

## **Protokol č. 8: Stanovení citlivosti k antibiotikům, stanovení koncentrace antibiotik**

**Úvod:** Antibiotika jsou chemické látky produkované různými mikroorganismy nebo synteticky vyráběné. Navzájem se liší chemickou strukturou, spektrem účinnosti a mechanismem účinku. Spolu s desinfekčními prostředky se antibiotika řadí mezi chemické kontroly mikrobiálního růstu, jsou produkována proto, aby potlačila růst konkurenčních druhů a získala tak výhodu pro druh, který je produkuje. V přirozeném prostředí jsou největšími producenty antibiotik houby, které exkrecí svých sekundárních metabolitů ovlivňují mikroorganismy ve svém bezprostředním okolí (např. rody *Penicillium*, *Aspergillus*, *Cephalosporium*, aj.). Vzhledem k této schopnosti ovlivňovat růst mikrobů je část těchto produktů využívána jako chemoterapeutické látky. Pro zhodnocení účinku je důležitá koncentrace látky, doba kontaktu a je-li pro bakterie letální (baktericidní) nebo způsobuje-li přechodnou inhibici růstu (bakteriostatické látky). Je také důležité určit citlivost mikroorganismu k aplikované látce (z důvodu aplikace v medicíně), což se provádí nejčastěji pomocí difúzního testu v agarovém mediu nebo pomocí dalších metod.

**Materiál:**

- Petriho miska s Mueller-Hiltonovým agarem
- sterilní Petriho misky s MPA (M 2)
- sterilní vatová tyčinka
- standardy a vzorky oxacilinu
- kokrovrty a skalpely
- pipety, zkumavky
- antimikrobiální disky
- sterilní pinzeta
- pravítko
- kahan

Bakteriální kmeny:

- *Staphylococcus aureus* NCTC 8511
- *Morganella morganii subsp. morganii* CCM 680

**Postup:**

úkol č. 1: Stanovení citlivosti bakterií k různým antibiotikům diskovou metodou

- Na připravenou Petriho misku s Mueller-Hiltonovým agarem jsme sterilní vatovou tyčinkou nanесли bakteriální kulturu ze zkumavky s šikmým agarem (*Morganella morganii subsp. morganii*) a pečlivě kulturu rozetřeli po celé Petriho misce.
- Na naočkovanou Petriho misku jsme pak pinzetou sterilně rozložili 6 testovacích disků s antibiotiky, po každém nanesení jsme pinzetu žíhali v plamenu.
- Nechali jsme inkubovat při 37 °C 23 hodin.

úkol č. 2: Stanovení koncentrace oxacilinu v neznámém vzorku difúzní jamkovou metodou

- Z Petriho misek naočkovaných druhem *Staphylococcus aureus* a s různou koncentrací oxacilinu jsme odečítali výsledky po 24hodinové inkubaci.
- Nejprve jsme počítali průměry inhibičních zón u misek se známou koncentrací oxacilinu, poté jsme počítali inhibiční zóny z misky o neznámé koncentraci oxacilinu.

## Vyhodnocení: Úkol č. 1:

**Tab. 1:** Průměry inhibičních zón vytvořených kolem disků různých druhů antibiotik rozložených na MH mediu s *Morganella morganii subsp. morganii*

Název antibiotika (zkratka)	c (µg/ml, m.j.)	r inhibičních zón (mm)
penicilin (PEN)	10	0
cefalotin (CLT)	30	0
ampicilin (AMP)	10	13
erytromycin (ERY)	15	0
oxacilin (OXA)	1	0
chloramfenikol (CMP)	30	23,5

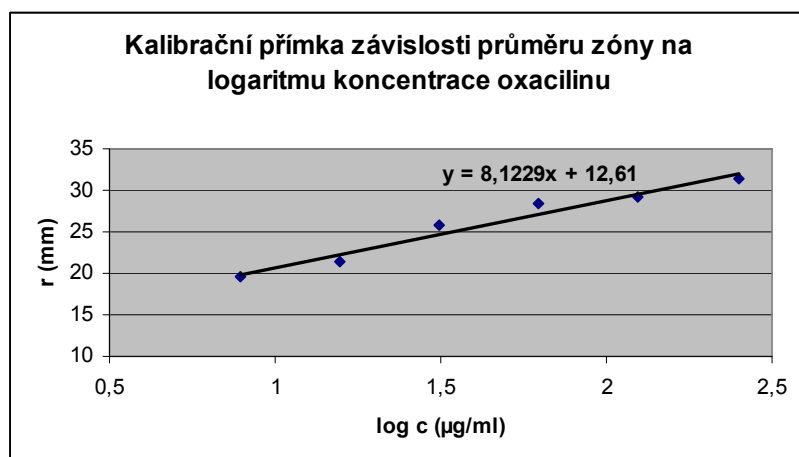
## Úkol č. 2:

**Tab. 1:** Závislost průměrných hodnot průměru inhibičních zón na koncentraci standardní řady roztoků oxacilinu pipetovaných na MPA s druhem *Staphylococcus aureus*

c standard (µg/ml)	r inhibičních zón (mm)
7,81	19,53
15,625	21,5
31,25	25,75
62,5	28,375
125	29,2
250	31,5

**Tab. 2:** Závislost průměrných hodnot průměru inhibičních zón na logaritmu koncentrace standardní řady roztoků oxacilinu pipetovaných na MPA s druhem *Staphylococcus aureus*

log c standard (µg/ml)	r inhibičních zón (mm)
0,893	19,53
1,194	21,5
1,495	25,75
1,796	28,375
2,097	29,2
2,398	31,5



Rovnice regrese:

$$y = 8,1229x + 12,61$$

**neznámý vzorek č. 4:**

$$\begin{aligned} r_1 &= 21,5 \\ r_2 &= 23 \\ r_3 &= 21,5 \\ r_4 &= 21,5 \\ r \text{ (průměr)} &= 21,875 \end{aligned}$$

$$21,875 = 8,1229x + 12,61$$

$$x = 1,141 \Rightarrow \log c = 1,141 \text{ } \mu\text{g/ml}$$

$$c = 10^{1,414}$$

$$c = \underline{13,836 \text{ } \mu\text{g/ml}}$$

**Závěr:** Při stanovování citlivosti bakterií k různým antibiotikům diskovou metodou jsme zjistili, že druh *Morganella morganii subsp. morganii* je citlivý pouze na 2 druhy použitých antibiotik z 6 použitých. Na antibiotika penicilin, cefalotin, erytromycin a oxacilin tedy citlivý není, protože kolem disků s těmito druhy se nevytvořila žádná kruhová inhibiční zóna. Kolem disku s ampicilinem se vytvořila inhibiční zóna s průměrem 13 mm, což znamená, že *Morganella* je na toto antibiotikum velmi citlivá (5 – 10 mm = citlivý mikroorganismus, nad 12 mm velmi citlivý). Kolem disku s chloramfenikolem se vytvořila zóna s průměrem 23,5 mm, což znamená, že je na toto antibiotikum také velmi citlivá. Velikost zóny je ovlivněna schopností antibiotika difundovat médiem, používají se proto pouze ty antibiotika, které difundují dobře, a jako medium se ke kultivaci používá Mueller-Hiltonův agar, ve kterém látky volně difundují.

Při stanovování koncentrace oxacilinu v neznámém vzorku difúzní jamkovou metodou jsme nejprve spočítali průměry inhibičních zón u vzorků, kde jsme znali koncentraci oxacilinu, abychom mohli sestavit kalibrační přímkou a z ní zjistit rovnici regrese. Na misce s neznámou koncentrací oxacilinu jsme pak spočítali průměr inhibiční zóny (průměrná hodnota ze 4) a dosadili do rovnice regrese z grafu. Koncentrace vzorku č. 4 byla tedy 13,836  $\mu\text{g/ml}$ . Všechny misky, na kterých jsme počítali průměry inhibičních zón už jsme měli připravené, byl použit druh *Staphylococcus aureus*. Principem jamkové metody je, že testované látky (oxacilin) se pipetují do jamek vyhloubených korkovrtem přímo do agarové vrstvy.