

# Mikrobiológia praktické cvičenie – 13. týždeň

## Stanovenie citlivosti baktérií na antibiotiká

### Testovanie citlivostí na ATB

- kvalitatívne
  - difúzny diskový test
- kvantitatívne
  - MIC
  - MBC
  - E test

Na tekutých (MIC, MBC) alebo tuhých pôdach (DDT, E test, MBC)

### Kvalitatívna metóda - Diskový difúzny test (DDT)

DDT je štandardizovaná metóda definovaná Európskou komisiou pre testovanie citlivosti EUCAST. Metóda sa používa na stanovenie citlivosti rastovo náročných baktérií a baktérií ktorých citlivosť nie je možné testovať diagnostickými súpravami na stanovenie break-pointov a MIC. Diskový difúzny test je kvalitatívna metóda na stanovenie citlivosti bakteriálneho kmeňa k antibiotiku. Kmeň je citlivý, alebo naopak rezistentný podľa veľkosti inhibičnej zóny okolo disku na tuhé pôde - ak je priemer inhibičnej zóny menšia ako stanovená hranica, znamená to, že podanie tohto antibiotiká by nebolo účinné a kmeň je teda rezistentný. Táto metóda nemeria stupeň citlivosti - kmeň je vždy buď citlivý alebo rezistentný.



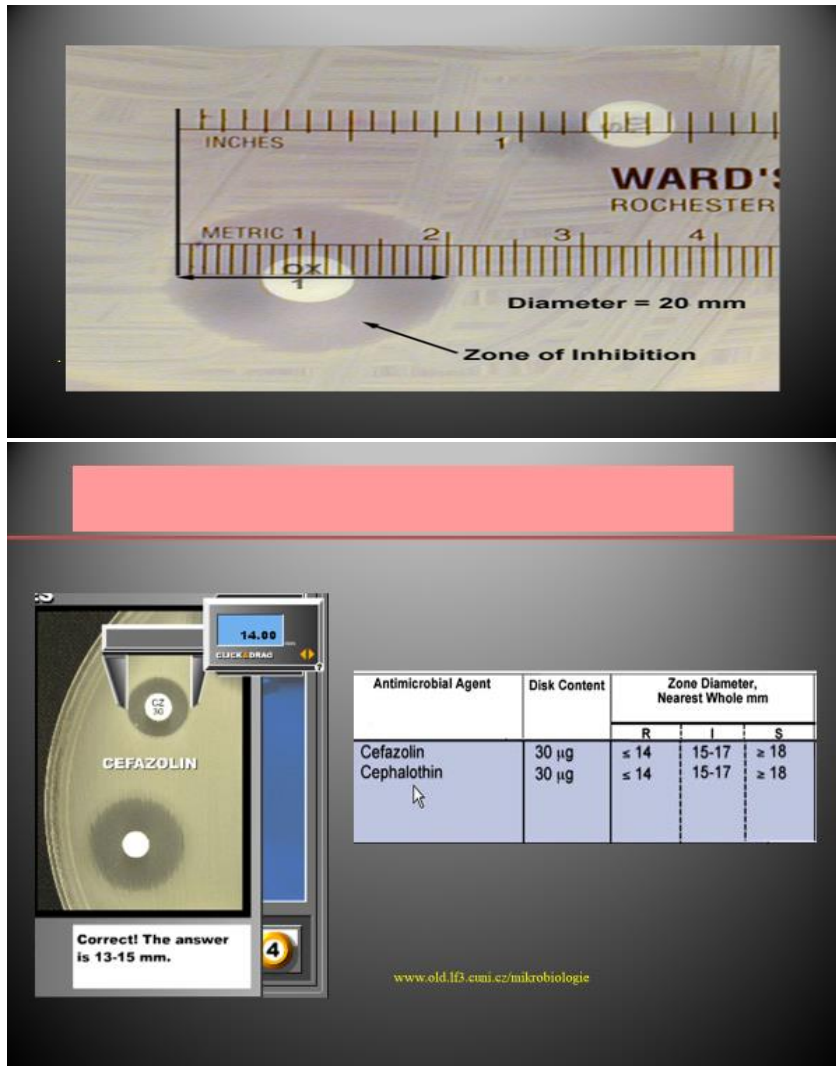
## POSTUP DDT:

- 1.-3. 3-4 kolónie baktérií suspenduje do bujónu a upravíme turbidity podľa zákalového štandardu zodpovedajúce koncentráciu (108 baktérií / ml).
4. Vzniknutú suspenziu nanesieme na Mueller-Hintonov agar.
5. Aplikátorom nakladíme disky na pôdu (používajú sa štandardné disky sa dohovoreným množstvom antibiotiká).
6. Inkubujeme cca 18 h v termostate.

Počas inkubácie - antibiotikum sa postupne uvoľňuje z disku a difunduje do pôdy. Naočkované baktérie sa množia, v okolí disku sa ale postupom času podľa citlivosti množiť prestávajú – vzniká **zóna inhibície rastu**.

Priemer inhibičnej zóny sa meria v mm.

Výsledok porovnáme s tabuľkovými hodnotami a stanovíme, či je kmeň na antibiotiká citlivý, alebo rezistentný.



## Interpretácia výsledkov kvalitatívnych testov citlivosti:

**C** - izolovaný kmeň je citlivý – účinná hladina antibiotika v sére sa dosiahne pri bežnom dávkovaní

**I**- izolovaný kmeň je slabo citlivý - účinná hladina antibiotika v sére sa dosiahne len pri zvýšenom dávkovaní, alebo v mieste, kde sa antibiotikum prirodzene koncentruje (moč)

**R** - izolovaný kmeň je rezistentný

## Kvantitatívne metódy – stanovenie MIC

### Minimálna inhibičná koncentrácia (MIC)

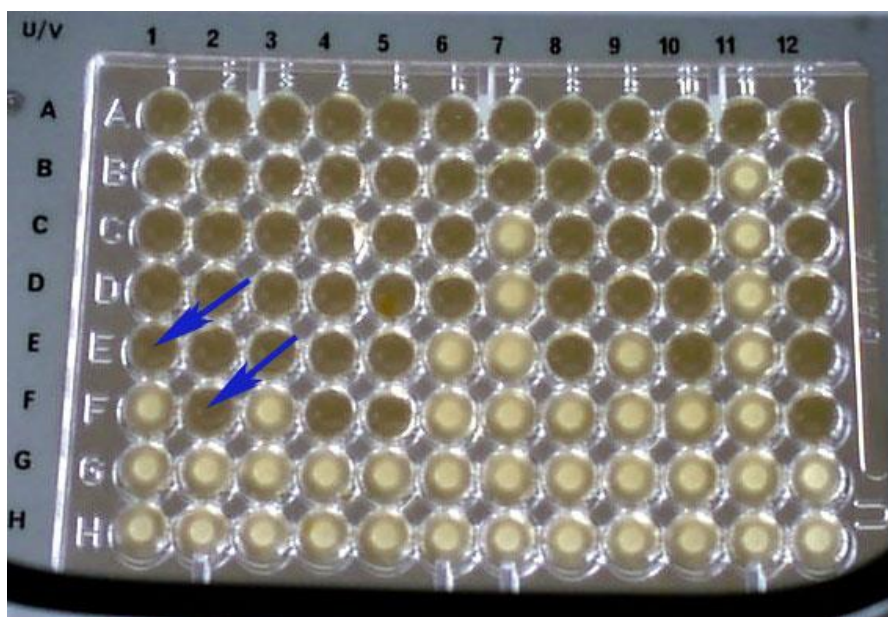
- najmenšie namerané množstvo (koncentrácia) antibiotika, ktoré inhibuje rast a množenie baktérií v testovacom médiu in vitro.
- při zisťovaní MIC je dôležitá standardizácia podmienok,
- výsledky môžu byť ovplyvnené veľkosťou inokula, druhom testovacej pôdy, trvaním a teplotou inkubácie, atď.

### Minimálna baktericídna koncentrácia (MBC)

- najnižšia nameraná koncentrácia antibiotika in vitro, ktorá usmrtí exponovanú bakteriálnu kultúru v priebehu 24 hod. inkubácie v tekutej pôde.
- kontrolou MBC je následný kultivačný test na agarových pôdach.

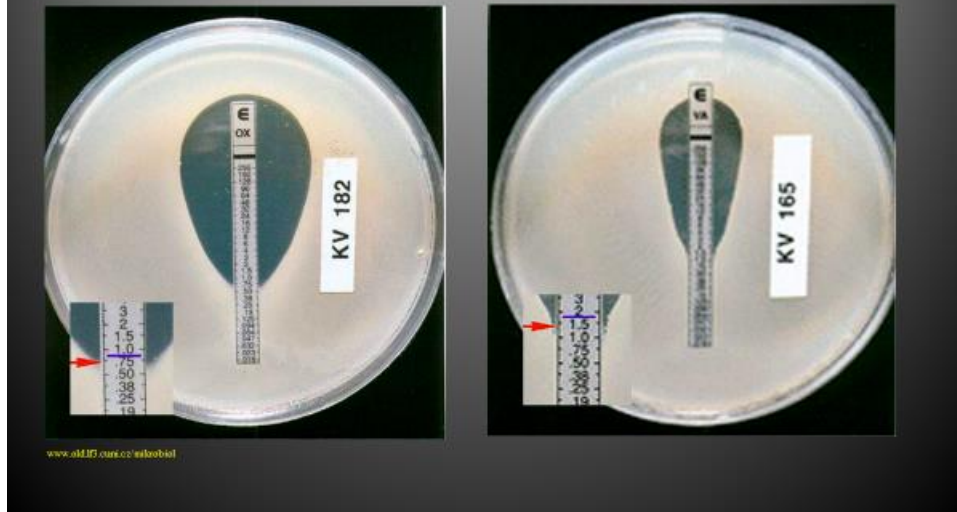
## Stanovenie minimálnej inhibičnej koncentrácie dilučnou metódou

1. Daný kmeň naočkujeme do jamiek mikrotitračnej doštičky s médiom, kde sa v rade zvyšuje pridaná koncentrácia antibiotika;
2. inkubujeme do doby, kedy narastie kontrola (spravidla cez noc)
3. pozorujeme zákal či sediment - z prvej jamky, kde je už rast potlačený a médium zostalo čisté, odčítame MIC.



Roztoky antibiotík sú umiestnené v stĺpcoch (1 až 12) od najnižšej koncentrácie v jamke H až po najvyššiu koncentráciu v jamke A. Po naočkovaní testovaného kmeňa baktérií do všetkých jamiek a inkubácii sa stanoví minimálna inhibičná koncentrácia (MIC). Rast baktérií sa prejavuje zákalom. MIC je najnižšia koncentrácia, ktorá už zabraňuje rastu testovaného kmeňa (šípky – v jamkách nie je zákal)

## Gradientová difúzna metóda – E-test



E-test je **kvantitatívny** test na stanovenie minimálnej inhibičnej koncentrácie (MIC) antibiotika. Ide o diagnostický prúžok, v ktorom sa postupne logaritmicke znižuje koncentrácia liečiva a obdobný gradient vytvorí po položení do Petriho misky aj na živnej pôde s naočkovaným vyšetrovaným bakteriálnym kmeňom.

Po inkubácii sa vytvorí v okolí prúžku inhibičná zóna tvaru slzy - v mieste, kde "kvapka" pretína diagnostický prúžok, odčítame hľadajú MIC. Metóda v sebe kombinuje výhody diskového difúzneho testu (jednoduchá manipulácia) s možnosťou určenia MIC. Nevýhodou je pomerne vysoká cena.

Zdroje:

<https://www.laboratornadiagnostika.sk/pre-lekarov/mikrobiologia/bakteriologia/antibiotika>

<http://mikrobiologie.lf3.cuni.cz/rep/mic.htm>