococcus aureus*

Klinická charakteristika: koagulázanegativní stafylokoky

Mikrokoky: vsuvka pro zvidavé

Diagnostika stafylokoků

Diferenciální diagnostika stafylokoků I

Diferenciální diagnostika stafylokoků II

Testování antibiotické citlivosti a antibiotická léčba

Klinická
charakteristika:
Staphylococcus
aureus

Příběh první



- Paní J. K., kuchařka ve studentské menze. Má na ruce puchýř, naplněný žlutobílým hnisem. Nevěnuje mu však pozornost. Bere do ruky knedlíky, které se už nevaří, ale jen prohřívají
- Student Miloš s přítelkyní si pochutnají na knedlicích. Odpoledne mají schůzku ... ale co to? Půl hodinu před schůzkou Miloše najednou rozbolelo břicho, má průjem a zvrací. Volá přítelkyni – ta má ale pochopení, je na tom stejně... Romantické odpoledne se nekoná...

Kdo je vinen?

- Vinen je *Staphylococcus aureus*
název z řeckého σταφυλή (staphylé) = hrozen
- Tento „zlatý stafylokok“ s oblibou způsobuje hnisavé infekce kůže a kožních adnex, případně také dýchacích cest
- Některé výjimečné kmeny produkují **enterotoxiny**, které fungují jako tzv. **superantigeny**
- Intoxikace bakteriálním toxinem se, na rozdíl od střevní infekce, projeví velice rychle; obvykle také rychle odezní

Vinna je ovšem také kuchařka, která nedodržela pravidla hygieny a nevšímalá si puchýře!

Enterotoxikózy a střevní infekce

- Je potřeba rozlišovat dva stavy:
- **Enterotoxikóza** znamená, že mikrob někde vně organismu vyprodukoval toxin, a ten byl pacientem zkonsumován. Potíže (zvracení, průjem) jsou důsledkem aktivity toxinu. Mikrob sám nemusí být v těle vůbec přítomen.
- **Střevní infekce** znamená, že se v těle množí mikrob a poškozuje tělo invazí do stěny střeva nebo produkcí toxinů. Pozor – i když jde o produkci toxinu, je toxin produkován uvnitř těla a nejde o enterotoxikózu.

Příběh druhý

- Studentka P. Z. je unavená. Má hodně učení, a navíc „své dny“. Nakonec usnula, aniž by si vyměnila tampón, ačkoli už ho měla dlouho...
- Najednou ji chytila třesavka, mdloby, horečka. Spolubydlička ji našla ležící na koberci a volá 155. Objevila se vyrážka, leží na JIP infekční kliniky...

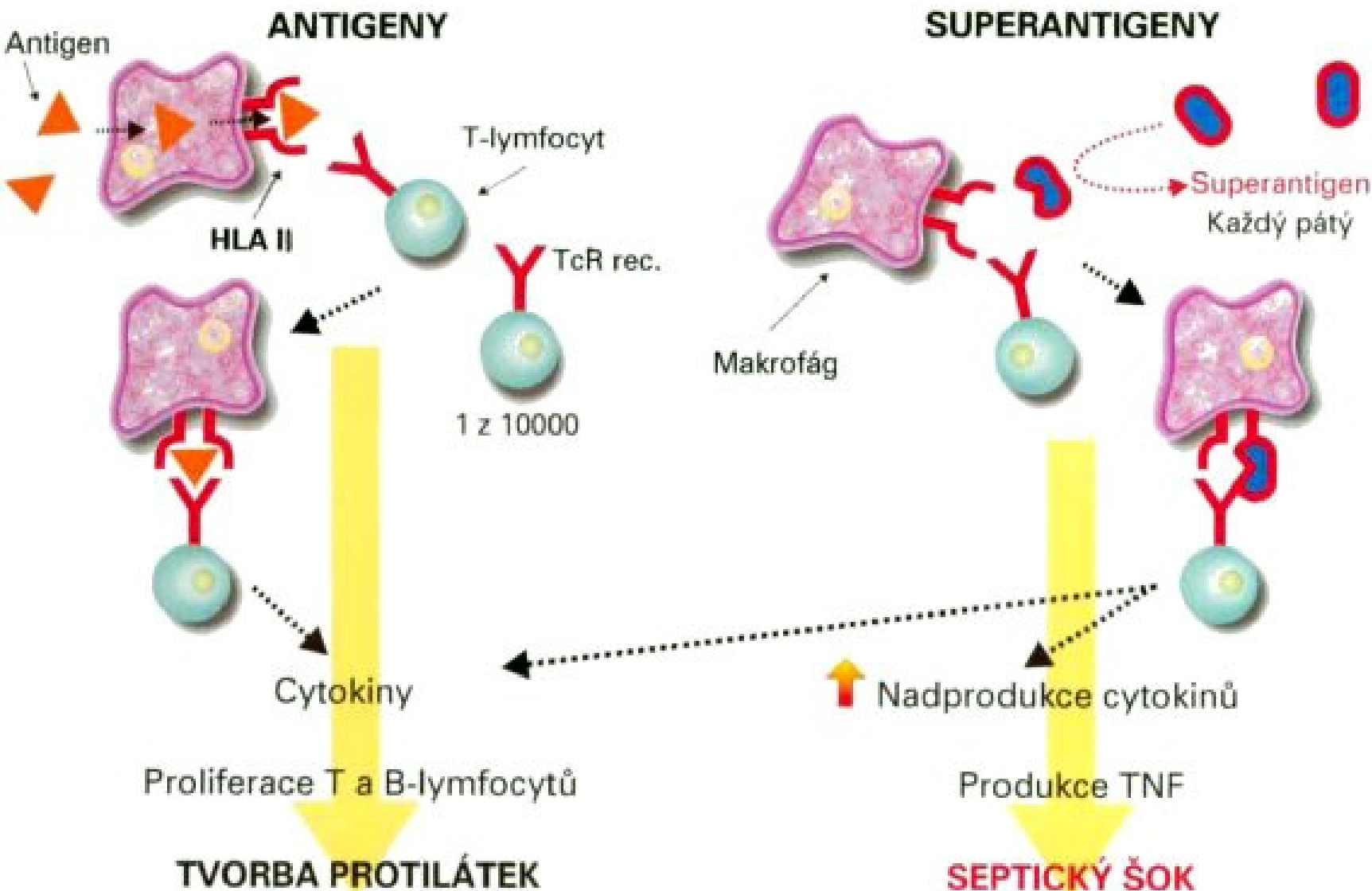
Kdo je vinen tentokrát?

- Opět je viníkem *Staphylococcus aureus*, tentokrát kmen produkující toxin zvaný TSST-1 (toxin syndromu toxického šoku)
- Také tento toxin je superantigenem
- Způsobuje toxický šok, typicky se vyskytuje u uživatelék menstruačních tampónů

Superantigeny

Imunitní odpověď

www.zuova.cz/informace/nrlpab16.php

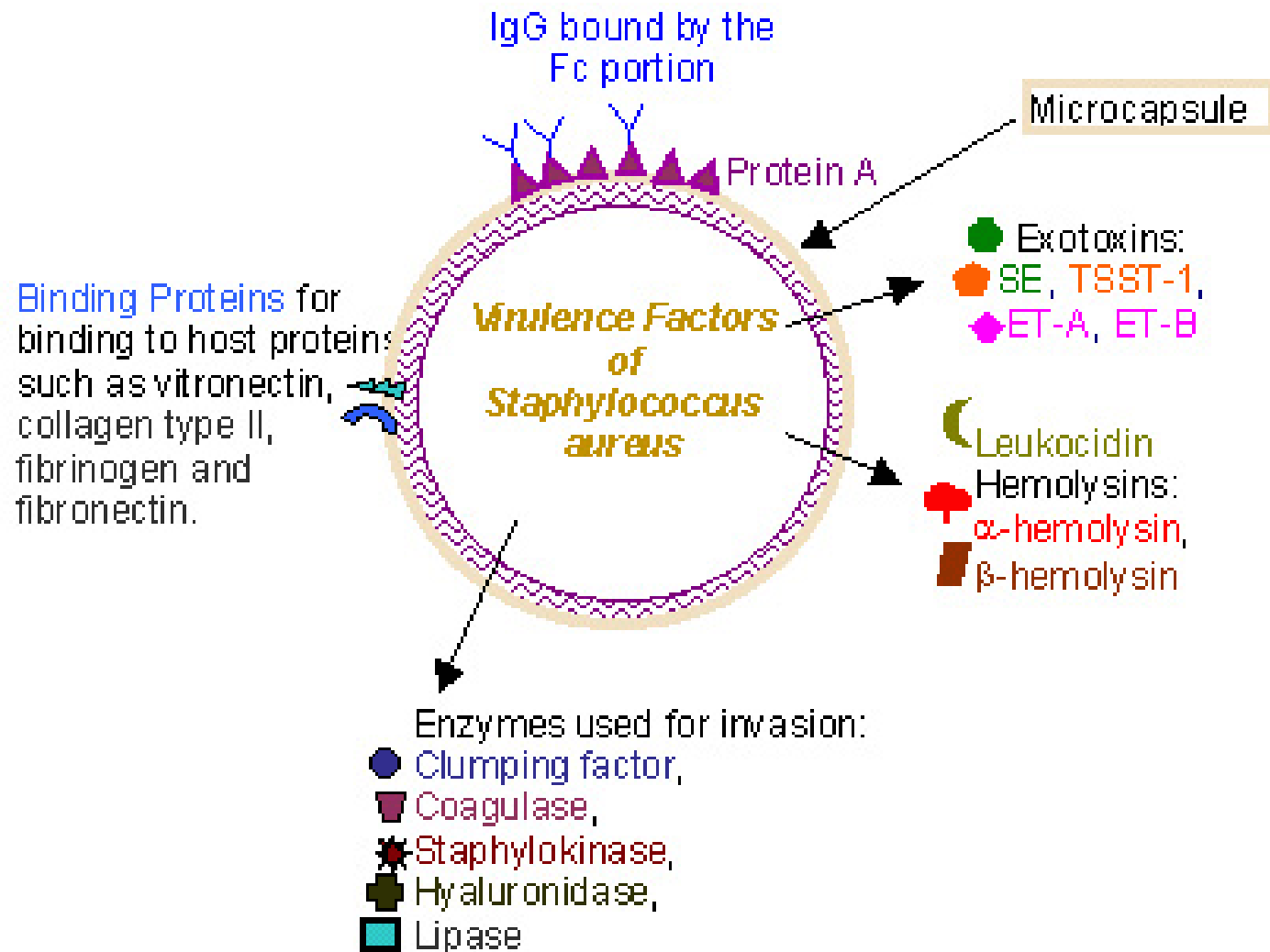


Staphylococcus aureus

(zlatý stafylokok)

- Jediný pro člověka běžně významný z tzv. **koaguláza pozitivních stafylokoků**
- Původce infekcí kůže, chlupů, nehtů, otitis externa, zánětů spojivek, infekcí HCD
- Někdy také původce abscesů ve tkáních
- Jak již bylo řečeno, některé kmeny, vybavené určitými **nikoli běžnými** faktory virulence, způsobují závažné, ale vzácné choroby
- Na druhou stranu mikroba nalezneme i na kůži zcela zdravých osob

Faktorů virulence, nalézaných u *S. aureus*, je veliké množství...



...ale jen některé jsou přítomny u téměř 100 % kmenů; jiné jsou produkovány třeba jen jedním kmenem z tisíce!

Abscesy

- Na rozdíl od streptokoků, které vytvářejí ve tkáni zpravidla **neopouzdržené flegmóny**, tvoří stafylokoky spíše **opouzdržené abscesy**.
- *Vznik abscesu (pomocí tzv. clumping faktoru a plasmakoagulázy – viz dále!) ukazuje schéma, převzaté z německých internetových stránek – vizte zde:*



Příklady infekcí způsobených zlatým stafylokokem: Impetigo...



...bulózní impetigo...



<http://www.adhb.govt.nz/newborn/TeachingResources/Dermatology/BullousImpetigo/BullousImpetigo3.jpg>

...otitis externa
s furunklem...



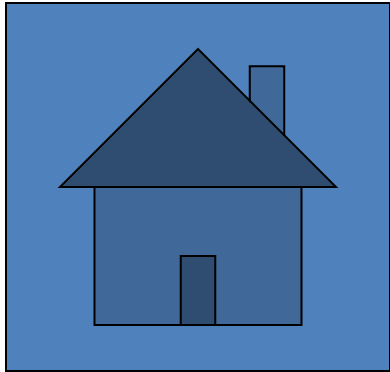
...či infekce kůže s krustami...

http://www.dermatology.co.uk/media/images/Infection_staphylococcus_crusting_chin_closeup.jpg

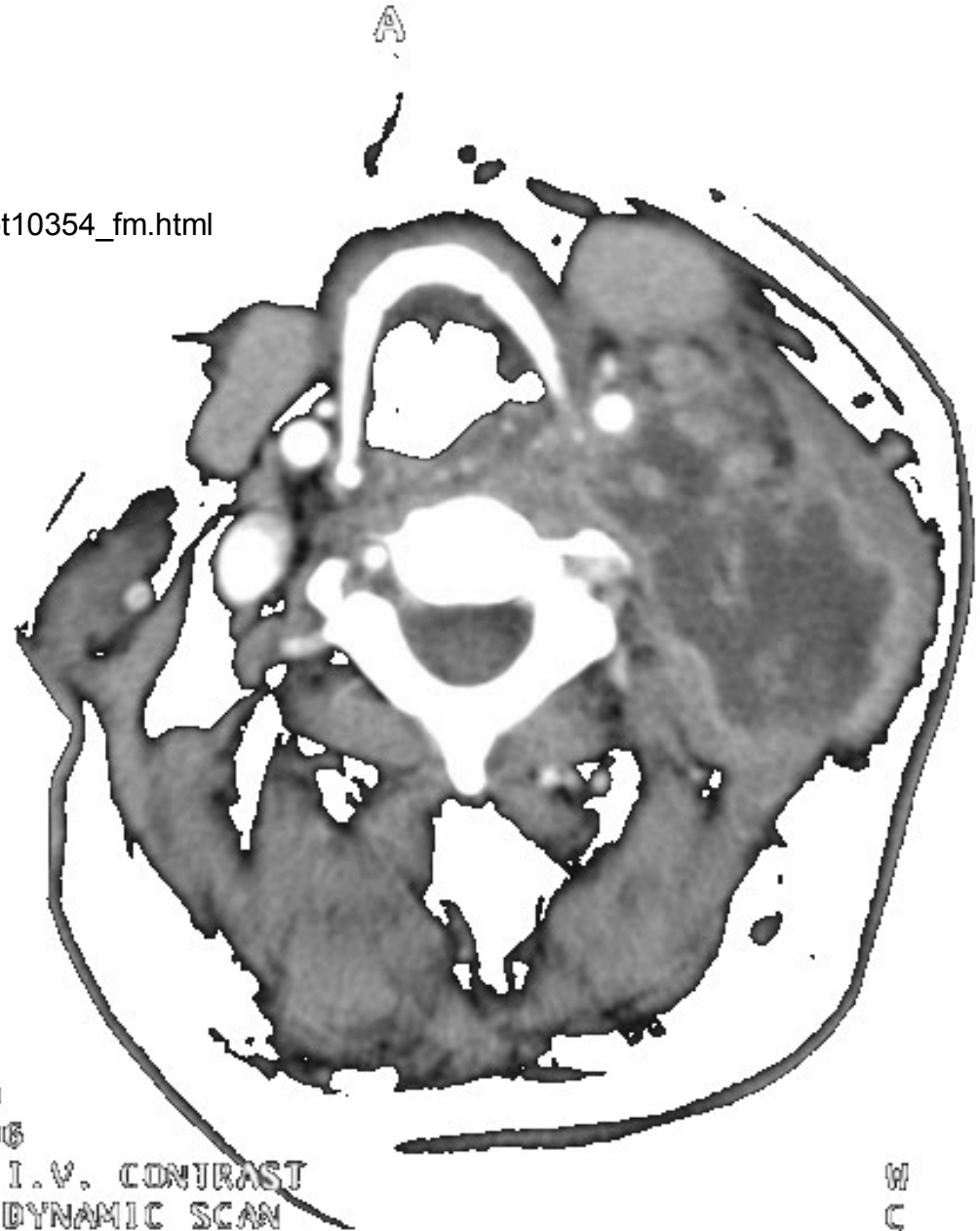


...ale také např. mozkové abscesy

http://www.mja.com.au/public/issues/176_12_170602/got10354_fm.html



kV 120
mA 280
TI 1.00
CT 0.0
SL 5.0/5.0
220 -7/-106
AB50 LO I.V. CONTRAST
10013>0 DYNAMIC SCAN



Klinická

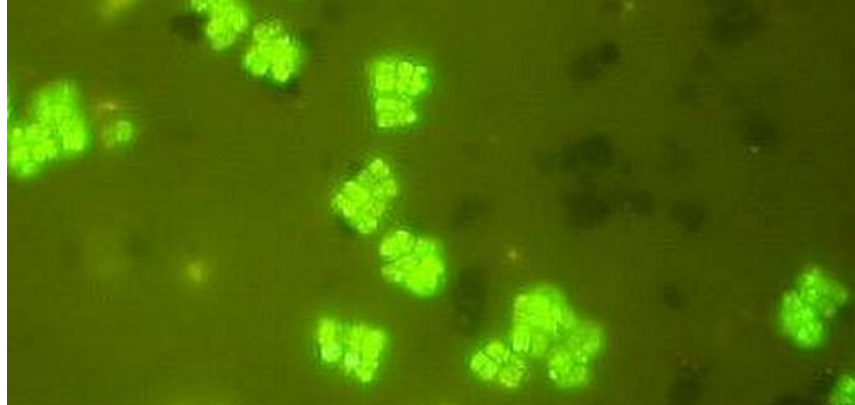
charakteristika:

Staphylococcus

sp. (koag.-neg.)

Příběh třetí

<http://www.zuova.cz/informace/pic/ompovabac20b.jpg>



- **Mladík F. B.** se zotavuje po těžké havárii. Do krevního řečiště má zavedeny dva žilní katétry pro infusní výživu a odběry krve
- Náhle se stav **prudce zhoršil**, objevily se vysoké horečky, které kolísají – ošetřující lékař vyslovil podezření na septický stav, odebírá krev na kultivaci (hemokulturu)
- Po **vyměnění katetru** a **antibiotické léčbě** se stav opět zlepšil

A kdo je vinen nyní?

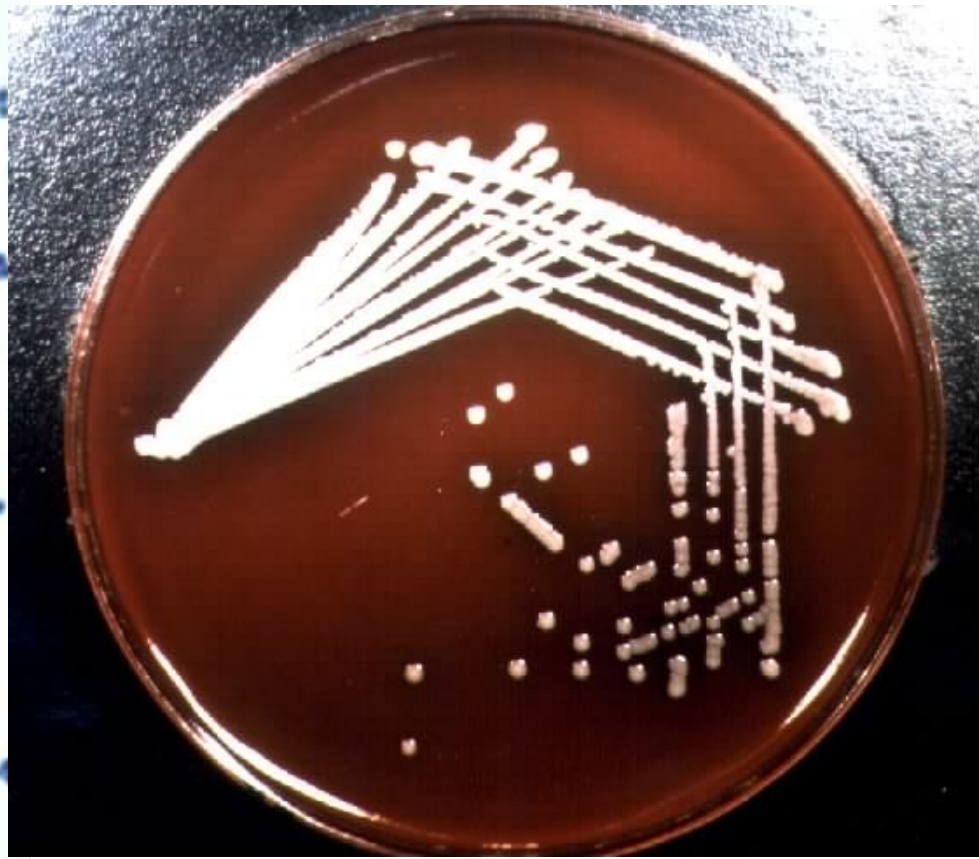
- Vinen je *Staphylococcus epidermidis*, nejběžnější z takzvaných koaguláza negativních stafylokoků (*stafylokoků s negativní koagulázovou reakcí – viz dále*)
- Koaguláza negativní stafylokoky patří do stejného rodu jako zlatý stafylokok
- Jsou mnohem méně patogenní než on
- V poslední době jsou však velice významnými původci infekcí u **oslabených osob**, zejména nemocničních
- Na katétrech a jiných plastech často tvoří **biofilm**

*Kromě druhu *S. aureus* a koagulázanegativních stafylokoků existuje i kategorie „koagulázapozitivních stafylokoků jiných než *S. aureus*“. V humánní klinické mikrobiologii má ale tato kategorie minimální význam. V praxi je tedy zvykem zjednodušeně hovořit pouze o *S. aureus* a koagulázanegativních druzích stafylokoků.*

Staphylococcus epidermidis

Autor: Prof. MVDr. Boris Skalka, DrSc.

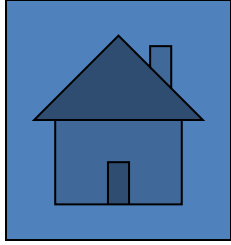
Autor: Prof. MVDr. Boris Skalka, DrSc.



Koaguláza negativní stafylokoky

- **Koaguláza negativní stafylokoky** (*Staphylococcus epidermidis*, *S. hominis*, *S. haemolyticus* a asi čtyřicet dalších druhů a poddruhů) jsou hlavní součástí běžné bakteriální mikroflóry kůže.
- Mohou být ale původci močových infekcí (hlavně *S. saprophyticus*), případně i infekcí ran, katetrových sepsí a různých dalších, často **biofilmových infekcí**
- Jejich nález se tedy hodnotí jinak např. ve výtěru v nosu či ve stolici, jinak v moči, a zcela jinak v hemokultuře.
- *Z toho plynou i praktické důsledky – pouze pokud kmen považujeme za možného patogena, snažíme se o bližší určení a testujeme citlivost na antibiotika.*

Stafylokoků je dnes mnoho druhů



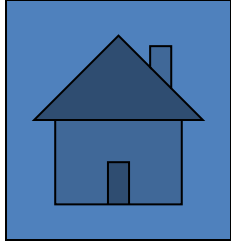
*Např. S. simiae
byl objeven
moravskými
vědci z řitních
výtěrů kotulů
veverovitých
v ZOO na
Svatém
Kopečku u
Olomouce*

S. simiae (AT72/531)

Mikrokoky
(vsuvka pro
zvídavé)

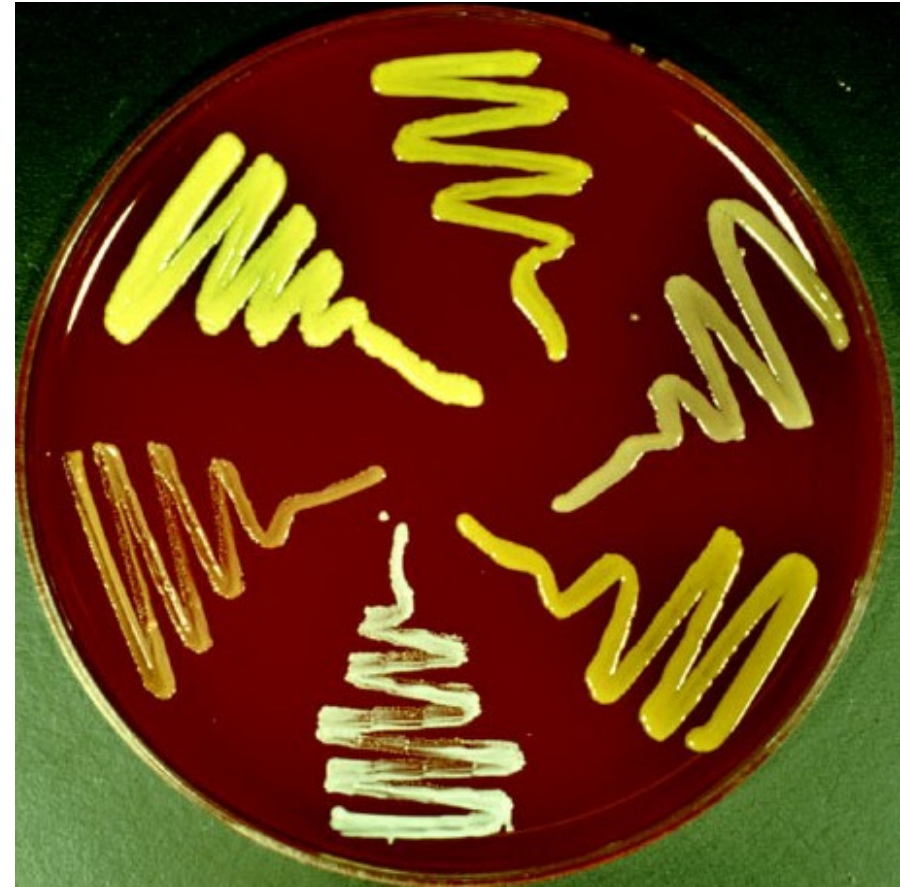
Pro zvědavé: něco o mikrokokcích

- **Mikrokoky** se dlouho považovaly za blízké příbuzné stafylokoků. Nyní se však soudí, že příbuzné nejsou.
- Jsou to rovněž grampozitivní koky v malých shlucích, jsou však **oxidáza pozitivní**
- Dřívější rod *Micrococcus* se rozpadl do rodů *Micrococcus*, *Kytococcus*, *Kocuria*, *Nesterenkonia* a dalších. ***Kocuria*** se jmenuje pro prof. Kocurovi, brněnském mikrobiologovi



Mikrokoky mají krásné pigmenty

- *Micrococcus luteus* je sírově žlutý (ne zlatý jako *Staphylococcus aureus*), *Kocuria rosea* je růžová
- V klinickomikrobiologické laboratoři je nacházíme většinou jako kontaminaci.

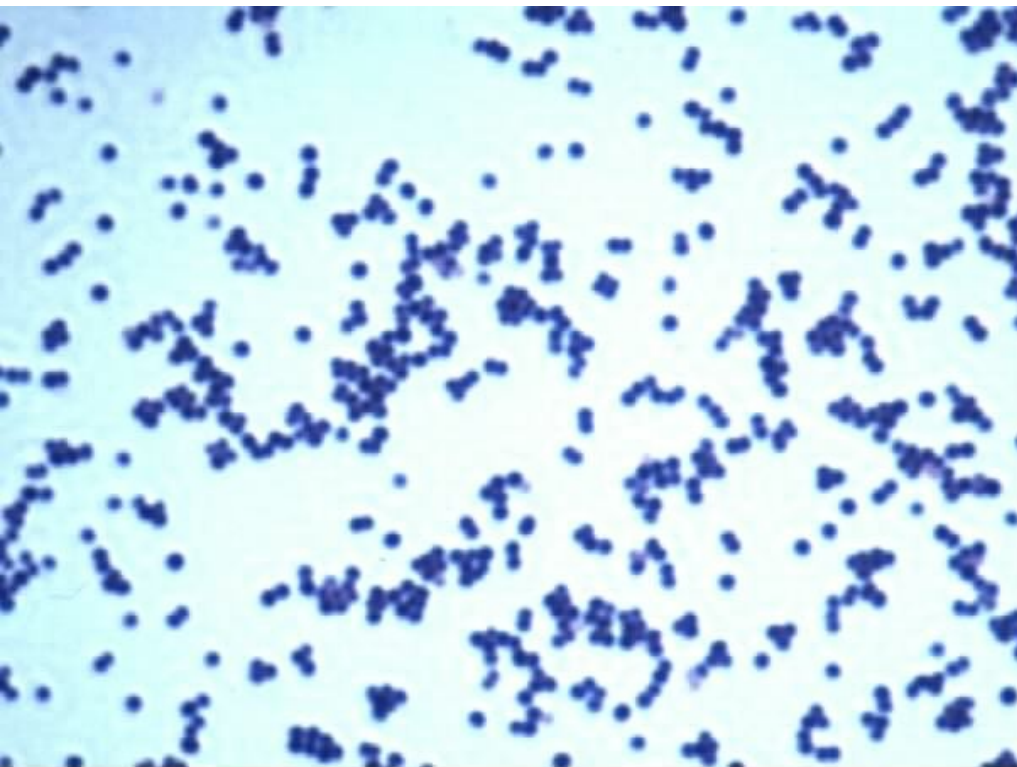
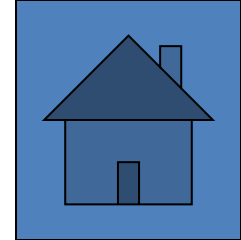


Diagnostika stafylokoků

Popis pachatele (diagnostika)

- **Mikroskopie:** grampozitivní kok
- **Kultivace:** na KA kolonie větší (2 mm), ploché, máslovité konzistence, bílé, anebo (hlavně u zlatého stafylokoka) nazlátlé
- **Biochemické testy:** kataláza pozitivní, oxidáza negativní, biochemicky lze rozlišit jednotlivé druhy
- **Antigenní analýza a speciální testy** mohou při pátrání velice pomoci

Fotografie z databáze zločinců



Autor: Prof. MVDr. Boris Skalka, DrSc.



Autor: Prof. MVDr. Boris Skalka, DrSc.

Diferenciální diagnostika
stafylokoků I: od
„neznámé bakterie“ po
rodové určení
„Staphylococcus“

Přehled mikrobiologické diagnostiky stafylokokové infekce

- *(Mikroskopie VZORKU (např. hemokultury)*
- Mikroskopie izolovaných KMENŮ

Nyní jsme odlišili grampozitivní koky od ostatních

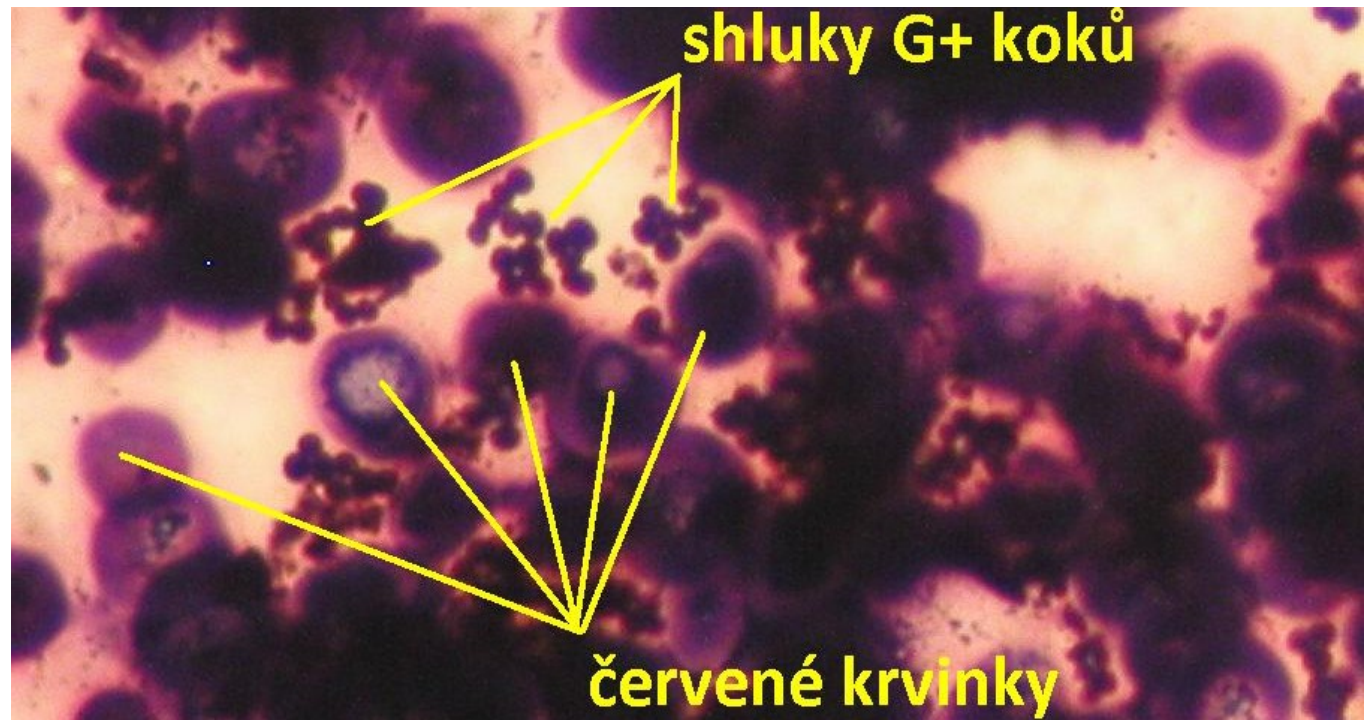
- (Popis kolonií na krevním agaru)
- Katalázový test (odlišení strepto- a enterokoků)
- Růst na KA s 10 % NaCl

Nyní jsme již odlišili stafylokoky od ostatních koků

- Odlišení zlatého stafylokoka od koaguláza negativních druhů
- Druhové určení stafylokoka
- *Testování citlivosti na atb (je-li stafylokok patogenem)*

Pátráme po pachateli mikroskopicky ve vzorku

- Prohlížíme mikroskopický preparát sputa, obarvený podle Grama
- Pátráme po grampozitivních kocích ve shlucích a také po erytrocytech (a případně i jakýchkoli jiných útvarech)



Odlišení od ostatních podezřelých (diferenciální diagnostika 1)

- Gramovo barvení odhalí všechny bakterie, které nepatří mezi grampozitivní koky
- Pozitivní kataláza odliší stafylokoky od streptokoků a enterokoků. *Oxidázu bychom případně využili k odlišení mikrokoků (v praxi výjimečně)*
- Stejnou službu (a ve směsi mikrobů ještě lepší) udělá kultivace na KA s 10 % NaCl
- *Orientačně můžeme využít i toho, že kolonie ostatních G+ koků nejsou bílé či nazlátlé a že mikroskopicky netvoří shluky*

Gramovo barvení (opakování)

- Uděláme nátěr, necháme uschnout, fixujeme plamenem, poté barvíme: Gram 30 s, Lugol 30 s, alkohol 15 s, voda, safranin 60 s, voda, osušit, imerzní obj.)
- Nyní již můžeme odlišit vše co je gramnegativní a/nebo je to tyčinka, tj. vše, co nepatří mezi grampozitivní koky

Katalázový test (pro připomenutí)



Katalázový test + a -

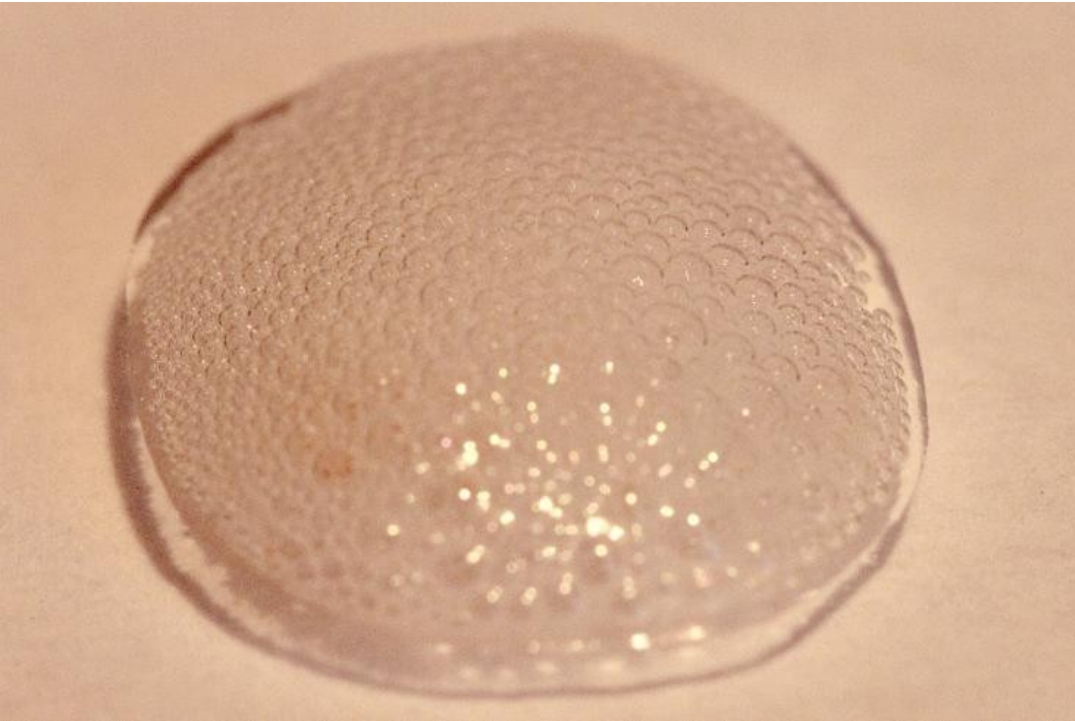
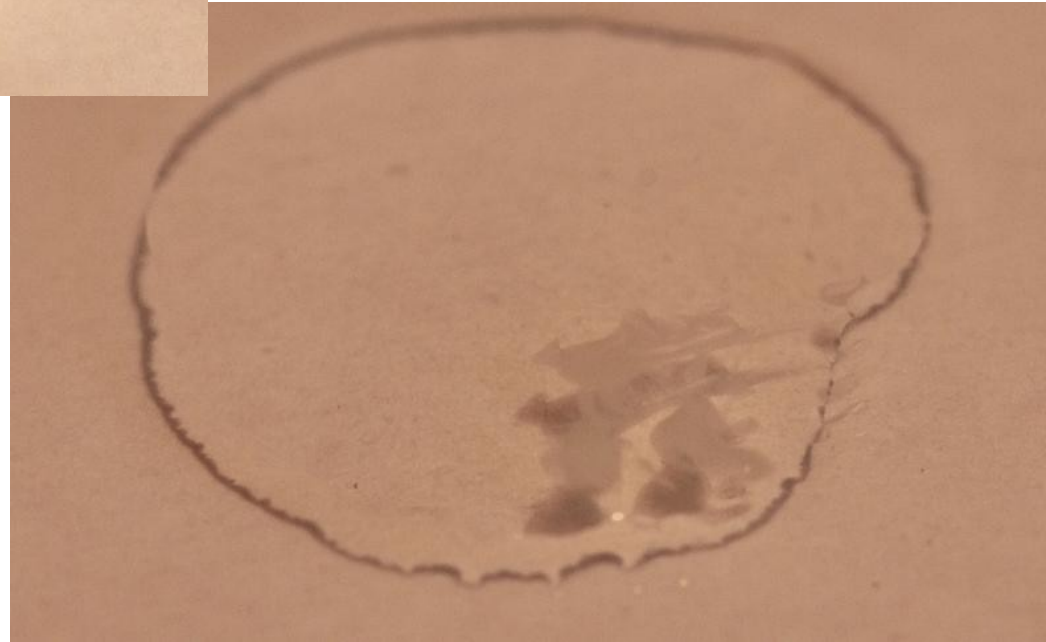


Foto: Veronika Holá



Popis kolonií na KA

- Popis kolonií nemá konkrétní místo ve schématu algoritmu diferenciální diagnostiky stafylokoků. Přesto je užitečné si jej udělat. Můžeme „pojmout podezření“: například stafylokoky mívají oproti streptokokům bělejší (případně žlutavější) kolonie. Takové podezření je ovšem potřeba ověřit.

Odlišení stafylokoků od jiných G+ koků



- Ve směsi se stafylokok prozradí růstem na KA s 10 % NaCl, ostatní G+ koky tu nerostou
- Máme-li čistý kmen, odhalíme stafylokoka i rychleji než kultivací na KA s 10 % NaCl a to katalázovým testem (kolonie vmícháme do kapky peroxidu vodíku). Pokud šumí, je to stafylokok

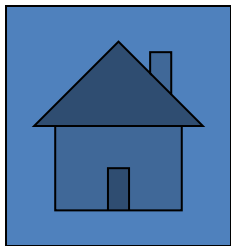
Pozor! Kdybychom přeskočili předchozí kroky, udělali bychom špatně. Pozitivní katalázu má spousta bakterií. Relativně průkazná je jen tehdy, víme-li, že náš kmen je G+ kok

Přehled diagnostiky (zjednodušeně)



(nebo další testy)

Enterococcus či



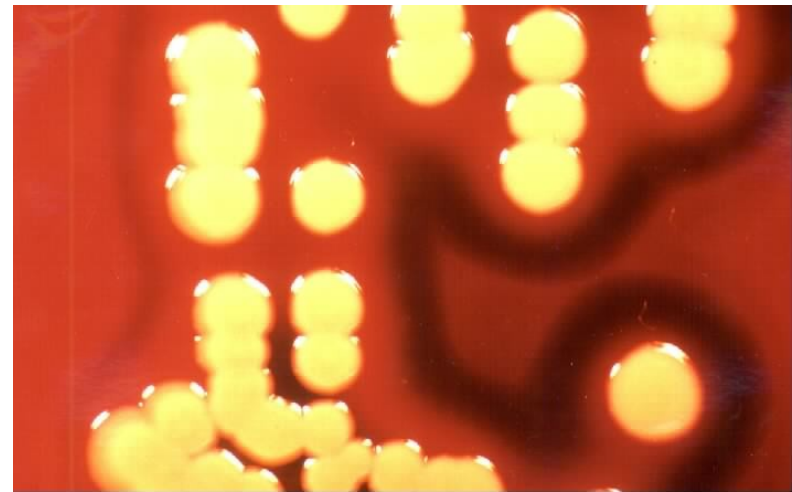
Diferenciální diagnostika
stafylokoků II: kroky
uvnitř rodu
„Staphylococcus“

Rozlišení podezřelých stafylokoků (diferenciální diagnostika 2)

- Volná plasmakoaguláza je pozitivní u zlatého stafylokoka, negativní u koaguláza negativních, proto se tak také jmenují
- Clumping factor neboli vázaná plasmakoaguláza se používá stejně, ale je méně spolehlivá
- Komerční testy na bázi antigenní analýzy jsou naopak velmi spolehlivé
- Hyaluronidáza je nejen spolehlivá, ale i levná

Méně spolehlivé testy: hodí se při pátrání, ale „nejsou důkazem pro soud“

- **Hemolýza:** Koaguláza negativní stafylokoky mohou produkovat jen delta hemolyzin, zlaté i alfa a beta, mívají proto mnohem výraznější hemolýzu
- **Nazlátlé zbarvení kolonií** a jejich větší průměr může také napovědět
- **Větší shluky v mikroskopii** jsou také typické pro zlaté stafylokoky



Clumping factor neboli také vázaná plasmakoaguláza – rychlé

- Kolonie se vmíchají do kapky králičí plasmy na podložním sklíčku
- Pozitivita se projeví jako tvorba „chuchvalců“ v kapce plasmy (viz obrázek na další obrazovce)
- Nejde vlastně o KOAGULACI, ale o AGLUTINACI plasmy
- Test není příliš spolehlivý

Clumping-Factor positiv



<http://memiserf.medmikro.ruhr-uni-bochum.de>

Clumping-Factor negativ



Volná koaguláza – klasika

- Nejklasičtější z testů pro odlišení zlatého stafylokoka (koaguláza pozitivního stafylokoka)
- Kličkou nabrané kolonie vmícháme do králičí plasmy ve zkumavce
- Pokud plasma koaguluje (má konzistenci želé), je kmen koaguláza pozitivní

Pozitivní a negativní plasmakoaguláza

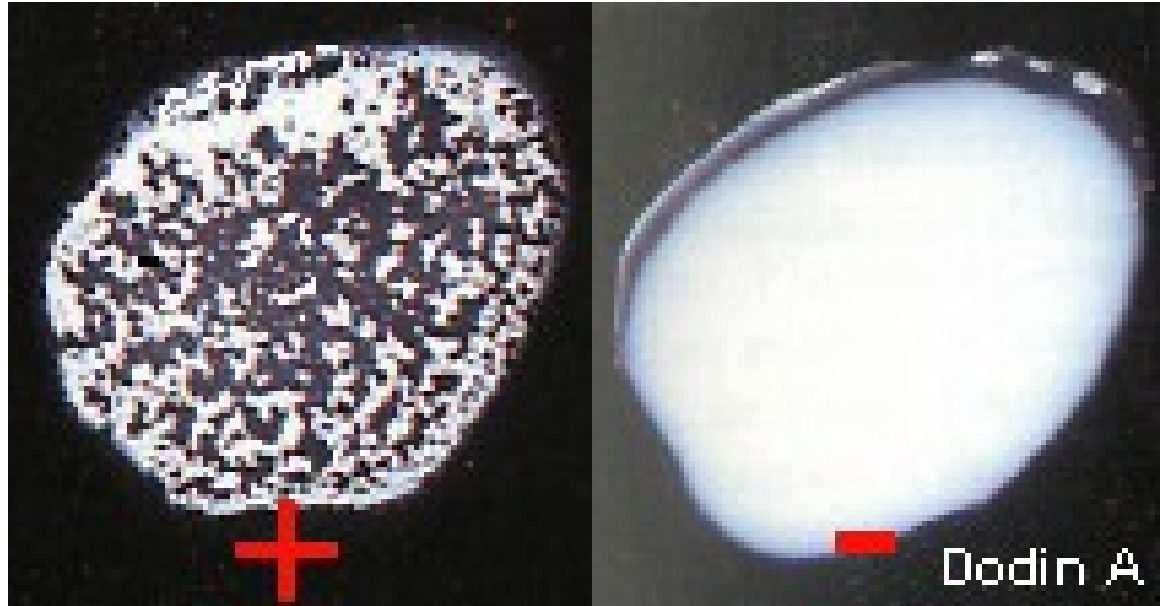
<http://microbiology.scu.edu.tw>

- **První zkumavka – pozitivní** (gel, při naklonění nemění tvar)
- **Druhá a třetí zkumavka = negativní** (tekutina, při naklonění si uchovává vodorovnou hladinu)



Komerční testy, např. Staphaurex (v praxi je neprovádíme)

- Provedením připomínají clumping factor, ale jsou spolehlivější než volná plasmakoaguláza
- Jsou bohužel relativně dražší oproti předchozím

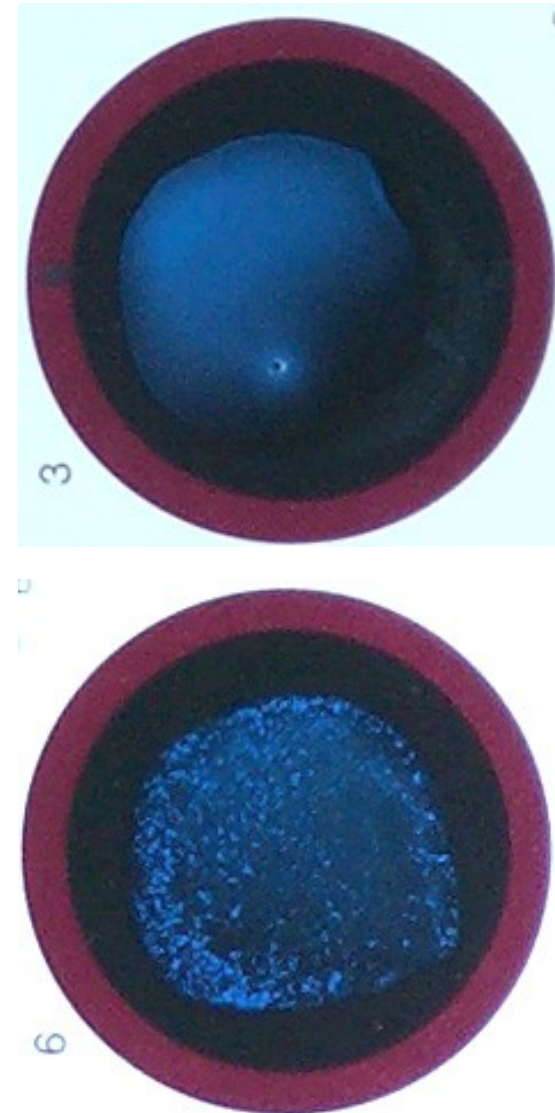


Souprava Staphaurex a výsledky

<http://www.pathologyinpractice.com>



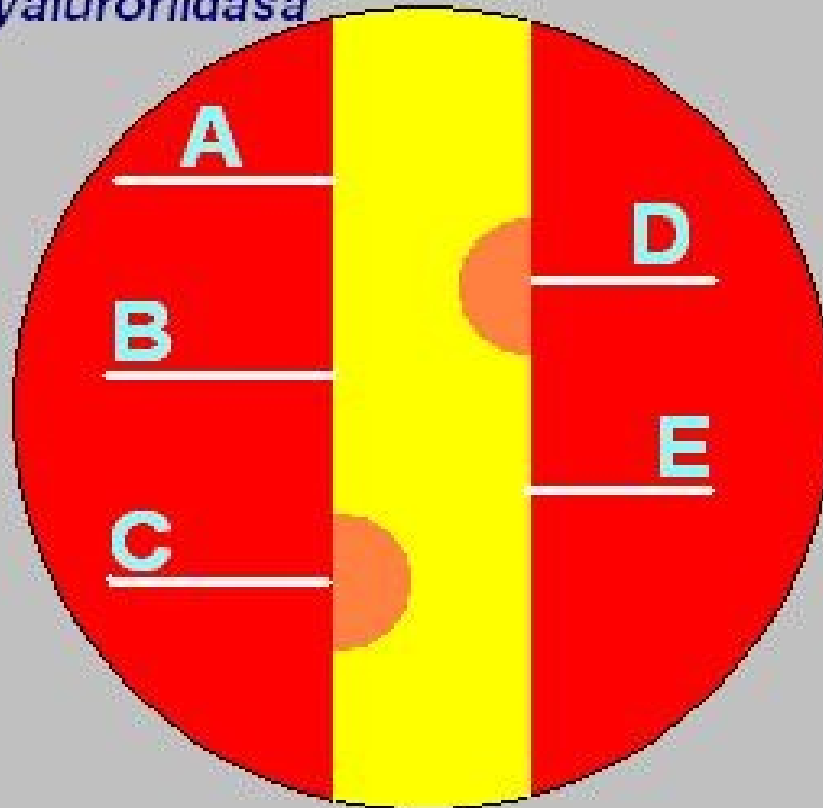
www.microbes-edu.org



Hyaluronidáza (test dekapulace – „odpouzdrění“)

- Elegantní test, jehož principem je skutečnost, že hyaluronidáza, produkovaná zlatým stafylokokem (ne však koaguláza negativními stafylokoky) rozpouští pouzdro (kapsulu) opouzdrěných bakterií. Používá se druh streptokoka *Streptococcus equii*, pro člověka nepatogenní
- Ztráta pouzdra se projeví změnou vzhledu streptokoka (ztráta „hlenovitosti“)

Hyaluronidasa



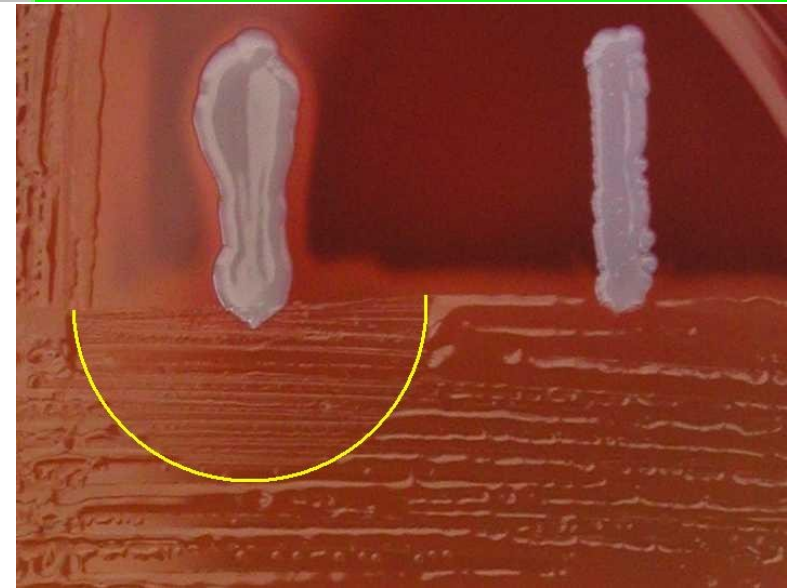
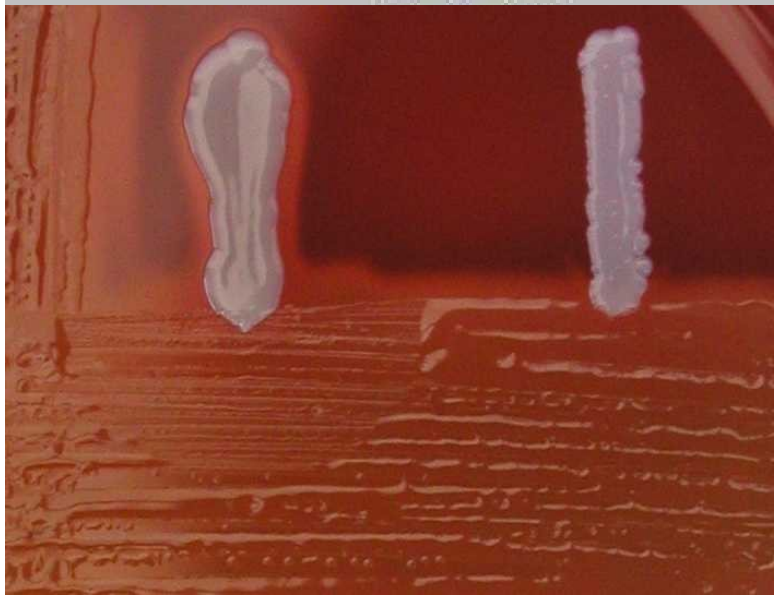
Žlutě "soplovitý" nárůst,
oranžově suché kolonie.

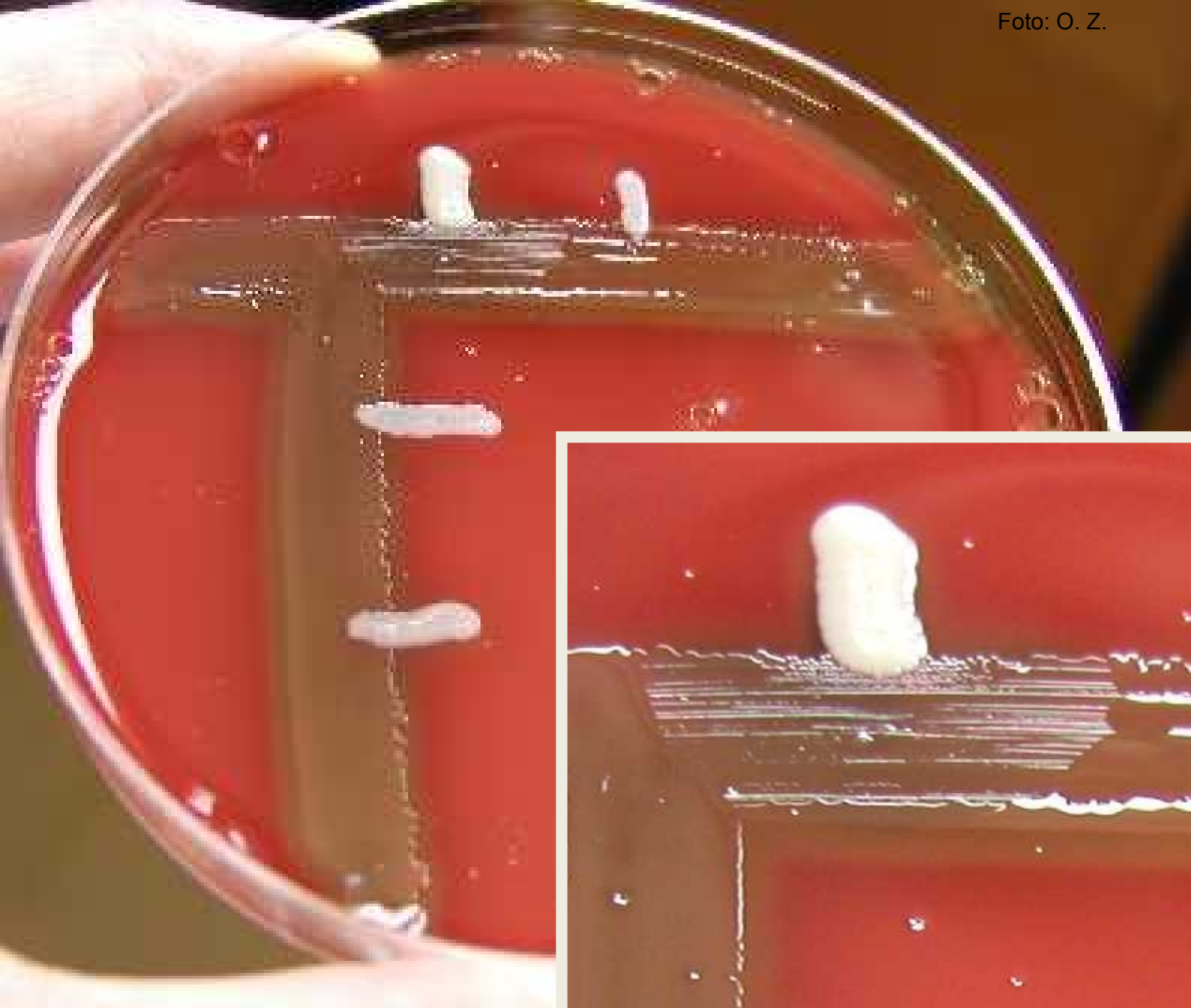
Bíle testované kmeny
stafylokoků.

Hodnocení:

Kmeny C, D patří k druhu
Staphylococcus aureus

Kmeny A, B, E patří mezi
koagulázanegativní
stafylokoky





Shrnutí testů k odlišení *S. aureus*

- **Clumping faktorový test:** kolonie se vmíchají do kapky králičí plasmy na podložním sklíčku, pozitivní je aglutinace
- **Plasmakoagulázový test:** kolonie se vmíchají do kapky králičí plasmy ve zkumavce, pozitivní je koagulace (koagulovaná tekutina). Odečítá se orientačně po 4 h a spolehlivě až po 24 h.
- **Hyaluronidázový test:** K testovacímu opouzdřenému kmeni (koňský *Streptococcus equi*) se přiočkují testované kmeny. Pozitivní je kmen, který „rozpouští slizovitost“ pásu streptokoka (zbavuje ho pouzdra)

Obávaný „zlatý“ to není: a co teď?

- Ve většině případů se spokojíme s tím, že jde o koaguláza negativního stafylokoka a **netrváme na druhovém určení**
- Pokud na druhovém určení trváme (např. u hemokultur), lze je provést **biochemicky**
 - V našich podmínkách se nejčastěji používá **STAPHYtest 16** (Erba-Lachema)

Vzájemné rozlišení stafylokoků




















































- STAPHYtest 16 je tedy v Česku nejběžnější test k biochemickému určení (zejména koaguláza negativních) stafylokoků
- Za normálních okolností zlaté stafylokoky STHAPHYtestem neurčujeme, stačí nám testy dříve popsané, popřípadě komerční testy

STAPHYtest 16 – jak ho odečíst

- Pozor – i když se jmenuje STAPHYtest 16, zahrnuje ve skutečnosti 17 reakcí. Jako první se odečítá test VPT ve zkumavce. Červená tekutina ve zkumavce = pozitivní VPT, bezbarvá tekutina = negativní
- První řádek STAPHYtestu = 2.–9. reakce
- Druhý řádek STAPHYtestu = 10.–17. reakce
- Vypočítejte kód a porovnejte s kódovníkem
- Kód je šestimístný. Prvních pět číslic je ze trojic testů, šestá číslice je z posledních dvou

Příklad výsledku

(703 651 = *S. aureus*, 99,8 %, $T_{in}=1,00$)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	
	Zkum	H	G	F	E	D	C	B	A	H	G	F	E	D	C	B	A	
	Zkum	První řádek panelu								Druhý řádek panelu								
+																		
-																		
?																		
	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	-	
	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	
	7			0			3			6			5			1		

Jiný příklad výsledku

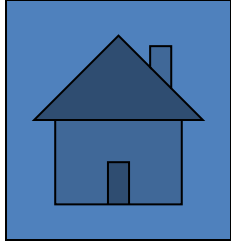
(703 241 = *S. epidermidis*, 97,95 %, $T_{in}=1,00$)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
	Zkum	H	G	F	E	D	C	B	A	H	G	F	E	D	C	B	A
		První řádek panelu								Druhý řádek panelu							
+																	
-																	
?																	
	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	+	+	-
	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2
	7			0			3			2			4			1	

Api Staph – zahraniční obdoba našich STAPHYtestů 16

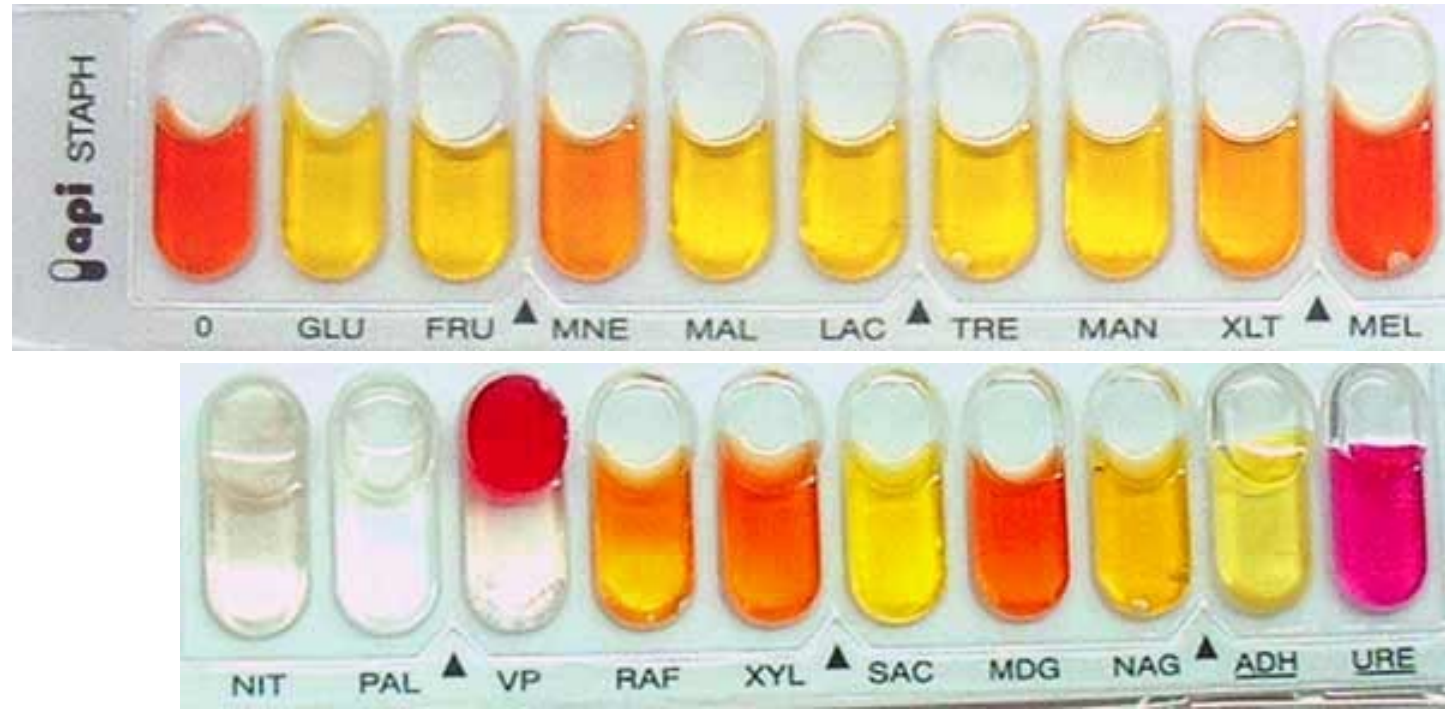
- Bez ohledu na provenienci konkrétního testu zůstává princip stejný – kombinace většího počtu enzymatických reakcí, které se projeví změnou zbarvení reakčního důlku





Jiná varianta testu API-Staph

- Na předchozím obrázku byl API-Staph pro automatické odečítání ve fotometru, tato varianta je pro „okometrické“ odečítání



Testování antibiotické citlivosti a antibiotická léčba stafylokokových infekcí

Léčba stafylokokových infekcí

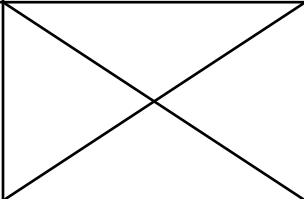
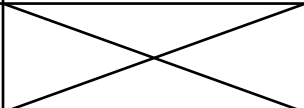
- U stafylokoků je lékem volby **oxacilin**, u močových infekcí **cefalosporiny první generace**. Oblíbené **makrolidy** jsou na místě jen u alergických osob, **linkosamidy** mají význam u infekcí pohybové soustavy a **aminoglykosidy** raději jen v kombinaci. **Glykopeptidová antibiotika (vankomycin a teikoplanin)** jsou v rezervě. Používají se u kmenů rezistentních na oxacilin, takzvaných **MRSA** a **MRSKN**. Pokud by byl stafylokok rezistentní i na ně, nebo pokud pacient toxické glykopeptidy nemůže užít, lze také použít linezolid.

Testování antibiotické citlivosti

- Lékem volby pro infekce *S. aureus* je obecně **oxacilin**, ale existují výjimky:
 - **Linkosamidy** se používají pro stafylokokové infekce kostí, protože mají dobrý průnik do kostní dřeně
 - **Cefalosporiny** první či druhé generace se používají pro močové infekce, protože lépe pronikají do močového systému než oxacilin
 - **Makrolidy a tetracykliny** je třeba nechat jako druhou volbu (pro alergické pacienty).
 - **Vankomycin či linezolid** spíše pro infekce způsobené kmeny MRSA nebo koagulázanegativními stafylokoky
- K ověření sekundárních rezistencí zpravidla používáme **difusní diskový test** – změříme zóny a porovnáme s referenčními zónami

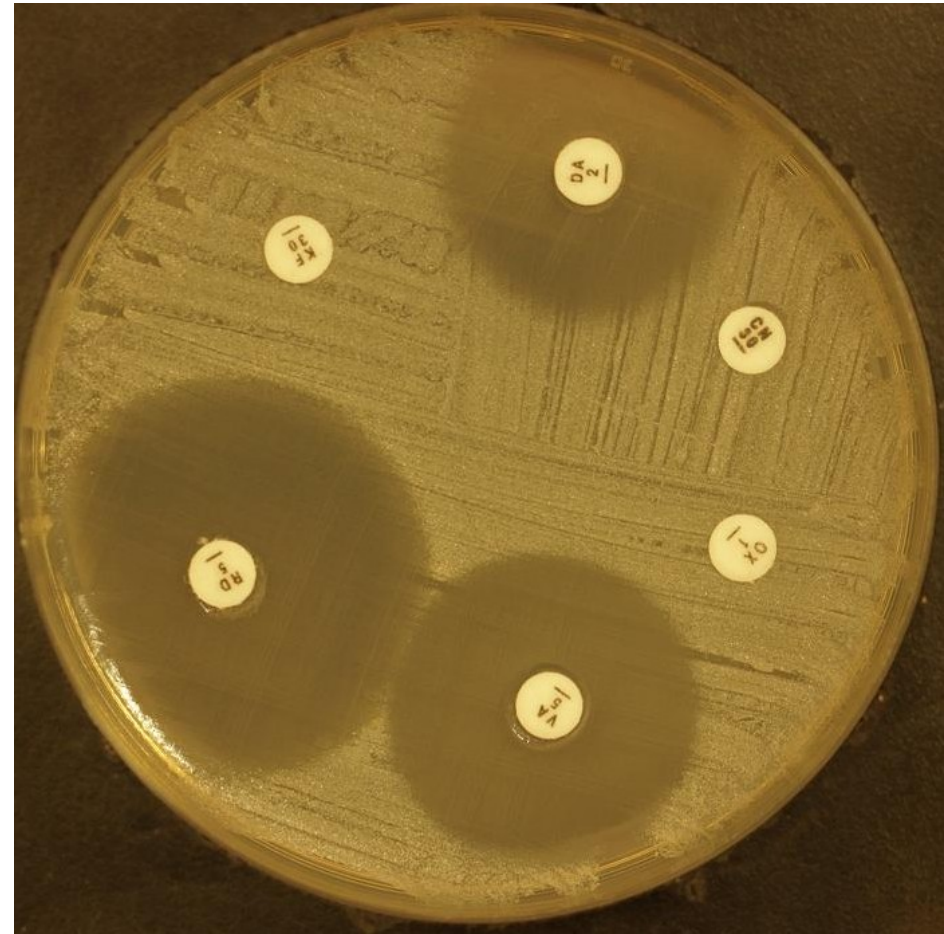
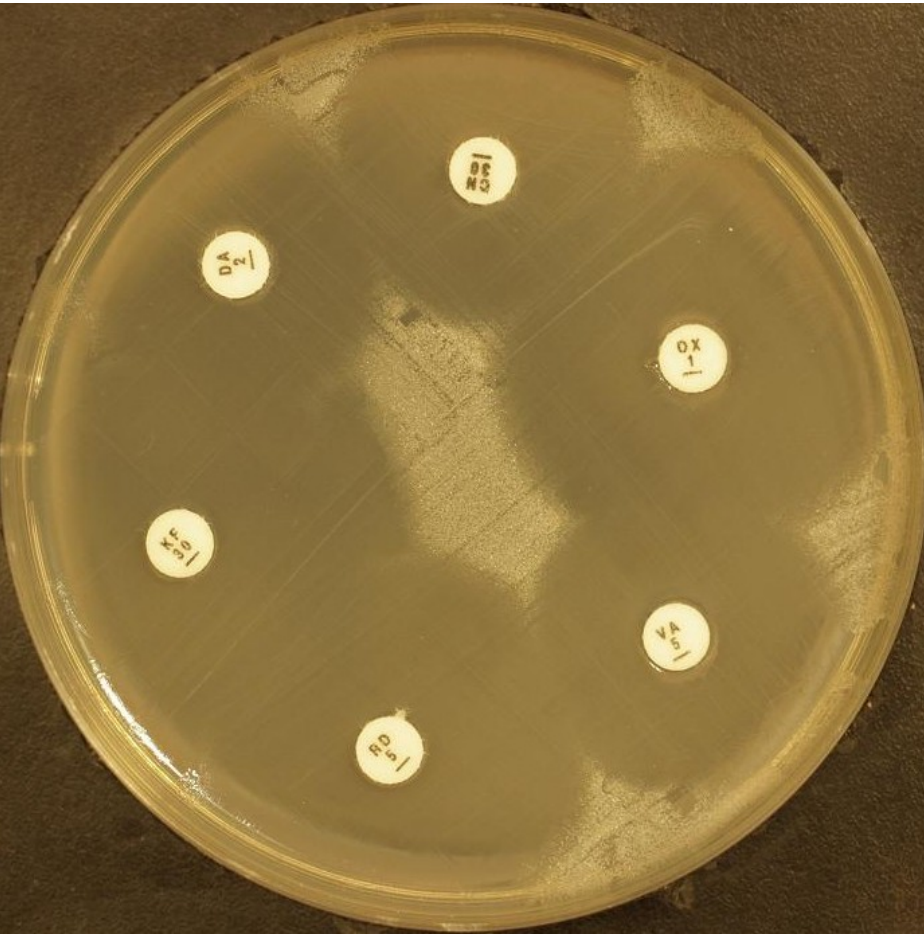
Pochopitelně se testují pouze kmeny považované za patogeny (= nikoli kmeny stafylokoků, představující součást normální mikroflóry člověka, náhodný nálezný či kontaminaci)

Zóny citlivosti některých běžných protistafylokokových antibiotik

Antibiotikum	Zkr.	„C“ je-li \geq než (mm)	„I“ je-li mezi (mm)	„R“ je-li $<$ než (mm)
Cefoxitin (cefalosporin); interpretace: oxacilin a další	CXT	\geq 22/25*		22/25* *
Erythromycin (macrolid)	E	\geq 21	18–20	$<$ 18
Clindamycin (linkosamid)	DA	\geq 22	19–21	$<$ 19
Ko-trimoxazol (směs)	SXT	\geq 17	15–16	$<$ 15
Tetracyklin (tetracyklin)	TE	\geq 22	19–21	$<$ 19
Chloramphenikol	C	\geq 18		$<$ 18

*CXT: 22 mm *S. aureus*, 25 mm koagulázanegativní stafylokoky

Test citlivosti u zlatého a koagulázanegativního stafylokoka (zlatý stafylokok je citlivější)



Kvalitativní a kvantitativní testy

- Zpravidla tedy používáme kvalitativní testy (difusní diskový test). Lze však použít i kvantitativní testy (např. mikrodiluční test nebo E-test). Konkrétní provedení může být různé.



Podle situace
používáme buď

←kvalitativní, nebo

kvantitativní testy →



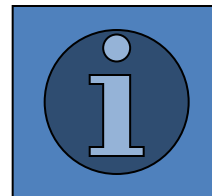
Obvyklé pravidlo:

horší patogen – lepší citlivost

- Při srovnání výsledků testů citlivosti lze často zaznamenat, že horší patogen (zde zlatý stafylokok) je zpravidla citlivější než mírnější patogen (koaguláza negativní stafylokok). Toto pravidlo je logické: menší patogenita je znakem adaptace, schopnosti mikroba koexistovat s námi a nevyvolávat u člověka chorobný stav. → přivyknutí mimo jiné i antibiotikům, která používáme.
- Neplatí ovšem vždycky! Jsou výborně citlivé kmeny *S. epidermidis*, a jsou rezistentní kmeny MRSA.

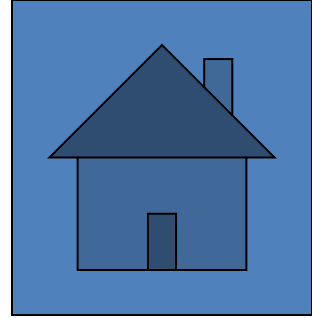
MRSA a jejich detekce

- Meticilin rezistentní stafylokoky (MRSA) jsou epidemiologicky závažné kmeny, často způsobující nozokomiální infekce
- Příčinou je změna tzv. penicillin binding proteins (PBP)
- Na problém upozorní malá zóna u oxacilinu. Ta však může být způsobena i jinými vlivy
- Za průkazné se považuje, je-li malá zóna nejen u oxacilinu, ale i u cefoxitinu
- Bonus v e-learningové verzi prezentace: rozšířené informace o MRSA zde →



Konec této části

www.osel.cz



Oběť
stafylokokové
infekce

Zpět na hlavní obsah prezentace

BONUSY

MRSA a jiné
epidemiologicky
významné kmeny

Meticilin rezistentní stafylokoky (MRSA): více informací



Historie MRSA

- **Původně** byly i stafylokoky **citlivé na penicilin**, brzy však získaly rezistenci betalaktamázového typu
- **Meticilin poprvé použit 1959**, o něco později byl použit příbuzný oxacilin (z různých důvodů ho používáme raději než původní meticilin)
- První **výskyt MRSA** zaznamenán roku 1961, tehdy byl ovšem ojedinělý. Dnes se podíl MRSA na celkové populaci stafylokoků pohybuje v USA a většině evropských zemí v desítkách procent (vizte mapu na další stránce)
- Podkladem je alterace „penicillin binding proteins“. Kmeny MRSA jsou rezistentní na všechny betalaktamová antibiotika s výjimkou zcela nové 5. generace cefalosporinů (*ceftarolin*)

MRSA jako medicínský problém

- Stárnutí populace
- Používání imunomodulační terapie
- Používání nitrožilních katetrů a nitrotělních implantátů
- Používání (a nadužívání antibiotik)

To vše jsou predisponující faktory, které ovlivňují riziko výskytu (nejen) MRSA

MRSA není virulentnější než jiný kmen *S. aureus*

- Oproti vžitě představě je potřeba si uvědomit, že z hlediska schopnosti vyvolat infekci se **kmeny MRSA chovají úplně stejně jako kterýkoli jiný zlatý stafylokok**. Rezistence k oxacilinu není faktorem virulence kmene!
- Nejsou více, ale ani méně virulentní než jiné.



Staphylococcus aureus (MRSA)



Není MRSA jako MRSA

- Mezi kmeny MRSA existují velké vzájemné rozdíly
- Existuje **populace tzv. EMRSA** – epidemických MRSA, které se vyskytují především jako nemocniční kmeny. Jsou často polyrezistentní a například rezistence k erytromycinu je u nich téměř vždy doprovázena i rezistencí k linkosamidům
- Naopak existují tzv. **komunitní kmeny MRSA**, které jsou většinou dobře postižitelné i běžnými nebetalaktamovými antibiotiky. V našich podmínkách zatím stále převažují.

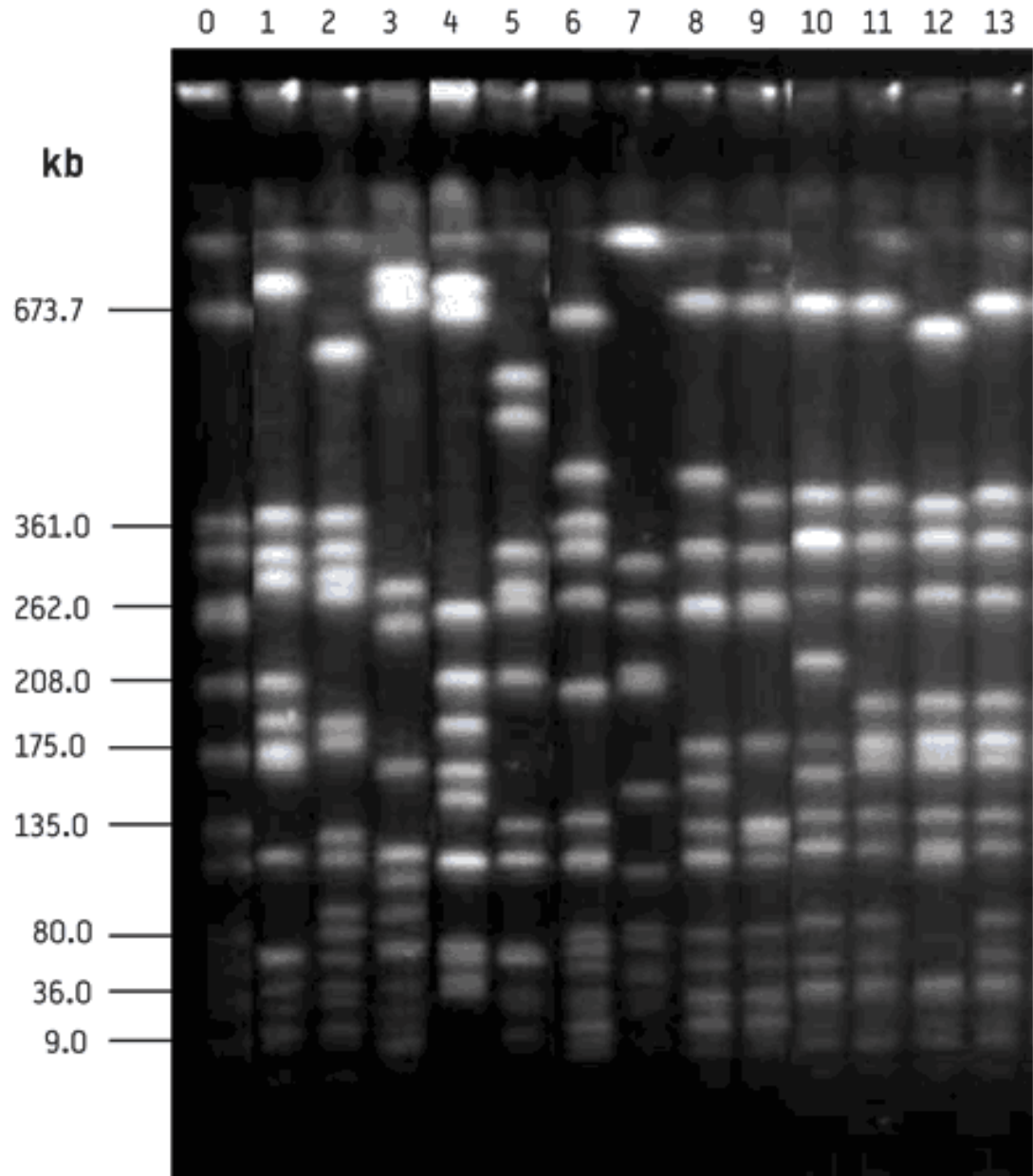
Rozdíly lze zmapovat i PFGE

Srovnání

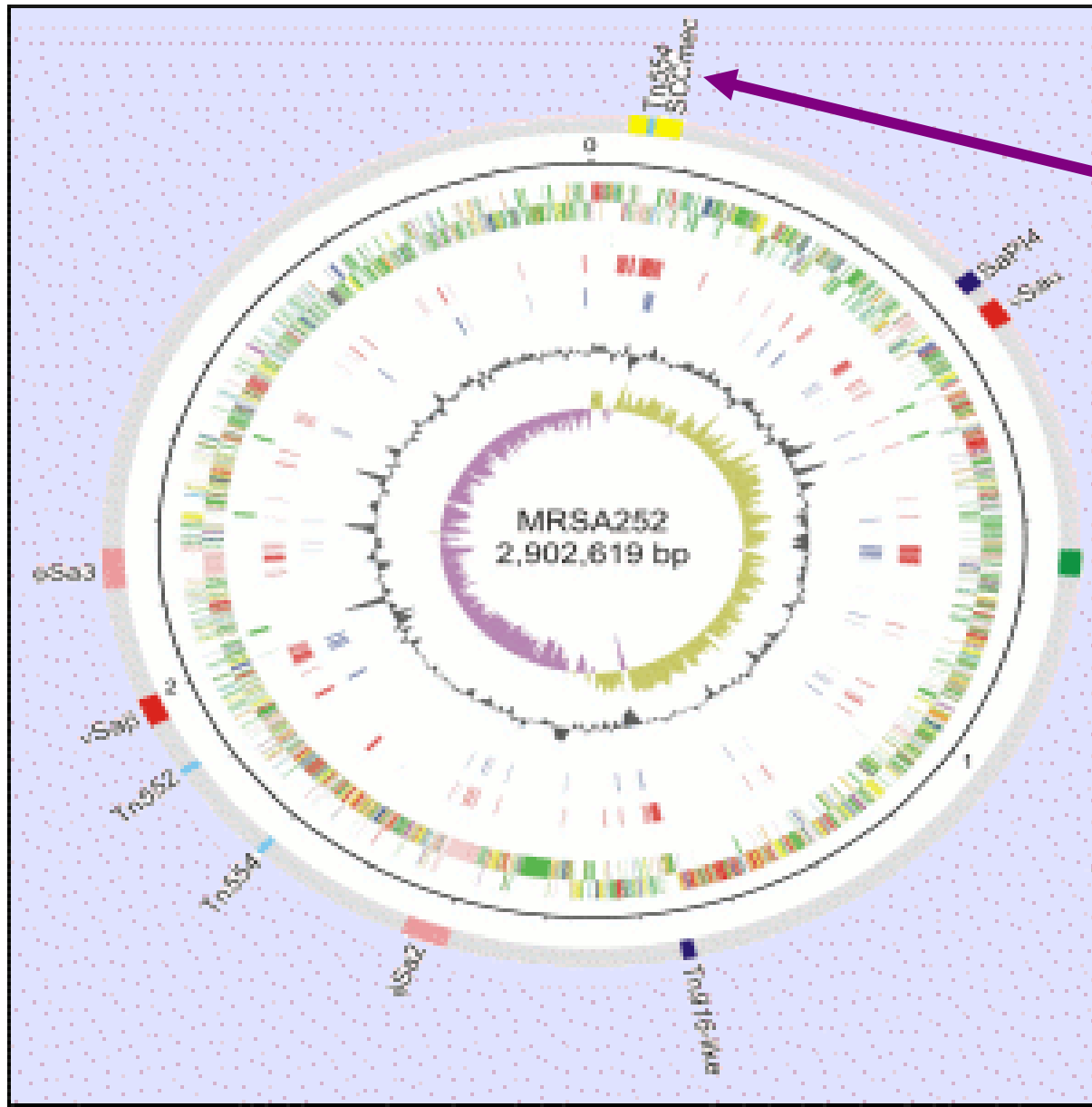
komunitních a nemocničních kmenů a kmenů od koní metodou PFGE ukazuje na časté podobnosti, ale i značné rozdíly mezi kmeny.

Zdroj:

<http://www.eurosurveillance.org/em/v11n01/1101-227.asp>



Genom jednoho z kmenů MRSA



gen *mec*,
podmiňující
rezistenci

Rozdíly jsou i v citlivosti na další atb

- Zde jsou dokumentovány tři populace kmenů s různými vzorci rezistence

TABLE

Characterisation of MRSA of MLST ST254 from infections in horses in VUW compared with healthcare-associated MRSA of MLST ST254 from humans and to MRSA from infections in horses, Canada

Origin	MLST	No. of isolates investigated	Resistance phenotypes	Resistance genes	PCR characterisation of SCCmec-elements
Horses, VUW	254	5	PEN, OXA, TET, GEN, TMP	mecA, tetM, aac6 ⁺ -aph2 ⁺	IVd
Humans	254	5	PEN, OXA, ERY, CLI, TMP	mecA, ermA	IVc
Horses, Canada	8	1	PEN, OXA, ERY, CLI, GEN, OTE	mecA, ermC, aac6 ⁺ -aph2 ⁺ , tetM	IV

<http://www.eurosurveillance.org/em/v11n01/1101-227.asp>

Aktuální situace v Brně

- Vyskytují se **sporadické případy MRSA** ve všech nemocnicích, občas se vyskytne kmen MRSA i u ambulantního pacienta. Celkově v naší laboratoři tvoří kmeny MRSA 8 až 9 % všech diagnostikovaných zlatých stafylokoků (2011–12)
- Naštěstí zpravidla **nedochází k významnějším epidemickým výskytům**, zejména díky obecnému povědomí o nutnosti dodržovat pravidla pro ošetřování pacientů s MRSA
- Některé kmeny jsou **dobře citlivé na jiná antibiotika**, pouze část kmenů je polyrezistentních

MRSA – přístup k výskytu

- Protistafylokoková **vakcinace** (u nás se neužívá)
- Eliminace **nosního nosičství zlatého stafylokoka** (pouze u indikovaných osob, např. před chystanými operacemi)
- Opatření k redukci **infekce žilních vstupů**
- Omezení používání **dialyzačních kanyl**
- Opatření k omezení **katetrových infekcí**, zejména u pacientů s hemodialýzou a peritoneální dialýzou

Podle www.ndt-educational.org/goldsmithslide.asp

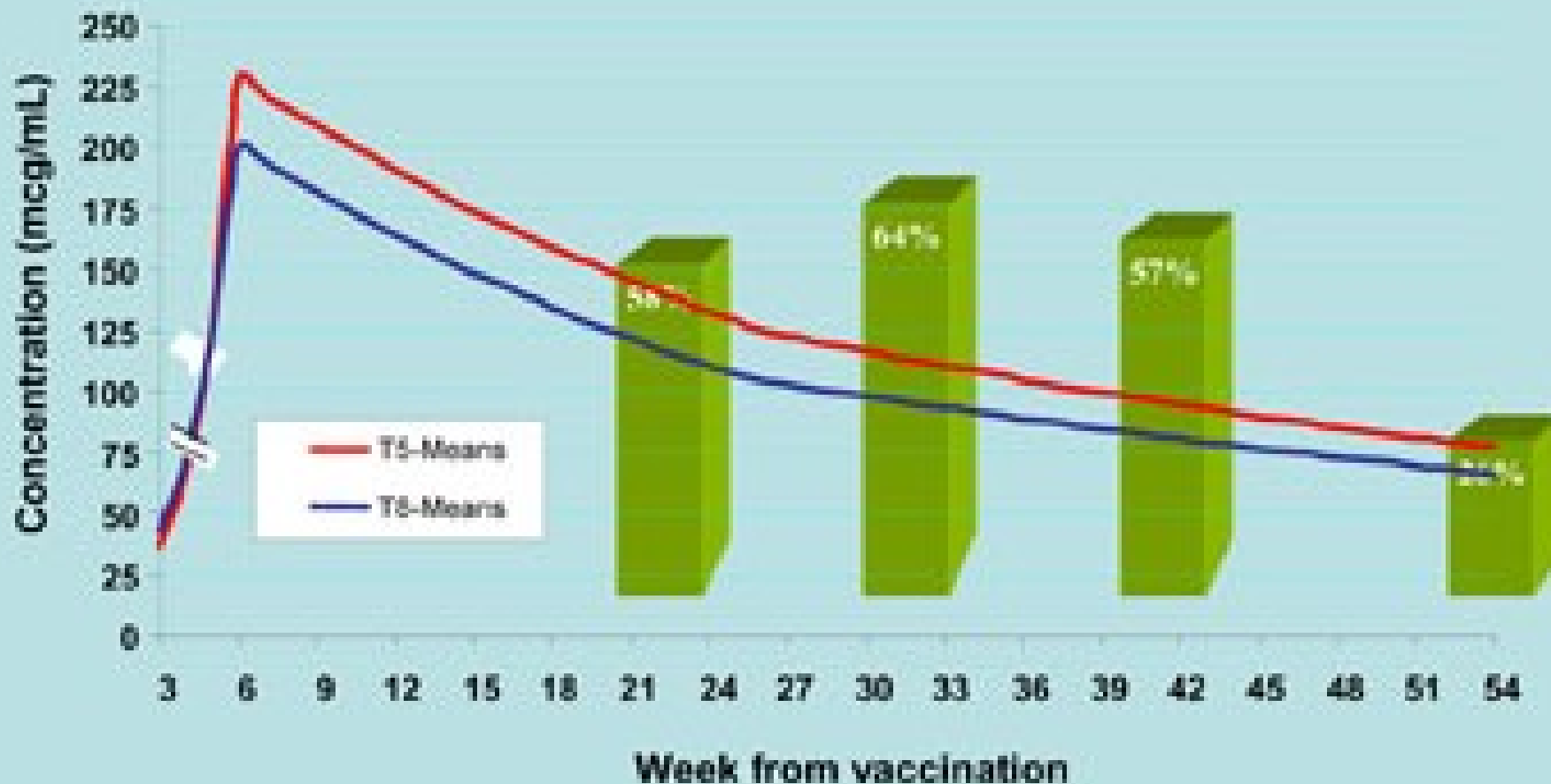
Vakcinace

- Dle informací z internetu (viz předchozí obrazovka) jediná dávka vakcíny **signifikantně redukuje riziko bakteriémie** v příštích deseti měsících, a to nejvíce u nosních nosičů
- Vakcína je **dobře tolerována**, a to i u starších a oslabených
- Kromě komerčně dostupných vakcín lze použít i autovakcíny od pacienta – to jediné by se případně někdy použilo i v našich podmínkách

Vakcinace – úspěšnost

www.ndt-educational.org/goldsmithslide.asp

85 % of patients responded to the vaccine

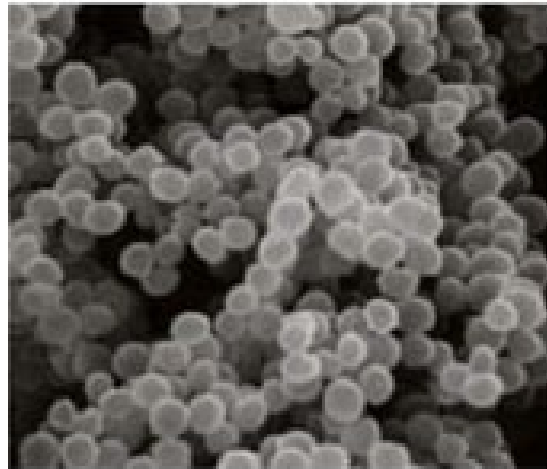


Eliminace nosního nosičství

- Má smysl pouze krátkodobě, např. před výkonem, a nelze použít celkově působící látky
- Eradikace nosního nosičství má jen **omezenou účinnost** a je obvykle jen **dočasná**
- Záleží také **na predispozici té které osoby být nosičem** (trvalým, či jen přechodným)
- Provádí se **lokálními antiseptiky**, především **mupirocinem**
- *Dobré výsledky má údajně také použití extraktů z medu včel, pasoucích se na jisté australsko-novozélandské bylině*

Prevence infekce žilních vstupů

- I při ošetřování žilních vstupů lze použít antibiotika např. mupirocin např. jodové apod.



www.ndt-educational.org/goldsmithslide.asp



Omezení katetrových sepsí

- **Proplachování hemodialyzačních katetrů** např. směsí gentamicinu s heparinem či gentamicinu s citrátem („antibiotic lock“)
- Používání katetrů **napuštěných určitým antibiotikem**
- Spolupráce mikrobiologů a makromolekulárních chemiků při vývoji **nových plastů**, které nepodporují tvorbu biofilmu
- Při výběru nových katetrů by měl spolupracovat i mikrobiolog (na Homolce to takto funguje)

Hlášení a identifikace kmene

- Všechny suspektní kmeny MRSA musí být pečlivě ověřeny a v případě positivity se **hlásí** jednak na oddělení, jednak ústavním epidemiologům
- Součástí komunikace mikrobiologie s oddělením je konzultace vhodné a dostatečně dlouho trvající **léčby infekce** (jde-li o infekci a ne jen kolonizaci)
- V případě výskytu kmene MRSA na oddělení se přistupuje k zavedení opatření, jejichž cílem je **zamezit přenesení infekce na další pacienty**

Opatření na oddělení



www.daikoh.net/service/creansysstem.html.

Čím léčit?

- U komunitních kmenů MRSA lze použít i ta **nebetalaktamová antibiotika**, na která je kmen in vitro citlivý (makrolidy, tetracykliny, ko-trimoxazol)
- U polyrezistentních kmenů je nutno použít **glykopeptidová antibiotika** (vankomycin, teikoplanin). S tím také souvisí požadavek nepoužívat tato antibiotika zbytečně, aby zůstala zachována citlivost alespoň na tato antibiotika
- U rezistence na glykopeptidy, či jejich kontraindikace z důvodu stavu pacienta, případně dalších zvláštních případů (kmeny prodující Panton-Valentinův leukocidin) lze použít **linezolid** či některé z dalších nových antibiotik

Nová antibiotika

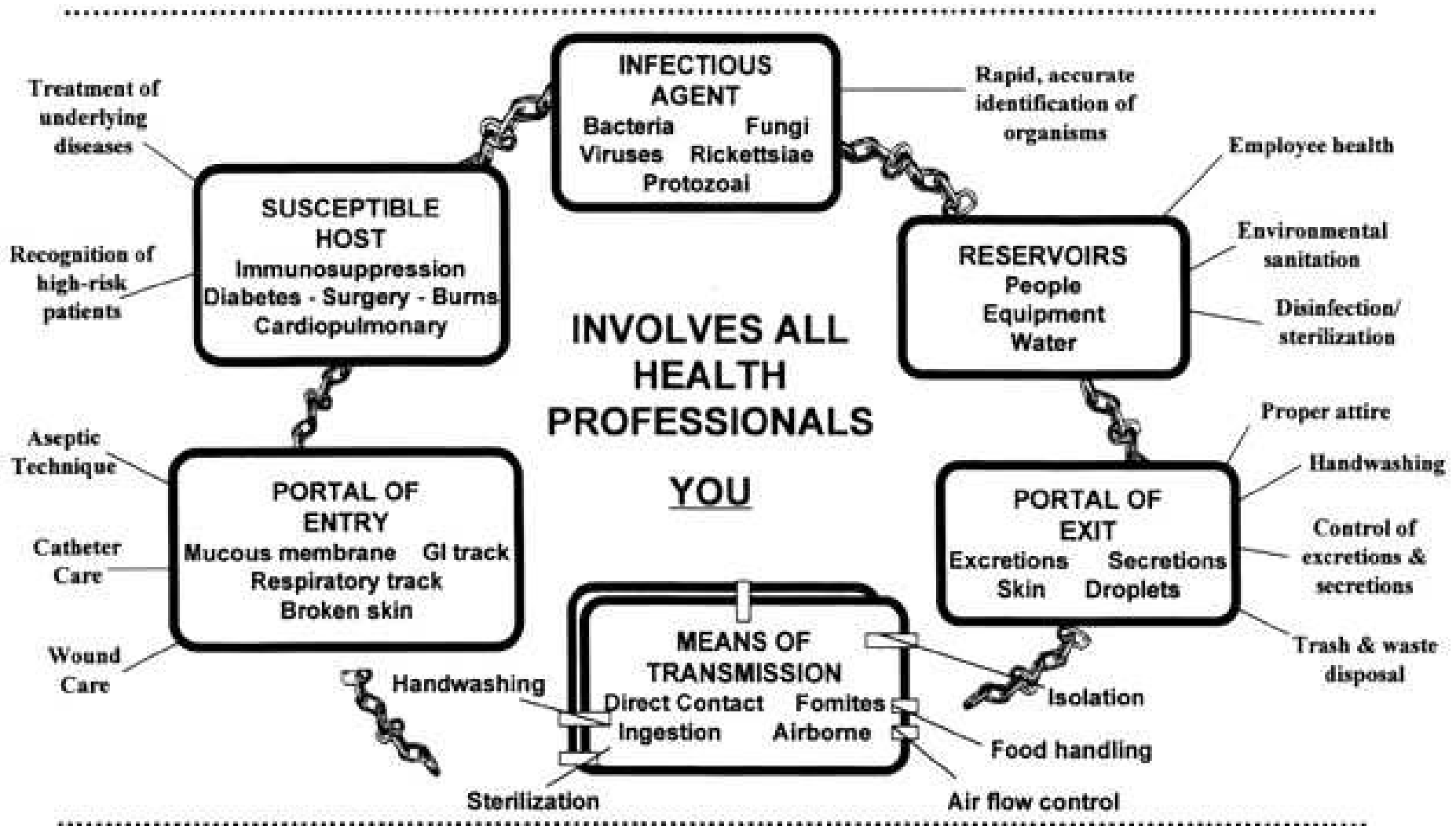
- Streptograminová kombinace
quinupristin/daflopristin (Synercid)
- Lipopeptid daptomycin
- Nové glykopeptidy – oritavancin, dalbavancin
- Glykolipodepsipeptid – ramoplanin

U glykopeptidů a jim příbuzných látek lze ale očekávat vývoj rezistence i v souvislosti s užíváním stávajících glykopeptidů

Hygienická pravidla

- Nutno **přerušit řetězec nákazy**
- Izolace pacienta **nesmí znamenat přerušení jeho společenských kontaktů** (etické zásady!)
 - návštěvy ovšem musí stejně jako personál dodržovat pravidla bariérového kontaktu
- Existuje **doporučený postup pro MRSA**, který je dostupný na www.cls.cz, přičemž jednotlivá zdravotnická zařízení zpravidla mají svoje lokalizovaná pravidla

BREAKING THE CHAIN OF INFECTION



Jak si mýt ruce

Technika mytí
rukou je
neobyčejně
podstatnou částí
prevence výskytu
MRSA a NN
vůbec



Vyšetřování na MRSA

- U indikovaných pacientů se odebírá zpravidla **výtěr z nosu a stěr z perinea**, případně též z rány či jiného místa (tracheostomie apod.), kde lze předpokládat přítomnost MRSA
- U takovýchto pacientů se také zpravidla provádí pravidelný **screening během celé hospitalizace**
- **Indikovaní pacienti** = pacienti, kteří měli MRSA, přícházení z oddělení, kde se MRSA vyskytla, nebo přicházejí k provedení rizikové operace (pak není ani nutná „nebezpečná anamnéza“)

Management nemocnice a MRSA

- V rámci nemocnice musí být vytvořen **system, který dopředu určuje postupy ve všech situacích** souvisejících s možným výskytem MRSA
- Zpravidla existují dva týmy
 - **koncepční tým** (který zahrnuje ředitelství nemocnice, vedení oddělení či klinik apod.): určují dlouhodobé trendy a směřování opatření sloužících k potlačení MRSA a nozokomiálních infekcí vůbec
 - **výkonný tým** (epidemiolog, mikrobiologové, „styční důstojníci“ klinik) – řeší konkrétní aktuální případy

Konec bonusového materiálu



WHAT IS MRSA?

METHICILLIN-RESISTANT STAPHYLOCOCCUS AUREUS (MRSA)

is a bacterium that causes infections in different parts of the body. It's tougher to treat than most strains of staph because it's resistant to some commonly used antibiotics.

CAUSES MRSA?

Garden-variety staph is common bacteria that can live in our bodies. Plenty of healthy people carry staph without being infected by it. In fact, 25%-30% of us have staph bacteria in our noses.

However, staph can be a problem if it manages to get into the body, often through a cut. Once there, it can cause an infection. Staph is one of the most common causes of skin infections in the U.S. Usually, these are minor and do not need special treatment. Less often, staph can cause serious problems like infected wounds or pneumonia.

SYMPTOMS

The symptoms of MRSA depend on where you are infected. Most often, it causes mild infections on the skin, like sores or boils. It can also cause more serious skin infections or infect surgical wounds, the bloodstream, the lungs, or the urinary tract. Staph skin infections, including MRSA, generally start as small red bumps that resemble pimples, boils or spider bites. These can quickly turn into deep, painful abscesses that require surgical draining. Sometimes the bacteria remain confined to the skin.



WHEN TO SEE A DOCTOR

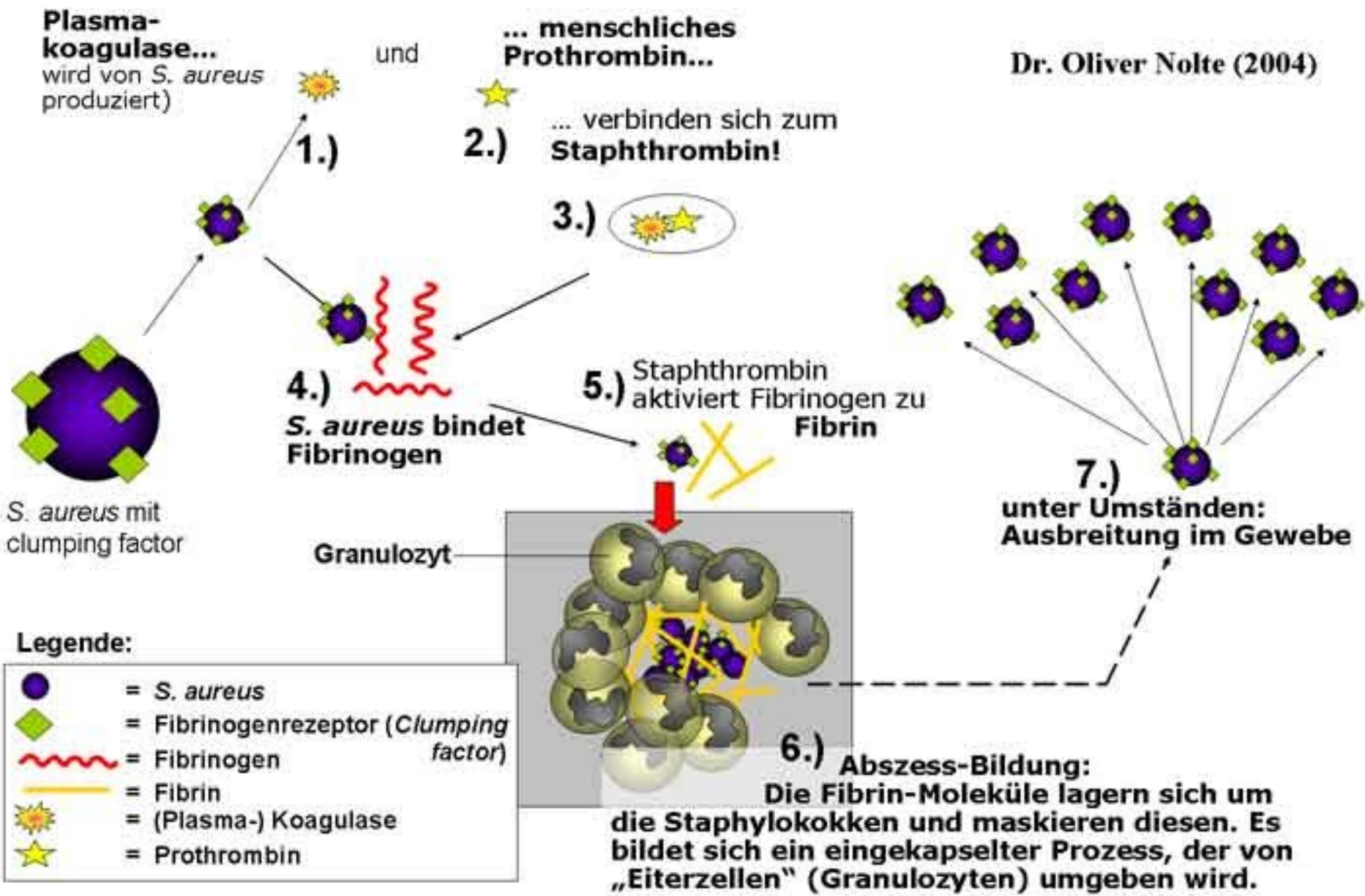
Keep an eye on minor skin problems — pimples, insect bites, cuts and scrapes — especially in children. If wounds become infected, see your doctor. Do not attempt to treat an MRSA infection yourself. You could worsen it or spread it to others.



Both health care-associated and community-associated strains of MRSA still respond to certain **TREATMENTS AND DRUGS** antibiotics. In some cases, antibiotics may not be necessary.

Provided by theMRSA.com





Bonusy – další
informace

Lugolův roztok je směs I_2 a KI

Jean Guillaume Auguste Lugol (18. 8. 1786 – 16. 9. 1851) byl francouzský lékař. Narodil se v Montaubanu. Studoval medicínu v Paříži a promoval v roce 1812. Roku 1819 se stal ordinářem v Nemocnici svatého Ludvíka, kde působil až do důchodu. Zajímal se o tuberkulózu a měl přednášku na Královské akademii věd v Paříži, kde se zastával čistého vzduchu, cvičení, studených koupelí a léků. Publikoval čtyři knihy o tuberkulózním onemocnění a jeho léčbě (1829, 1830, 1831, 1834). Navrhl, že by se jeho jódový roztok mohl používat k léčbě tuberkulózy. To tehdy vzbudilo velkou pozornost. I když se Lugolův roztok k léčbě TBC nehodil, byl zato Plummerem s úspěchem použit k léčbě thyreotoxikózy.

http://en.wikipedia.org/wiki/Jean_Guillaume_Auguste_Lugol



www.jergym.hiedu.cz

Zpět

Prof. Hans Christian Gram



Hans Christian Joachim Gram (13. září 1853 – 14. listopadu 1938) byl dánský bakteriolog. Gram studoval botaniku na Kodaňské Univerzitě a byl botanickým asistentem zoologa Japeta Steenstrupa. V roce 1878 začal studovat medicínu a promoval 1883. V roce 1884 v Berlíně vyvinul metodu, která dnes slouží k rozlišení dvou hlavních tříd bakterií. V roce 1891 se Gram stal přednášejícím farmakologie, a v témže roce byl jmenován profesorem Kodaňské univerzity. V roce 1900 převzal vedení farmakologického ústavu.

en.wikipedia.org/wiki/Hans_Christian_Gram.

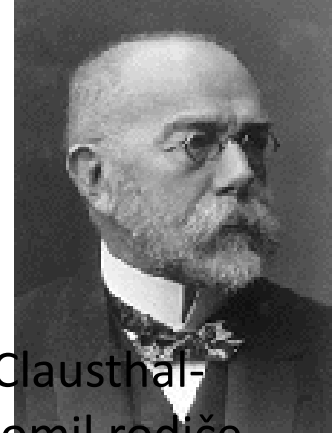
Zpět

Lipopolysacharid stěny G– bakterie

- Obsahuje **lipid A**. Tento lipid se také nazývá endotoxin. Je uvolňován při lýze bakterie. Jde o významný faktor virulence.
- Obsahuje také **polysacharidovou část**. I ta je faktorem virulence; obsahuje také antigeny (zvané O-antigeny). Tyto antigeny jsou často významné v diagnostice (zvláště u enterobakterií, jako je *Escherichia coli* či *Salmonella*)

Zpět

Robert Koch

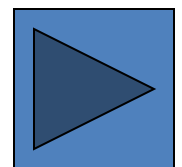


Německý mikrobiolog Robert Koch se narodil 11. prosince 1843 v Clausthal-Zellerfeldu jako jedno z 13 dětí důlního technika. Už v 5 letech ohromil rodiče, když jim oznámil, že se podle novin naučil číst. V roce 1862 odešel Koch na univerzitu do Göttingenu studovat medicínu. Po obdržení doktorátu v roce 1866 odešel na šestiměsíční studium chemie do Berlína. Po období všeobecné praxe se jako dobrovolník přihlásil do služby v ve francouzsko-pruské válce v roce 1870 a od roku 1872 do 1880 ve wollsteinském okresu. Zde uskutečnil své epochální výzkumy, které ho vynesly do čela vědeckých pracovníků. Zabýval se zejména bacilem antraxu, tuberkulózními bacily a choleroým vibriem.

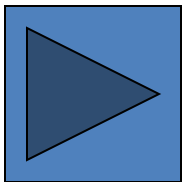
Koch byl během života vyznamenám mnoha medailemi a odměněn mnoha cenami, získal také několik čestných doktorátů a stal se čestným občanem několika měst. V roce 1905 obdržel Nobelovu cenu za fyziologii a medicínu.

Robert Koch zemřel 27. května 1910 v Baden-Badenu

<http://www.quido.cz/osobnosti/koch.htm>



Ještě
jednou
Robert
Koch



Robert Koch při expedici do Egypta při cholerové epidemii



Zpět

Bonusový materiál: Přehled antimikrobiálních látek

- Toto je pouze stručný přehled nejdůležitějších antibiotik, nikoli záruka, že to bude stačit ke zkoušce 😊

Fotografie, u kterých není uveden zdroj, pocházejí z AISLP na intranetu FN USA v Brně

Betalaktamová antibiotika

- Mají ve struktuře tzv. **betalaktamový kruh**
- 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 (deriváty kyseliny penicilanové)
 - Cefalosporiny (deriváty kys. cefalosporanové)
 - Monobaktamy
 - Karbapenemy

Různé formy „klasického“ (Flemingova) penicilinu

- Parenterální (injekční) formy
 - **Benzylpenicilin** (G-penicilin), nitrožilní. Lékem volby u řady infekcí (viz dále).
 - **Prokain-benzylpenicilin**, nitrosvalový. Hůře se drží plasmatická dávka – nepomůže ani zvýšení dávky
 - **Benzatin-benzylpenicilin**, nitrosvalový. Měl by se používat pouze na streptokoky a treponemata
- Perorální (ústí podávané) formy
 - **Fenoxymetylpenicilin** (V-penicilin). **Lékem volby u angíny**, v sekvenční léčbě* po G-penicilinu aj.
 - **Penamecilin**

*Sekvenční léčba je postup, kde se začne injekčním antibiotikem a pokračuje se perorálním.

Perorální peniciliny – V penicilin...



... a penamecilin

Kde je G-penicilin lékem volby

(jen pro ilustraci!)

- Meningitida a sepse způsobená meningokoky, pneumokoky a streptokoky.
- Pneumokoková pneumonie.
- Endokarditida způsobená viridujícími streptokoky.
- Těžké streptokokové a klostridiové infekce měkkých tkání.
- Anaerobní infekce vyvolané nesporulujícími anaeroby (s výjimkou *Bacteroides fragilis*), např. aspirační pneumonie a plicní absces.
- Aktinomykóza.
- Neuroborrelióza.
- Anthrax, diphtherie, červinka.
- Neurosyfilis, kongenitální syfilis.

*Podle Konsensu
používání
antibiotik
subkomise pro
antibiotickou
politiku ČLS JEP*

Depotní formy penicilinu

(po podání se dlouho udržuje v organismu určitá hladina)

Depotní
formy
penicilinu
pro
dlouho-
dobou
léčbu



Protistafylokokové peniciliny

Spektrum rozšířené o stafylokoky, ale ne o jiné bakterie

- **Methicilin** – užívá se v některých jiných zemích. Pro nás je významný tím, že figuruje ve zkratce MRSA (u nás by byla příhodnější zkratka ORSA – oxacilin rezistentní *S. aureus*)
- **Oxacilin** – indikován pouze u stafylokokových infekcí a u smíšených infekcí stafylokokovo-streptokokových a stafylokokovo-pneumokokových. Zato v případě stafylokoků by se měl používat u nealergických pacientů striktně, nenahrazovat makrolidy, na které velice vzrůstá počet rezistencí



Ampicilin a amoxicilin

- **Rozšíření účinku** na některé gramnegativní bakterie, enterokoky a další bakterie
- **Ampicilin** je užitečný hlavně v injekční formě, perorální se příliš nedoporučuje (místo něj raději amoxicilin)
- **Amoxicilin** je doporučován k léčbě zánětů středního ucha a přínosných dutin. (Zde nemá smysl vyšetřovat např. výtěr z nosu či ucha a je lépe rovnou zahájit léčbu.)



AMOCLEN
AMOCLEN[®]

1000
1000

Amoxicilin 1000 mg

Amocilin 1000 mg (1000 mg)
v 1 kapsle (1000 mg)
v 1 kapsle (1000 mg)
Občasne miedky (1000 mg)
Občasne miedky (1000 mg)

LECIVA

AMOCLEN

1000 mg

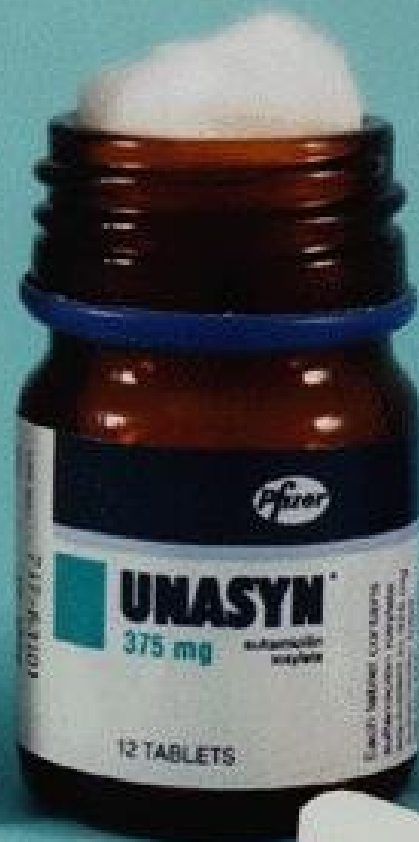
14

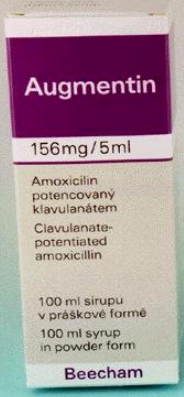
Problém: betalaktamázy

- **Řada bakterií produkuje různé typy betalaktamáz**, ať už primárně (tj. vždycky) nebo sekundárně (tj. jen některé kmeny). V takovém případě např. amoxicilin nemusí být účinný.
- Možným řešením je **spolu s antibiotikem podat tzv. inhibitor betalaktamázy**, který zajistí účinnost amoxicilinu (či jiného antibiotika) i za těchto okolností (vizte též pojednání v hlavní části prezentace)

Ko-ampicilin a ko-amoxicilin

- **Ko-ampicilin** je označení ampicilinu se sulbaktamem, známé např. pod firemním názvem Unasyn
- **Ko-amoxicilin** je označení amoxicilinu s kyselinou klavulanovou, známé např. jako Augmentin, Amoksiklav apod.
- Neměly by se používat tam, kde stačí např. samotný amoxicilin, povzbuzují bakterie k tvorbě betalaktamáz. U rezistentních bakterií jsou ale užitečné.





Piperacilin a tikarcilin

- Oproti předcházejícím mají širší spektrum zejména na **gramnegativní nefermentující tyčinky (například pseudomonády)**.
- Nejsou však účinné proti enterobakteriím, které produkují betalaktamázy
- Lékem volby jsou právě u **pseudomonádových infekcí** a infekcí dalšími gramnegativními nefermentujícími tyčinkami
- Používají se také **kombinace s inhibitory betalaktamázy**, podobně jako u ampicilinu či **amoxicilinu**.
- *(Piperacilin je v současnosti dostupný jen v kombinaci s inhibitorem betalaktamázy, ačkoli k léčbě by byl užitečný i samotný)*

Cefalosporiny 1

- Jsou **částečně příbuzné penicilinům**
- **Zkřížené alergie peniciliny × cefalosporiny** méně časté než např. mezi peniciliny navzájem. V případě nutnosti lze při alergii na peniciliny za kontroly stavu použít cefalosporiny a naopak
- **Některé rezistence jsou společné**, jiné se týkají pouze penicilinů, pouze cefalosporinů, nebo pouze některých preparátů
- Většinou se oproti penicilinům **více vylučují močí**, hodí se proto lépe u cystitid (včetně stafylokokových, místo oxacilinu)

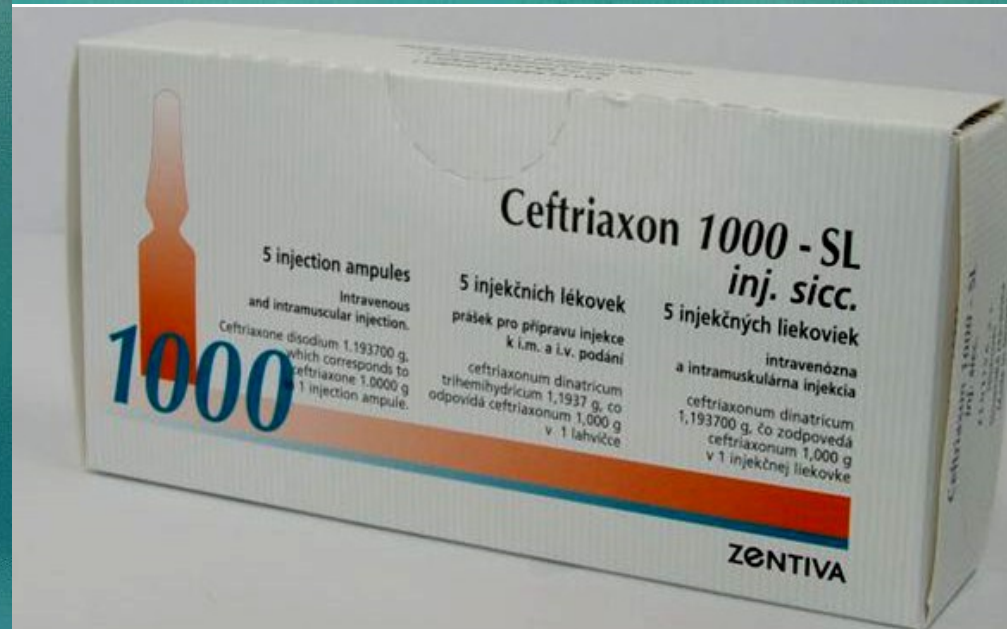
Cefalosporiny 2

- Všechny **enterokoky a listerie jsou rezistentní na všechny cefalosporiny** – přitom peniciliny jsou na tyto bakterie účinné (klasický penicilin jen částečně)
- Někdy se zvláště vyčleňují tzv. **cefamyciny** – sem patří cefoxitin, popř. cefotetan. Vyznačují se lepším působením na anaerobní bakterie.
- **Cefamyciny se používají i v diagnostice**, např. při ověření kmene MRSA, jde-li o skutečný kmen MRSA, nebo jen kmen s hyperprodukcí stafylokokové betalaktamázy

Cefalosporiny 3

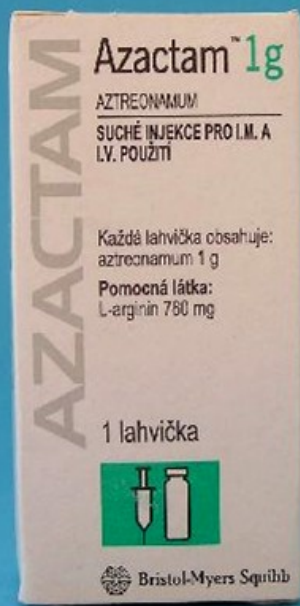
- **I. generace:** účinné zejména na G+ bakterie, ale i na některé enterobakterie.
- **II. generace:** lepší účinnost na G- bakterie, ale některé (enterobaktery, serratie, *Proteus vulgaris* aj.) jsou na I. i II. generaci primárně rezistentní
- **III. generace:** mnohem lepší účinnost na enterobakterie a u některých (***opravdu jen u některých, např. u ceftazidimu***) i na G-nefermentující tyčinky včetně pseudomonád. Bohužel jsou výraznými selektory betalaktamáz!
- **IV. generace:** účinnost i na producenty některých betalaktamáz (tzv. ampC), obecně ještě lepší na G-bakterie

3. generace

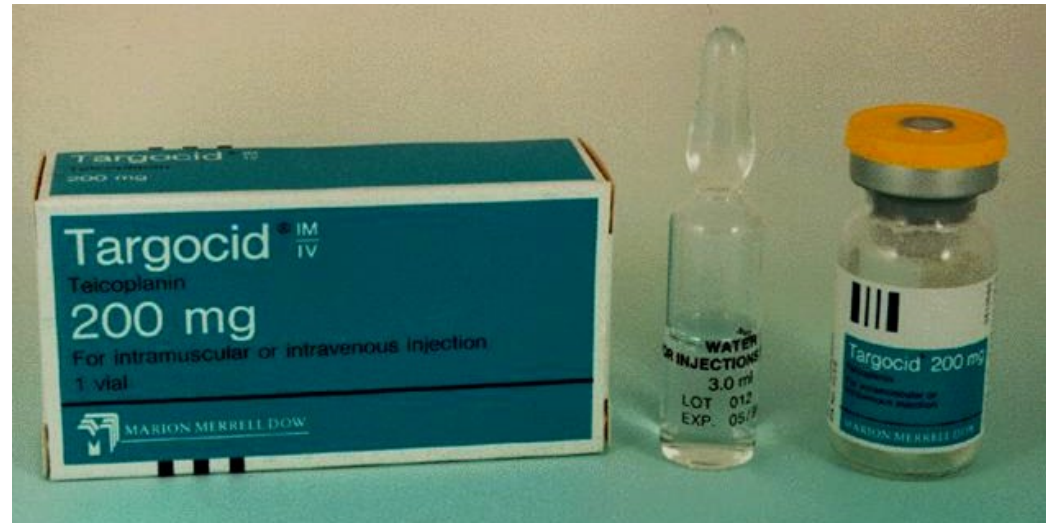


„Nové betalaktamy“

- **Monobaktamy** – nejvýznamnějším zástupcem je aztreonam (AZACTAM). Neúčinkují na G+.
- **Karbapenemy** – imipenem (TIENAM) a meropenem (MERONEM) – na pseudomonády a producenty širokospektrých betalaktamáz (na ty se používá také ertapenem – INVANZ)



Glykopeptidová antibiotika



- Působí také především na syntézu buněčné stěny (ale nejen); nejsou příbuzná s betalaktamy. Jsou vhodná **pouze k léčbě infekcí vyvolaných G+ bakteriami**.
- Používají se jako **rezervní**, např. u methicilin rezistentních stafylokoků (MRSA), některých enterokoků a podobně
- Patří sem **vankomycin** (EDICIN) a méně toxický, ale dražší **teikoplanin** (TARGOCID)



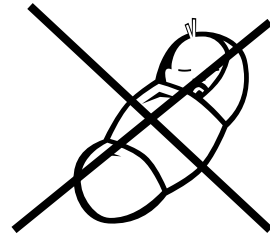
Polypeptidová antibiotika



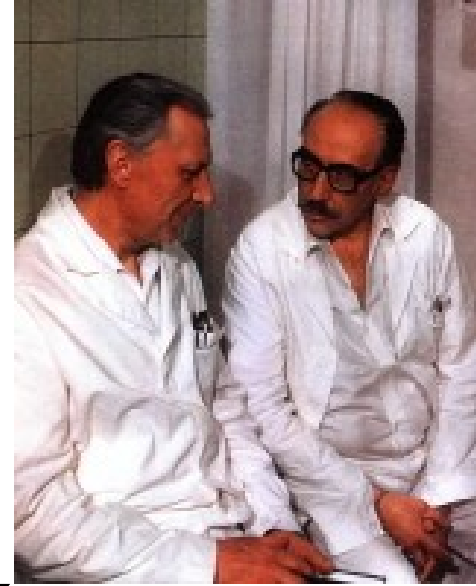
- Působí na cytoplasmatickou membránu
- Jsou vysoce toxická: **ototoxická, nefrotoxická**
- **Polymyxin B** se používá jen lokálně (např. součást ušních kapek Otosporin)
- **Polymyxin E – kolistin** se ve výjimečných případech užívá celkově
- Působí i na nerostoucí bakterie
- Rezistentní jsou všechny 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 (CIPLOX), 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 kouličkama“... 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 dnes už poměrně málo.
- **II. generace:** roxithromycin (RULID); josamycin (WILPRAFEN) a spiramycin se příliš nepoužívají
- **III. generace:** klarithromycin (KLACID), azithromycin (SUMAMED, AZITROX). Azithromycin se někdy vyčleňuje do zvláštní skupiny tzv. azalidů. Od ostatních se liší lepším intracelulárním průnikem a dlouhodobým účinkem

Tetracyklinová antibiotika

- Poměrně **široké spektrum**, ale mohou být sekundární rezistence
- **Nesměji se podávat do deseti let (vývoj zubů)**
- Používají se dnes méně než dříve, ale občas jsou stále nenahraditelné (u některých atypických pneumonií, některých gynekologických infekcí apod.)
- Spíše než klasický tetracyklin se dnes používá **doxycyklin** (Deoxymykoin). In vitro se ale testuje citlivost na tetracyklin a vztahuje se na doxycyklin.
- Vzdáleně příbuzná jsou nová **glycylcyklinová antibiotika**. Preparát tigecyklin (TYGACIL) je širokospektrý a představuje šanci u rezistentních kmenů.

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 pseudomembranosní enterokolitidy

Chloramfenikol (amfenikoly)

- **Široké spektrum a nepříbuznost s jinými antibiotiky** je jeho výhodou
- Má vynikající **průnik do likvoru**
- Avšak: je **výrazně hematotoxický** (ovlivnění krvetvorby)
- V humánní klinické praxi se používá pouze chloramfenikol, ostatní amfenikoly se používaly ve veterinární medicíně
- Zůstává jako rezerva, kdyby jiné možnosti selhávaly

Makrolidy a tetracykliny:

kdy ano, kdy ne

- **U onemocnění způsobených mykoplasmaty, chlamydiemi, helikobakterem, brucellou apod. jsou lékem volby.** (Mykoplasmata nemají buněčnou stěnu → betalaktamová antibiotika na ně neplatí)
- **U angíny či zánětu středního ucha pouze tam, kde je pacient alergický na lék volby (penicilin, amoxicilin)**

Ukázky makrolidů a linkosamidů



Analoga kyseliny listové

- Nejběžnější je sulfametoxazol v kombinaci s pyrimidinovým chemoterapeutikem trimetoprimem – **ko-trimoxazol** – BISEPTOL...
- Bakteriostatický, horší průnik do některých tkání, ale poměrně dobrý průnik do mozkomíšního moku
- Běžně se používá **k léčbě močových infekcí**, ale lze jej použít i k léčbě některých respiračních infekcí

Nitrofurantoin (a nifurantel)

- Působí na **metabolismus cukrů**. Je **bakteriostatický**. Mají poměrně široké spektrum
- **Nitrofurantoin** se užívá na močové infekce. Podezíral se ze závažných nežádoucích účinků na gastrointestinální trakt, ty se však již v současnosti nepovažují za tak závažné.
- **Nifuratel** se používá lokálně, hlavně v gynekologii, buď samotný (MACMIROR) nebo v kombinaci s antimykotikem (MACMIROR KOMPLEX, kombinace s nystatinem)

Nitroimidazoly

- Působí na syntézu nukleových kyselin u **anaerobních bakterií**. Kromě nich ale působí také na prvoky (*T. vaginalis*, *E. histolytica*)
- Používá se **metronidazol** (ENTIZOL, EFLOLAN) a **ornidazol** (AVRAZOR, TIBERAL). Nejčastěji se využívají v léčbě gynekologických nebo střevních infekcí
- Některá se **kombinují s antimykotiky**, např. KLION je směs metronidazolu s antimykotikem – Mikonazolem. Používá se v gynekologii.

Ukázky ko-trimoxazolu a nitroimidazolů



Nová antibiotika

- **Linezolid (ZYVOXID)** je antibiotikum z nové skupiny **oxazolidinových** antibiotik. Inhibuje proteosyntézu. Používá se proti G+ mikrobům tam, kde nechceme použít glykopeptidy, případně u rezistence na ně (vankomycin rezistentní enterokoky – viz dále)
- **Quinupristin+dalfopristin (SYNERCID)** je kombinovaný přípravek **streptograminových** antibiotik se širokým spektrem účinku
- **Tigecyklin (TYGACIL)** je **glycylcyklinové** antibiotikum, o kterém již byla řeč
- **Fidaxomicin (DIFICLIR)** je nové nadějně **makrocyclické** antibiotikum vhodné zejména pro léčbu infekcí *Clostridium difficile*

Antivirotika (virostatika)

- Používají se jen u **závažných virových infekcí**, běžné se léčí symptomaticky
- U velkého množství virů ani **neexistuje adekvátní antivirotická léčba**
- V praxi se zatím **nepoužívá in vitro testování** citlivosti virů na antivirotika
- Léčba se proto opírá spíše o zkušenosti ze **změn účinnosti** jednotlivých preparátů
- Zpravidla mají smysl jen **je-li infekce zachycena v inkubační době nebo ve fázi prodromů**, ne již u rozvinuté infekce (např. herpesvirové)

Přehled antivirotik (kromě antiretrovirotik)

HSV (1 a 2), VZV	aciklovir	p. o., i. v., lokálně
HSV, VZV, EBV	valaciklovir	p. o.
CMV	valaganciklovir	p. o.
HSV1, HSV2	trifuridin	p. o.
CMV, HBV, HSV	ganciklovir	i. v.
RSV, chřipka a jiné	foskarnet	i. v.
chřipka A	ribavirin	i. v., p. o., aerosol
hepatitida B	adefovir dipivoxil	p. o.
HPV	podofylotoxin	lokálně
HPV, VZV, HBV	interferony	i. v.
chřipka	amantadin, zanamivir, oseltamivir	p. o.

Léky účinné proti herpesvirům

- Používají se **lokálně i celkově**
- Působí **proti replikaci virů**
- Dávkují se **po osmi až dvanácti hodinách**
- Pro léčbu pásového oparu je u acikloviru **doporučeno použít parenterální formu**
- Pro léčbu infekcí CMV se užívá **ganciklovir, valaganciklovir, cidofovir a foskarnet**. Jsou účinnější, ale bohužel i toxičtější.

Při oparu lokalizovaném na rtu lze údajně též použít extrakt z meduňky (Mellisa officinalis), který obsahuje např. kyselinu rozmarýnovou. Extrakt má být účinný především v počátečních stádiích onemocnění. (Nalezeno na internetu, bez záruky)

Herpes simplex: léčba

*Shora: famciklovir,
valaciklovir,
acyklovir*



opt.pacificu.edu/ce/catalog/14382-AS/Herpes.html



Léky účinné proti chřipce

- Používají se **u oslabených osob**
- Na rozdíl od očkování je **nelze použít k primární prevenci**, některé však lze použít k **profylaxi**
- Starší: **amantadin a rimantadin**, ztrácejí účinnost (proti klasické chřipce). Brání **průniku a začlenění viru do buňky**
- **Osetamivir a zanamivir** jsou modernější a účinnější preparáty, k použití i proti některým ze současných pandemických kmenů. Jsou to **inhibitory neuraminidázy**
- Dávkuje se po 12–24 hodinách. Léčbu je třeba zahájit **co nejdříve**

Přehled antiretrovirotik

Inhibitory proteáz	sakinavir, indinavir, ritonavir, nelfinavir
Nukleosidové a nukleotidové inhibitory RT	zidovudin, didanosin, stavudin, zalcitabin, lamivudin, abakavir, tenofovir, emtricitabin
Kombinace předchozích	tamivudin + zidovudin tenofovir + emtricitabin
Nenukleosidové inhibitory RT	nevirapin, efavirenz

Další antivirotika

- **Interferony** se používají v léčbě papilomavirových infekcí, hepatitid, VZV aj. Účinek je komplexní.ů
- **Podofylotoxin** se používá lokálně proti papilomavirovým condylomata accuminata
- **Z dalších** se používá vidarabin, iododeoxyuridin a mnoho dalších
- **Rozvoj antivirotik** je očekáván



Antimykotika

- Antimykotika jsou **léky na houby**. 😊
- **Lokální antimykotika** se používají u nekomplikovaných kožních a slizničních mykotických infekcí
- **Celková léčba** je nutná u systémových mykóz, ale i u opakujících se nebo komplikovaných mykóz kožních a slizničních (například vaginálních)

Polyenová antimykotika: amfotericin B

- **Amfotericin B** je účinné, ale velmi toxické (nefrotoxické) antimykotikum.
- **Nepůsobí příliš na dermatofyty, ale na kvasinky má dobrou účinnost** i při rezistenci na azolová antimykotika. Působí i na aspergily (= kropidláky) a mucory (= plíseň hlavičková). Navzdory toxicitě zůstává lékem volby u závažných infekcí

Polyenová antimykotika: ambisom

- **Ambisom** je liposomální derivát amfotericinu B
- Spektrum účinnosti je zachováno, přičemž výskyt nežádoucích projevů je nižší (asi pětinašobně nižší toxicita)
- Z klinického pohledu: aplikace nevyžaduje několikahodinové infúze, ale jen asi 40 min
- Jde ovšem bohužel o velmi nákladný preparát

Polyenová antimykotika: ostatní

- **Nystatin** účinkuje zejména na kandidy a používá se s výhodou k eliminaci střevního rezervoáru kandidové infekce
- **Natamycin** má podobné zaměření. Při použití vaginálních globulí se projevuje jeho současný antitrichomonádový efekt
- Ani tyto preparáty neúčinkují na dermatofyty

Imidazolová antimykotika

- **Lokálně i celkově** podávané preparáty, na rozdíl od většiny jiných se používají i perorálně
- **Inhibice syntézy ergosterolu** v membráně
- Minimální **nežádoucí účinky**
- Hodí se k léčbě **kožních a slizničních, nikoli však systémových mykóz**
- Patří sem **mikonazol a ketokonazol**, a dále pouze lokální **klotrimazol, ekonazol, bifonazol, oxikonazol a fentikonazol**

Triazolová antimykotika

- Jsou **účinnější než imidazoly**, ani ne tak spektrem účinku, ale spíše biologickým poločasem, dávkováním apod.
- Lze je použít i k léčbě **systemových mykóz**
- Patří sem **itrakonazol, flukonazol** a nový **vorikonazol**
- **Flukonazol** je dobře snášen a je účinný, avšak *Candida crusei* je primárně rezistentní
- **Itrakonazol** je lékem volby u bronchopulmonární aspergilózy. Používá se perorálně.

Analoga nukleotidů

- **Flucytosin** (5-fluorocytosin) se v buňce houby mění na cytostatikum, kdežto člověk ho příliš nemetabolisuje
- **Nedoporučuje se podávat ho samotný,** spíše v kombinaci s amfotericinem B.
- U dětí lze monoterapii použít u **kandidózy močových cest.**

Caspofungin a anidulafungin

- Caspofungin (CANCIDAS) a nový anidulafungin (ECALTA) jsou **echinokandidová** antimykotikum k léčbě **invazivní kandidózy a aspergilózy**
- Jsou to rezervní antimykotika
- Nebývají na ně rezistence

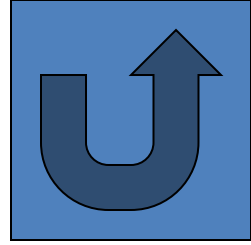
Terbinafin a naftifin

- Jsou to novější látky k léčbě dermatomykóz

Jodid draselný

- Opomíjená lokální terapie některých kandidóz

Antiparazitární látky



- Antiparazitární látky je **souhrnný název** pro látky působící proti parazitům
- **Ve skutečnosti je tato skupina různorodá** tak, jako jsou různorodí paraziti sami
- In vitro citlivost se u parazitů netestuje
- Chemoprophylaxe malárie – snad jediný případ, kdy se antimikrobiální látka používá **dlouhodobě k profylaxi**
- Dělí se na antiprotozoika, anthelmintika a látky proti vnějším parazitům

Další bonusy
k antibiotikům

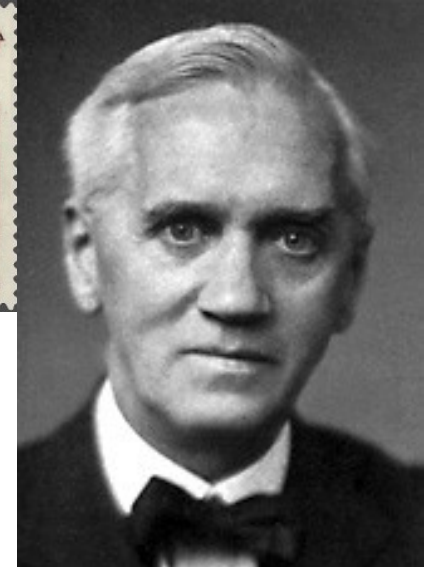
Sir Alexander Fleming

Sir Alexander Fleming (6. srpna 1881 farma Lochfield u Darvelu v hrabství Ayrshire ve Skotsku – 11. března 1955 Londýn) byl skotský lékař známý objevem baktericidních účinků lysozymu, ale hlavně získáním penicilinu z plísně *Penicillium notatum*.



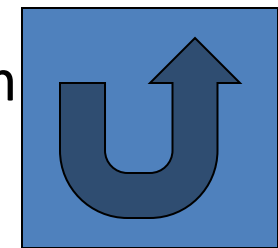
http://cs.wikipedia.org/wiki/Alexander_Fleming

http://nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/1945/fleming-bio.html



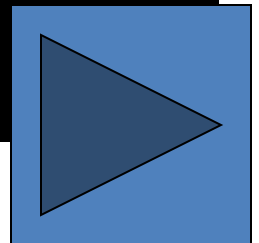
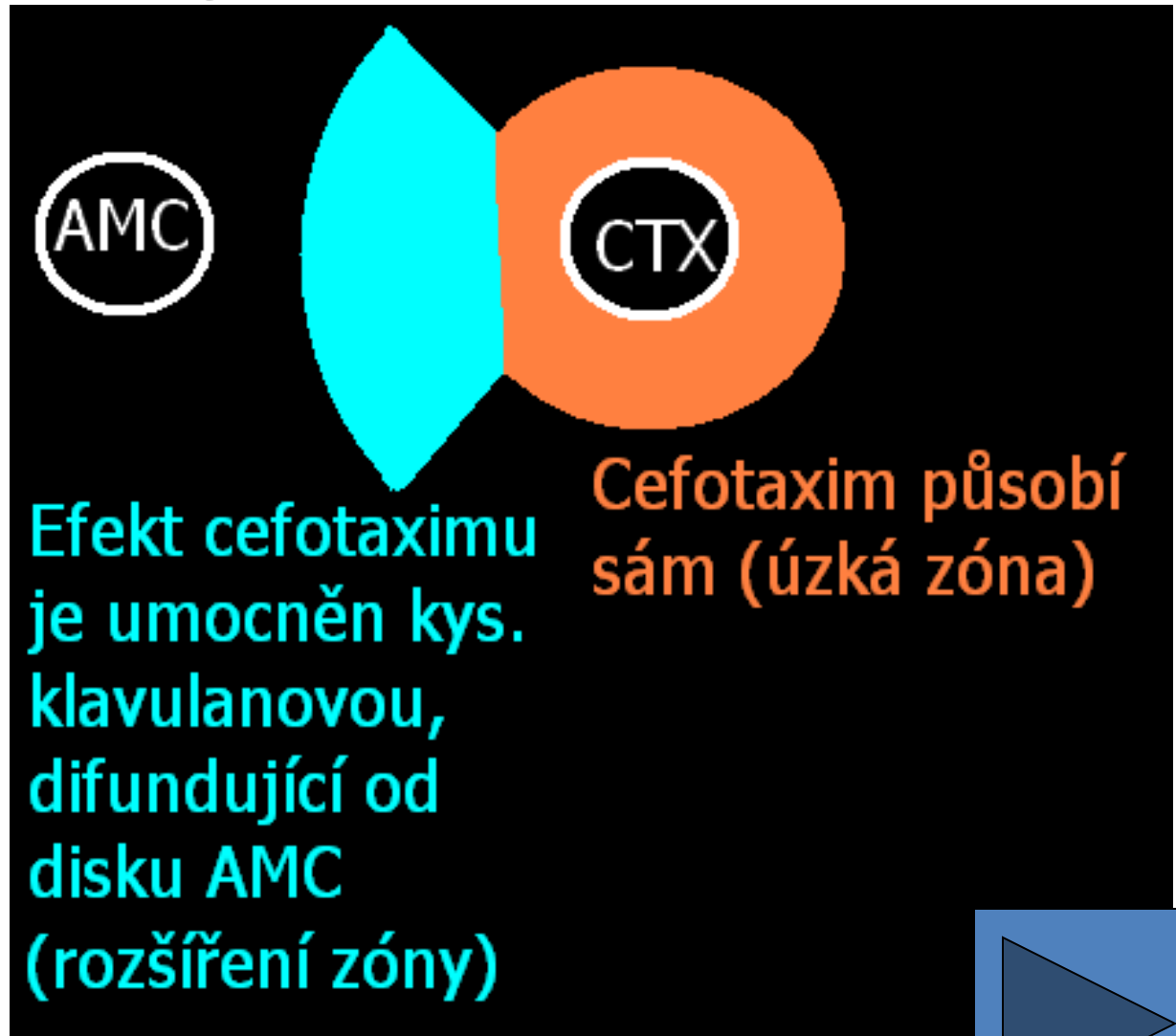
- V roce 1922 učinil Fleming objev s lysozymem, který ve své době neměl příliš velký význam, ale o třicet let později se k němu věda vrátila. V roce 1928 Fleming objevil penicilin, k tomuto objevu došlo z části náhodou, Fleming totiž náhodou našel na staré Petriho misce plíseň usazenou na agaru. Izolovat čistý penicilin se nepodařilo a když Fleming přednesl tento objev svým mimo laboratorním kolegům nikdo se o něj nezajímal. Izolovat penicilin se podařilo teprve v květnu 1940 oxfordskému chemikovi jménem Ernst Chain s jeho přítelem biochemikem jménem Howard Flory.

http://cs.wikipedia.org/wiki/Alexander_Fleming

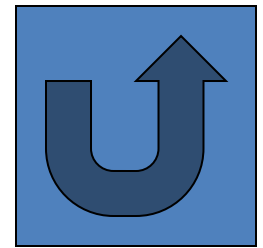


Test synergismu

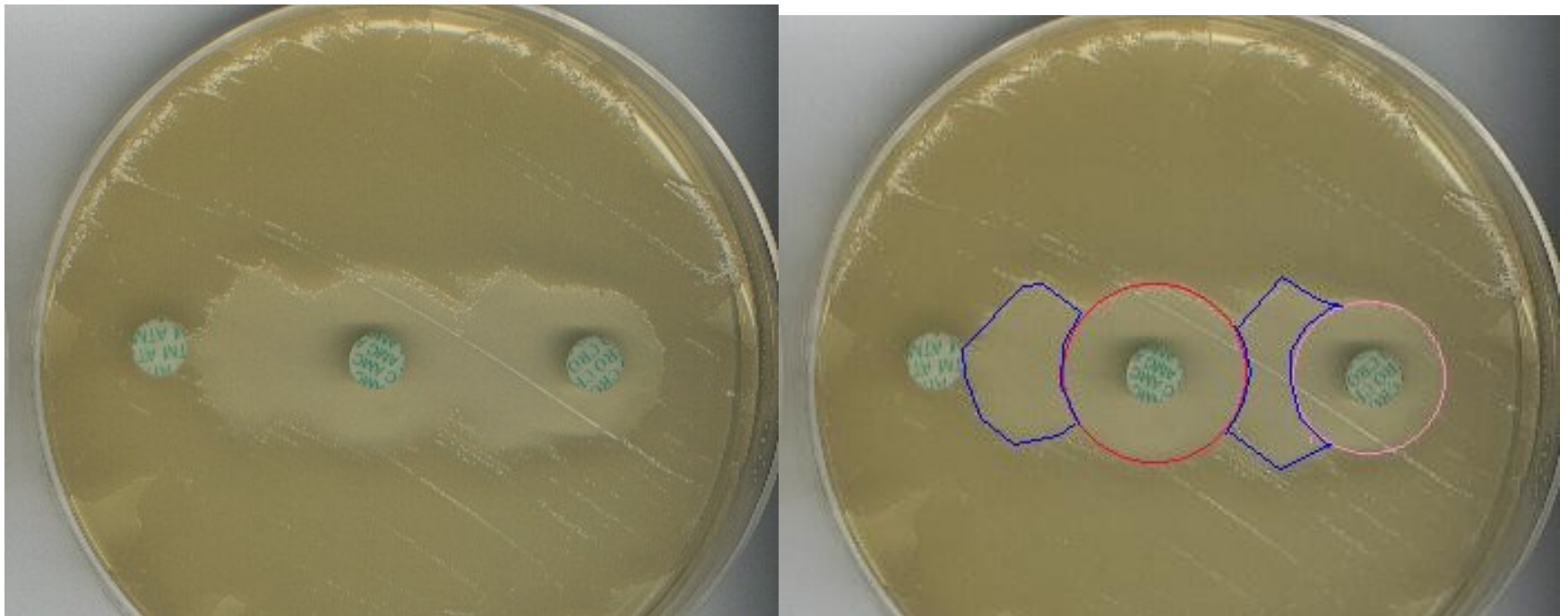
Na obrázku je pozitivní výsledek – zóna je širší na levé straně (tedy straně přivrácené ke ko-amoxicilinu)



Příklad pozitivního výsledku



Důležitá je modře ohraničená oblast



Zpět na hlavní obsah prezentace