

CVIČENÍ I.

STANOVENÍ FENOTYPU REZISTENCE K VYBRANÝM ANTIBIOTIKŮM

Stanovení citlivosti bakteriálního kmene k antibiotikům umožňuje výběr účinné terapie pro léčbu bakteriálních infekcí, což vede k zrychlení léčby pacienta a omezení rozvoje antibiotické rezistence. Pro stanovení citlivosti k antimikrobiálním látkám jsou používány metody difúzní nebo diluční. Mezi nejpoužívanější difúzní metody řadíme diskovou difúzní metodu a E-test (není považován za referenční metodu). Tyto metody jsou jednodušší na provedení, ale v případě diskové difúzní metody poskytují jen kvantitativní výsledek. Naopak výhodou dilučních metod je určení minimální inhibiční koncentrace (MIC), jedná se tedy o kvantitativní metody. MIC je definována jako minimální koncentrace antimikrobiální látky, která zastaví růst bakterie. Mezi referenční diluční metody řadíme agarovou diluční metodu a bujónovou diluční metodu. Tyto metody jsou náročnější na provedení, ale poskytují mnohem přesnější a konkrétnější výsledek.

Mezi další fenotypové metody řadíme double-disk synergy test (DDST), který slouží k průkazu produkce širokospektrých beta-laktamáz (extended spectrum beta-lactamase, ESBL). ESBL enzymy hydrolyzují většinu beta-laktamových antibiotik jako jsou peniciliny, cefalosporiny a monobaktam aztreonam.

Reference:

Bagul S. U., Sivakumar S. M. ANTIBIOTIC SUSCEPTIBILITY TESTING: A REVIEW ON CURRENT PRACTICES, *Int J Pharm.* 2016; 6(3): 11-17.

Drioux L., Brossier F., Sougakoff W., Jarlier V. Phenotypic detection of extended-spectrum β -lactamase production in Enterobacteriaceae: review and bench guide, *Clinical Microbiology and Infection.* 2008; 14(S1): 90-103.

ÚLOHA 1: Testování citlivosti diskovou difúzní metodou

Testované kmeny: *E. coli* ATCC 25922 (referenční kmen), testované izoláty

Postup:

- 1) Pro každý testovaný izolát si označíme jednu denzila zkumavku.
- 2) Do denzila zkumavky napipetujeme 2 ml sterilní destilované vody.
- 3) Několik kolonií (přibližně 3 – 4 kolonie) resuspendujeme ve 2 ml sterilní destilované vody pomocí bakteriologické kličky.
- 4) Zkumavku s bakteriální suspenzí zvortexujeme.
- 5) Zákal suspenze bakterií změříme pomocí fotometru. Zákal by měl odpovídat hodnotě 0,5 McFarlandovy stupnice (tj. $\approx 1 - 2 \cdot 10^8$ CFU/ml). Pokud je zákal naší suspenze vyšší, ředíme ho pomocí sterilní destilované vody (vodu přikapáváme pomocí Pasteurovy pipety). Pokud je zákal naší suspenze nižší, přidáváme kulturu. Vždy si bereme čistou sterilní kličku.
- 6) Výchozí inokulum ředíme ve fyziologickém roztoku v poměru 1:100 tak, že 30 μ l homogenizované suspenze pipetou přeneseme do 3 ml sterilního fyziologického roztoku (URIN zkumavky se žlutým uzávěrem), pokud používáme Petriho misky o průměru 150 mm, dáváme 50 μ l homogenizované suspenze do 5 ml sterilního fyziologického roztoku. Počet buněk ve výsledné suspenzi určené pro očkování ploten odpovídá přibližně 10^6 CFU/ml.
- 7) Suspenzi ihned (nejdéle však do 15 minut od přípravy) sterilně nalijeme na povrch předsušené plotny s Mueller-Hintonovým agarem. Přelití celého povrchu plotny docílíme jejím nakláněním

na všechny strany. Následně je potřeba plotnu nahnout až do kolmé pozice a odpipetovat přebytečné inokulum.

- 8) Inokulum naočkované na povrchu Mueller-Hintonova agaru necháme dobře zaschnout. Na vlhkých plotnách se vytváří nehodnotitelné zóny inhibice.
- 9) Pomocí dispenzoru umístíme na plotnu příslušné antibiotické disky. Ve chvíli, kdy se disk dotkne agaru, začíná difúze antibiotik. Z tohoto důvodu po položení disků s nimi nemanipulujeme a neposouváme je.
- 10) Plotny umístíme do termostatu (víčkem nahoru, neobracet, aby disky nespadly) a inkubujeme při 37 °C přes noc (16-18 hodin).
- 11) Po inkubaci změříme průměry zón inhibice vytvořené v okolí antibiotických disků u testovaných izolátů a kontrolního kmene *E. coli* ATCC 25922 a zapíšeme si přesné hodnoty [mm]. Průměr zóny inhibice se měří ve dvou na sebe kolmých směrech a jako okraj zóny se považuje okraj viditelný pouhým okem. Výsledky porovnáme s průměry inhibičních zón u enterobakterií publikovaných v metodice CLSI 2015 (Tabulka 1). Průměry inhibičních zón u kontrolního kmene *E. coli* ATCC 25922 porovnáme s hraničními hodnotami uvedenými v CLSI (Tabulka 2) pro ověření správného provedení diskové difúzní metody.

Tabulka 1. Hraniční hodnoty zón inhibice antibiotik u enterobakterií dle CLSI 2015

Antibiotikum	Zkratka	Obsah ATB v disku	Hraniční hodnoty pro průměr zóny inhibice [mm]			Reference
			S	I	R	
Ampicilin	AMP	10 µg	≥ 17	14–16	≤ 13	CLSI 2015
Streptomycin	S	10 µg	≥ 15	12–14	≤ 11	CLSI 2015
Sulfonamidy	S3	300 µg	≥ 17	13–16	≤ 12	CLSI 2015
Tetracyklin	TE	30 µg	≥ 15	12–14	≤ 11	CLSI 2015
Trimetoprim-sulfametoxazol	SXT	1.25/23.75 µg	≥ 16	11–15	≤ 10	CLSI 2015
Chloramfenicol	C	30 µg	≥ 18	13–17	≤ 12	CLSI 2015
Cefalotin	KF	30 µg	≥ 18	15–17	≤ 14	CLSI 2015
Kyselina nalidixová	NA	30 µg	≥ 19	14–18	≤ 13	CLSI 2015
Ceftazidim	CAZ	30 µg	≥ 21	18–20	≤ 17	CLSI 2015
Gentamicin	CN	10 µg	≥ 15	13–14	≤ 12	CLSI 2015
Amoxicilin-kyselina klavulanová	AMC	20/10 µg	≥ 18	14–17	≤ 13	CLSI 2015
Ciprofloxacin	CIP	5 µg	≥ 21	16–20	≤ 15	CLSI 2015

ATB, antibiotikum; S, citlivý; I, intermediální; R, rezistentní

Tabulka 2. Hraniční hodnoty zón inhibice pro kontrolní kmen ATCC 25922 dle CLSI 2015

Antibiotikum	Zkratka	Obsah ATB v disku	Hraniční hodnoty zón inhibice [mm]
Ampicilin	AMP	10 µg	15–22
Streptomycin	S	10 µg	12–20
Sulfonamidy	S3	300 µg	-
Tetracyklin	TE	30 µg	18–25
Trimetoprim-sulfametoxazol	SXT	1.25/23.75 µg	23–29
Chloramfenicol	C	30 µg	21–27
Cefalotin	KF	30 µg	15–21
Kyselina nalidixová	NA	30 µg	22–28
Ceftazidim	CAZ	30 µg	25–32
Gentamicin	CN	10 µg	19–26
Amoxicilin-kyselina klavulanová	AMC	20/10 µg	18–24
Ciprofloxacin	CIP	5 µg	30–40

ATB, antibiotikum

Obrázek: Disková difuzní metoda pro kmen *Escherichia coli* ATCC 25922**Reference:**

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Fifth Informational Supplement*. CLSI document M100-S25. CLSI, Wayne, PA, USA, 2015.

ÚKOL 1:

Doplňte do tabulky naměřené hodnoty inhibičních zón [mm.] U testovaných kmenů napište, zda se jedná o kmen citlivý, intermediální nebo rezistentní k danému antibiotiku (S, I, R).

U referenčního kmene *E. coli* ATCC 25922 uveďte, zda naměřené hodnoty byly v rozmezí udávaných hodnot dle metodiky CLSI (2015).

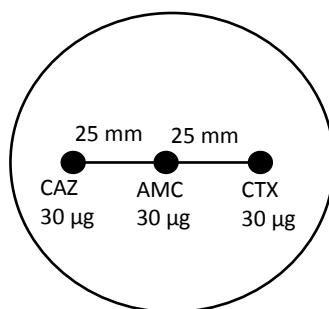
kmen	AMP	S	S3	TE	SXT	C	KF	NA	CAZ	CN	AMC	CIP
....												
výsledek												
...												
výsledek												
ATCC 25922												
výsledek												

ÚLOHA 2: Stanovení produkce širokospektrých beta-laktamáz metodou double-disk synergy test (DDST)

Testované kmeny: *E. coli* ATCC 25922, *E. coli* 172 DI/B

Postup:

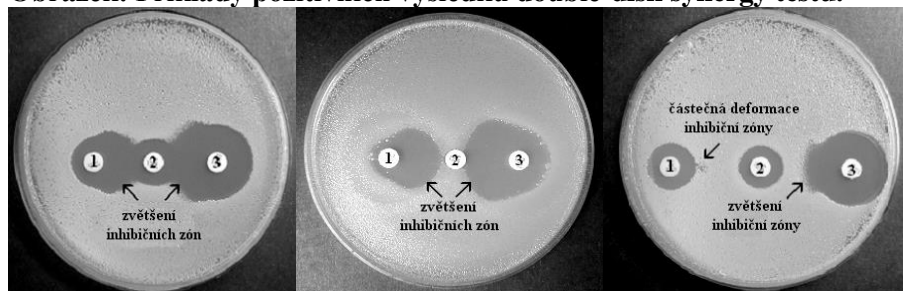
- 1) Pro každý testovaný izolát si označíme jednu denzila zkumavku.
- 2) Do denzila zkumavky napipetujeme 2 ml sterilní destilované vody.
- 3) Několik kolonií (přibližně 3 – 4 kolonie) resuspendujeme ve 2 ml sterilní destilované vody pomocí bakteriologické kličky.
- 4) Zkumavku s bakteriální suspenzí zvortexujeme.
- 5) Zákal suspenze bakterií změříme pomocí fotometru. Zákal by měl odpovídat hodnotě 0,5 McFarlandovy stupnice (tj. $\approx 1 - 2 \cdot 10^8$ CFU/ml). Pokud je zákal naší suspenze vyšší, ředíme ho pomocí sterilní destilované vody (vodu přikapáváme pomocí Pasteurovy pipety). Pokud je zákal naší suspenze nižší, přidáváme kulturu. Vždy si bereme čistou sterilní kličku.
- 6) Výchozí inokulum ředíme ve fyziologickém roztoku v poměru 1:100 tak, že 30 μ l homogenizované suspenze pipetou přeneseme do 3 ml sterilního fyziologického roztoku (URIN zkumavky se žlutým uzávěrem). Počet buněk ve výsledné suspenzi určené pro očkování ploten odpovídá přibližně 10^6 CFU/ml.
- 7) Suspenzi ihned (nejdéle však do 15 minut od přípravy) sterilně nalijeme na povrch předsušené plotny s Mueller-Hintonovým agarem. Přelití celého povrchu plotny docílíme jejím nakláněním na všechny strany. Následně je potřeba plotnu nahnout až do kolmé pozice a odpipetovat přebytečné inokulum.
- 8) Inokulum naočkované na povrchu Mueller-Hintonova agaru necháme dobře zaschnout. Na vlhkých plotnách se vytváří nehodnotitelné zóny inhibice.
- 9) Do středu naočkované plotny umístíme sterilní injekční jehlou disk s amoxicilinem-kyselinou klavulanovou (AMC, 30 μ g) a ve vzdálenosti 25 mm od středu disku položíme 2 cefalosporinové disky. Nalevo od disku s amoxicilinem-kyselinou klavulanovou se položí disk s ceftazidimem (CAZ, 30 μ g) a napravo disk s cefotaximem (CTX, 30 μ g). Schéma rozmístění disků je znázorněno na následujícím obrázku.



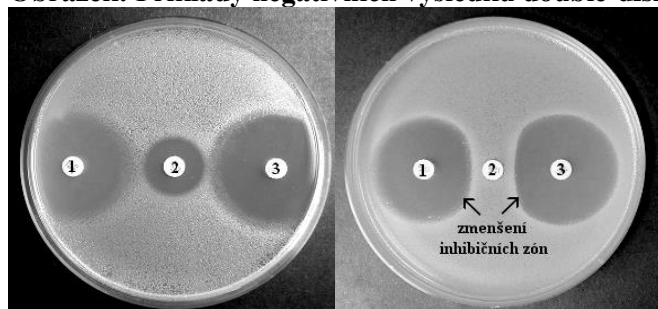
10) Plotny umístíme do termostatu (víčkem nahoru, neobracet, aby disky by nespadly) a inkubujeme při 37 °C přes noc (16-18 hodin).

11) Další den vyhodnotíme výsledky. Při **pozitivním výsledku** testu pozorujeme zvětšení inhibiční zóny v okolí cefotaximu a ceftazidimu u strany přilehlé k disku obsahujícího amoxicilin-kyselinu klavulanovou (AMC). Ke zvětšení inhibiční zóny došlo v důsledku inhibice produkce širokospektré beta-laktamázy inhibitorem - kyselinou klavulanovou. Tvar inhibiční zóny u disku cefotaximu (CTX) a ceftazidimu (CAZ) připomíná zátku od šampaňského. Změříme inhibiční zóny v okolí všech disků (v případě CAZ a CTX na straně vzdálenější od disku AMC). Při negativním výsledku nedojde ke změně tvaru inhibiční zóny. Příklady pozitivních a negativních výsledků jsou uvedeny na následujících obrázcích.

Obrázek: Příklady pozitivních výsledků double-disk synergy testu.



Obrázek: Příklady negativních výsledků double-disk synergy testu.

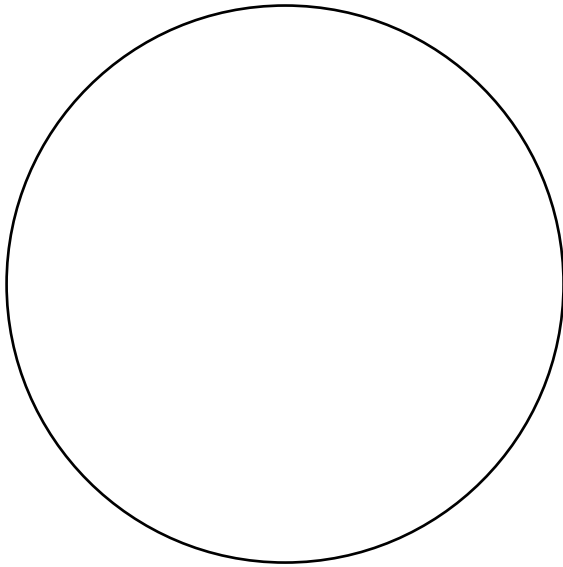


Reference:

CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) (2008) Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals 3rd ed. approved standard. Document M31-A3. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, 518 PA.

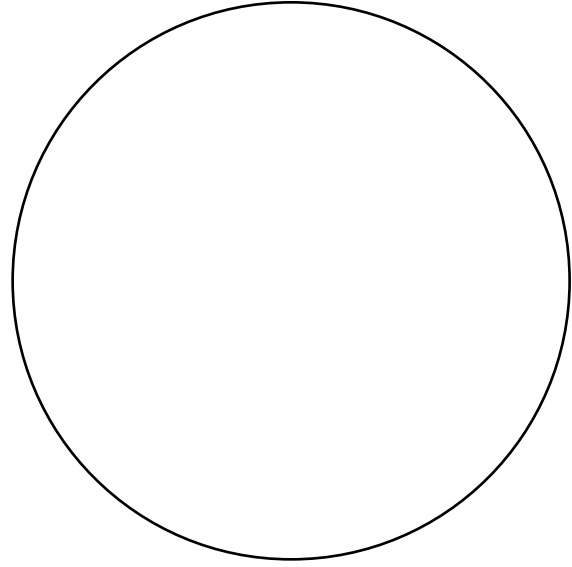
ÚKOL 2:

Zakreslete výsledek DDST pro kmeny *E. coli* ATCC 25922 a *E. coli* 172 DI/B. Napište, zda byl výsledek testu pozitivní či negativní.



E. coli ATCC 25922

Výsledek DDST:



E. coli 172 DI/B

Výsledek DDST: