

Metoda: Stanovení citlivosti na antibiotika

Eliška Chmelařová, 2. ročník

Školitelé: Mgr. Martina Šnajdrová

Léčba mikrobiálních infekcí je často spojena s použitím antibiotik. V dnešní době existuje široké spektrum antibiotik, proto existují v mikrobiologii metody sloužící k určení nejvhodnějšího, a tím i nejúčinnějšího druhu antibiotika.

Využívají se antibiotika v sestavách, která jsou volena jak dle druhu zpracovaného materiálu (moč, sputum, výtěr...), tak dle vyšetřovaného druhu bakterie. Výsledkem stanovení citlivosti testované bakterie k antimikrobním přípravkům (ATB) je tzv. antibiogram, který umožní výběr nejvhodnějšího antibiotika pro léčbu konkrétního pacienta.

Disková difúzní metoda

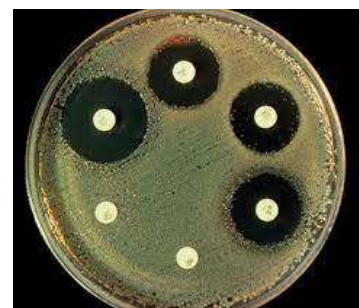
Kvalitativní metoda jejíž výsledek nám říká, zda je antibiotikum účinné nebo je testovaný kmen k ATB rezistentní. Tato metoda neměří stupeň citlivosti, nelze určit přesnou hodnotu antibiotika, která bude účinná. Hodnocení probíhá na základě měření velikosti inhibičních zón s následným porovnáním s referenčními hodnotami.

Princip:

Z čisté, izolované kolonie, kterou chceme testovat připravíme suspenzi mikroba tak, že pomocí bakteriální kličky sejmeme kolonii bakteriálního kmene a přeneseme do fyziologického roztoku. Zde je potřeba dodržet stanovený zákal hodnocený pomocí McFarlandových jednotek. Doporučená hodnota zákalu je 0,5 McFarlanda. Suspenzi mikroba naočkujeme pomocí sterilního tampónu na celý povrch agarové pudy, nejčastěji jde o Müller-Hintonovu pudu. Pomocí speciálních dávkovačů přidáme ATB disky. Kultivujeme nejčastěji 24 hodin při teplotě 37 °C. Antibiotikum se postupně uvolňuje z disku a difunduje do pudy. Naočkované bakterie se množí, v okolí disku se ale postupem času podle citlivosti množit přestávají. V určité vzdálenosti od disku ale už není antibiotikum schopné množení bakterií zastavit – vzniká zde okraj inhibiční zóny. Po inkubaci se měří průměr inhibičních zón. Výsledek se porovná s tabulkou NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards) a tak se zjistí, zda kmen je na antibiotikum citlivý nebo rezistentní.

Výsledek:

Pokud je testovaný kmen k antibiotiku rezistentním, antibiotikum difundující z disku nezastaví růst bakteriálního kmene a nedojde k vytvoření inhibiční zóny. Pokud je testovaný kmen na ATB citlivý, antibiotikum difundující z disku zastaví růst bakteriálního kmene a dojde k vytvoření inhibiční zóny.



Obrázek č.1: Diskový difúzní test (https://is.muni.cz/el/sci/podzim2017/Bi5710c/um/ATB_iva.pdf)

E-test

Kvantitativní metoda, jejíž výsledek nám poskytne informaci o vhodné koncentraci antibiotika, která je proti testovanému kmenu účinná. Jde v podstatě o metodu určení minimální inhibiční koncentrace (= taková koncentrace ATB, která je schopna zastavit růst bakterie).

Princip:

Na plošně inokulované plotny klademe místo disků proužky s geometricky se snižujícím obsahem ATB. Zóny inhibice mají kapkovitý tvar – zužují se směrem snižujícího se obsahu ATB v proužku. Proužky mají na povrchu vyznačenou stupnici, která umožňuje přesně odečíst hodnotu MIC, a to v místě, kde se okraj zóny inhibice dotýká proužku. Metoda je přesná, je jednoduchá na provedení, nevýhodou je vyšší cena.



Obrázek č.2: E-test
(<https://docplayer.cz/778042-15-Patrame-po-mikrobech-dil-v-testovani-citlivosti-mikrobu-a-jejich-faktoru-rezistence.html>)

Výsledek:

V případě citlivosti na ATB, se vytváří zóna inhibice růstu ve tvaru elipsy (kapky), která přetíná proužek s antibiotikem právě v místě udávajícím hodnotu MIC.

Diluční metoda

Kvantitativní metoda, která slouží ke zjištění minimální inhibiční koncentrace (MIC), tj. minimální koncentrace ATB, která je schopna zastavit růst bakterie.

Princip:

Do tekutého kultivačního média připraveného v mikrotitrační destičce se přidá testované ATB tak, aby bylo ATB v jednotlivých jamkách naředěno geometrickou řadou. Do každé jamky inokulujeme testovanou bakterii. Po uplynutí kultivační doby vyhodnotíme výsledek – v jamkách, kde bakterie rostou, se vytvoří zákal nebo sediment. Bakterie rostou v jamkách s ATB do určité koncentrace.

Výsledek:

Nejnižší koncentrace ATB, která již inhibuje růst bakterie, představuje výsledek testu. Tuto koncentraci označujeme jako minimální inhibiční koncentraci (MIC). Bakterie citlivé k danému antibiotiku budou mít MIC nízkou, bakterie rezistentní vysokou. Vyhodnocení testu se provádí srovnáním zjištěné MIC s tzv. hraniční hodnotou (break point). Diluční metoda je nejpřesnější metoda stanovení citlivosti k ATB.



Obrázek č.3: Stanovení MIC
(https://www.wikiskripta.eu/w/Testov%C3%A1n%C3%AD_citlivosti_na_antibiotika)

Zdroje:

1. **Ph.D., RNDr. Karel Fajfrlík.** *Úvod do předmětu mikrobiologie.* Plzeň.
2. **Testování citlivosti na antibiotika.** **WikiSkripta.** [Online]
https://www.wikiskripta.eu/w/Testov%C3%A1n%C3%AD_citlivosti_na_antibiotika.

3. Diskový difúzní test. *WikiSkripta.* [Online]
https://www.wikiskripta.eu/w/Diskov%C3%BD_difuzn%C3%AD_test.

4. Mgr. Jana Kopecká, Ph. D., Mgr. Gabriela rotková, Ph. D. Skripta ke cvičení z obecné mikrobiologie, cytologie a morfologie bakterií. [Online]
https://is.muni.cz/do/rect/el/estud/prif/js17/cviceni_mikrobiologie/web/pages/stanoveni_citlivosti_atb.html.