



Stanovení citlivosti k
antibiotikům.

Stanovení koncentrace
antibiotik.

Antimikrobiální látky

- ▶ **Látky působící celkově:**
- ▶ **Antiparazitární** látky proti parazitům
- ▶ **Antimykotika** proti kvasinkám a vláknitým houbám
- ▶ **Antivirotika** proti virům
- ▶ **Antituberkulóza** proti mykobakteriím
- ▶ **Antibiotika** proti bakteriím (přírodního původu)
- ▶ **Antibakteriální chemoterapeutika** také proti bakteriím, ale syntetická

- ▶ **Látky působící lokálně:**
 - ▶ antiseptika



Chemoterapeutika a antibiotika

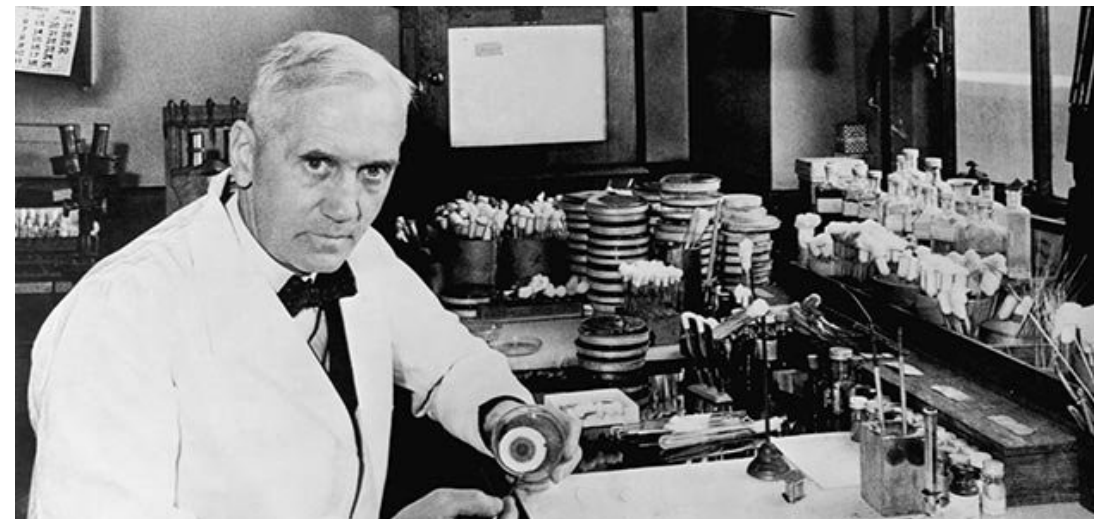
- ▶ **CHEMOTERAPEUTIKA = chemicky** syntetizované látky, které ve **velmi nízkých koncentracích** (řádově $\mu\text{g/ml}$) mohou inhibovat nebo usmrtit (citlivé) mikroorganismy.
- ▶ **ATB = jakákoliv látka přirozeného, semisyntetického nebo syntetického původu**, která již ve velmi nízkých koncentracích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

Mechanismy účinku antimikrobiálních látek

- ▶ **Inhibice syntézy BS – inhibice syntézy peptidoglykanu, baktericidní účinky na rostoucí bunky** (beta-laktamy, glykopeptidy) – penicilíny, cefalosporiny, vankomycin, teikoplanin, bacitracin, cykloserin, fosfomycin
- ▶ **Inhibice propustnosti cytoplazmatické membrány** – polypeptidy (colistin, polymyxin), antimykotika polyenového charakteru (amfotericin B a nystatin)
- ▶ **Inhibice proteosyntézy konkurenčního kmene – baktericidní:** aminoglykosidy (30S), bakteriostatické: makrolidy (50S), tetracykliny (30S), linkosamidy (50S), amfenikoly (50S)
- ▶ **Inhibice syntézy nukleových kyselin** – interference s DNA bakterií (chinolony - vyvázání gyrázy, nitroimidazoly) a s RNA (vyvázání RNA polymerázy - ansamiciny, rifampicin - mRNA)
- ▶ **Antagonismus a kompetitivní inhibice, antimetabolity** – bakteriostatické – sulfonamidy, trimetoprim, dapson, izoniazid

Antibiotika

- ▶ Antibiotika = **sekundární metabolity mikroorganismů, slouží pro potlačení růstu konkurenčních MO**
- ▶ Přirození producenti antibiotik: ***Penicillium*, *Aspergillus*, *Acremonium*, *Cephalosporium*, *Scopulariopsis*...**
- ▶ První antibiotikum – **penicilín**, produkovaný plísní ***Penicillium*** (Alexander **Fleming**, 1928), druhé **streptomycin** produkovaný aktinomycetou rodu ***Streptomyces***
- ▶ Přirozená a modifikovaná; úzko a širokospektrá; lokálně, orálně nebo injekčně podávaná
- ▶ **Vedlejší účinky:** toxicita, sekundární infekce poškozením vlastní mikroflóry



Rezistence

- ▶ **Primární** – vyplývá z **přirozených vlastností** buňky: chybějící receptor, transportní systém, či cílové místo AB
- ▶ **Sekundární** – **získaná**, způsobená spontánními změnami v genomu mutacemi či přenosem genetické informace
- ▶ *Stafylococcus, Escherichia, Klebsiella, Enterococcus, Mycobacterium, Salmonella, Proteus*
- ▶ **Multirezistentní kmeny**
- ▶ **Problémy** – nevhodné anebo zbytečné užívání antibiotik (viry), ukončení léčby po vymizení symptomů, snaha farmaceutických firem o prodej, preventivní podávání AB zvířatům ke zvýšení produkce

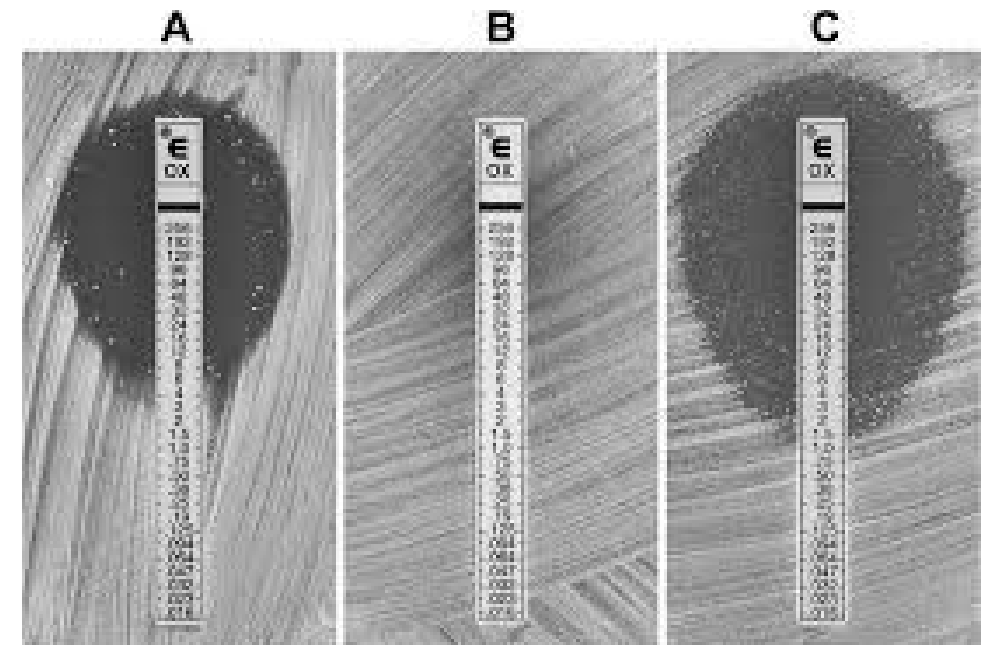


Hodnocení účinku ATB

- ▶ **Důležitými kritérii** pro zhodnocení účinku ATB jsou jeho **koncentrace, doba kontaktu** a je-li pro bakterii letální (**baktericidní**) nebo jen dočasně inhibuje růst (**bakteriostatické**)
- ▶ Pro medicínu je důležité určit **citlivost mikroorganismu k ATB** – umožní to identifikaci
Souhrn testů citlivosti bakterie na ATB se nazývá **antibiogram**
- ▶ Pro kultivační testy citlivosti k ATB se využívá speciální **Mueller-Hinton agar**
Má nižší obsah ztužovačů pro lepší difúzi antibiotika agarem.
- ▶ Určení **MIC** – **minimální inhibiční koncentrace ATB** – je to zředovací metoda, provádí se buď ve zkumavce nebo na mikrotitrační destičce
MIC = nejnižší koncentrace antimikrobiální látky, při které ještě nepozorujeme růst bakterie

Stanovení citlivosti a rezistence na ATB - kvantitativně

- ▶ **Kvantitativní diluční E-test** – papírek napuštěný klesající koncentrací ATB se položí na misku s kulturou, sleduje se projasnění nárůstu a hodnota MIC

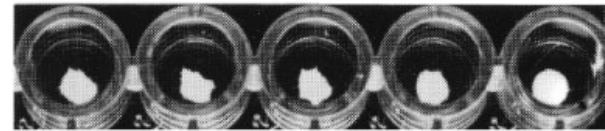


Stanovení citlivosti a rezistence na ATB

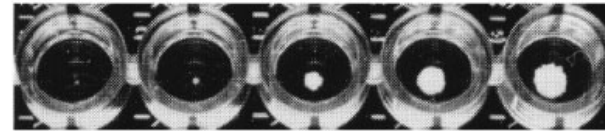
- kvantitativně

Mikrodiluční test

- ▶ Mikrotitrační destička s jamkami, kde postupně klesá koncentrace ATB
- ▶ **Určuje MIC** (nejnižší koncentrace co inhibuje mikroorganismus)



Doxycycline
(Growth in all wells, resistant)



Sulfamethoxazole
(Trailing end point; usually read where there is an estimated 80% reduction in growth)



Streptomycin
(No growth in any well; sensitive at all concentrations)



Ethambutol

(Growth in second wells;
ethambutol and kanamycin
equally sensitive)

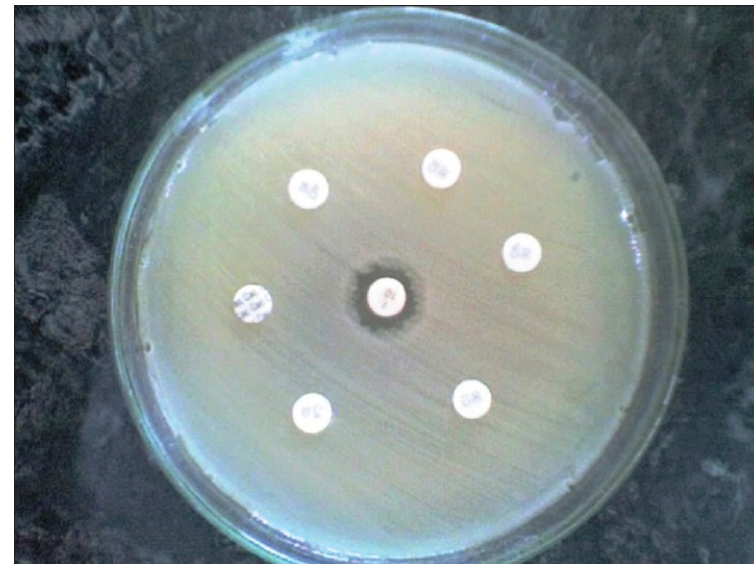
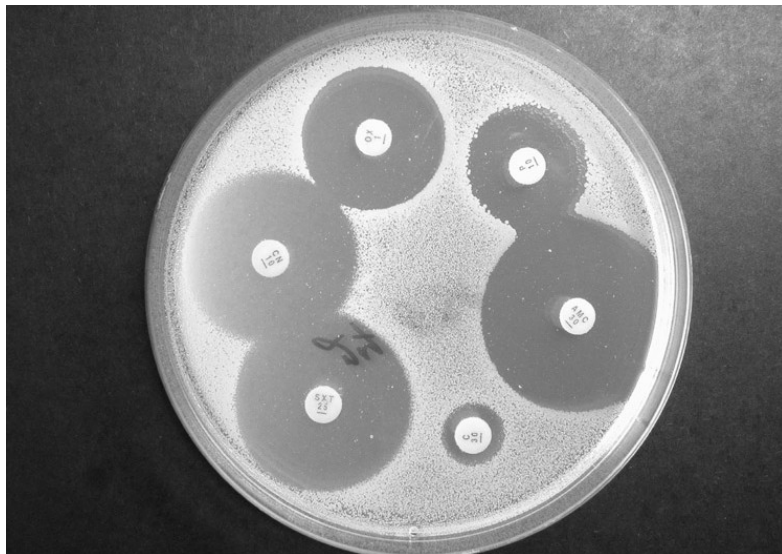


Kanamycin

Decreasing concentration of drug →

Stanovení citlivosti a rezistence na ATB - kvalitativně

- ▶ **1. kapková metoda** – ATB se kape na povrch tekutého média s kulturou
- ▶ **2. disková metoda** – na agarové plotny s naočkovanou kulturou se kladou **disky nasyceny antibiotiky**. Měří se **průměry inhibičních zón**, které se interpretují podle tabulek hraničních hodnot rezistence



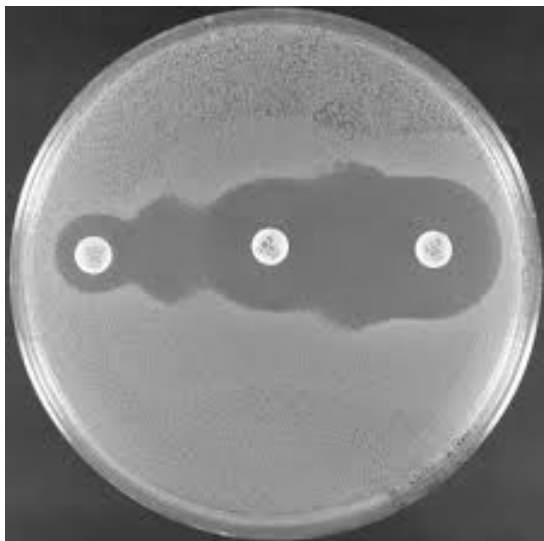
Stanovení citlivosti a rezistence na ATB - kvalitativně

- ▶ **3. komínková metoda** – do agaru se vtlačí komínky, do nich se pipetují roztoky ATB
- ▶ **4. jamková metoda** – do jamek v agaru se pipetují roztoky ATB

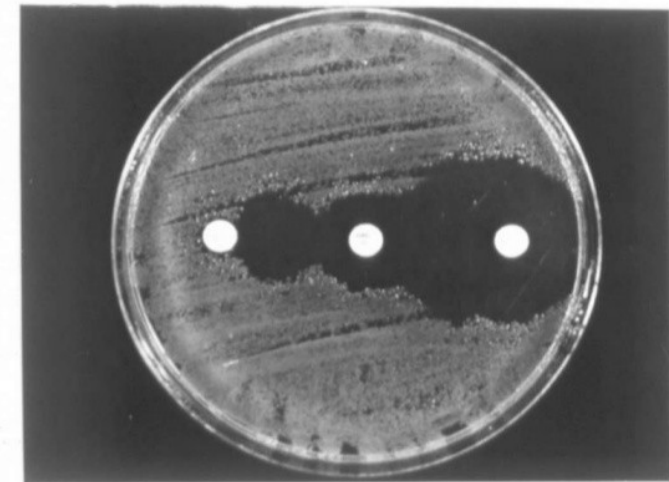


Stanovení citlivosti a rezistence na ATB

- ▶ **Test synergizmu** - testování na produkci širokospektrých betalaktamáz (enzymy inhibující betalaktamové ATB)
- ▶ využívá se difúze klavulanové kyseliny od disku obsahujícího ko-amoxicilin



Double disc test for *K. pneumoniae* TEM-10⁺



Ceftazidime 30 Augmentin 20+10 Cefotaxime 30 µg

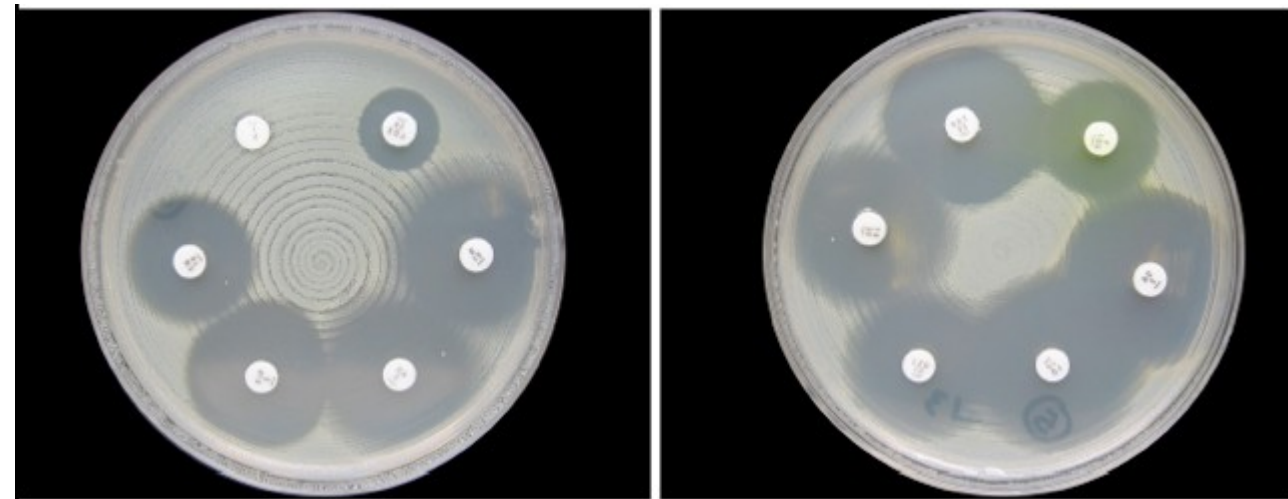
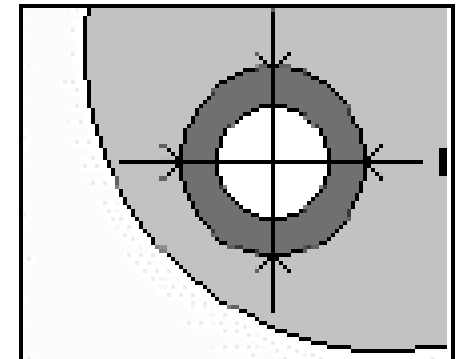
Stanovení citlivosti k ATB difuzním testem – disková metoda

- ▶ Testovaný kmen se rovnoměrně rozetře po povrchu agarů a na roztěr se nakladou papírové **disky napuštěné antimikrobiální látkou**
- ▶ Během kultivace difunduje látka z disku horizontálně do okolního agarů v koncentračním gradientu.
- ▶ Účinná látka se projeví vytvořením kruhové, tzv. **inhibiční zóny** kolem disku.
- ▶ **Citlivost mikroorganismu k testované látce se určí z velikosti inhibiční zóny.**



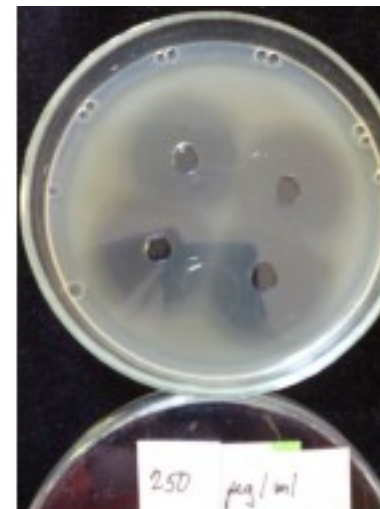
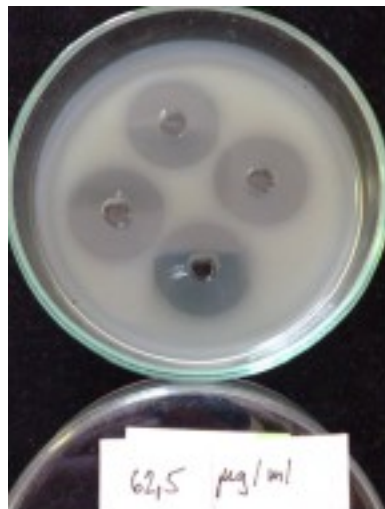
Postup – disková metoda

- ▶ Na agar rozetřít hokejkou kulturu (0,2 ml) a nechat zaschnout
- ▶ Sterilní jehlou rozložit disky s ATB
- ▶ Kultivovat 24 – 36 h, 37°C
- ▶ Sledujeme velikost inhibičních zón vytvořených kolen disků
- ▶ Zóna 5 - 11 mm = citlivý mikroorganismus
- ▶ Zóna nad 12 mm = velmi citlivý organismus



Stanovení koncentrace ATB – difuzní jamková metoda

- ▶ Do jamek na agaru s kulturou se napipetuje **roztok antibiotika o známé koncentraci**
- ▶ Po kultivaci se okolo jamky vytvoří **inhibiční zóna**
- ▶ Z hodnot průměrů zón rezistence kolem jamek se standardními roztoky se sestrojí **kalibrační přímka** sledující **závislost průměru zóny v mm na logaritmu koncentrace**
- ▶ Z kalibrační přímky se stanoví neznámá koncentrace vzorků antibiotika



Postup – difuzní jamková metoda

- ▶ Na misku s Mueller-Hinton agarem **naočkovat kulturu** *S. aureus*, nechat ztuhnout
- ▶ Připravit standardní **ředící řadu ATB** (250, 125, 62,5, 31,25, 15,625, 7,81 µg/ml)
- ▶ Popsat misky – **vždy 1 miska = 1 koncentrace**
- ▶ **+ 1 miska vzorek o neznámé koncentraci**
- ▶ Do misky **vyvrtat 4 jamky** sterilním korkovrtem (etanol a ožehnutí), agar odkládat do Petriho misky – infekční!
- ▶ Do každé jamky **napipetovat 40 µl** dané koncentrace roztoku ATB
- ▶ Opatrně zacházet, nevylít roztoky
- ▶ Kultivovat 24h, 37°C

Hodnocení

▶ Disková metoda

- ▶ Změřit inhibiční zóny – měří se průměr včetně disku
- ▶ Do 11 mm – necitlivý mikroorganismus
- ▶ 11 – 17 mm – citlivý
- ▶ Nad 17 mm – velmi citlivý

▶ Jamková metoda

- ▶ Změřit 4 zóny na misce (v mm) a vypočítat průměr
- ▶ Sestrojit kalibrační křivku – průměr zóny v mm/log koncentrace
- ▶ Určit koncentraci neznámého vzorku

