

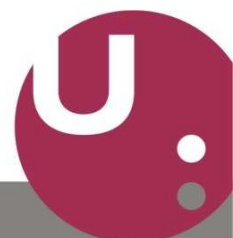
CITLIVOST A REZISTENCE MIKROORGANISMŮ K ANTIBIOTIKŮM

Mgr. Sylva Janovská, Ph.D.

Mgr. Eva Slehová

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Katedra biologických a biochemických věd

*Centralizovaný rozvojový projekt MŠMT č. C29:
„Integrovaný systém vzdělávání v oblasti výskytu a eliminace reziduí léčiv v
životním prostředí“*



Vyučující:

Mgr. Sylva Janovská, Ph.D.¹; Mgr. Eva Slehová²

¹Katedra biologických a biochemických věd, Fakulta chemicko-technologická, Univerzita Pardubice

²Ústav environmentálního a chemického inženýrství, Fakulta chemicko-technologická, Univerzita Pardubice

TEORETICKÁ ČÁST ÚLOHY:

Antibiotika jsou skupinou antimikrobiálních léčiv, které zastavují růst bakterií nebo je přímo usmrcují. V posledních letech však významně narůstá schopnost bakterií odolávat jejich působení. Testování citlivosti mikroorganismů na antibiotika je proto nezbytným předpokladem pro správnou a cílenou volbu antibiotika v terapii a profylaxi bakteriálních infekcí.

Metody testování citlivosti dělíme na kvalitativní a kvantitativní. Kvalitativní metody jsou prováděny formou tzv. difúzních testů, založených na difúzi antimikrobiální látky ze zdroje do okolí, například diskový difúzní test. Mezi kvantitativní techniky se řadí agarové a bujónové diluční metody nebo E-test. Cílem dilučních technik je stanovení množství antimikrobiální látky, inhibující růst mikroorganismu. Citlivost je vyjádřena tzv. minimální inhibiční koncentrací (MIC), což je nejnižší koncentrace testované antimikrobiální látky, která viditelně potlačuje růst mikroorganismu. V některých případech se dále stanovuje minimální baktericidní koncentrace (MBC), což je nejnižší koncentrace antibiotika, která je potřebná k usmrcení mikroorganismu.

PRINCIP ÚLOHY:

1. Diskový difúzní test

Testovaný mikroorganismus je v čisté kultuře naočkován po celé ploše agarové půdy. Následně se na povrch kultivačního média aplikují papírové disky impregnované antibiotiky, jejichž inhibiční vliv je zkoumán. Antimikrobiální látka difunduje z disků do agarové půdy a vytváří okolo každého z nich zóny s klesající koncentrací ve směru k vnějšímu okraji. Uvnitř těchto zón potlačuje antimikrobiální látka růst mikroorganismu, zatímco okolní půda bez obsahu antimikrobiální látky je testovaným kmenem porostlá. Průměr těchto inhibičních zón

slouží k orientačnímu posouzení citlivosti mikroorganismu k antimikrobiálním látkám (Obrázek č. 1).

2. E-test

E-test kombinuje principy kvantitativních technik a diskové difúzní metody. Na agarovou půdu s naočkovaným testovaným mikroorganismem se přiloží sterilní plastový proužek napuštěný vzrůstající koncentrací antibiotika. Po uplynutí inkubační doby vzniká inhibiční zóna kapkovitého tvaru, jejíž špička protíná plastový proužek v místě s minimální inhibiční koncentrací daného antibiotika.

3. β -lactam test

Beta-laktamáza je bakteriální enzym hydrolyzující beta-laktamový kruh a je tak odpovědný za rezistenci některých bakterií k beta-laktamovým antibiotikům (penicilin, ampicilin, aj.). Jednou z možností průkazu produkce beta-laktamáz je acidimetrická metoda. V případě komerčně dostupného β -lactam testu (Erba Lachema; Brno) je v zóně detekčního proužku obsažen benzylpenicilin. Jeho hydrolýzou v důsledku působení enzymu dochází k posunu pH a tím i ke změně zbarvení acidobazického indikátoru.

POSTUP PRÁCE:

1. Disková difúzní metoda

Z testovaného bakteriálního kmene nejprve připravíme třením bakteriologickou kličkou o vnitřní stěnu zkumavky suspenzi ve fyziologickém roztoku o intenzitě 0,5 stupně McFarlandovy stupnice. Následně do zhotovené suspenze ponoříme sterilní vatový tampón a po odstranění přebytečné tekutiny rotací po vnitřní stěně zkumavky, rovnoměrně rozetřeme inokulum po povrchu Mueller-Hintonova (MH) agaru, tak aby byla inokulována celá plocha agarové půdy. Do 15 minut od provedené inokulace se na povrch agarové půdy kladou disky s obsahem antibiotik. Následně umístíme naočkované půdy s antibiotickými disky do termostatu a necháme inkubovat do druhého dne při 37°C.

Po provedené inkubaci měříme průměry inhibičních zón, které srovnáváme s referenčními hodnotami pro posuzování citlivosti mikroorganismů na antibiotika (3).

2. E-test (vyhodnocení)

Na agarové půdě s testovaným bakteriálním kmenem a proužkem s antibiotikem hodnotíme hodnotu MIC v místě protnutí koncentrační stupnice s inhibiční zónou (Obr. č. 2). Získanou hodnotu MIC poté srovnáváme s referenčními hodnotami pro posuzování citlivosti mikroorganismů na antibiotika.

3. β -lactam test

Po vyjmutí detekčního proužku z tuby jej navlhčíme 10 μ l sterilní destilované vody. Očkovací kličkou vetřeme několik kolonií testované kultury do detekční zóny proužku a necháme při laboratorní teplotě 10 minut inkubovat. Následně hodnotíme barevnou reakci. Červená barva indikuje produkci beta-laktamáz, zatímco žlutá barva negativní reakci.

ZÁVĚR

1. Disková difúzní metoda

Testovaný bakteriální kmen:

ANTIBIOTIKUM	ZKRATKA	PRŮMĚR INH. ZÓNY (mm)	INTERPRETACE
CIPROFLOXACIN	CIP		
TETRACYKLIN	TET		
GENTAMICIN	CN		
CEFOTAXIM	CTX		
AMPICILIN	AMP		
AMPICILIN + SULBACTAM	SAM		

2. E-test

Inhibiční zóna testovaného kmene *Escherichia coli* protínala stupnici detekčního proužku v koncentraci mg/l. Srovnáním s referenčními hodnotami pro posuzování citlivosti mikroorganismů na antibiotika hodnotím testovaný kmen jako

3. β -lactam test

Na základě barevné změny u provedeného β -lactam testu hodnotím testovaný bakteriální kmen jako

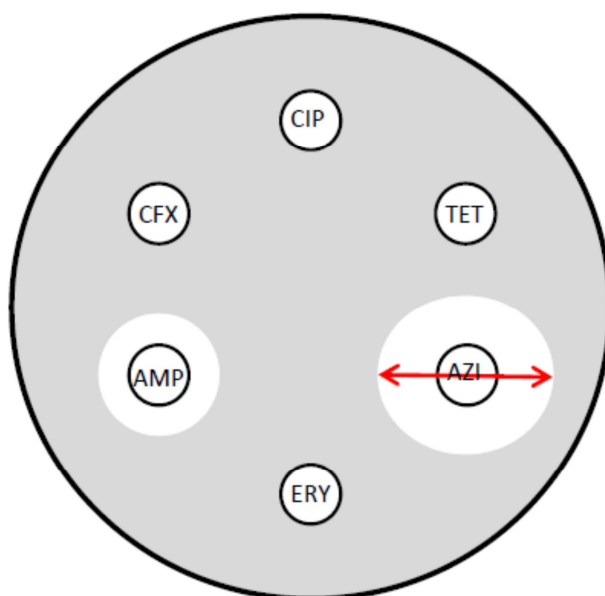
Doporučená literatura:

¹Urbášková, P. Rezistence bakterií k antibiotikům. Vybrané metody. Praha Trios, 1998; ISBN 80-238-3106-2.

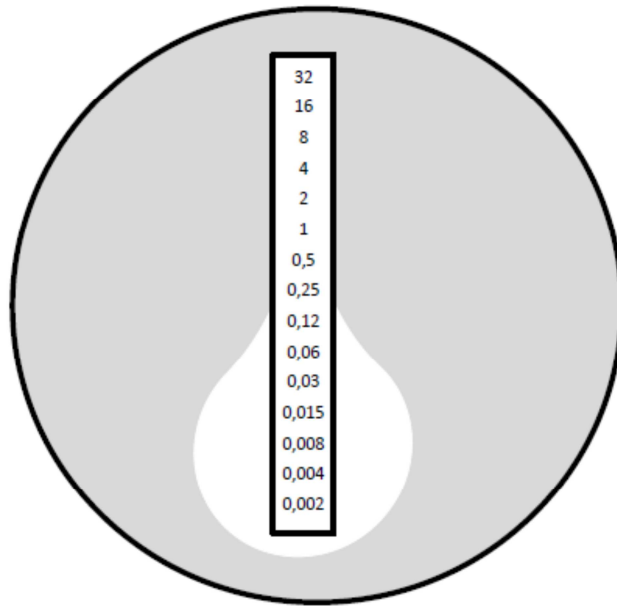
²Votava, M. *et al.* Lékařská mikrobiologie obecná, 2. přepracované vydání, Neptun, 2005: 236-300; ISBN-10: 80-86850-00-5.

³The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 5.0, 2015. <http://www.eucast.org> (citováno dne 22. července 2015).

Příloha



Obrázek č. 1 Hodnocení průměru inhibičních zón u diskové difúzní metody



Obrázek č. 2 Schéma inhibiční zóny u E-testu