

# Stanovení citlivosti bakterií k ATB, stanovení koncentrace ATB

**Cíl: Stanovit citlivost MO k ATB**

**Porovnat citlivost různých MO k různým ATB**

**Stanovit min. inhibiční koncentraci dilučním testem**



MO – produkují látky s ATB vlastnostmi; sekundární metabolity

ATB - liší se původem, chemickou strukturou, spektrem účinnosti, mechanismem účinku

- aplikovaná ATB – málo, testy, škodlivost makroorganismu

- *Bacillus*, *Streptomyces*, *Penicillium*...

*Streptomyces griseus* (streptomycin)

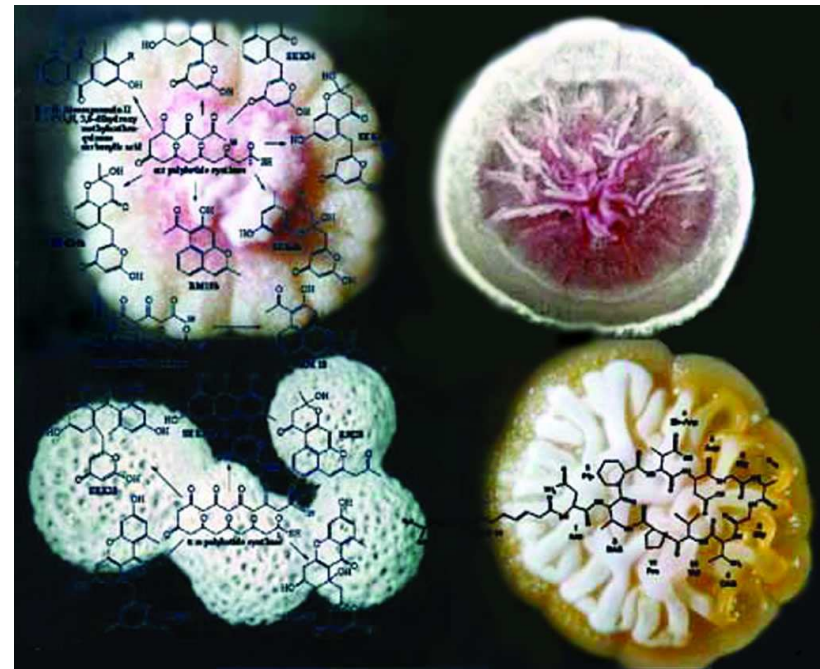
*S. kanamyceticus* (kanamycin)

*S. erythraeus* (erytromycin)

*S. venezuelae* (chloramfenikol)

*S. aureofaciens* (chlortetracyklin)

*S. fradiae* (neomycin)



# Antimikrobiální látky

## Látky působící celkově:

Antiparazitární látky proti parazitům

Antimykotika proti kvasinkám a vláknitým houbám

Antivirotika proti virům

Antituberkulotika proti mykobakteriím

Antibiotika proti bakteriím (přírodního původu)

Antibakteriální chemoterapeutika také proti bakteriím, ale syntetická

*V poslední době se stírají rozdíly mezi posledními dvěma*

## Látky působící lokálně:

antiseptika

- **CHEMOTERAPEUTIKA = chemicky** syntetizované látky, které ve **velmi nízkých koncentracích** (řádově  $\mu\text{g/ml}$ ) mohou inhibovat nebo usmrtit (citlivé) mikroorganismy.
- **ATB = jakákoliv látka přirozeného, semisyntetického nebo syntetického původu, která již ve velmi nízkých koncentracích (řádově  $\mu\text{g/ml}$ ) může inhibovat nebo usmrtit (citlivé) mikroorganismy (prostřednictvím specifických inhibičních účinků na specifické děje).**
- Mikrobicidní x mikrobi**statický** účinek
- POZOR na nežádoucí účinky!!

# MECHANIZMY ÚČINKU ANTIMIKROBIÁLNÍCH LÁTEK

- **Inhibice syntézy BS** (Beta-laktamy, glykopeptidová ATB, baktericidní)  
Penicilíny, cefalosporiny, vankomycin, teikoplanin, bacitracin, cykloserin, fosfomycin
- **Poškození syntézy cytoplazmatické membrány**  
baktericidní  
Polypeptidy (colistin, polymyxin, tyrothricin)  
Antimykotika polyenového charakteru (amfotericin B a nystatin)

- **Inhibice proteosyntézy**

kys. fusidová, oxazolidinony – linezolid a eperelinezolid

baktericidní - aminoglykosidy (30S)  
bakteriostatické - makrolidy (50S), tetracykliny (30S),  
linkosamidy (50S), amfenikoly (50S)

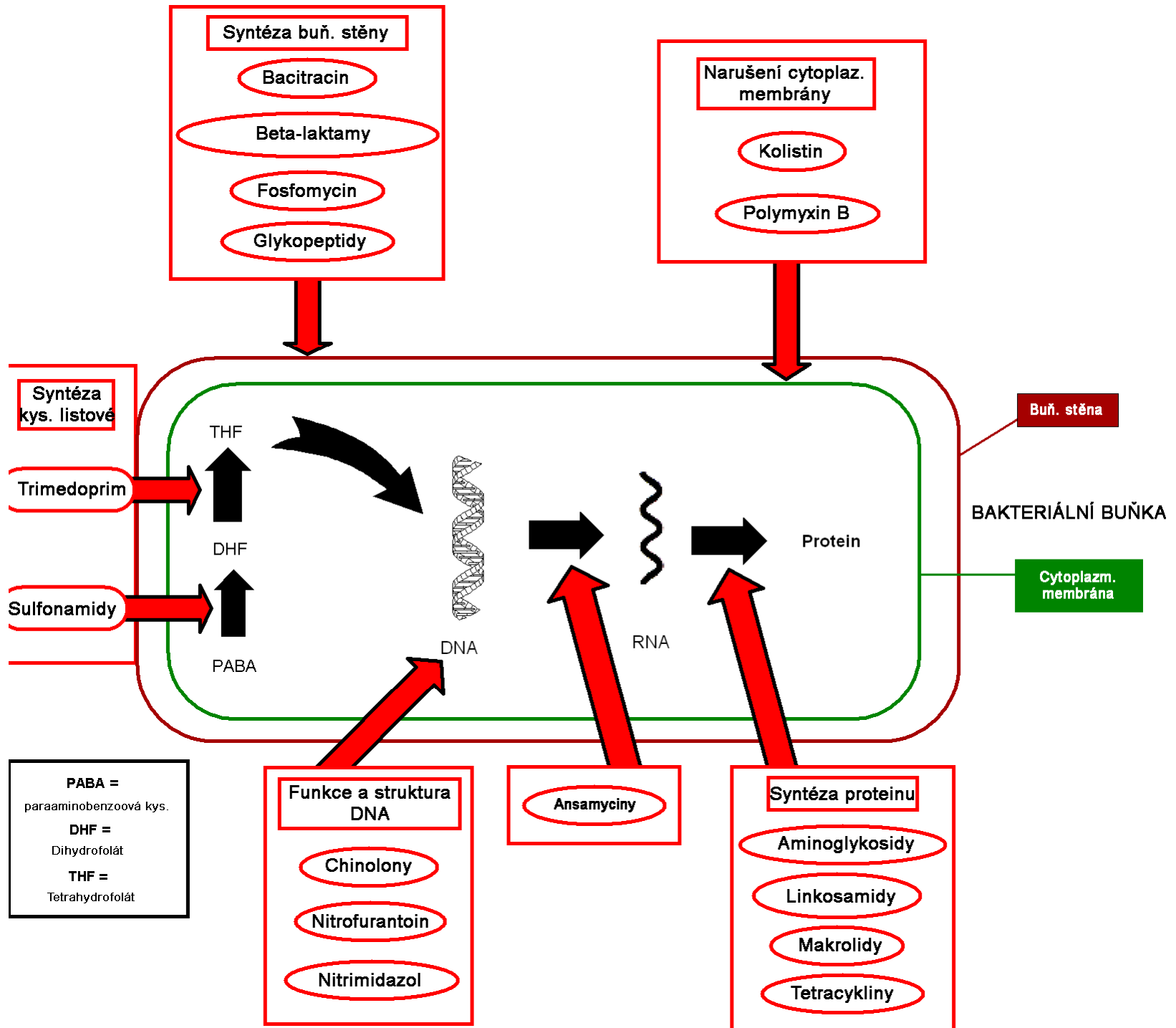
## Porucha syntézy nukleových kyselin

baktericidní

Interference s DNA bakterií (chinolony - gyrázy, nitroimidazoly)  
s RNA (ansamiciny, rifampicin - mRNA)

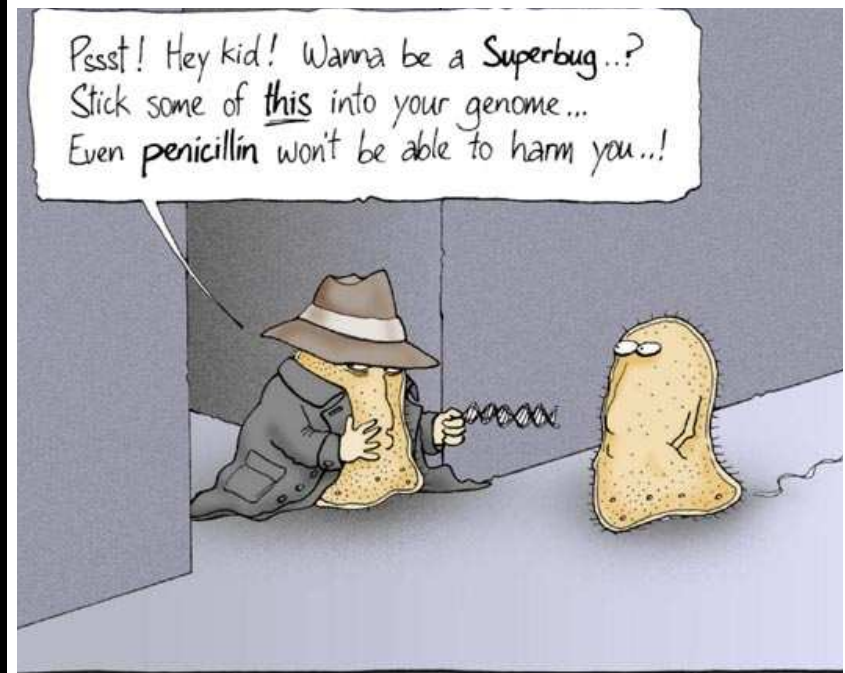
- **Antagonismus a kompetitivní inhibice - antimetabolity**

bakteriostatické,  
sulfonamidy, trimetoprim, dapson, izoniazid



## Rezistence – primární x sekundární (získaná)

Antibiotikum	Mechanizmus rezistence
peniciliny, cefalosporiny	PBP, $\beta$ -laktamázy
aminoglykosidy	acetyl-, fosfo-, nukleotidyltransferázy
chloramfenikol	acetyltransferázy
tetracykliny	efflux systém ochrana ribozómů
makrolidy	metylace rRNA
streptoraminy	esterázy
linkosamidy	acetyl-, fosfotransferázy
glykopeptidy	vanA-ligáza



It was on a short-cut through the hospital kitchens that Albert was first approached by a member of the Antibiotic Resistance.

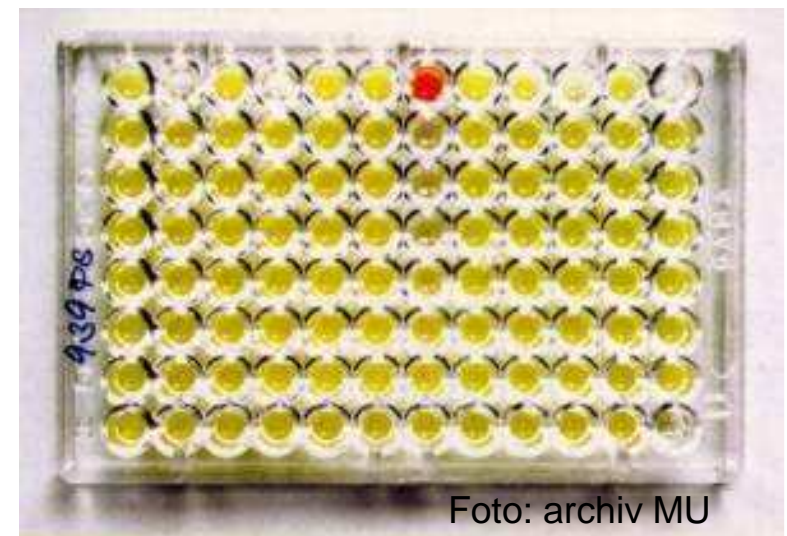
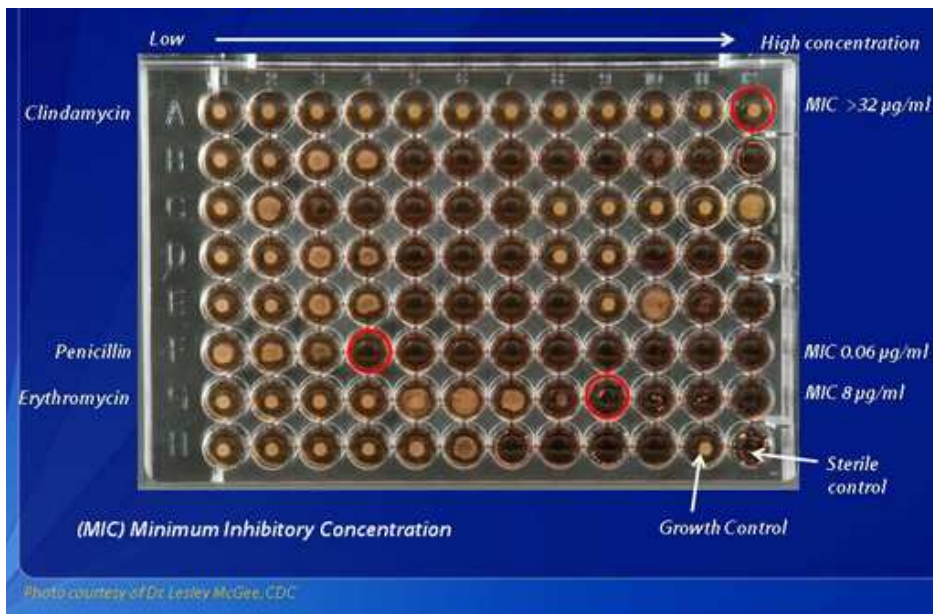
# Stanovení koncentrace

- Inhibice x stimulace
- ATB, vitamínů,...
- **Zředovací metody** – min. koncentrace
- **Nefelometrické metody** – řada koncentrací účinné látky, tekuté médium s MO, měření intenzity růstu (zákalu)
- **Titrimetrické metody** – fyz.-chem. změny prostředí (produkce kyselin), titrace
- **Difúzní metody** – tuhá média s MO, účinná látka tvoří inhibiční/stimulační zóny
  - velikost zóny odráží koncentraci
  - kapková, disková, komínková, jamková metoda
  - E-test – kvantitativní (gradient ATB)



# Mikrodiluční test

- ATB - v řadě důlků v plastové destičce, koncentrace postupně klesá
- MIC = nejnižší koncentrace, která inhibuje růst
- jedna destička se zpravidla použije pro jeden kmen, např. 12 antibiotik, každé v 8 různých koncentracích





PDM

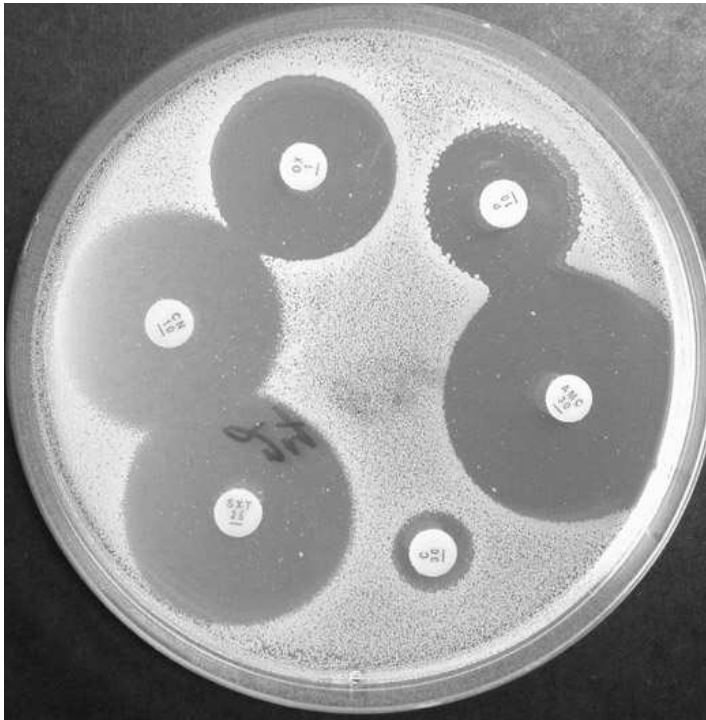
PDM (Paper Disc Methods) is the registered trademark of products first introduced in 1958. It represents the earliest concept for susceptibility testing based on the use of a single antibiotic disc for the diffusion method. The PDM concept integrates the use of a defined and standardized antibiotic susceptibility medium (PDM ASM), a comprehensive range of antibiotic sensitivity discs (PDM ASD) and underlying interpretive criteria generated with these components.



Etest

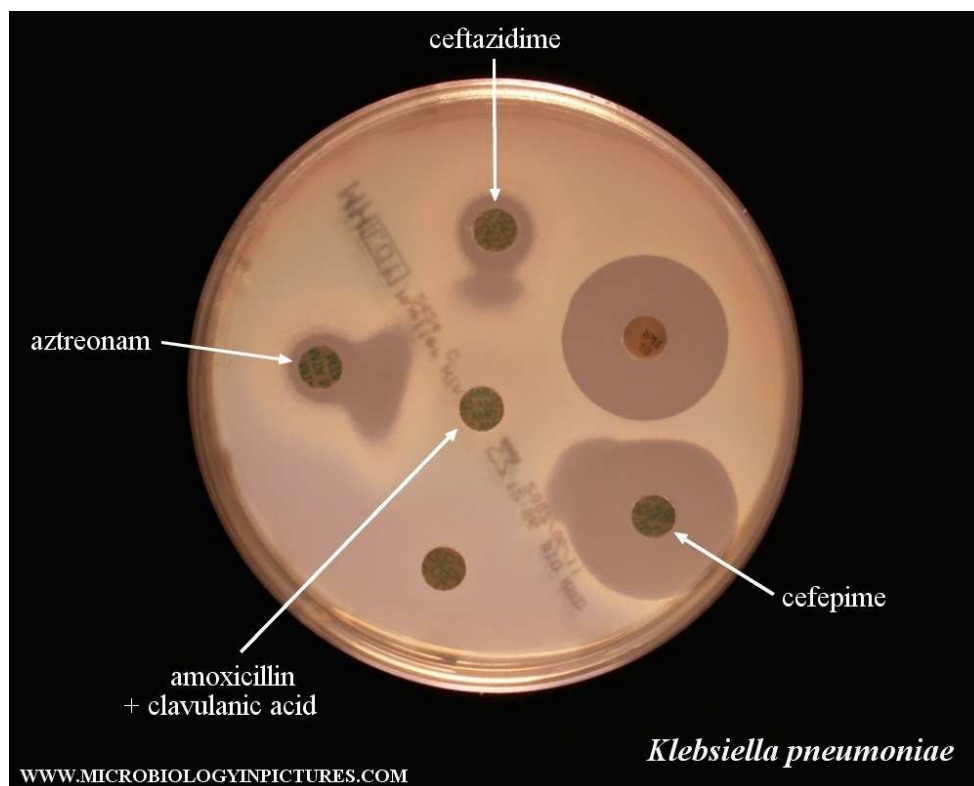
Etest is a well-established trademark registered in all major markets worldwide. It represents the first in a new generation of novel and patented products from AB BIODISK. The scientific principles were initially presented at the Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy (ICAAC) in 1988. The product was introduced worldwide in 1991. Etest now enjoys international recognition as a significant innovation in susceptibility testing.





## Testování na produkci širokospektrých betalaktamáz

- **test synergismu** - využívá se difúze klavulanové kyseliny od disku obsahujícího ko-amoxicilin (tj. amoxicilin plus právě kyselinu klavulanovou)



Efekt cefotaximu je umocněn kys. klavulanovou, difundující od disku AMC (rozšíření zóny)

Cefotaxim působí sám (úzká zóna)

# Stanovení koncentrace ATB

Rozvařená média, temperovaná na 45°C

Rozpipetovat po 15 ml

Zaočkování 0,5 ml kultury *S. aureus*

Rozlít na misky

Standardní řada ředění (250; 125; 62,5; 31,25; 15,625; 7,81 µg/ml)

Po utuhnutí agaru udělat jamy korkovrtem (4 na misce)

Do jamky 0,04 ml roztoku, 1 miska = 1 koncentrace

6 misek se známou koncentrací ATB + vzorek o neznámé konc.

Inkubace 24 hod při 37°C

**POSTUP:** Změřit zónu, zprůměrovat

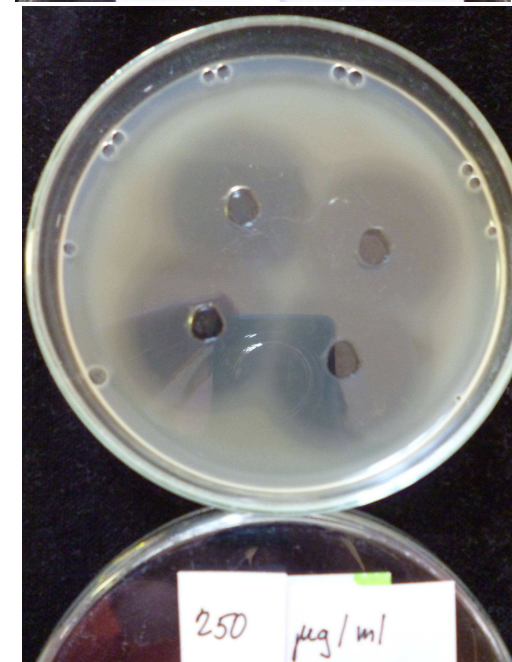
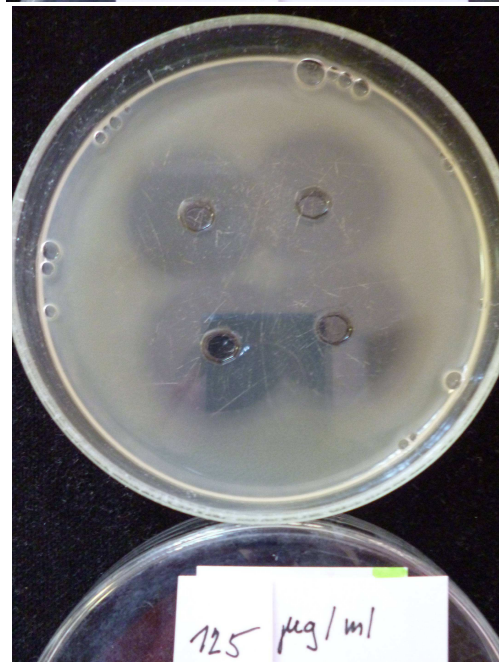
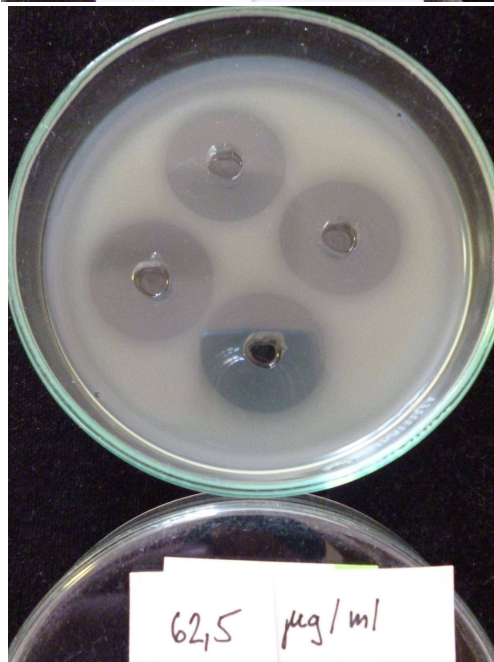
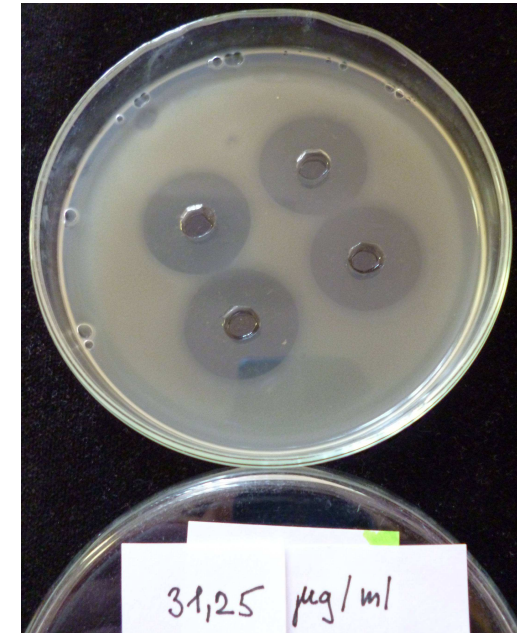
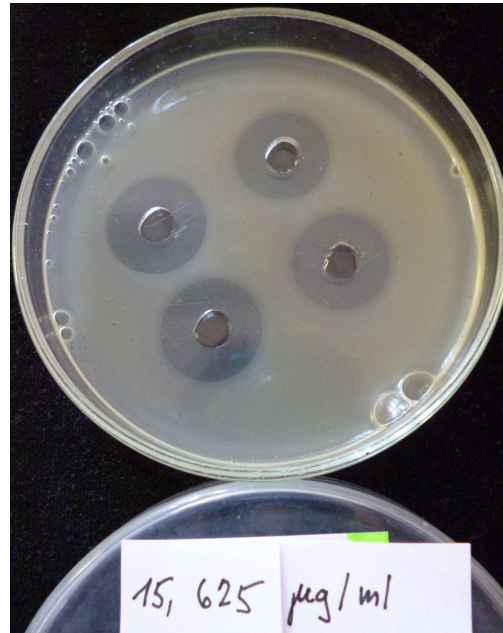
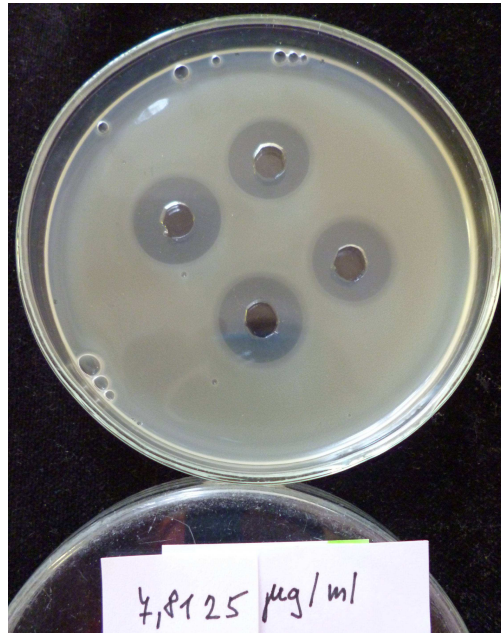
Sestrojit kalibrační přímku

(průměr zóny v mm / log koncentrace)

→ určení koncentrace neznámého vzorku



# Různé koncentrace oxacilinu - *S. aureus*



# Citlivost k ATB

## Postup:

- Na půdu s M-H agarem rozetřit kulturu *S. saprophyticus*.
- Sterilně jehlou rozložit v dostatečné vzdálenosti od sebe a kraje misky testovací disky s ATB.
- kultivace 24 hod, 30°C
- Po 24-ti hod měření inhibičních zón, měří se průměr včetně disku (v hodnocení je již velikost disku započítána)
- Hodnocení:

do 11 mm	necitlivý mikroorganismus
11 – 17 mm	citlivý mikroorganismus
nad 17 mm	velmi citlivý mikroorganismus

## Použitá ATB

- erytromycin - makrolidy 1. generace
- vankomycin - glykopeptidy
- rifampicin - ansamyciny
- chloramfenikol - amfenikoly
- cefalotin - cefalosporiny I. generace
- nitrofurantoin
- oxacilin - isoxazolympeniciliny (penicilinázarezistentní)
- tetracyklin - cykliny
- ko-trimoxazol – sulfonamidy s potencovaným antimikrobním účinkem
- penicilin – beta-laktamy (dipeptidy)