

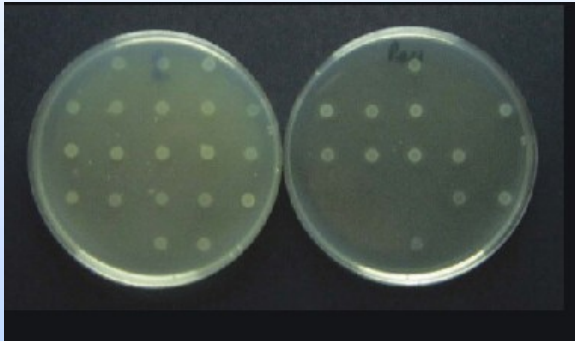
# Laboratorní kontrola antimikrobní terapie

Diluční metody

Update 2023

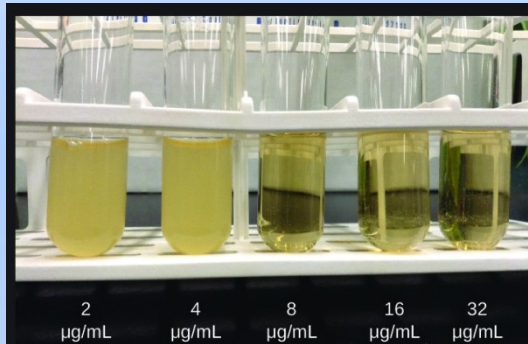
L.Pokludová MU\_CZ

# Diluční metody



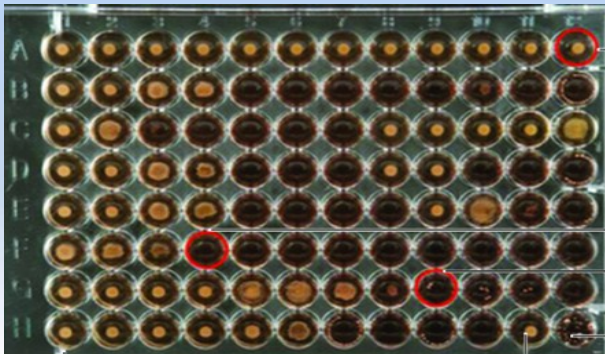
## Agarová diluční metoda

- Na Petriho miskách, agarové médium, antibiotikum v agaru
- Sada P.M. s dvojnásobně (geometricky) se zvyšující konc.
- Zde na obrázku miska vlevo nižší konc., proto narostlo více izolátů, vpravo miska s vyšší konc, některé izoláty již inhibovány
- Inokulum se nanáší bodově (mikromnožství)
- Body mají čísla (= č izolátů), hodnotí se nárůst, první miska, kde bod chybí (izolát nenarostl) je MIC



## Diluční bujónová metoda („makrometoda“- zkumavky)

- Sada zkumavek s dvojnásobně (geometricky) se zvyšující koncentrací, antibiotikum v bujónu
- Inokulace standardizovaným inokulem s kulturou bakterií (v určitém poměru s celk objemem média ve zkumavce),
- Hodnotí se zákal (= nárůst) vs čírost
- Třetí zkumavka, 8 µg/ml je MIC



## Diluční mikrometoda (bujón , destičky)

- Stejný princip jako „zkumavková metoda výše“, jen mikroobjemy, možnost větší automatizace inokulace i odečítání (readery)

# Diluční metody

- DILUCE = ředění (na různé koncentrace) => „hledáme takto nejčastěji MIC“
- Cílem je prokázat **stupeň rezistence (citlivosti)** testovaných bakteriálních kmenů k antimikrobikům
- **kvantitativní stanovení** stupně citlivosti (rezistence) stanovení hladiny **MIC** (Minimální Inhibiční Concentrace)
- Jsou vhodné i pro pomalu rostoucí bakterie a bakterie se speciálními nároky (včetně anaerobů) => Pro tyto druhy bakterií jsou vyvinuty modifikace metod, půd i kultivačních podmínek.

# Kvantitativní vyšetření citlivosti je metodou volby pro

- Mikroorganismy s nízkou růstovou rychlostí, nebo se speciálními kultivačními nároky, jako jsou například:
  - anaeroby, legionely, kampylobaktery, korynebakteria, nokardie, pomalu rostoucí nefermentující tyčky, mykotické organismy a další
- diluční mikrometodu (v tekutém médiu) **nelze** použít pro mikroorganismy, které v tekutém prostředí **autolyzují**

# Význam použité metody :

## 1) Základní výsledky stanovení slouží jako :

- podklad pro výběr antimikrobních látek event. **použitelné terapeutické koncentrace** (toto je důležité zejména u izolátů z tělních tekutin za normálních podmínek sterilních - krev, likvor aj.) se zaměřením na **cílenou léčbu** onemocnění způsobenou zkoumaným infekčním agens.

## 2) Rozšířené výsledky (včetně výsledků testování látek nepoužívaných v terapii) slouží jako podklad pro

- \* monitorování a přehledy rezistence,
- \* pro odlišení kmenů se sníženou citlivostí k lékům volby (u daného druhu bakterie a dané infekce)
- \* vyhledávání neobvyklé rezistence
  - HLA R enterokoky (HLAR)
  - VAN R enterokoky (VRE)

## 3) Speciální výsledky pro účely

- taxonomické
- pro účely laboratorního ověřování nově registrovaných přípravků aj.

# Diluční metody

## 7.1.1 Agarová diluční metoda

na Petriho miskách – pevné médium!

## 7.1.2 Diluční mikrometoda

v mikrodestičkách – tekuté médium!

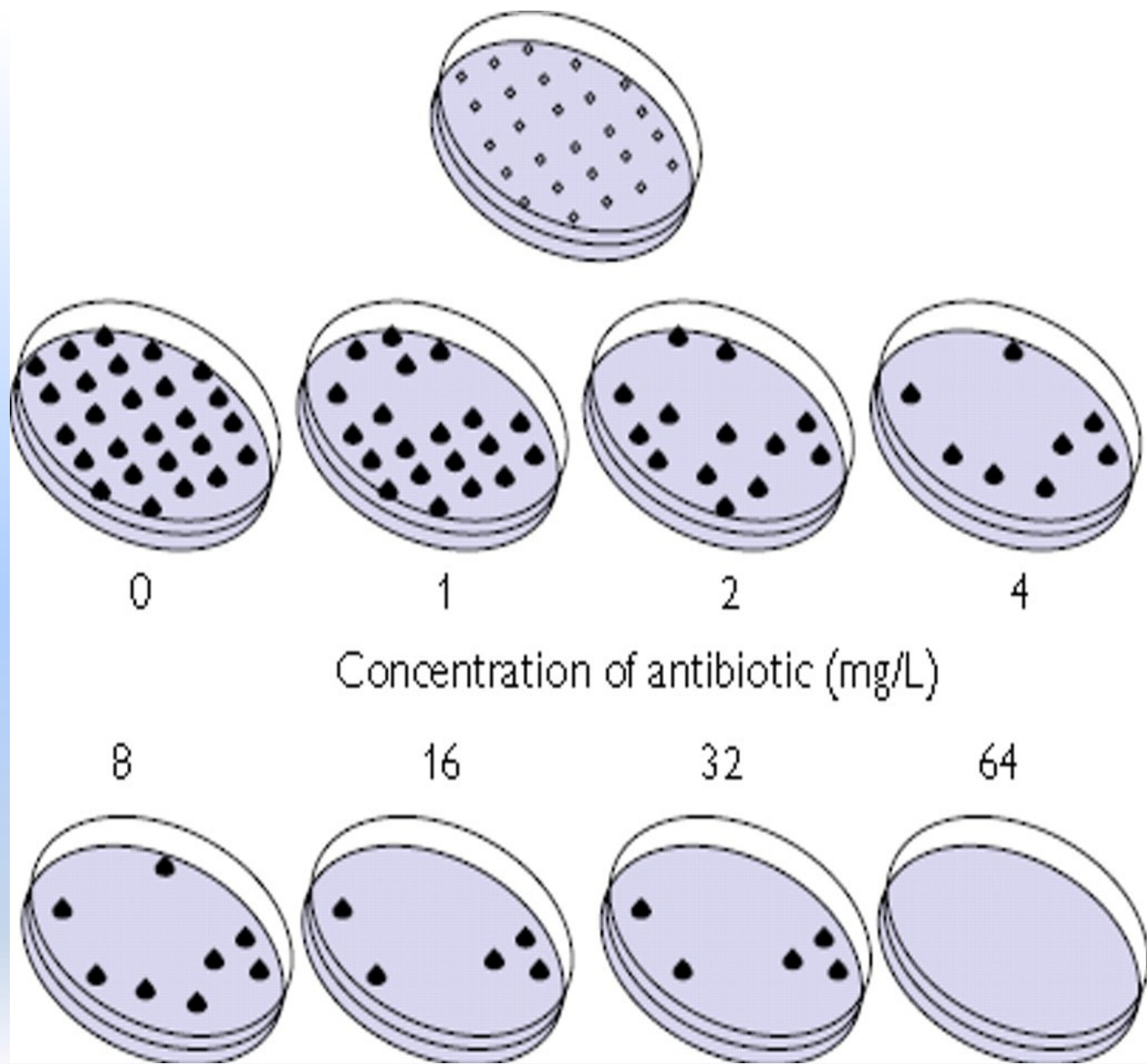
# 7.1.1 Agarová diluční metoda

## ● Princip metody

- MIC se hodnotí na agarových půdách, které obsahují zvolené koncentrace antibiotik.
- Obvykle se připravuje 12-15 koncentrací jednoho antibiotika, ředěných dvojnásobně geometrickou řadou.
- Na půdy se očkuje standardní inokulum vyšetřovaných bakterií.
- Na jednu plotnu obsahující jednu koncentraci antibiotika se ručně naočkuje cca 20 kmenů a inokulátorem 32 – 45 kmenů.

## ● Metoda

- je vysoce standardizovaná, referenční,
- lze jí vyšetřit velké množství kmenů za stejných podmínek
- je spolehlivá při hodnocení nových atb
- lze jí odhalit kontaminaci kmene i heterorezistentní populaci



Inoculation  
of plates



Determination  
of MICs by  
finding lowest  
concentration  
producing no  
growth



# Agarová diluční metoda

## kultivační média

- **Mueller - Hinton Agar (MHA) - komerčně vyráběné medium :**  
MHA bez obohacení vyhovuje pro testování citlivosti většiny kmenů.  
Má obsahovat 20 - 25 mg Ca<sup>2+</sup> a 10 - 12,5 mg Mg<sup>2+</sup>, skladování krátkodobé : 2-8 °C
- **Mueller Hinton Agar + 5 % defibrinované koňské krve + 20 mg/L β-NAD (MH-F)**  
pneumokoky, listerie  
hemofily, branhamely,  
kampylobakter, moraxela,  
pasteurella, korynebakteria ...
- **BCYE ( pufr. agar s kvasnič. extr. a živočiš. uhlím)** legionely  
Buffered Charcoal Yeast Extract Agar supplemented with α-ketoglutarate (BCYE-α)
- **WCA (Wilkins Chalgren Agar), BA (Brucela Agar)** anaeroby
- **(MHA + 2 % NaCl)** dříve stafylokoky (OXA )

# Agarová diluční metoda

## postup přípravy ploten

- 1) Na předem označené P.M. se napipetuje příslušná koncentrace antimikrobika (celkový objem 2 ml).
- 2) Následně do P.M. na misku o průměru 90 mm (výška agaru cca 4 mm = cca 25 ml vysterilizovaného média ochlazeného na max 45 °C. Miskou se krouživým pohybem rozvrství rovnoměrně agar bez bublin a ponechá se utuhnout na vodorovné ploše.
- 3) Misky s bublinami vzduchu, nerovnoměrně ztuhlým agarem event. nerovným povrchem se musí vyřadit.
- 4) Skladovat lze při 4 °C zatavené do plastových fólií 7 dní, misky s ampicilinem a cefaclorem 3 až max 5 dní, misky s imipenemem nebo amox/clav se musí spotřebovat v den přípravy.
- 5) Před použitím nechat plotny vytemperovat a nejlépe i předsušit při 36 °C (nesmí obsahovat kondenzní vodu – kolonie by se „slily“)

# Agarová diluční metoda inokulum

- K přípravě inokula o vyhovující koncentraci buněk se používá
  - zákalový standard dle McFarlanda odpovídající koncentraci  **$5 \times 10^4$  buněk / ml.** Hodnocení referenční suspenze a suspenze mikroorganismů pomocí zákalometru.

# Agarová diluční metoda

## postup inokulace

- Obvykle se očkuje 1 – 2  $\mu\text{l}$  a vytvoří se otisk o průměru max 5 mm
- **Inokulace :**
  - mikropipetou, kalibrovanou kličkou nebo inokulátorem
- Paralelní inokulace kontrolní plotny bez atb,
- očkování od nejnižší koncentrace atb po nejvyšší
- Po naočkování nechat zaschnout inokulované kapky a pak teprve přemístit do termostatu

# Agarová diluční metoda

## referenční mikroorganismy

- **Referenční mikroorganismy**

- Kmeny se stabilními vlastnostmi a známou citlivostí k antibiotikům poskytované sbírkami typových kultur.
- Slouží pro kontrolu přesnosti stanovení a kontrolu dodržování standardní hustoty inokula a standardního pracovního postupu.
- S touto kontrolou je nutno pracovat nejlépe při každé sérii stanovení, zcela nezbytná je pak kontrola každé nové série misek.

- **Používání referenčních kmenů**

- Kmeny jsou distribuovány např. Českou sbírkou mikroorganismů v Brně ve formě želatinových disků na jedno použití . Tato forma uložení zajišťuje stálost vlastností kmene a minimalizuje možnost kontaminace . Oživování kmenů ze želatinových disků odpovídá návodu z CCM .

# Kontrolní kmeny – želatinové disky



MASARYKOVA UNIVERZITA  
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA  
ÚSTAV EXPERIMENTÁLNÍ BIOLOGIE



Česká sbírka mikroorganismů (CCM)

tel.: +420 549 491 430 • fax +420 543 247 339

e-mail: [ccm@sci.muni.cz](mailto:ccm@sci.muni.cz) • <http://www.sci.muni.cz/ccm>

## DOPORUČENÉ KONTROLNÍ KMENY PRO TESTOVÁNÍ MÉDIÍ V KLINICKÉ MIKROBIOLOGII - Bakteriologie

Vzhledem ke standardizaci práce v mikrobiologických laboratořích hrají důležitou roli použitá média a jejich kvalita. Česká sbírka mikroorganismů vám nabízí kontrolní kmeny pro testování médií v klinické mikrobiologii.

**Forma dodání:** želatinové disky nebo lyofilizáty

# Agarová diluční metoda

## **inkubace ploten**

- Do 15 minut po inokulaci se misky umístí do termostatu ve sloupci po maximálně 5 miskách a inkubují se při teplotě do 35 °C
- doba kultivace a použitá atmosféra – např. CO<sub>2</sub> (dle specifikace mikroorganismu).

# Agarová diluční metoda - hodnocení

- Po příslušné době inkubace se misky vyjmou z termostatu a umístí na tmavou podložku. (pokud není používáno automatického readeru a vyhodnocovače).
- Zhodnotí se nárůst mikroorganismů na kontrolních miskách bez atb a posoudí se čistota kultur.
- Odečte se koncentrace, která zřetelně inhibuje růst.
- Velmi jemný povlak, který se vytváří v koncentracích vyšších než je koncentrace zřetelně inhibující růst se ignoruje.
- Vyšetření se opakuje při podezření na kontaminaci inokula (jiný vzhled na P.M. s různými koncentracemi).

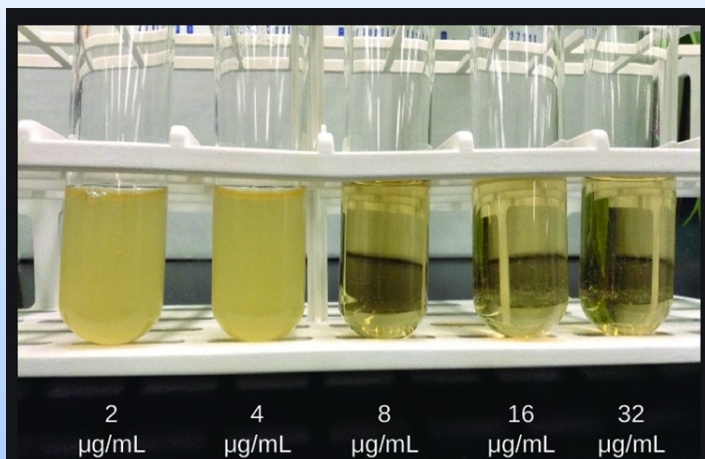


# Agarová diluční metoda - vyjadřování výsledků a interpretace

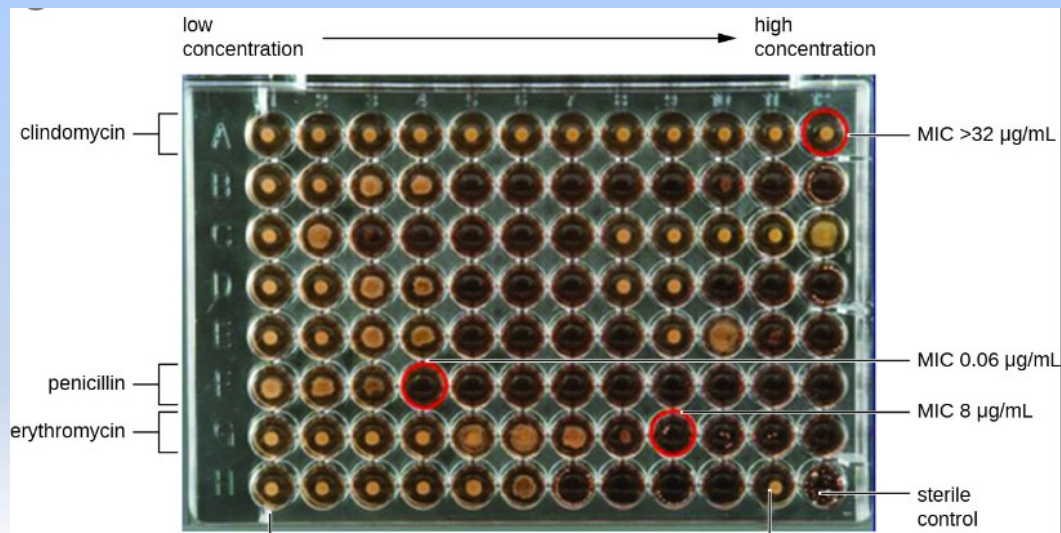
- Nejnižší koncentrace atb, která inhibuje růst je MIC.
- MIC zjištěná u testovaného kmene se porovnává s breakpointy citlivých kmenů.
- Kmeny s MIC rovnou nebo nižší než breakpoint jsou označeny jako citlivé.
- U některých mikrobů a nebo při pochybnostech (např. u mikrobů produkujících ESBL beta-laktamázy je nutno provést doplňková vyšetření).

# Diluční metody v tekutém médiu

- Diluční „zkumavková“ metoda



- Diluční mikrometoda



## 7.1.2 Diluční mikrometoda

- Je používána ke **kvantitativnímu** stanovení aktivity antimikrobních látek vůči bakteriálním izolátům.
- Stanovuje se **MIC**, tj. nejnižší koncentrace, která viditelně inhibuje růst testovaného mikroorganismu.
- Sterilní plastová **mikrodiluční destička** obsahující v jednotlivých mikrojamkách v bujónu rozplněné postupně dvojnásobná ředění (geometrická řada) => sada **koncentrací antibiotik** (v rozsahu obsahujícím brakpointovou koncentraci) je inokulována standardizovanými suspenzemi testovaných bakterií. Inkubuje se 18 - 24 hod při 35 °C.

# Diluční mikrometoda

## kultivační média

- **Mueller - Hinton broth (MHB):**

- **komerčně vyráběné medium dle ISO standardu 20776-1, 2019:**

MHB bez obohacení vyhovuje pro testování citlivosti většiny kmenů.

Má obsahovat 20 - 25 mg Ca<sup>2+</sup> a 10 - 12,5 mg Mg<sup>2+</sup>, skladování krátkodobé : 2-8 °C

- **Mueller Hinton Broth + 5% lyzátu koňské krve + 20 mg/L β-NAD**

- *Streptococcus* spp. (including *S. pneumoniae*), *Haemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis*, *Listeria monocytogenes*, *Campylobacter jejuni* a *C.coli*, *Pasteurella multocida*, *Corynebacterium* spp., *Aerococcus sanguinicola* a *A. urinae*, *Kingella kingae*

- **BHI (Brain Heart Infusion),**

- **AB (Wilkins Chalgren), BB (Brucela Broth)** anaeroby

- Destička z každé připravené série se inkubuje při 35°C / 24 hodin pro kontrolu sterility (v odděleném termostatu).

- Zatavením destiček do sáčků nebo důkladným přebalem alobalem lze zamezit odparu vody a prodloužit dobu použitelnosti na 2 týdny po přípravě.

- Destičky lze skladovat zamražené při teplotě -20°C až 6 - 8 týdnů a při -70 °C i déle.

- Roztoky ampicilinu menší stabilita (max 4 týdny), Roztoky amox/clav a imipenemu nestabilní - nelze zmrazit.

# Diluční mikrometoda

## způsob inokulace

- **Inokulum o hustotě :**
  - $5 \times 10^{4-5}$  v jamce se 100 $\mu$ l tj.  $5 \times 10^{5-6}$  buněk/ml
  - Obvykle se očkuje 1 – 5  $\mu$ l (max však 10  $\mu$ l) na jamku
- **Inokulace :**
  - vícekanálovou mikropipetou např. z P.M. nebo
  - multidávkovým replikátorem z dávkovače

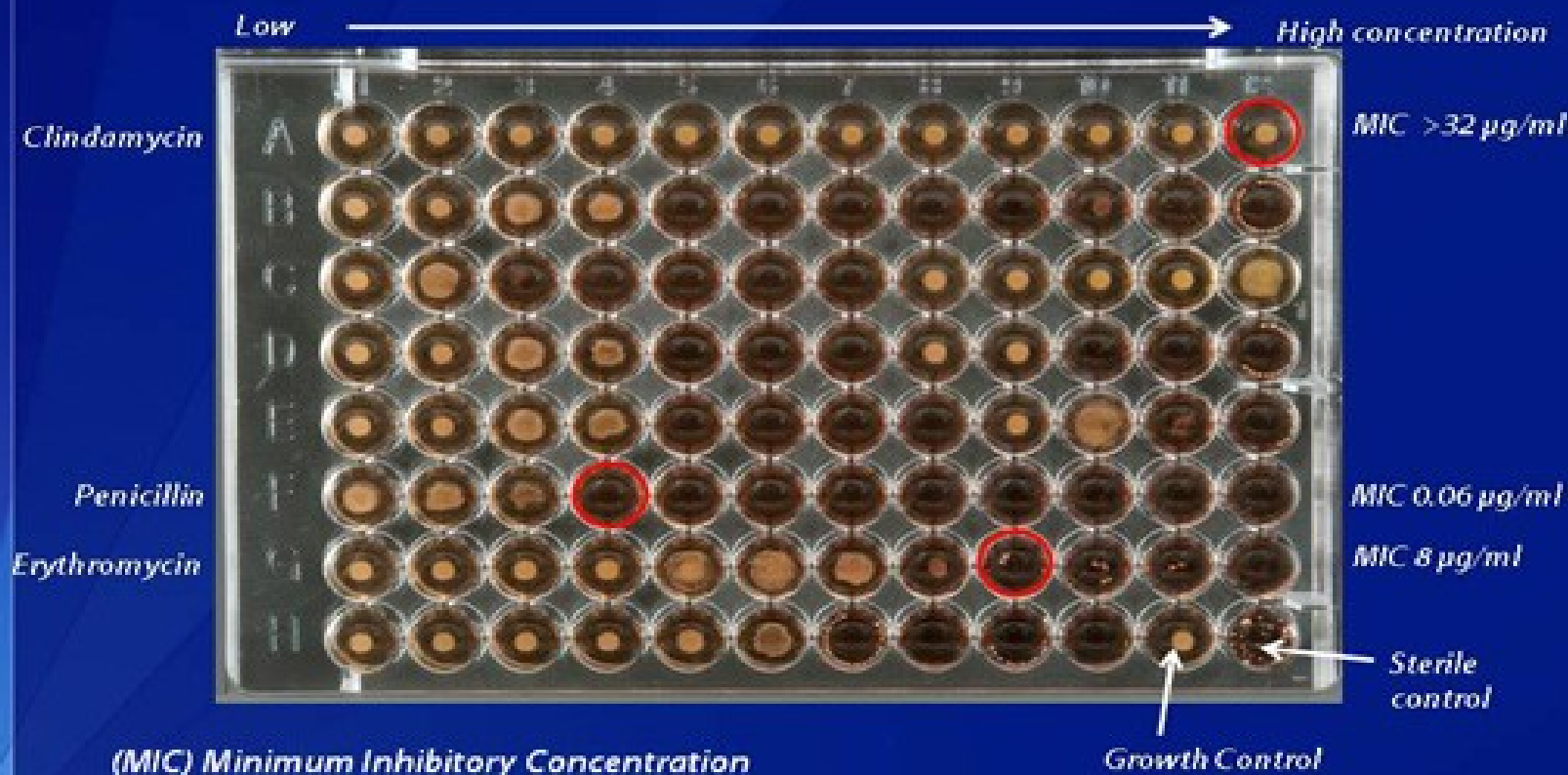
# Diluční mikrometoda inkubace destiček

- Nejpozději do 30 minut po inokulaci se destičky umístí do termostatu a inkubují se při teplotě do 3 °C
- doba kultivace a použitá atmosféra – např. CO<sub>2</sub> (dle specifikace mikroorganismu).

# Odečítání MIC

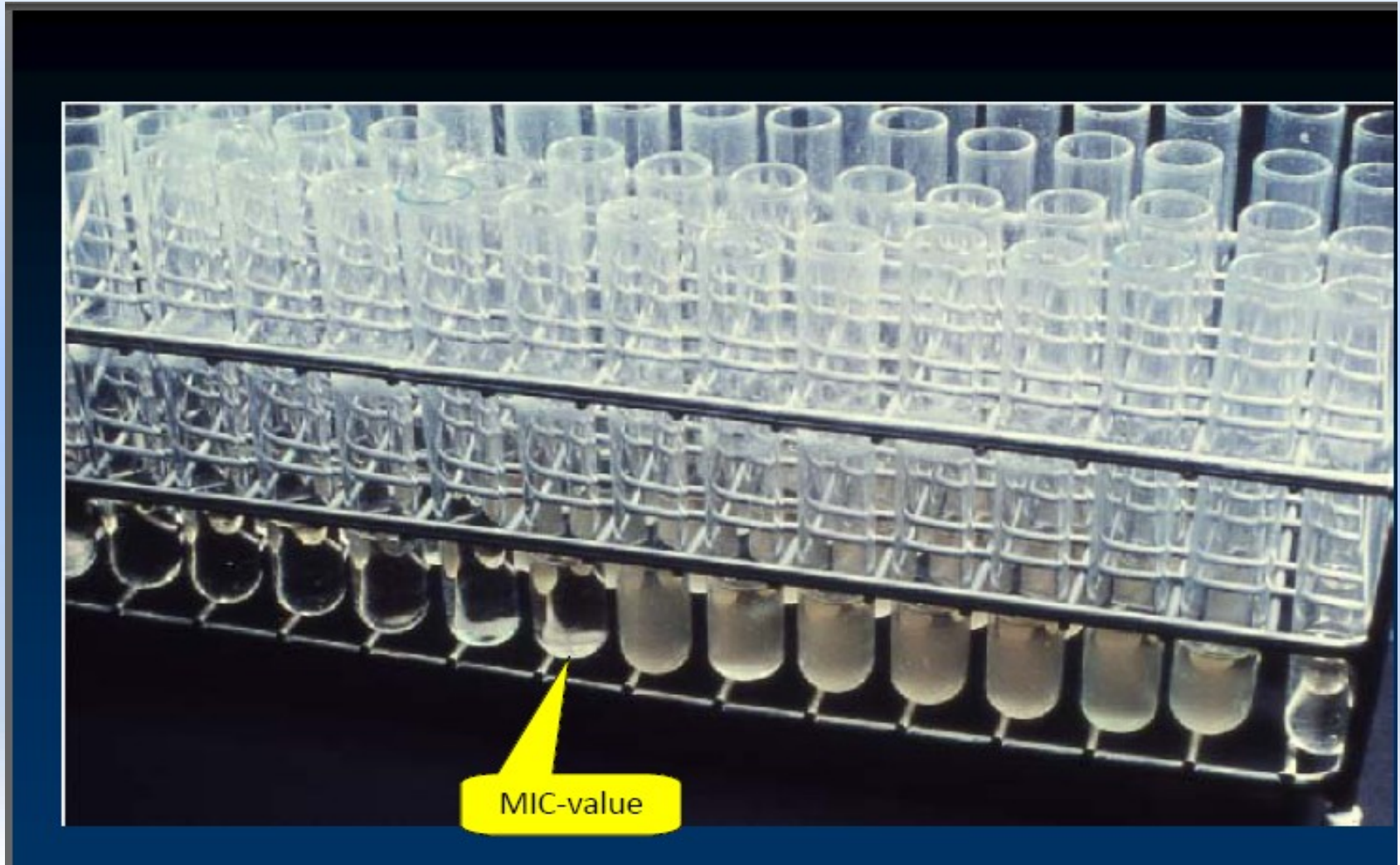
## mikrodiluční metoda (zdroj CDC, Lesley McGee)

### Antimicrobial Susceptibility Test Broth Microdilution Dilution





# Odečet MIC (zdroj foto EUCAST)



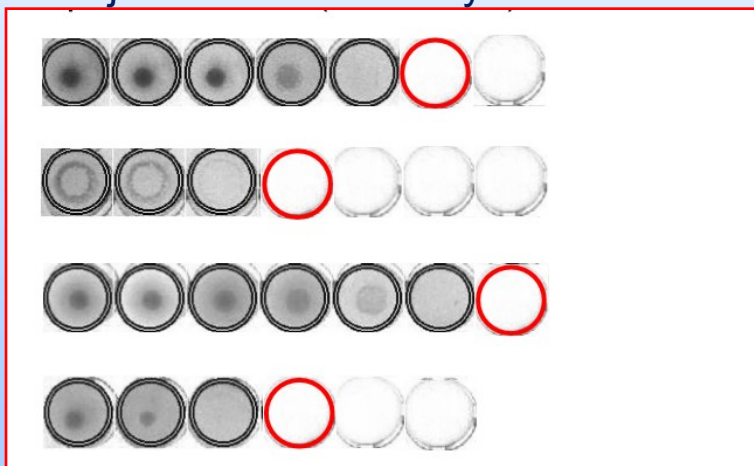


# Diluční mikrometoda - hodnocení

- Po příslušné době inkubace se destičky umístí na tmavou podložku. (pokud není používáno automatického readeru a vyhodnocovače).
- Zhodnotí se nárůst mikroorganismu v kontrolní jamce obsahující pouze živné médium bez atb a posoudí se zda je zákal difúzní nebo sedimentující.
- S pozitivní kontrolou růstu se porovnávají další jamky, které však již obsahují atb. Odečte se koncentrace, která zřetelně inhibuje růst.
- U trimetoprimu a sulfonamidů se odečítá jako negativní už koncentrace s velmi slabým zákalem (tam kde je růst inhibován cca z 80 %)
- Jedna čirá jamka v řadě jamek se zřetelným nárůstem se ignoruje, nejedná-li se o jamku s nejvyšší koncentrací atb. Také dvě číré jamky je možno ignorovat, pokud se po nich vyskytují alespoň dvě jamky se zřetelným nárůstem. Jiné odchylky by měly být zváženy a vyšetření by mělo být eventuálně zopakováno.

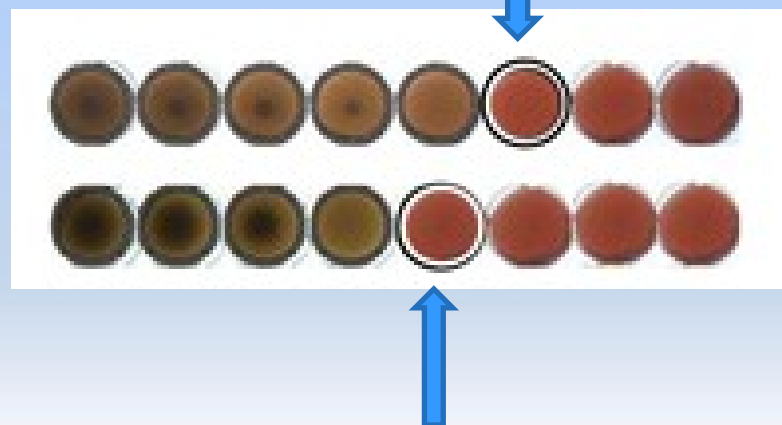
## Čiré MHB médium - odečet

Mírný zákal, nebo zákal bez vloček pozorovaný u izolátů pseudomonád nebo acinetobakterů musí být považován za nárůst a tak jako MIC lze odečíst až první čirou jamku bez viditelného zakalení(nárůstu).  
MIC jsou zakroužkovány červeně.



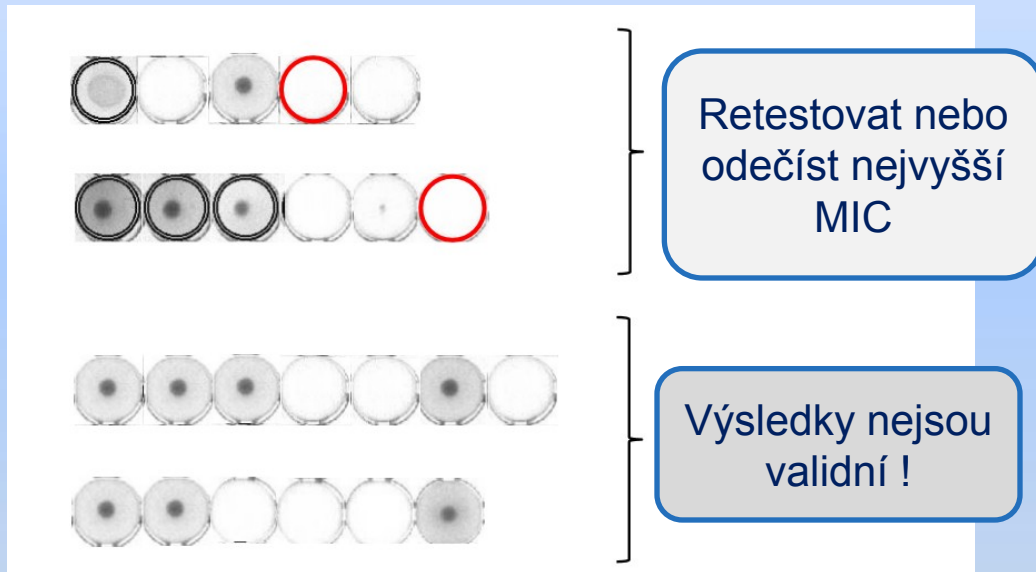
## MH-F médium – hemolýza - odečet

Pro mikroorganismy testované na médiu MH-F může být patrná hemolýza krevních komponent. Většinou je spojená se zákallem, nebo usazeninou (vločkami). Odečtete jako MIC až jamky bez těchto efektů



## Odečet při „vynechané“ jamce

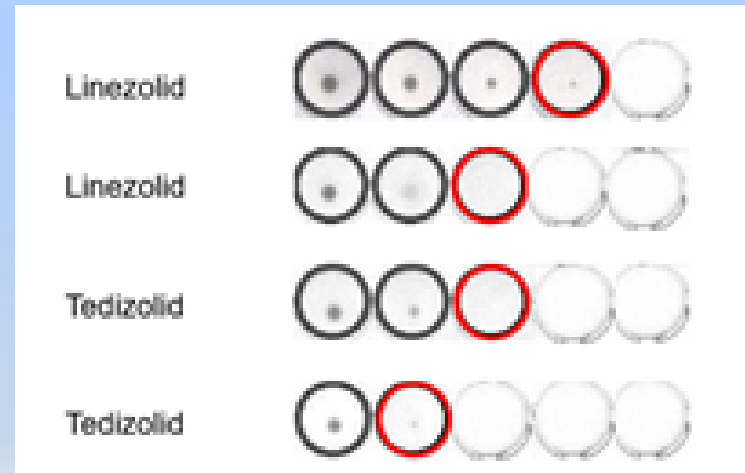
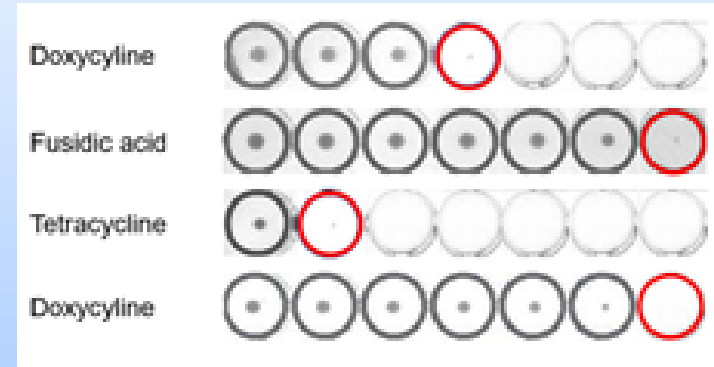
Může dojít k situaci, kdy vybrané jamky jsou „vynechány“, tj. chybí v nich nárůst, což může být např. způsobeno ucpáním kanálu pipety a neinokulováním. Test je vhodné zopakovat, nebo v případě pouze individuální jamky odečíst následovně. MIC jsou zakroužkovány červeně.



## Odečítání G+ koků s bakteriostatickými ATM

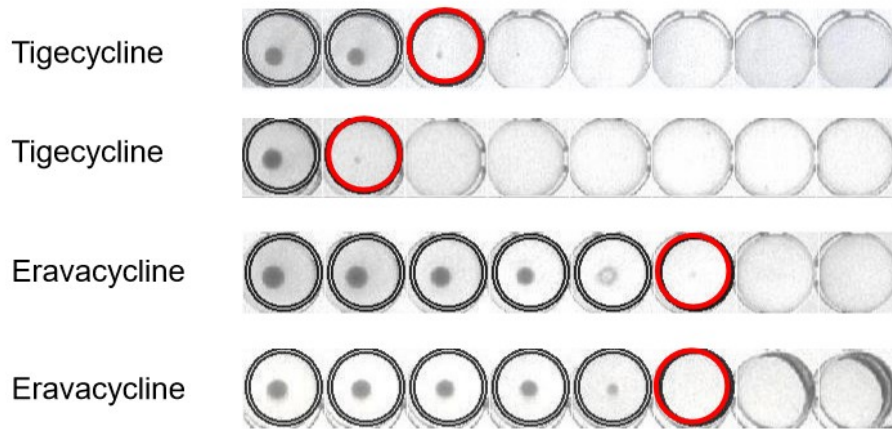
Neberte v úvahu téměř nepatrný nárůst (špendlíková hlavička/tečka).

MIC jsou zakroužkovány červeně.

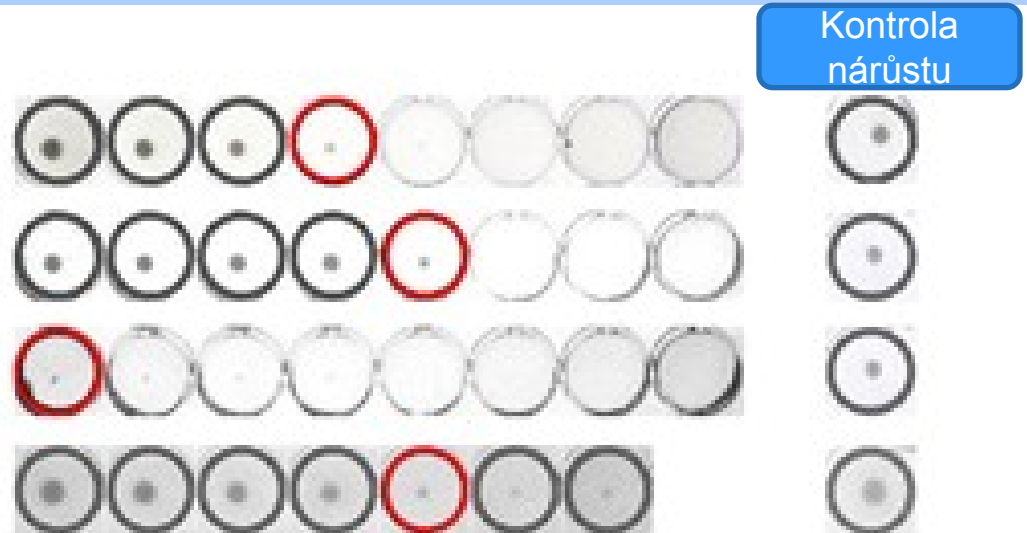


## G- mikroorganizmy : tigecyklin a eravacyklin

Neberte v úvahu téměř nepatrný nárůst (špendlíková hlavička/tečka). MIC jsou zakroužkovány červeně.



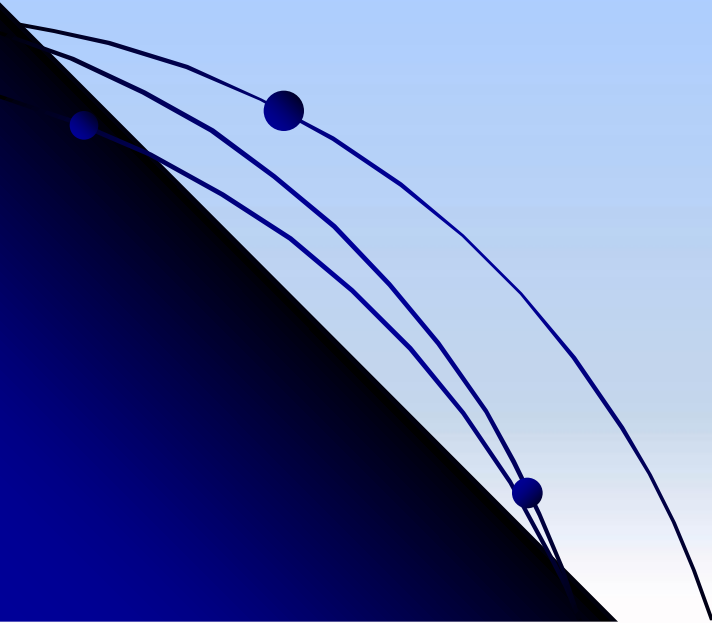
**Trimethoprim a kombinace Trimethoprim/sulfamethoxazol**  
Odečti MIC nejnižší koncentrace, která inhibuje  $\geq 80\%$  nárůstu v porovnání s kontrolou nárůstu. MIC jsou zakroužkovány červeně.



# Cefiderocol

- Broth microdilution MIC determination must be performed in iron-depleted Mueller-Hinton broth and specific reading instructions must be followed. For testing conditions, see [http://www.eucast.org/guidance\\_documents/](http://www.eucast.org/guidance_documents/).
- The MIC is read as the first well in which the reduction of growth corresponds to a button of <1 mm or is replaced by the presence of light haze/faint turbidity.
- The positive control should show strong growth in the form of a button of >2 mm or heavy turbidity.
- See next slide for pictures with reading examples.

NEW 2023



# Pro interpretaci výsledků je zásadní:

- Před hlášením výsledků klinických izolátů je nutné se ujistit, že hodnoty MIC pro kmeny používané v rámci kontroly kvality jsou v rámci akceptovatelných rozmezí (viz EUCAST QC kritéria).
- Interpretovat MIC hodnoty dle současných kategorií:
  - S = susceptible => C = Citlivý
  - R = resistant => R = rezistentní
  - I = susceptible, increased exposure => I = citlivý, zvýšená expozice

## Interpretation of results

- Make sure that MIC values for relevant Quality Control strains are within acceptable ranges before reporting results for clinical isolates.
  - See quality control criteria in EUCAST QC Tables ([www.eucast.org](http://www.eucast.org)).
- Interpret MIC values into susceptibility categories (S, I and R) according to the current EUCAST Breakpoint Tables ([www.eucast.org](http://www.eucast.org)).

Prezentace je určena výslovně pro účely výuky,

**Použité fotografické materiály pocházejí**

**z citovaných zdrojů:**

Web stránky EUCAST

Web stránky CCM

Prezentace není určena k dalšímu šíření.