



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 (peroxid vodíku, alkohol)

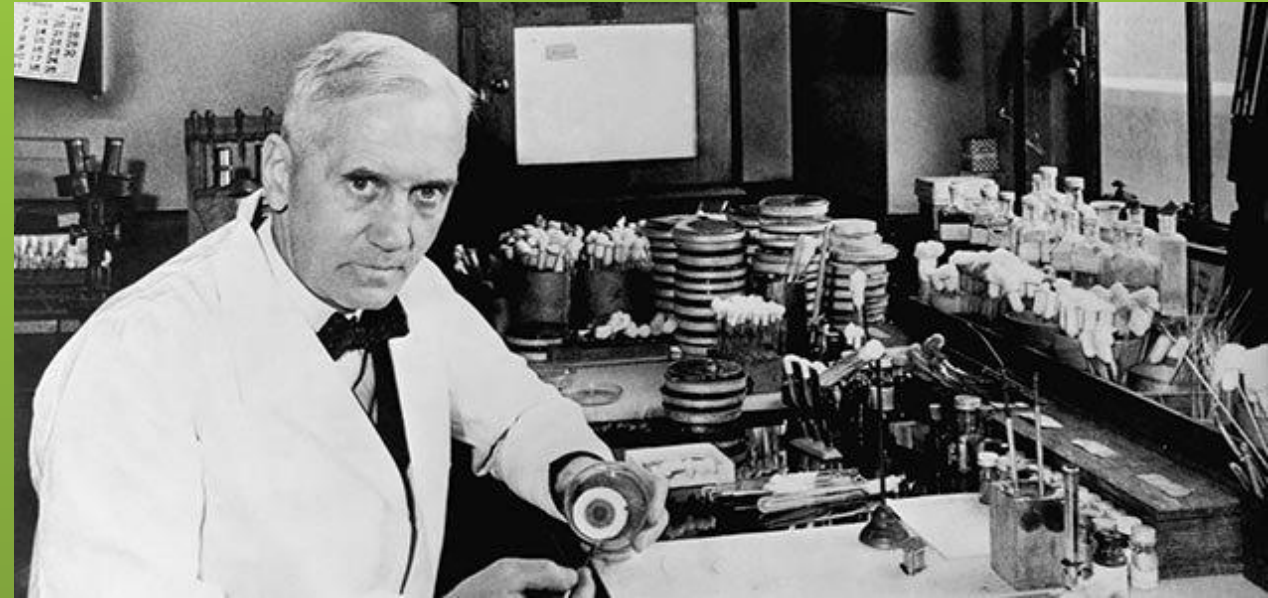


Antibiotika vs. chemoterapeutika, Rozdílné účinky na mikroorganismy

- **antibiotikum** = látka přirozeného, biosyntetického nebo polosyntetického původu, která již ve velmi nízkých koncentracích (řádově $\mu\text{g/ml}$) může inhibovat nebo usmrtit (citlivé) mikroorganismy
 - působí prostřednictvím specifických inhibičních účinků na fyziologické děje buněk mikroorganismů
- **chemoterapeutikum** = synteticky připravené látky, které ve velmi nízkých koncentracích (řádově $\mu\text{g/ml}$) mohou inhibovat nebo usmrtit (citlivé) mikroorganismy
- **bakteriostatické** = blokují reversibilně funkci makromolekul (proteiny, nukleové kyseliny), aniž je ničí; zastavují fyziologické funkce → zastavují růst mikroorganismu
- **bakteriocidní** = ireversibilně poškozují buněčné komponenty → usmrcení buňky mikroorganismu

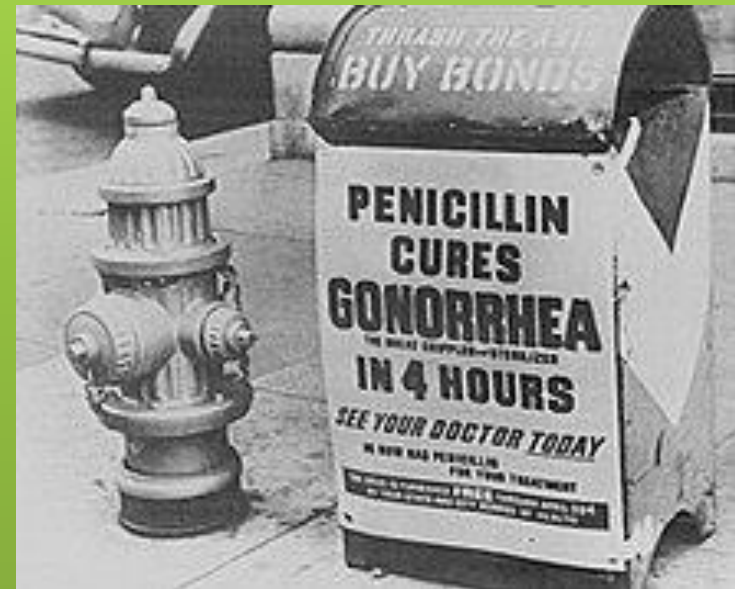
Antibiotika

- antibiotika jsou produkována jako sekundární metabolity mikroorganismů, které slouží k potlačení růstu konkurenčních mikroorganismů v přirozeném prostředí
- přirození producenti antibiotik: *Penicillium*, *Aspergillus*, *Streptomyces*, *Acremonium*, *Cephalosporium*, *Scopulariopsis*...
- první antibiotikum – **penicilin**, produkováný plísní *Penicillium* (Alexander **Fleming**, 1928), druhé **streptomycin** produkováný aktinomycetou rodu *Streptomyces*
- ▶ antibiotika:
 - ▶ přirozená a modifikovaná
 - ▶ úzko a širokospektrá
 - ▶ lokálně, orálně nebo injekčně podávaná
- ▶ **vedlejší účinky**: toxicita, sekundární infekce jako důsledek poškození vlastní mikroflóry



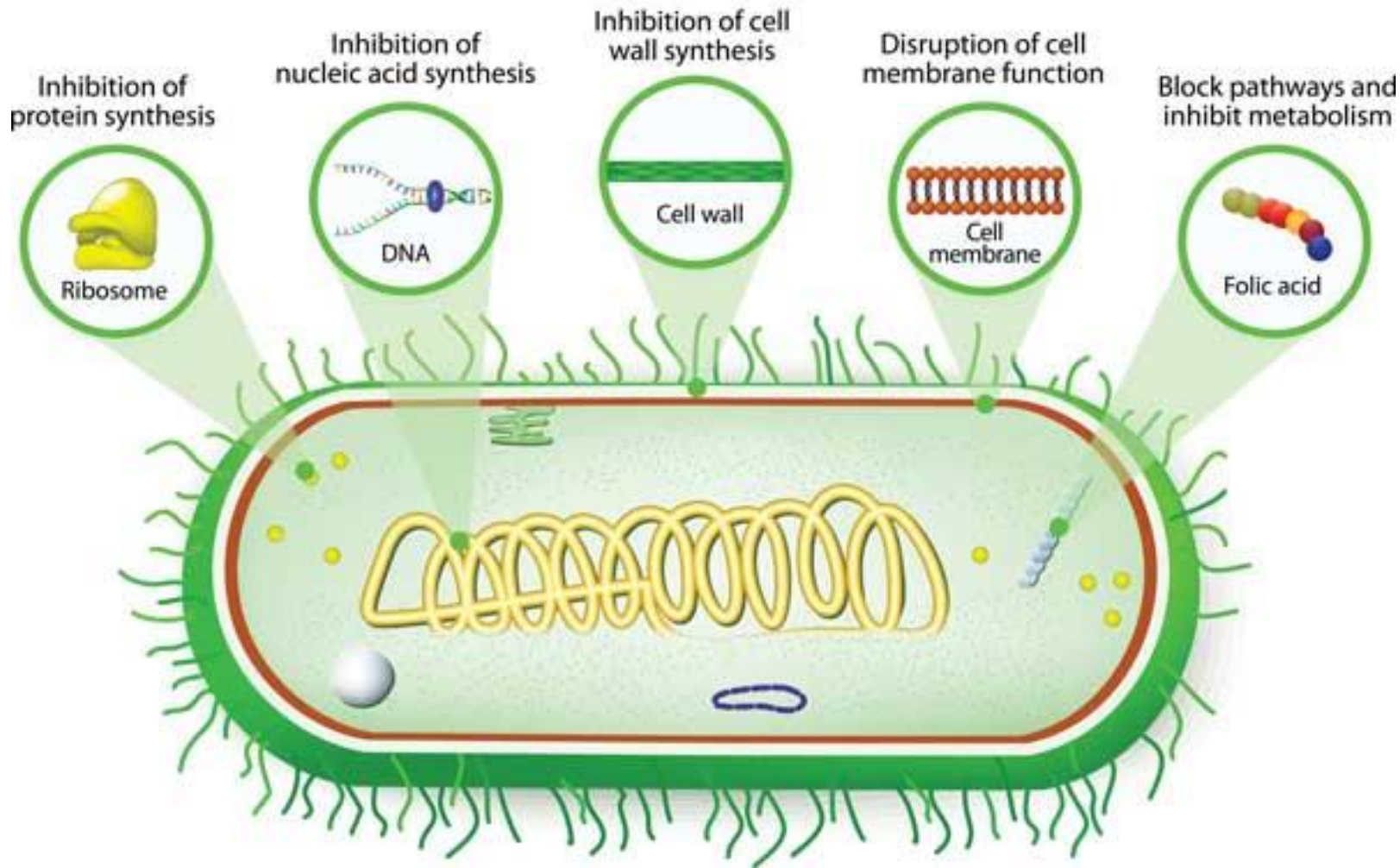
Fleming a penicilin

- ▶ Jak byl objeven penicilin?
<https://youtu.be/0ZWjzcsTd5M>



Mechanismy účinku antibiotik

MECHANISMS OF ANTIBIOTIC ACTION



Mechanismy účinku antibiotik

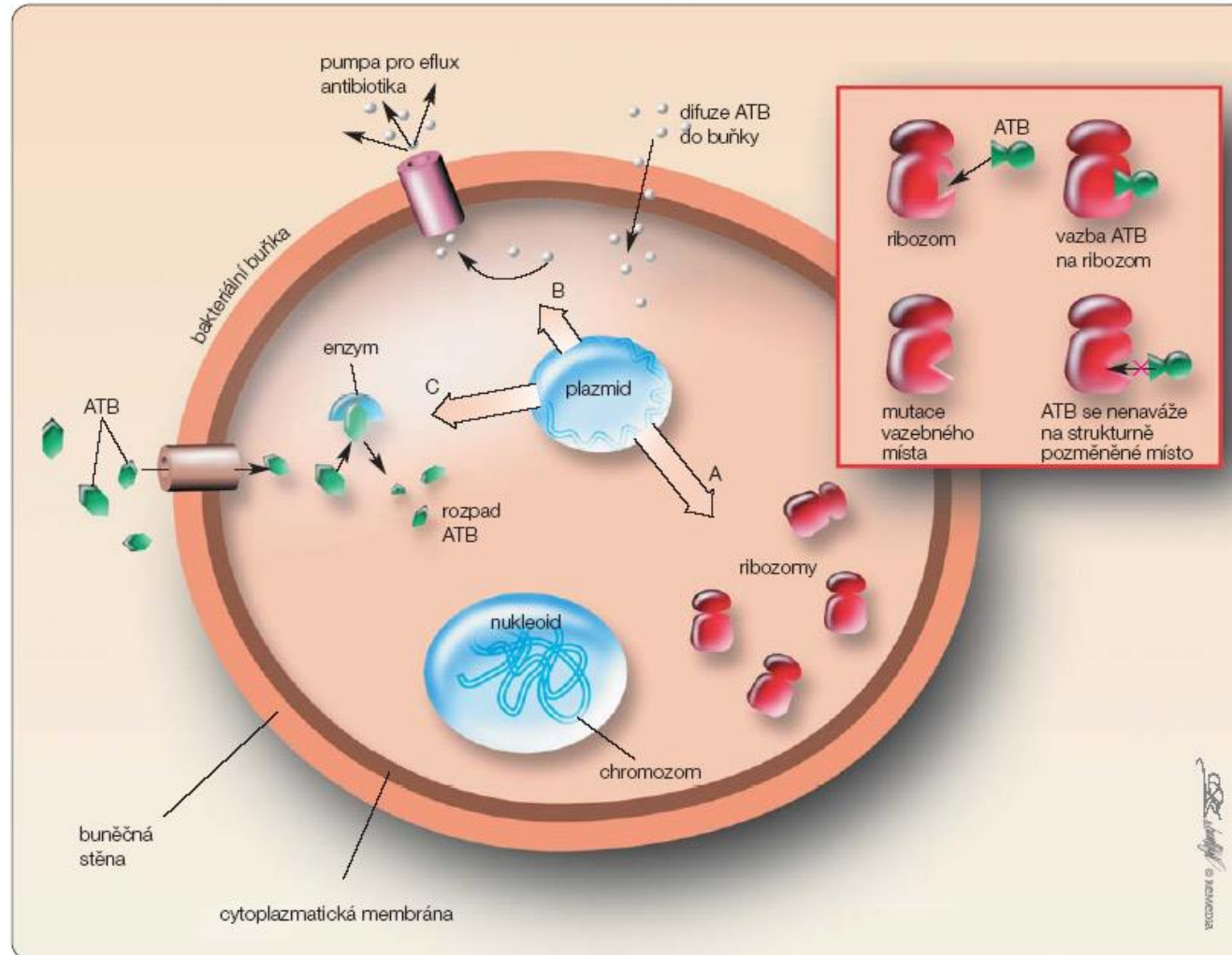
- **inhibice syntézy buněčné stěny** – (beta-laktamy, glykopeptidy) – peniciliny, cefalosporiny, vankomycin, teikoplanin, bacitracin, cykloserin, fosfomycin
- **inhibice syntézy cytoplazmatické membrány** – polypeptidy (colistin, polymyxin), antimykotika polyenového charakteru (amfotericin B a nystatin)
- **inhibice proteosyntézy** – baktericidní: aminoglykosidy (30S), bakteriostatické: makrolidy (50S), tetracykliny (30S), linkosamidy (50S), amfenikoly (50S)
- **inhibice syntézy nukleových kyselin** – interference s DNA bakterií (chinolony - gyrázy, nitroimidazoly) a s RNA (ansamiciny, rifampicin - mRNA)
- **antagonismus a kompetitivní inhibice, antimetabolity** – bakteriostatické – sulfonamidy, trimetoprim, dapson, izoniazid

Rezistence

- **primární** – vyplývá z **přirozených vlastností** buňky: chybějící receptor, transportní systém, či cílové místo ATB
- **sekundární** – **získaná**, způsobená spontánními změnami v genomu mutacemi či přenosem genetické informace
- problémové rody v ČR s četnými rezistencemi: *Stafylococcus*, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Enterococcus*, *Mycobacterium*, *Salmonella*, *Proteus*
- **multirezistentní kmeny** - bakteriální kmeny odolné k více ATB zároveň
- **problémy** – nevhodné anebo zbytečné užívání antibiotik (na virózy), ukončení léčby po vymizení symptomů, snaha farmaceutických firem o prodej, preventivní podávání ATB zvířatům ke zvýšení produkce



Mechanismy bakteriální resistance



Obr. 3 Mechanismy bakteriální resistance k makrolidům. Situace A, B, C představují expresi genů umístěných v plazmidové DNA do změn ve struktuře bílkovin, jež jsou podkladem pro vznik resistance.

A – modifikace cílového místa účinku; důsledkem modifikace je snížení nebo úplná inaktivace vazby makrolidů na jejich cílové místo na ribozomu;
B – aktivní eflux; C – enzymatická degradace makrolidů; ATB – antibiotikum

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** – napomáhá 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

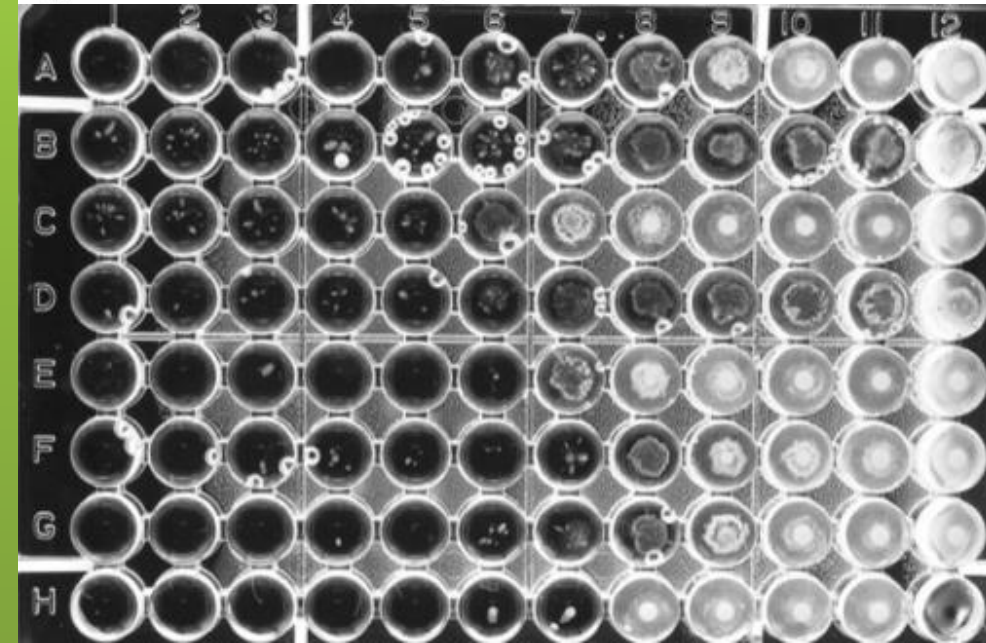
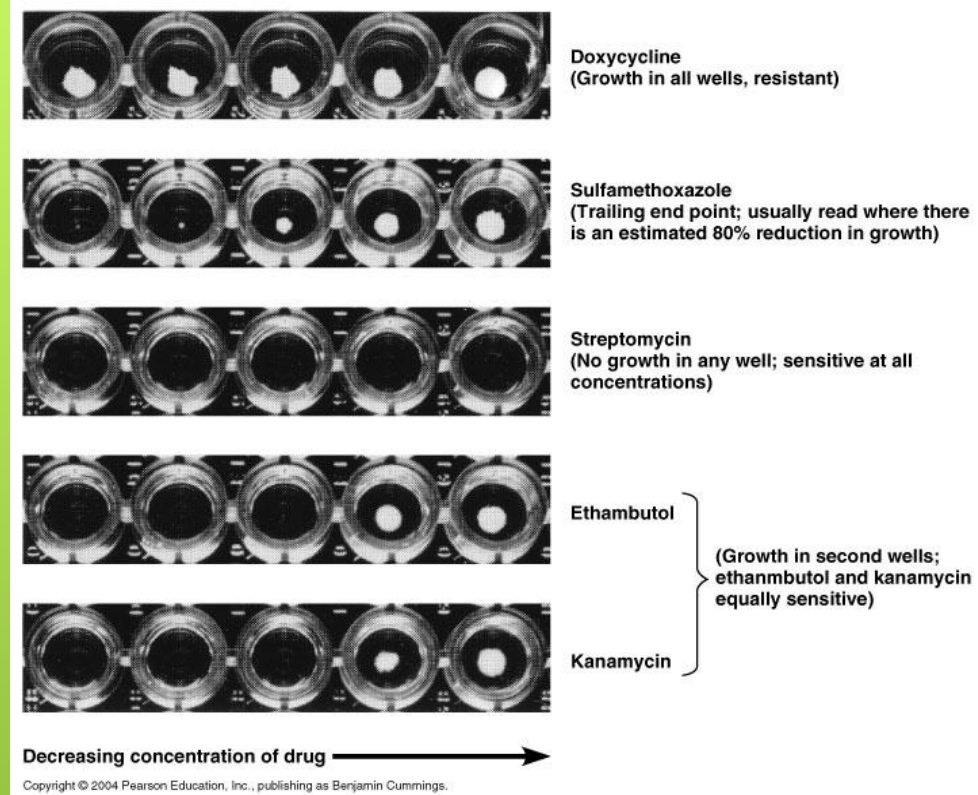
- papírek napuštěný klesající koncentrací ATB se položí na misku s kulturou
- sleduje se projasnění nárůstu a hodnota MIC



Stanovení citlivosti a rezistence na ATB - kvantitativně

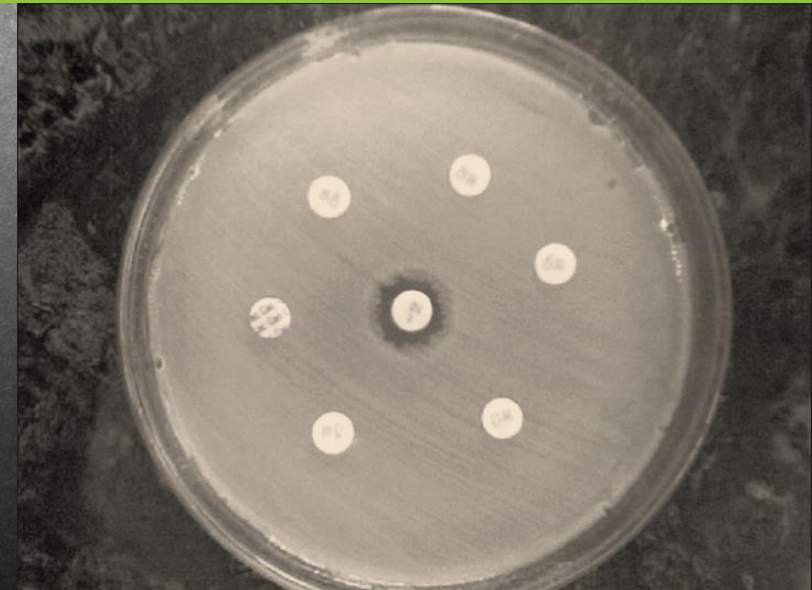
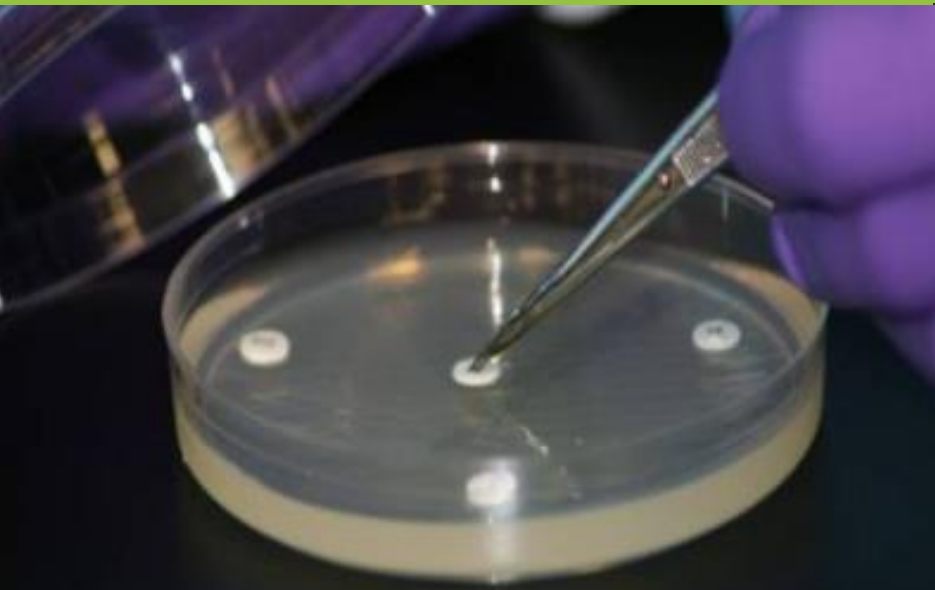
Mikrodiluční test

- mikrotitrační destička s jamkami, kde postupně klesá koncentrace ATB
- určuje **MIC** (nejnižší koncentrace co inhibuje mikroorganismus)



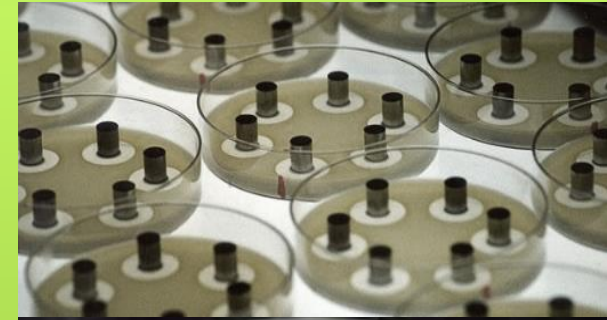
Stanovení citlivosti a rezistence na ATB - kvalitativně

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



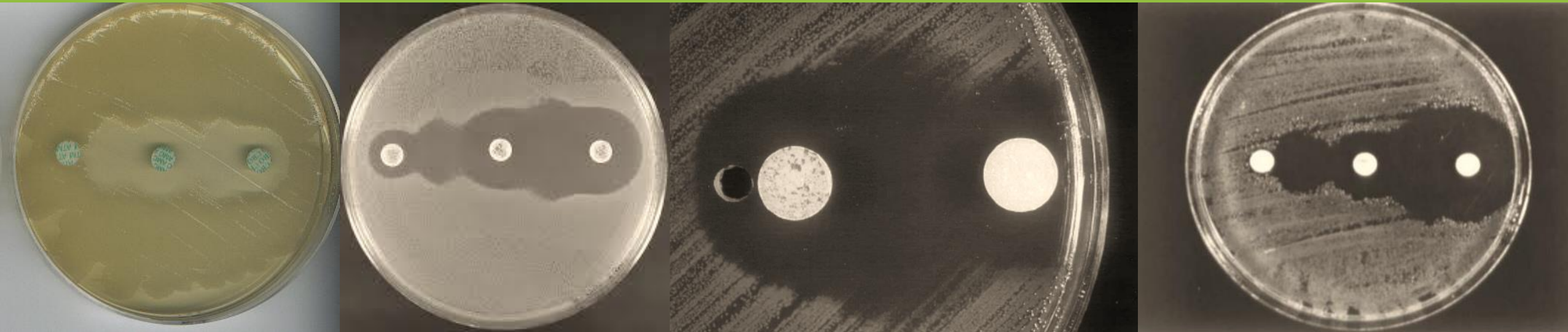
Stanovení citlivosti a rezistence na ATB - kvalitativně

- **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



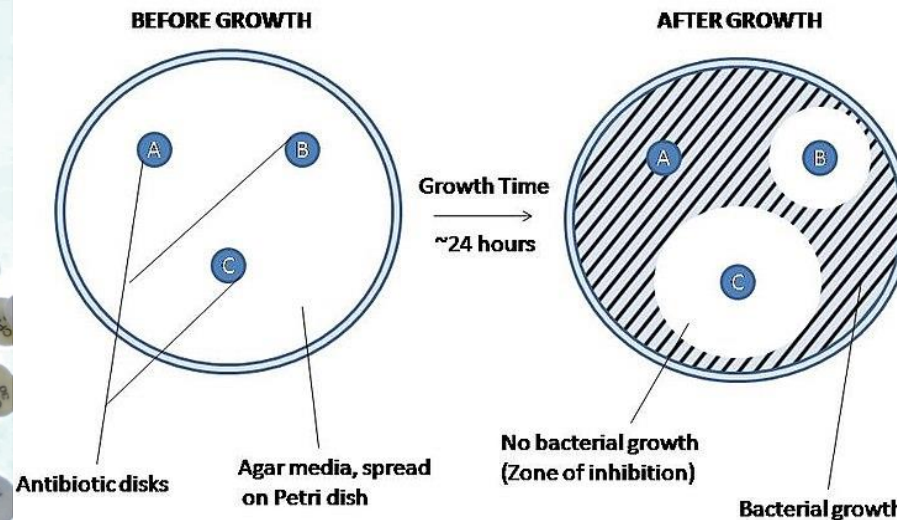
Stanovení citlivosti a rezistence na ATB

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



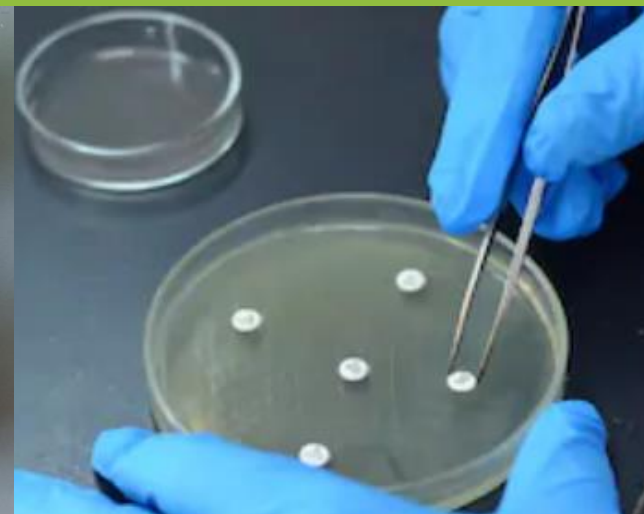
Stanovení citlivosti k ATB difuzním testem – disková metoda

- testovaný kmen se rovnoměrně rozetře po povrchu agaru a na roztěr se nakladou papírové **disky napuštěné antimikrobiální látkou**
- během kultivace difunduje látka z disku horizontálně do okolního agaru 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**

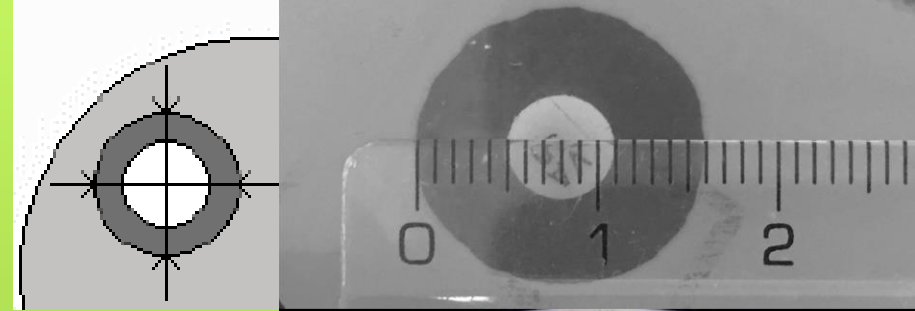


Postup – disková metoda

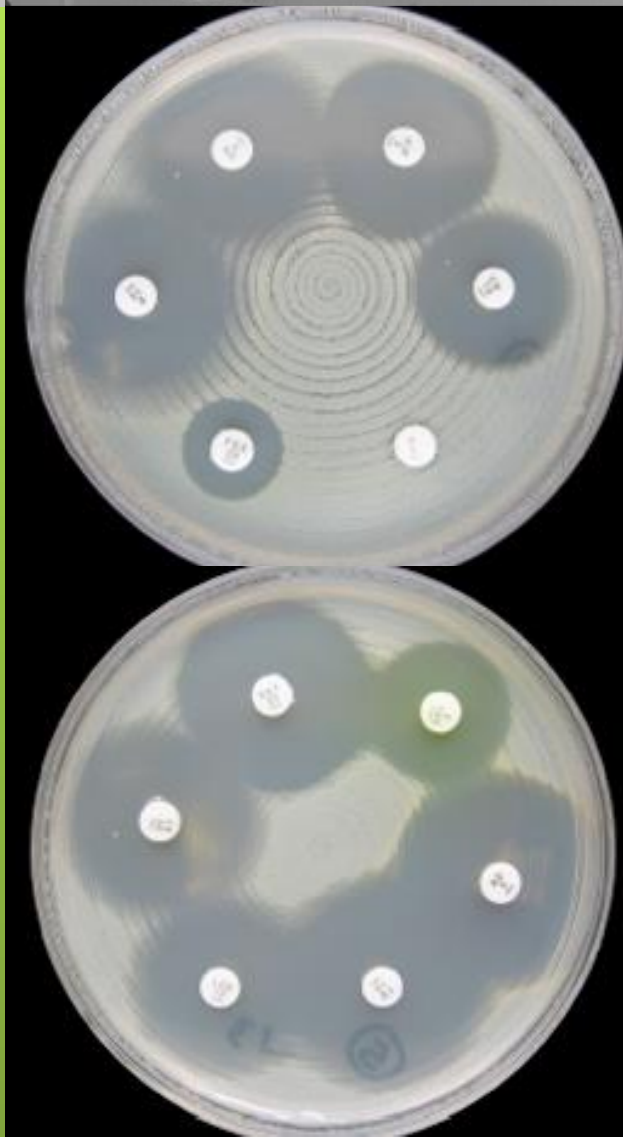
- na agar **rozetřít** namočenou (v destilované vodě) vatovou tyčinkou **kulturu** – pokud je kultura odebírána z PM/šikmého agaru
 - v případě kultury naočkované v tekutém médiu (viz obr. vpravo dole) se vatová tyčinka již ve sterilní destilované vodě nenamáčí, ponoří se přímo do bujónu s kulturou
 - rozetřít pečlivě všemi směry, od kraje ke kraji
- sterilní jehlou/pinzetou **rozložit disky s ATB (stačí 4 disky na plochu PM)**
- kultivovat 24 – 36 h, 37°C



Postup – disková metoda

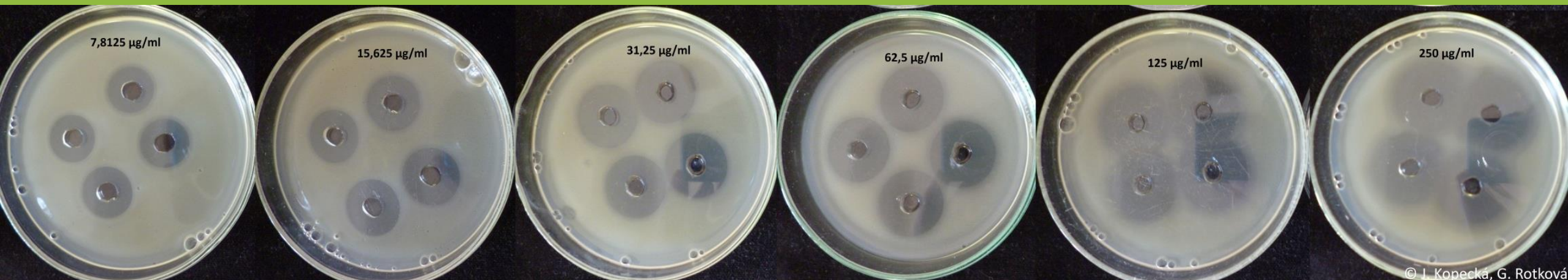


- sledujeme velikost inhibičních zón vytvořených kolem disků
 - do 11 mm – necitlivý mikroorganismus
 - 11 – 17 mm – citlivý
 - nad 17 mm – velmi citlivý
-
- názorná ukázka – Jak postupovat při diskové metodě?
 - <https://www.youtube.com/watch?v=siKuXVPlmG8&feature=youtu.be>
 - <https://youtu.be/Np87w5kCL-4>
 - https://www.youtube.com/watch?v=BXr_kcki4Ag



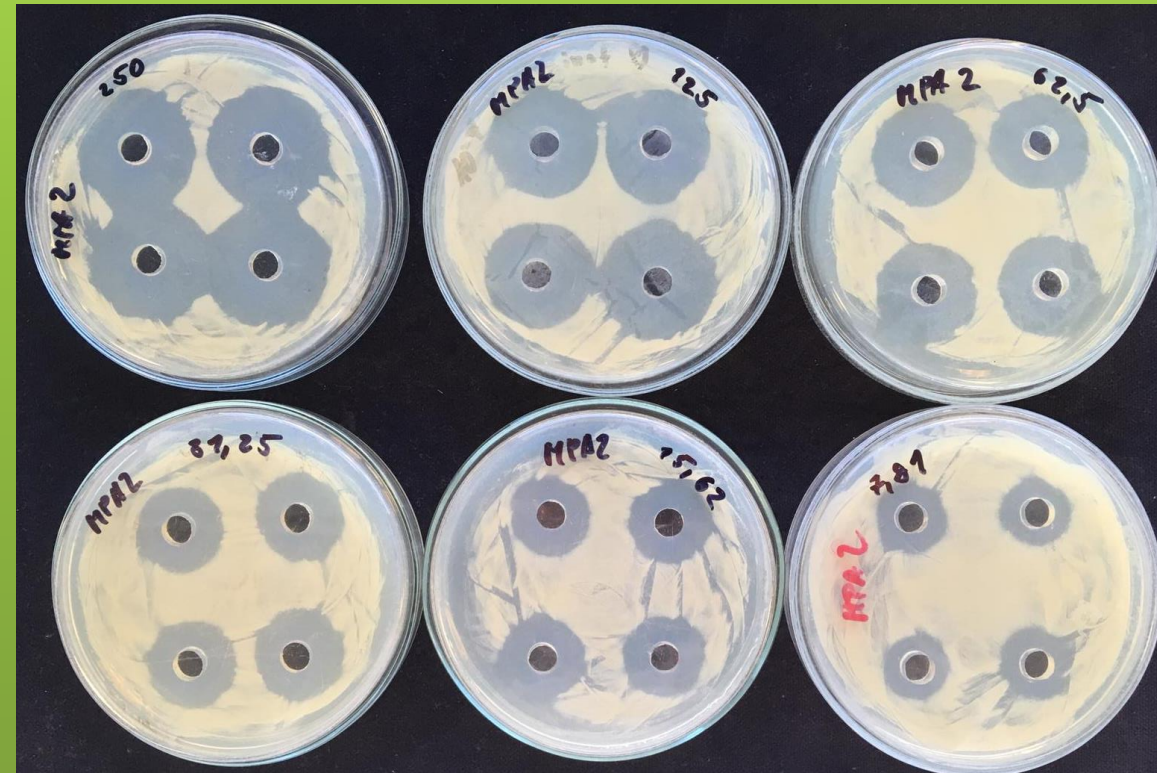
Stanovení koncentrace ATB – difuzní jamková metoda

- do jamek na agaru s kulturou se napipetuje **roztok antibiotika o známé koncentraci** (250, 125, 62,5, 31,25, 15,625, 7,81 $\mu\text{g/ml}$)
- 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** *Staphylococcus aureus*, nechat ztuhnout
- připravit standardní **ředící řadu ATB** (250, 125, 62,5, 31,25, 15,625, 7,81 $\mu\text{g/ml}$)
- 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

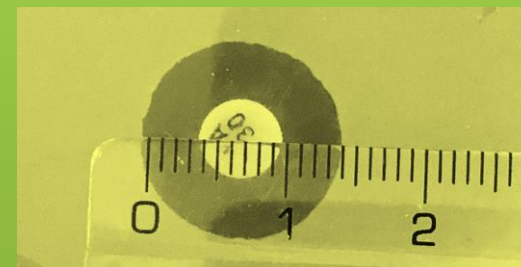


Podklady pro vyhotovení protokolu

- ▶ Příslušný protokol je vložen v IS, do něj si vyplníte úvodní část pomocí prezentace a také pomocí skript, která již v IS máte (přednostně vycházejte z prezentací)
- ▶ Na následujících snímcích budete mít výsledky jednotlivých stanovení

○ Disková metoda

- změřit inhibiční zóny – měří se průměr včetně disku (při měření si nastavte cca 60% zobrazení – kontrolou je změření velikosti ATB disku – ten má průměr 6 mm)
 - do 11 mm – necitlivý mikroorganismus
 - 11 – 17 mm – citlivý
 - nad 17 mm – velmi citlivý



○ Jamková metoda

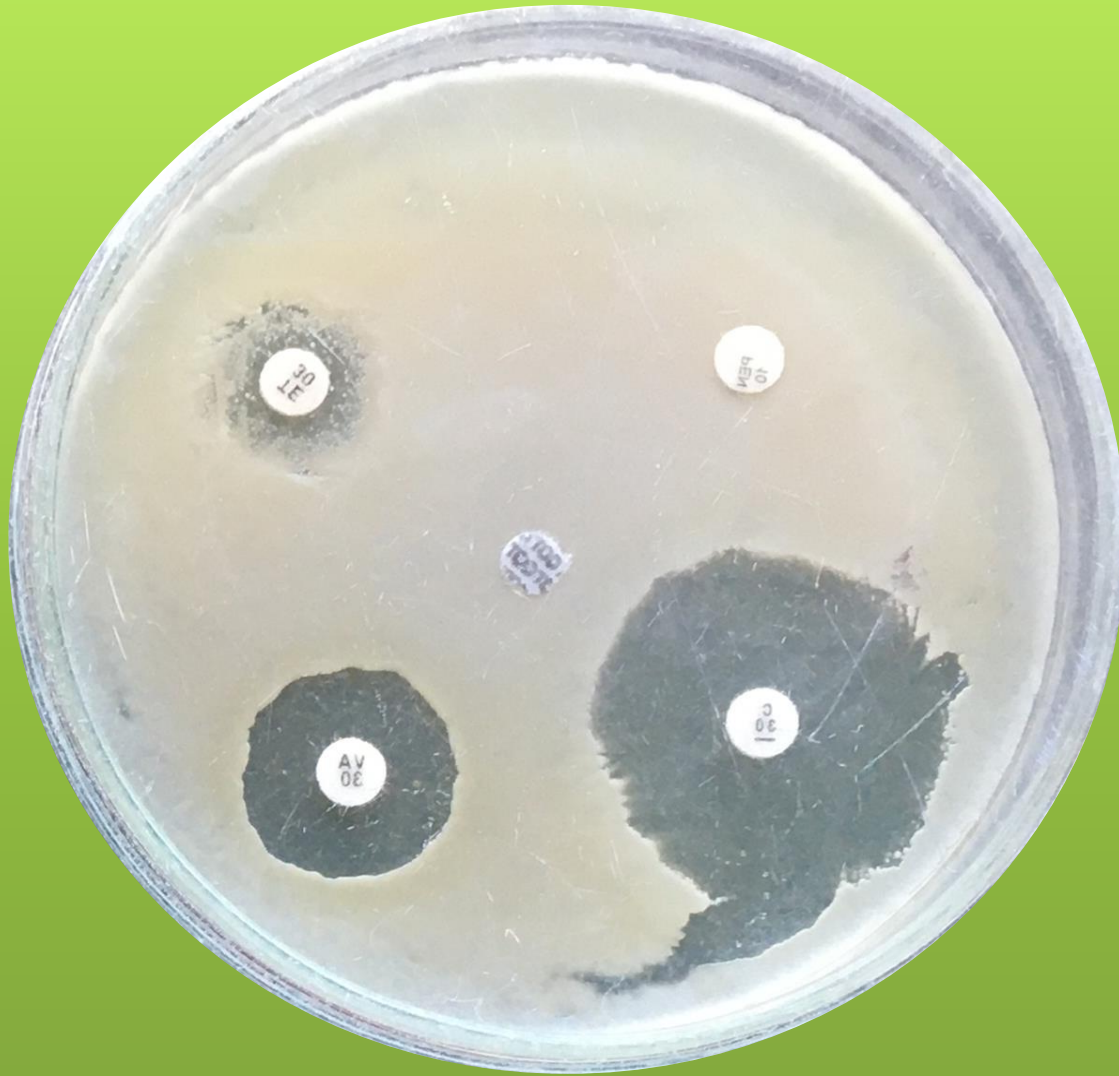
- z hodnot 4 zón [mm] vypočítat průměr
 - sestavit kalibrační křivku – průměr zóny v mm/log koncentrace (osa x vyjadřuje logaritmus koncentrace ATB)
 - určit koncentraci neznámého vzorku (nezapomeňte tedy odlogaritmovat, výsledek je nutné uvést jako koncentraci)
- ▶ **V závěru tyto úkoly souhrnně zhodnoťte podle pokynů v protokolu**

Provedení diskové difúzní metody

Bakteriální kmen:				
ATB		zkratka ATB (označení na disku)	d [mm]	Interpretace
Vankomycin 30		VA 30		
Chloramfenikol 30 µg		C 30		
Tetracyklin 30 µg		TE 30		
Ko-trimoxazol 25 µg		COT 25/COT		
Penicilin 10 m.j.		PEN 10		

* tabulky k vyplnění výsledků pro jednotlivé MO jsou součástí protokolu

Disková metoda

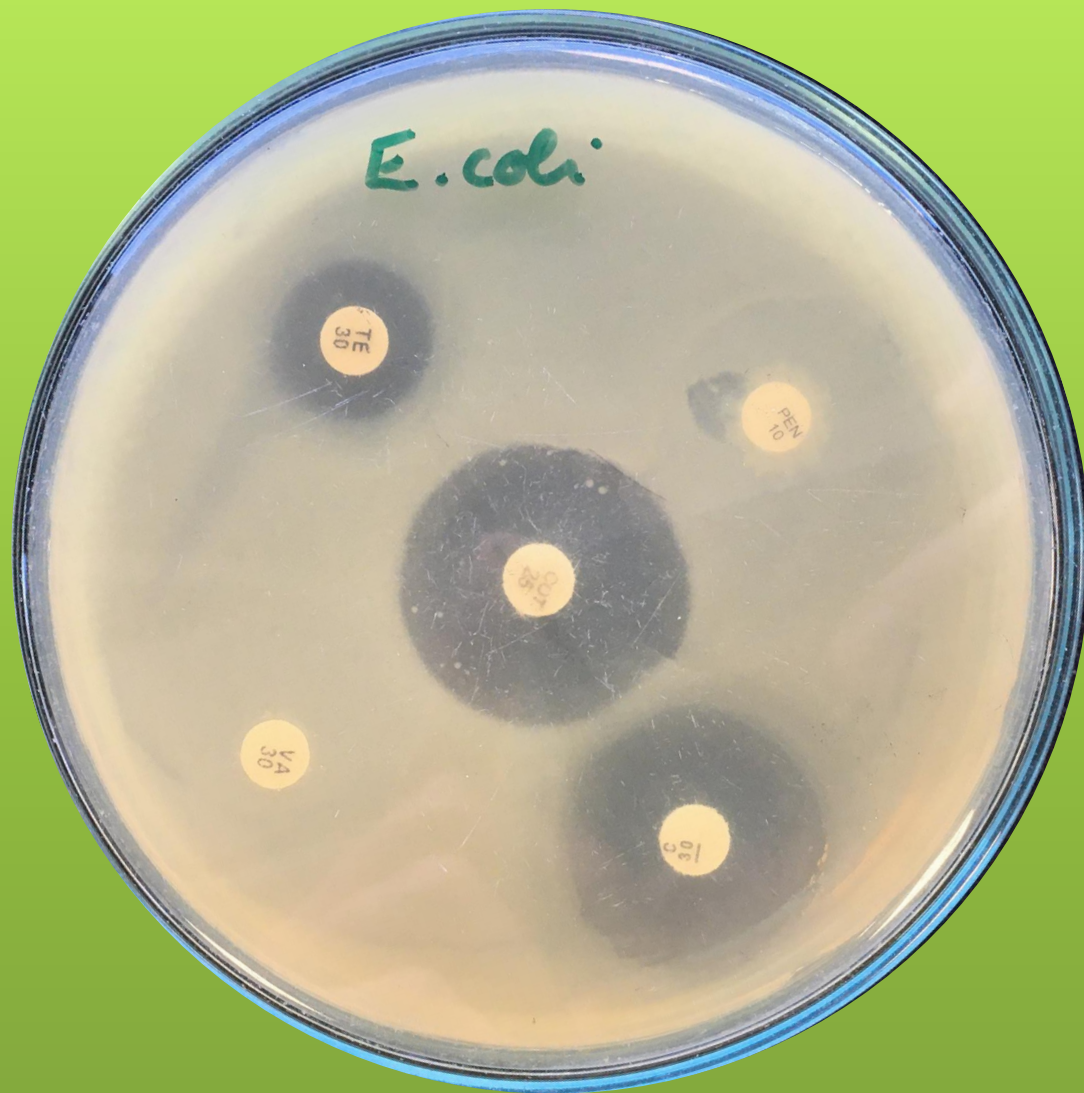


Bacillus cereus

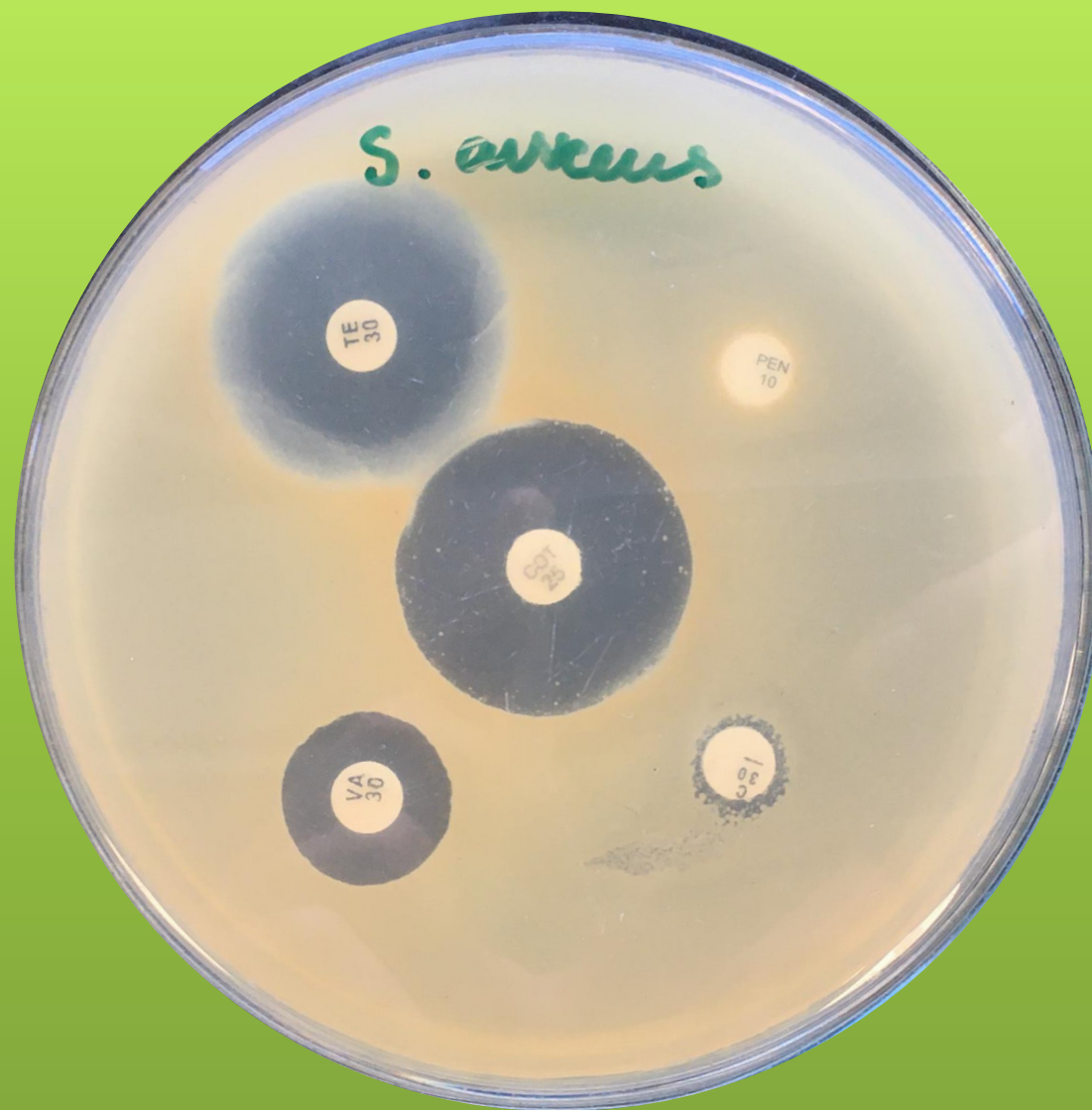


Serratia marcescens

Disková metoda



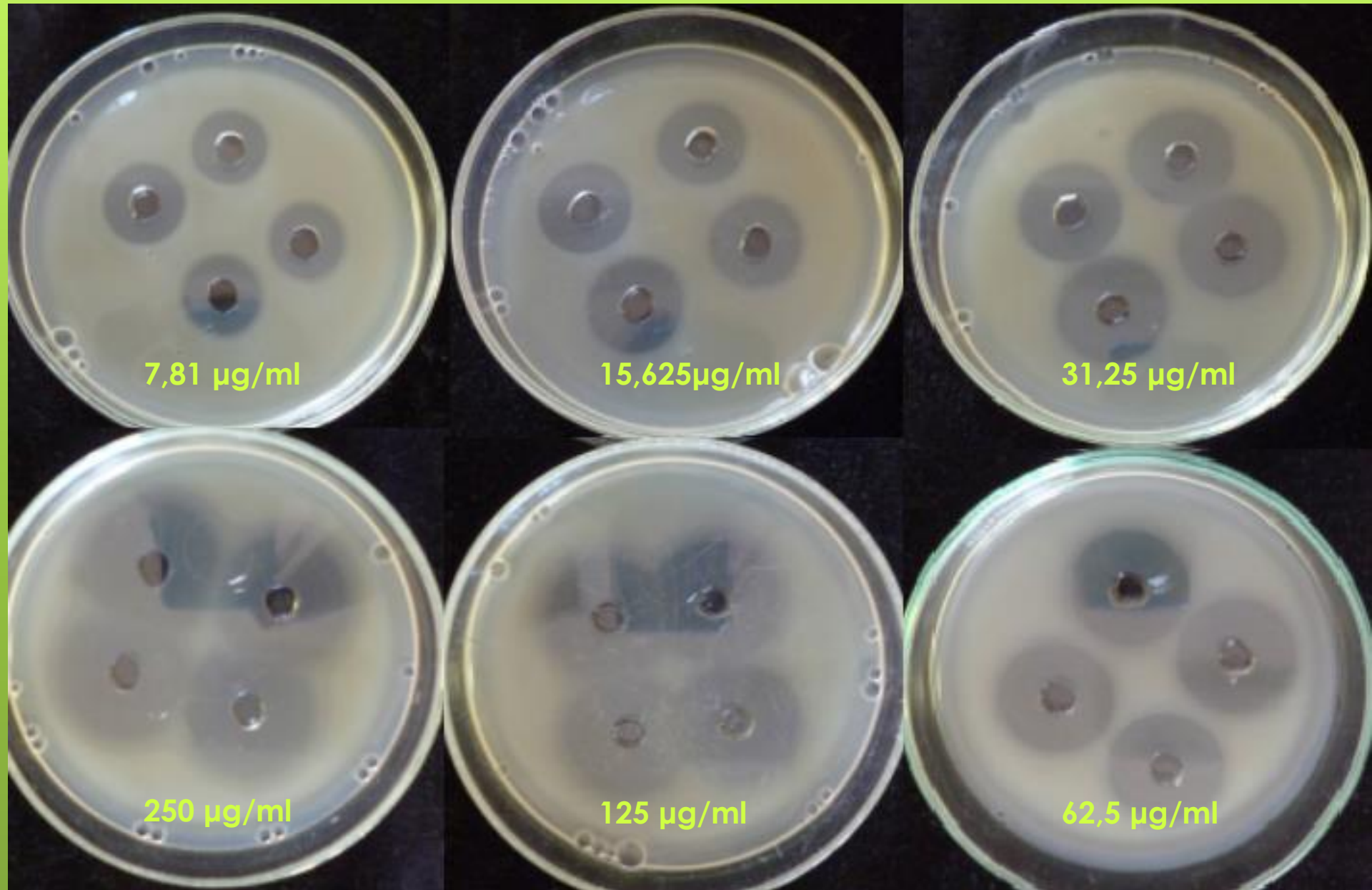
Escherichia coli



Staphylococcus aureus

Jamková metoda

- Koncentrace antibiotika oxacilinu [$\mu\text{g/ml}$]*



- * tabulka k vyplnění na následujícím snímku je součástí protokolu

Stanovení koncentrace antibiotika oxacilinu difúzní jamkovou metodou u neznámého vzorku s využitím kultury kmene *Staphylococcus aureus**

Konc. [$\mu\text{g/ml}$]	hodnoty průměrů zón				Průměr z hodnot [mm]	Log konc.
	1	2	3	4		
250	29,90	30,10	29,90	30,10		
125	28,70	28,80	30,00	28,70		
62,5	24,10	24,20	24,30	24,20		
31,25	19,90	20,10	20,00	20,00		
15,625	16,70	16,70	16,80	16,80		
7,8125	13,70	13,80	13,80	13,70		
Neznámý vzorek	23,10	23,00	23,00	22,90		

* tabulka v protokolu