

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická

Testování citlivosti mikroorganismů diskovou difúzní metodou

Bc. Nela Konečná

Diplomová práce

2018

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2017/2018

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE (PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Nela Konečná**
Osobní číslo: **C16477**
Studijní program: **N3912 Speciální chemicko-biologické obory**
Studijní obor: **Analýza biologických materiálů**
Název tématu: **Testování citlivosti mikroorganismů diskovou difuzní metodou**
Zadávací katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

Zásady pro vypracování:

Teoretická část:

1. Zpracujte literární referenci zaměřenou na testování citlivosti mikroorganismů diskovou difuzní metodou.

Experimentální část:

1. Otestujte citlivost vybraných referenčních mikroorganismů na antibakteriální látka diskovou difuzní metodou.

2. Změnou podmínek v průběhu testování se pokuste zkrátit čas k získání výsledků.

3. Výsledky vyhodnoťte a vyvoďte závěry.

Prohlašuji:

Tuto práci jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

V Pardubicích dne

Nela Konečná

Touto cestou bych ráda poděkovala vedoucí mé diplomové práce RNDr. Markétě Vydržalové, PhD. za odborné vedení, cenné rady a za čas strávený při konzultacích práce. Dále bych ráda poděkovala konzultantce práce RNDr. Petře Mosio, PhD. za věnovaný čas při konzultacích a cenné rady, které mi poskytla. V neposlední řadě chci poděkovat paní primářce MUDr. Janě Janečkové za vymyšlení tématu diplomové práce. Také bych ráda poděkovala rodině za podporu a toleranci, kterou mi po celou dobu poskytovali.

ANOTACE

Tato diplomová práce je zaměřena na testování citlivosti antimikrobiálních látek diskovou difúzní metodou. Jejím cílem práce bylo zkrátit čas k získání výsledků, změnou podmínek v průběhu testování. Testováno bylo 5 kontrolních kmenů (*Staphylococcus aureus*, *Haemophilus influenzae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus pneumoniae*, *Escherichia coli*). Vyhodnocovány byly velikosti inhibičních zón antimikrobiálních látek po inkubační době 4, 5, 6, 7 a 24 hodin.

KLÍČOVÁ SLOVA

disková difúzní metoda, antibiotika, kontrolní kmeny, *Staphylococcus aureus*, *Haemophilus influenzae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus pneumoniae*, *Escherichia coli*.

TITLE

Susceptibility testing of microorganisms by the disk diffusion method

ANNOTATION

This thesis is focused on susceptibility testing of antimicrobial substances by the disk diffusion method. The aim was to shorten the time to obtain results by changing conditions during the testing. Five control strains (*Staphylococcus aureus*, *Haemophilus influenzae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus pneumoniae*, *Escherichia coli*) were tested. The inhibition zone diameters of antimicrobial substances were measured after incubation time of 4, 5, 6, 7 and 24 hours.

KEYWORDS

disk diffusion method, antibiotics, control strains, *Staphylococcus aureus*, *Haemophilus influenzae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus pneumoniae*, *Escherichia coli*.

Obsah

ÚVOD	19
1. TEORETICKÁ ČÁST	20
1.1 HISTORIE TESTOVÁNÍ CITLIVOSTI NA ANTIBIOTIKA	20
1.2 PRINCIP METODY	22
1.2.1 Půdy	23
1.2.2 Příprava inokula	24
KMENY PRO RUTINNÍ KONTROLU KVALITY	25
<i>Staphylococcus aureus</i>	25
<i>Haemophilus influenzae</i>	27
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	29
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	30
<i>Escherichia coli</i>	31
1.2.3 Inokulace	31
INOKULACE ROZTĚREM	32
INOKULACE PŘELIVEM	33
1.2.4 Aplikace disků s antibiotiky	33
ANTIBIOTIKA	34
Beta-laktamová antibiotika	35
Tetracykliny	36
Makrolidy	36
Linkosamidy	37
Sulfonamidy	37
Chinolony	38
1.2.5 Inkubace	38
1.2.6 Měření zón a interpretace citlivosti	38
1.3 OVLIVNĚNÍ VÝSLEDKŮ DISKOVÉ DIFÚZNÍ METODY	39

1.3.1	Velikost disku	40
1.3.2	Difúze antimikrobiální látky.....	40
1.3.3	Hloubka (výška) agaru	40
1.3.4	Doba mezi inokulací ploten a položením disků	40
1.3.5	Inkubace	40
1.3.6	pH	41
1.3.7	Vlhkost	41
1.3.8	Složení média	41
1.4	NORMY.....	42
1.4.1	EUCAST.....	42
	Cíle organizace	42
1.4.2	CLSI	43
	Historie vzniku	43
	Cíle organizace	43
2	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	45
2.1	Kontrolní kmeny	45
2.2	Antibiotické disky.....	45
2.3	Přístroje a pomůcky	45
2.4	KULTIVAČNÍ MÉDIA A ROZTOKY	46
2.4.1	Fyziologický roztok	46
2.4.2	BHI bujón (HiMedia Laboratories Pvt. Ltd., č.š. 0000140607).....	46
2.5	TESTOVÁNÍ CITLIVOSTI DISKOVOU DIFÚZNÍ METODOU	47
2.5.1	Oživení a pomnožení testovaných kmenů	47
2.5.2	Aplikace antibiotických disků	48
2.5.3	Inkubace.....	48
3	VÝSLEDKY A DISKUZE.....	50
	Testování citlivosti referenčního kmene Escherichia coli na vybraná antibiotika.....	51

Testování citlivosti referenčního <i>Haemophilus influenzae</i> na vybraná antibiotika	60
Testování citlivosti referenčního kmene <i>Staphylococcus aureus</i> na vybraná antibiotika.....	68
Testování citlivosti referenčního kmene <i>Pseudomonas aeruginosa</i> na vybraná antibiotika	77
Testování citlivosti referenčního kmene <i>Streptococcus pneumoniae</i> na vybraná antibiotika	86
ZÁVĚR	96
ZDROJE.....	98

SEZNAM ILUSTRACÍ

Obrázek 1: Metoda využívající nerezové válečky k testování antimikrobiální citlivosti ^[54] ...	20
Obrázek 2: Disková difúzní metoda ^[55]	21
Obrázek 3: Mueller – Hinton agar ^[56]	23
Obrázek 4: Mueller – Hinton agar s krví ^[57]	24
Obrázek 5: Kolonie <i>Haemophilus influenzae</i> na čokoládovém agaru (24 hodin při 37 °C v 5 % CO ₂) ^[59]	29
Obrázek 6: Kolonie <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , CHROMaga TM <i>Pseudomonas</i> (24 hodin, 37 °C) ^[60]	30
Obrázek 7: Kolonie <i>Streptococcus pneumoniae</i> , Columbia krevní agar s 5 % defibrinované ovčí krve (48 hodin při 37 °C v 5 % CO ₂) ^[převzato a upraveno 61]	31
Obrázek 8: Inokulace roztěrem ^[37]	32
Obrázek 9: Rotační stolek pro inokulaci roztěrem ^[62]	32
Obrázek 10: Inokulace přelivem ^[55]	33
Obrázek 11: Raznice pro aplikaci antibiotických disků ^[37]	34
Obrázek 13: Mechanismus účinku antibiotik ^[63]	35
Obrázek 14: Měření inhibiční zóny posuvným měřítkem ^[37]	39
Obrázek 15: BACMED G2 ^[64]	39

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1 -Vybrané kmeny pro rutinní kontrolu kvality ^[58]	25
Tabulka 2 - Mechanismus rezistence <i>Staphylococcus aureus</i> ^[převzato a upraveno 18]	27
Tabulka 3 - Skupiny antibiotik použité pro jednotlivé kontrolní kmeny.....	48
Tabulka 4 – Průměr inhibičních zón – <i>Escherichia coli</i> , předehřáté kultivační médium, inokulace přelivem	51
Tabulka 5 – Průměr inhibičních zón – <i>Escherichia coli</i> , inokulace přelivem.....	52
Tabulka 6 – Průměr inhibičních zón – <i>Escherichia coli</i> , předehřáté kultivační médium, inokulace roztěrem	53
Tabulka 7 – Průměr inhibičních zón – <i>Escherichia coli</i> , inokulace roztěrem.....	55
Tabulka 8 - Rozmezí breakpointů podle EUCAST tabulek pro <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	56
Tabulka 9 – Průměr inhibičních zón – <i>Haemophilus influenzae</i> , předehřáté kultivační médium, inokulace přelivem	60
Tabulka 10 – Průměr inhibičních zón – <i>Haemophilus influenzae</i> , inokulace přelivem	61
Tabulka 11 - Průměrné inhibičních zón – <i>Haemophilus influenzae</i> , předehřáté kultivační médium, inokulace roztěrem	62
Tabulka 12 – Průměr inhibičních zón – <i>Haemophilus influenzae</i> , inokulace roztěrem	64
Tabulka 13 - Rozmezí breakpointů dle EUCAST pro <i>Haemophilus influenzae</i> ATCC 4976665	
Tabulka 14 – Průměr inhibičních zón – <i>Staphylococcus aureus</i> , předehřáté kultivační médium, inokulace přelivem	68
Tabulka 15 – Průměr inhibičních zón – <i>Staphylococcus aureus</i> , inokulace přelivem	70
Tabulka 16 – Průměr inhibičních zón – <i>Staphylococcus aureus</i> , předehřáté kultivační médium, inokulace roztěrem	71
Tabulka 17 – Průměr inhibičních zón – <i>Staphylococcus aureus</i> , inokulace roztěrem	72
Tabulka 18 - Rozmezí breakpointů dle EUCAST pro <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213 .	73
Tabulka 19 – Průměr inhibičních zón – <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , předehřáté kultivační médium, inokulace přelivem	77
Tabulka 20 – Průměr inhibičních zón – <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , inokulace přelivem.....	79
Tabulka 21 – Průměr inhibičních zón – <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , předehřáté kultivační médium inokulace roztěrem	80
Tabulka 22 – Průměr inhibičních zón – <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , inokulace roztěrem.....	81

Tabulka 23 - Rozmezí breakpointů dle EUCAST pro <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	82
Tabulka 24 – Průměr inhibiční zóny – <i>Streptococcus pneumoniae</i> , předehřáté kultivační médiu, inokulace přelivem	86
Tabulka 25 – Průměr inhibiční zóny – <i>Streptococcus pneumoniae</i> , inokulace přelivem.....	88
Tabulka 26 – Průměr inhibičních zón – <i>Streptococcus pneumoniae</i> , předehřáté kultivační médiu, inokulace roztěrem	89
Tabulka 27 – Průměr inhibičních zón – <i>Streptococcus pneumoniae</i> , inokulace roztěrem	90
Tabulka 28 - Rozmezí breakpointů dle EUCAST pro <i>Streptococcus pneumoniae</i> ATCC 49619	91

SEZNAM GRAFŮ

Graf 1 – Citlivost <i>Escherichia coli</i> na antibiotika – předeřtáté kultivační médium, inokulace přelivem.....	51
Graf 2 – Citlivost <i>Escherichia coli</i> na antibiotika – inokulace přelivem.....	52
Graf 3 – Citlivost <i>Escherichia coli</i> na antibiotika – předeřtáté kultivační médium, inokulace roztěrem.....	54
Graf 4 – Citlivost <i>Escherichia coli</i> na antibiotika – inokulace roztěrem.....	55
Graf 5 – Porovnání velikostí inhibičních zón po 7 hodinách inkubace <i>Escherichia coli</i> - inokulace přelivem a roztěrem na předeřtátém kultivačním médiu.....	56
Graf 6 - Porovnání velikostí inhibičních zón po 7 hodinách inkubace <i>Escherichia coli</i> – inokulace přelivem a roztěrem	57
Graf 7 - Porovnání velikostí inhibičních zón po 7 hodinách inkubace <i>Escherichia coli</i> – inokulace přelivem s předeřtátým kultivačním médiem a nepředeřtátým kultivačním médiem	58
Graf 8 - Porovnání velikostí inhibičních zón po 7 hodinách inkubace <i>Escherichia coli</i> – inokulace roztěrem s předeřtátým kultivačním médiem a nepředeřtátým kultivačním médiem	59
Graf 9 – Citlivost <i>Haemophilus influenzae</i> na antibiotika – předeřtáté kultivační médium, inokulace přelivem	60
Graf 10 – Citlivost <i>Haemophilus influenzae</i> na antibiotika – inokulace přelivem.....	62
Graf 11 – Citlivost <i>Haemophilus influenzae</i> na antibiotika – předeřtáté kultivační médium, inokulace roztěrem	63
Graf 12 – Citlivost <i>Haemophilus influenzae</i> na antibiotika – inokulace roztěrem.....	64
Graf 13 - Porovnání velikostí inhibičních zón po 7 hodinách inkubace <i>Haemophilus influenzae</i> - inokulací přelivem a roztěrem na předeřtátém kultivačním médiu.....	65
Graf 14 - Porovnání velikostí inhibičních zón po 7 hodinách inkubace <i>Haemophilus influenzae</i> - inokulace přelivem a roztěrem	66
Graf 15 - Porovnání velikostí inhibičních zón po 7 hodinách inkubace <i>Haemophilus influenzae</i> inokulací přelivem s předeřtátým kultivačním médiem a nepředeřtátým kultivačním médiem	67
Graf 16 - Porovnání velikostí inhibičních zón po 7 hodinách inkubace <i>Haemophilus influenzae</i> inokulací roztěrem s předeřtátým kultivačním médiem a nepředeřtátým kultivačním médiem	68

Graf 17 – Citlivost <i>Staphylococcus aureus</i> na antibiotika – předeřáté kultivační médium, inokulace přelivem	69
Graf 18 – Citlivost <i>Staphylococcus aureus</i> na antibiotika – inokulace přelivem	70
Graf 19 – Citlivost <i>Staphylococcus aureus</i> na antibiotika – předeřáté kultivační médium, inokulace roztěrem	71
Graf 20 – Citlivost <i>Staphylococcus aureus</i> na antibiotika – inokulace roztěrem	72
Graf 21 - Porovnání velikostí inhibičních zón po 7 hodinách inkubace <i>Staphylococcus aureus</i> - inokulace přelivem a roztěrem na předeřátém kultivačním médiu	74
Graf 22 - Porovnání velikostí inhibičních zón po 7 hodinách inkubace <i>Staphylococcus aureus</i> - inokulace přelivem a roztěrem	75
Graf 23 - Porovnání velikostí inhibičních zón po 7 hodinách inkubace <i>Staphylococcus aureus</i> - inokulace přelivem s předeřátým kultivačním médiem a nepředeřátým kultivačním médiem	76
Graf 24 - Porovnání velikostí inhibičních zón po 7 hodinách inkubace <i>Staphylococcus aureus</i> - inokulace roztěrem s předeřátým kultivačním médiem a nepředeřátým kultivačním médiem	77
Graf 25 – Citlivost <i>Pseudomonas aeruginosa</i> na antibiotika – předeřáté kultivační médium, inokulace přelivem	78
Graf 26 – Citlivost <i>Pseudomonas aeruginosa</i> na antibiotika – inokulace přelivem	79
Graf 27 – Citlivost <i>Pseudomonas aeruginosa</i> na antibiotika – předeřáté kultivační médium, inokulace roztěrem	80
Graf 28 – Citlivost <i>Pseudomonas aeruginosa</i> na antibiotika – inokulace roztěrem	81
Graf 29 - Porovnání velikostí inhibičních zón po 7 hodinách inkubace <i>Pseudomonas aeruginosa</i> - inokulace přelivem a roztěrem na předeřátém kultivačním médiu	83
Graf 30 - Porovnání velikostí inhibičních zón po 7 hodinách inkubace <i>Pseudomonas aeruginosa</i> - inokulace přelivem a roztěrem	84
Graf 31 - Porovnání velikostí inhibičních zón po 7 hodinách inkubace <i>Pseudomonas aeruginosa</i> - inokulace přelivem s předeřátým kultivačním médiem a nepředeřátým kultivačním médiem	85
Graf 32 - Porovnání velikostí inhibičních zón po 7 hodinách inkubace <i>Pseudomonas aeruginosa</i> - inokulace roztěrem s předeřátým kultivačním médiem a nepředeřátým kultivačním médiem	86
Graf 33 – Citlivost <i>Streptococcus pneumoniae</i> na antibiotika – předeřáté kultivační médium, inokulace přelivem	87

Graf 34 – Citlivost <i>Streptococcus pneumoniae</i> na antibiotika – inokulace přelivem.....	88
Graf 35 – Citlivost <i>Streptococcus pneumoniae</i> na antibiotika – předehřáté kultivační médium, inokulace roztěrem	89
Graf 36 – Citlivost <i>Streptococcus pneumoniae</i> na antibiotika – inokulace roztěrem.....	90
Graf 37 - Porovnání velikostí inhibičních zón po 7 hodinách inkubace <i>Streptococcus pneumoniae</i> - inokulace přelivem a roztěrem na předehřátém kultivačním médiu	92
Graf 38 - Porovnání velikostí inhibičních zón po 7 hodinách inkubace <i>Streptococcus pneumoniae</i> - inokulací přelivem a roztěrem	93
Graf 39 - Porovnání velikostí inhibičních zón po 7 hodinách inkubace – <i>Streptococcus pneumoniae</i> inokulace přelivem s předehřátým kultivačním médiem a nepředehřátým kultivačním médiem.....	94
Graf 40 - Porovnání velikostí inhibičních zón po 7 hodinách inkubace <i>Streptococcus pneumoniae</i> - inokulace roztěrem s předehřátým kultivačním médiem a nepředehřátým kultivačním médiem.....	95

SEZNAM ZKRATEK

23S	rRNA katalyzující prodlužování peptidového řetězce; část 50S podjednotky
50S	sedimentační koeficient velké ribozomální podjednotky
AMP	Ampicillin
AMC	Amoxicillin/klavulanová kyselina (z angl. clavulanic acid)
AST	testování antimikrobiální citlivosti (z angl. antimicrobial susceptibility testing)
ATCC	Americká sbírka typových kmenů (z angl. American Type Culture Collection)
ATM	Aztreonam
β – NAD	β – nikotinamindadenindinukleotid
blaZ	gen <i>Staphylococcus aureus</i> kódující β -laktamásovou aktivitu
BHI	mozko-srdcový bujón (z angl. Brain-Heart Infusion)
CCM	České sbírka mikroorganismů (z angl. Czech Collection of Microorganisms)
CFR	Cefadroxil
CFU	počet jednotek tvořících kolonie (z angl. Colony Forming Units)
CIP	Ciprofloxacin
CLSI	Klinický a laboratorní standardizační institut (z angl. Clinical and Laboratory Standards Institute)
CNCTC	Česká národní sbírka typových kultur (z angl. Czech National Collection of Type Cultures)
CTX	Cefotaxim
CXM	Cefuroxim

D – Ala – D – Lac	D-Alanyl – D-Laktát pozměněné aminokyselinové zbytky peptidových podjednotek; mechanismus rezistence na vankomycin
DA	Klindamycin
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DO	Doxycyklin
E	Erythromycin
ECDC	Evropské středisko pro prevenci a kontrolu nemocí (z angl. European Centre for Disease Prevention and Control)
ESCMID	Evropská společnost pro klinickou mikrobiologii a infekční nemoci (z angl. European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases)
EUCAST	Evropský výbor pro testování antimikrobiální citlivosti (z angl. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing)
FEP	Cefepim
FOX	Cefoxitin
gyrA	DNA gyráza typ A <i>Staphylococcus aureus</i>
gyrB	DNA gyráza typ B <i>Staphylococcus aureus</i>
mecA	gen kódující protein vázající se na penicilin (PBP)
MH	Mueller – Hinton agar
MHF	Mueller – Hinton agar s krví
MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> rezistentní na methicilin (z angl. Methicillin resistant <i>Staphylococcus aureus</i>)
McF	McFarlandova zákalová stupnice
NCCLS	Národní výbor pro klinické laboratorní standardy (z angl. National Committee for Clinical Laboratory Standards)
OX	Oxacilin
P	Penicilin G

PABA	para-aminobenzoová kyselina
parC	gen kódující DNA topoizomeráza 4
PBP	penicilin vázající protein (z angl. Penicillin Binding Protein)
pH	potenciál vodíku (z lat. pondus hydrogenia)
QRDR	oblast určující rezistenci na chinolony (z angl. Quinolone – Resistance Determining Region)
RNA	ribonukleová kyselina
SRGA	Švédská referenční skupina pro antibiotika (z angl. Swedish Reference Group for Antibiotic)
SXT	Sulfamethoxazol trimethoprim
SZÚ	Státní zdravotní ústav
TE	Tetracyklin
TIM	Ticarcillin/klavulanová kyselina (z angl. clavulanic acid)
VISA	Kmen <i>Staphylococcus aureus</i> středně rezistentní k vankomycinu (z angl. Vancomycin Intermediate Resistant <i>Staphylococcus aureus</i>)
VRSA	Kmen <i>Staphylococcus aureus</i> rezistentní k vankomycinu (z angl. Vancomycin Resistant <i>Staphylococcus aureus</i>)
WHO	Světová zdravotnická organizace (z angl. World Health Organization)

ÚVOD

Objev antibiotik a jejich použití k léčbě infekčních onemocnění znamenal v medicíně velký pokrok. Do té doby řadu těžce probíhajících onemocnění bylo možné úspěšně léčit. Současně se zavedením antibiotik do praxe se však začala objevovat i rezistence bakterií na antibiotika. S objevem rezistence, ať už přirozené či získané, vyvstala nutnost citlivost mikroorganismů testovat. Jednou z metod, která byla vyvinuta za účelem testování, je disková difúzní metoda. Jedná se o kvalitativní metodu, která nám poskytuje informace o citlivosti testovaného mikroorganismu na vybrané druhy antibiotik. Průběh této metody je ovlivněn řadou faktorů, jako je zvolené kultivační médium, hustota inokula, teplota inkubace atd. Výsledek diskové difúzní metody má vliv na správný výběr antibiotické terapie.

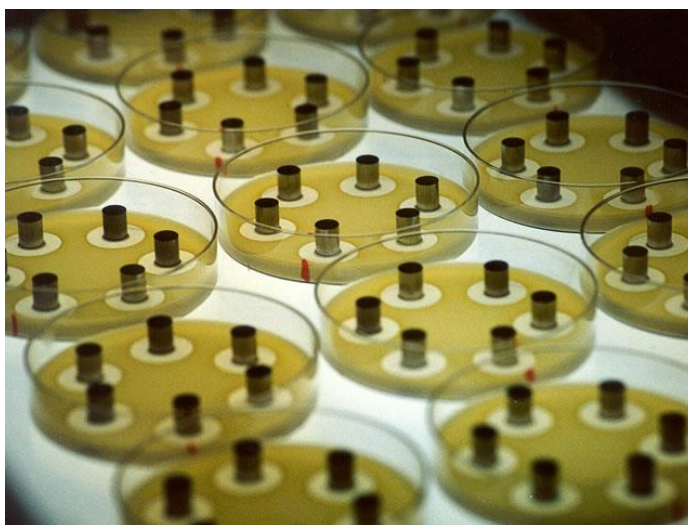
Tato diplomová práce je zaměřená na testování citlivosti mikroorganismů, a to konkrétně druhů *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, diskovou difúzní metodou. Za účelem zkrácení doby odečtu výsledků byly změněny podmínky průběhu této metody. Před inokulací byla kultivační média přehřívána na teplotu 37 °C. Inokulace suspenze testovaného kmene byla provedena přelivem kultivačního média. Cílem úpravy diskové difúzní metody je rychlejší získání výsledků mikrobiologického vyšetření a umožnění včasné a cílené terapie pacienta.

1. TEORETICKÁ ČÁST

1.1 HISTORIE TESTOVÁNÍ CITLIVOSTI NA ANTIBIOTIKA

Objev penicilinu Alexandrem Flemingem v roce 1928 se stal v medicíně důležitým mezníkem, po němž následovalo objevení dalších látek s antimikrobiálním účinkem. Tyto objevy vedly k naději, že některá infekční onemocnění budou zcela vymýcena. Tento předpoklad se však záhy ukázal být mylným. Rezistence bakterií, ať už přirozená, nebo získaná, vedla k nutnosti zavedení metod určených k testování citlivosti mikroorganismů na antimikrobiální látky ^[1].

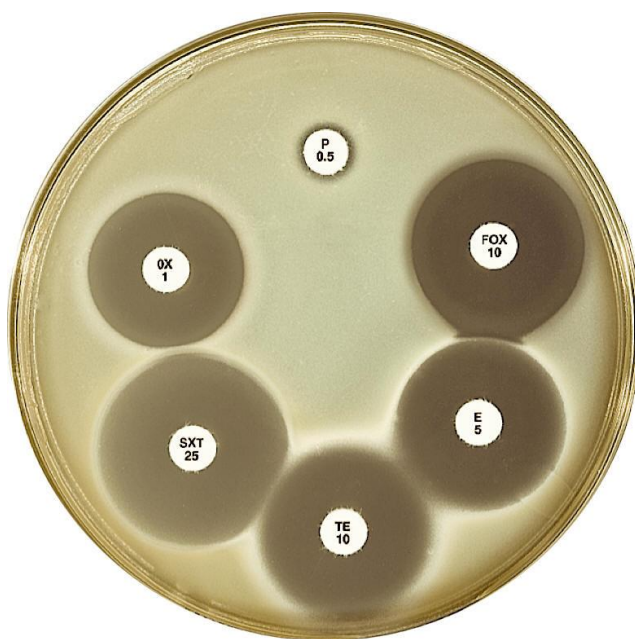
Před zavedením diskové difúzní metody byla nejpoužívanější metoda využívající malého skleněného, nebo ocelového nerezového válečku o průměru zhruba 8 mm (Obrázek 1) ^[2]. Na povrch inokulovaného média v Petriho misce bylo umístěno několik válečků, přičemž každý byl umístěn rovnoměrně od středu. Válečky byly naplněny roztokem obsahujícím určitou koncentraci antimikrobiální látky. Poté byly Petriho misky inkubovány ^[3,4]. První modifikace této metody, začala místo kovových válečků využívat filtračního papíru. O první zmínku této modifikace se v roce 1944 zasloužili pánové Vincent a Vincent. Metoda využívající disky filtračního papíru, dnes známá pod názvem disková difúzní metoda, byla mnohem jednodušší a citlivější pro zjištění citlivosti penicilinu ^[2].



Obrázek 1: Metoda využívající nerezové válečky k testování antimikrobiální citlivosti ^[54]

V 60. letech 20. století nebyla disková difúzní metoda stále standardizována. Kirby a Bauer (1960) sjednocovali všechny doposud známé postupy ^[1]. Byly známy 2 způsoby provedení. První způsob provedení zahrnoval 2 nebo 3 disky s různou koncentrací jedné antimikrobiální látky. Citlivost na danou látku byla určována pouze z přítomnosti nebo nepřítomnosti inhibiční zóny. Na velikost zóny v tomto případě nebyl brán ohled. Zóna inhibice kolem disku s nejnižší koncentrací indikovala, že mikroorganismus je citlivý, zatímco nepřítomnost zóny kolem disku s nejvyšší koncentrací indikovala rezistenci. Druhý způsob tzv. metoda jednoho disku využívala pro každou antimikrobiální látku jeden disk (Obrázek 2). Stupeň citlivosti byl založen na velikosti zóny inhibice kolem disku. Výhodou byla možnost testovat citlivost mikroorganismů na 10 až 12 antimikrobiálních látek na jedné Petriho misce. Výrobci komerčních disků však nebyli ochotni zahrnout do svých pokynů popis výkonu a standardní velikosti zón pro metodu s jedním diskem, a proto většině laboratoří nebyly k dispozici dostatečné informace o tomto postupu ^[5]. Kirby a Bauer se věnovali vývoji metody s jedním diskem. Byli přesvědčeni, že tato metoda přesněji určuje citlivost bakterií, která vyplývá z velikosti inhibiční zóny.

Na základě publikací vydaných Kirby a Bauerem, sestavila v roce 1961 Světová zdravotnická organizace výbor pro standardizaci metody. Výsledkem byl standardizovaný postup diskové difúzní metody, který je také nazýván Kirby-Bauer diskový difúzní test ^[1].



Obrázek 2: Disková difúzní metoda ^[55]

1.2 PRINCIP METODY

Disková difúzní metoda se používá pro vyšetření citlivosti k antibiotikům u rychle rostoucích, nenáročných bakterií a některých kultivačně náročnějších bakterií. Výsledky umožňují zařadit bakteriální kmen do kvalitativní kategorie jako citlivý nebo rezistentní k určitému antibiotiku ^[7].

Disková difúzní metoda neboli Kirby-Bauer test je jednou z klasických mikrobiologických technik ^[6]. Stanovuje citlivost nebo rezistenci podle toho, zda vyšetřovaný bakteriální kmen vytvoří nebo nevytvoří kolem disku s určitou koncentrací antimikrobiální látky zónu inhibice růstu. Průměr zóny inhibice se liší u jednotlivých antibiotik v závislosti na citlivosti mikroorganismu k antimikrobiální látce a na rychlosti difuze látky z disku ^[7].

Suspenze bakteriálního inokula o hodnotě $1 - 2 \times 10^8$ CFU/ml, což odpovídá zákalu 0,5 McFarlanda, je rovnoměrně nanášena na vhodnou půdu (př. Mueller-Hinton agar). Na inokulovaný povrch půdy jsou umístěny disky z filtračního papíru o průměru 6 mm, obsahující určitou koncentraci antimikrobiální látky. Pro rychlé nanášení více disků najednou se využívá speciální aplikátor. Poté nastává inkubace po dobu 16 – 24 hodin při teplotě 37 °C. Během této doby difunduje antimikrobiální látka z disku do půdy. Je-li daná antimikrobiální látka účinná na bakteriální kmen, tedy je-li bakteriální kmen citlivý k dané antimikrobiální látce, vytvoří se kolem disku inhibiční zóna, ve které není patrný bakteriální růst. Zóny inhibice růstu kolem každého z antibiotických disků se měří s přesností na milimetry ^[8,9].

Výhody:

- jednoduchá příprava
- nenáročnost na speciální přístrojové vybavení
- nízké náklady ve srovnání s jinými metodami vyšetření citlivosti

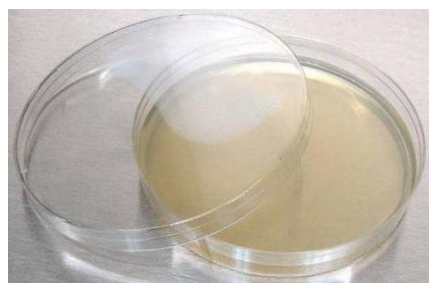
Nevýhody:

- metodu nelze použít pro mikroorganismy se speciálními kultivačními nároky
- výsledky jsou velmi významně ovlivněny koncentrací inokula
- metoda může selhat v průkazu klinicky významné rezistence některých bakterií a je nezbytné provést speciální vyšetření ^[7]

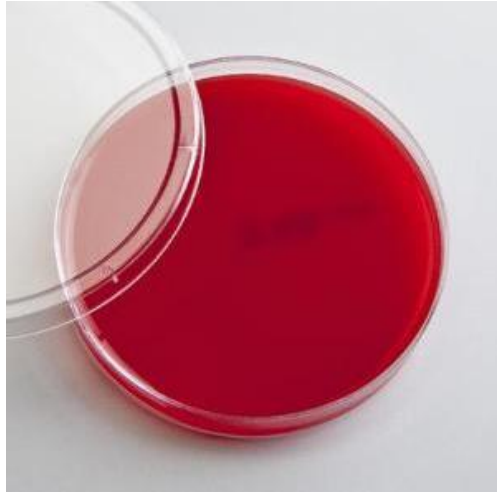
1.2.1 Půdy

John Howard Mueller a Jane Hinton společně v roce 1941 vyvinuli médium pro izolaci patogenních kmenů neiserií tzv. Mueller-Hinton agar ^[10]. Agar se nyní používá jako médium pro testování antimikrobiální citlivosti. Mueller-Hinton agar byl vybrán z několika důvodů. Má nízký obsah inhibitorů sulfonamidu, trimethoprimu a tetracyklinu a podporuje růst nenáročných mikroorganismů ^[7,11]. Je vhodný pro zjišťování citlivosti gramnegativních střevních tyčinek, stafylokoků, enterokoků, *Pseudomonas aeruginosa* a ostatních rychle rostoucích, nenáročných gramnegativních bakterií ^[7]. Mueller-Hinton agar obsahuje hovězí extrakt, kaseinový hydrolyzát, škrob a agar (Obrázek 3). Hovězí extrakt a kaseinový hydrolyzát poskytují dusík, vitamíny, uhlík, aminokyseliny, síru a další živiny. Škrob absorbuje toxické metabolity. Hydrolýzou škrobu vzniká dextróza, která slouží jako zdroj energie ^[11]. Ke stanovení citlivosti náročnějších bakterií jako jsou *Streptococcus* spp., *Haemophilus* spp., *Campylobacter* spp. apod., se Mueller-Hinton agar obohacuje ovčí, nebo koňskou krví s přidávkem β - nikotinamidadeninukleotidu (β -NAD) (Obrázek 4) ^[7, 12].

Výška půdy by měla být 4 mm \pm 0,5 mm. Na agaru nižším než 4 mm se rezistentní kmen může jevit jako citlivý, na agaru vyšším než 4 mm se citlivý kmen může jevit jako rezistentní. Půda musí mít při pokojové teplotě pH 7,20 – 7,40. V půdách s nižším pH mají nižší účinnost aminoglykosidy a makrolidy a vyšší účinek tetracykliny a některá beta-laktamová antibiotika, a naopak. Před použitím by měl být povrch ploten suchý. Na povrchu agaru nebo uvnitř víčka by neměly být žádné viditelné kapky vody. Pokud je to nezbytné, suší se plotny přes noc při 20 – 25 °C, nebo s odkrytým víčkem 15 minut při 35 °C. Při vlastní přípravě jsou plotny skladovány při 8 – 10 °C. Komerční půdy se skladují podle pokynů výrobce do data expirace ^[7,13,14].



Obrázek 3: Mueller – Hinton agar ^[56]



Obrázek 4: Mueller – Hinton agar s krví ^[57]

1.2.2 Příprava inokula

Inokulum se připravuje z kultury vyrostlé na pevné neselektivní půdě staré nejvýše 24 hodin. Z této kultury se kolonie odebírají dotykem sterilní kličkou nebo bavlněným tamponem. Kolonie bakterií se rozetřou přímo ve fyziologickém roztoku tak, aby zákal odpovídal hustotě 0,5 McFarlanda, tj. $1-2 \times 10^8$ CFU/ml. K úpravě zákalu se používá fotometr, který musí být kalibrován na hustotu zákalu 0,5 McFarlanda. Alternativně se hustota inokula upravuje vizuálně porovnáním s hustotou zákalu 0,5 McFarlanda. Hustota suspenze se upraví přidáním fyziologického roztoku nebo bakterií. Hustší inokulum vytváří malé zóny inhibice, řídké inokulum má opačný účinek. U *Streptococcus pneumoniae* se upřednostňuje příprava inokula z kultury narostlé na krevním agaru o hustotě zákalu 0,5 McFarlanda. Pokud se připravuje inokulum *Streptococcus pneumoniae* z čokoládového agaru, musí být ekvivalentní hustotě zákalu 1,0 McFarlanda. Suspenze inokula se očkuje na plotny nejlépe do 15 minut od přípravy, a vždy nejpozději do 60 minut ^[14].

KMENY PRO RUTINNÍ KONTROLU KVALITY

Pro kontrolu vyšetření citlivosti na antibiotika se používají doporučené kmeny pro kontrolu kvality [37].

Tabulka 1 -Vybrané kmeny pro rutinní kontrolu kvality [37]

Druh	Číslo sbírky kultur	Vlastnosti
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 29213 (CNCTC 5480, CCM 4223)	Slabý producent betalaktamázy
<i>Haemophilus influenzae</i>	ATCC 49766 (CNCTC 5105, CCM 4457)	Citlivý, divoký typ
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 27853 (CNCTC 5482, CCM 3955)	Citlivý, divoký typ
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	ATCC 49619 (CNCTC 5043, CCM 4501)	Kmen se sníženou citlivostí k benzylpenicilinu
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25922 (CNCTC 5276, CCM 3954)	Citlivý, divoký typ

Legenda: ATCC (American type Culture Collection), CNCTC (Česká národní sbírka typových kultur; Czech National Collection of Type Cultures), CCM (Česká sbírka mikroorganismů; Czech Collection of Microorganisms)

Staphylococcus aureus

Druh *Staphylococcus (S.) aureus* se řadí do rodu *Staphylococcus* [15]. Je to grampozitivní, kataláza pozitivní kok o průměru zhruba 0,5 – 1,5 µm. V mikroskopickém obraze tvoří charakteristické útvary připomínající hrozny. Optimální teplota pro růst je 37 °C a pH 7,0 – 7,5. Na běžných půdách dobře roste v širokém rozmezí teplot (7 – 48 °C) i pH (4,2 – 9,3) [16]. Přirozeně se vyskytuje na kůži a sliznicích lidí a zvířat [15].

S. aureus je hlavní příčinou nozokomiálních a komunitních infekcí po celém světě. Má mnoho faktorů virulence, které přispívají ke vzniku onemocnění. Produkuje toxiny usnadňující destrukci tkáně, dále disponuje množstvím adhezínů a povrchových proteinů zprostředkovávajících adhezenci a kolonizaci tkáně (Tabulka 2) [17]. Objev beta-laktamových antibiotik, konkrétně penicilinu G v roce 1940, přinesl krátkou úlevu. Bohužel kolem roku 1946 již více než 60 % kmenů produkovalo beta-laktamázu, která je zodpovědná za rezistenci. Jako

řešení této situace byla vyvinuta polosyntetická beta-laktamová methicilinová antibiotika. Bohužel se velmi rychle objevily kmeny *S. aureus*, které získaly gen *mecA* kódující rezistenci na methicilin. Tyto kmeny se označují jako MRSA (methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*). Jako důsledek vzniku MRSA vzrostla závislost na glykopeptidovém antibiotiku vankomycinu. Snížená citlivost na vankomycin přišla téměř po 40 letech a dala vzniku tzv. VISA kmenům (vancomycin – intermediate – resistant *Staphylococcus aureus*), které vykazovaly pouze částečnou (intermediární) rezistenci. V roce 2002 se objevily VRSA kmeny (vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*), které byly současně rezistentní i k methicilinu. Geny kódující rezistenci na vybrané antibiotické skupiny jsou zaznamenány v Tabulce 2 ^[18].

Tabulka 2 - Mechanismus rezistence *Staphylococcus aureus* [převzato a upraveno 18]

Antibiotikum	Gen kódující rezistenci	Produkty genů	Mechanismus rezistence
Betalaktamy	<i>blaZ</i>	Beta-laktamáza	Enzymatická hydrolýza beta-laktamového jádra
	<i>mecA</i>	PBP2a	Redukovaná afinita k PBP
Glykopeptidy	neznámý (VRSA)	Pozměněný peptidoglykan	Zadržování vankomycinu v buněčné stěně
	neznámý	D-Alanyl-D-Laktát (D-Ala-D-Lac)	Syntéza dipeptidu s redukovanou afinitou k vankomycinu
Chinolony	<i>parC</i>	<i>ParC</i> komponenta topoizomerázy IV	Mutace v oblasti určující rezistenci na chinolony (QRDR)
	<i>gyrA</i> nebo <i>gyrB</i>	<i>gyrA</i> nebo <i>gyrB</i> komponenta gyrázy	
Aminoglykosidy	aminoglykosid modifikující enzymy	Acetyltransferáza, fosfotransferáza	Acetylované a/nebo fosforylované enzymy modifikující aminoglykosidy

Haemophilus influenzae

Haemophilus (H.) influenzae je gramnegativní, kataláza pozitivní, pleomorfní kokobacil. Ideální podmínky pro růst představuje teplota 37 °C, 5 % CO₂ a přidavek dvou klíčových faktorů (hemin - X, nikotinamidadenindinukleotid - V) do růstového média (Obrázek 5). Dříve byla tato bakterie nazývána „Pfeifferův bacil“ nebo „chřipkový bacil“, protože poprvé byl mikroorganismus popsán v roce 1892 Richardem Pfeifferem během chřipkové pandemie.

Bakterie byla mylně považována za etiologické agens chřipky až do roku 1933, kdy byl jako původce označen virus chřipky [19,20].

H. influenzae může vyvolávat infekce dýchacích cest u dětí i dospělých. Přestože je součástí normální bakteriální flóry respiračního traktu, konkrétně horních cest dýchacích, zejména nasofaryngu, způsobuje invazivní infekce, které se z nasofaryngu šíří do dolních dýchacích cest. Podle charakteru kapsulárního antigenu se hemofily řadí do 6 antigenických typů – *H. influenzae* typ a, b, c, d, e, f a zvláště se řadí neopouzdržené kmeny tzv. netypovatelné = *H. influenzae* NT. Kmeny *H. influenzae* typu b, jsou převážně spojeny s těžkými systémovými infekcemi, jako je pneumonie, septicémie, meningitida, empyém a septická artritida. Tzv. netypovatelné kmeny *H. influenzae* obvykle způsobují sinusitidu, otitis media, akutní infekce dolních cest dýchacích a konjunktivitidu. Prevalence antibiotické rezistence stoupá a optimální léčba závažných infekcí je komplikovaná. Světová zdravotnická organizace (WHO) odhaduje, že ročně zemře ve vyspělých zemích na meningitidu nebo pneumonii 386 000 dětí [21,22].

Lékem volby hemofilových respiračních infekcí jsou aminopeniciliny. Rezistence k aminopenicilinům je u hemofilů tradičně spojená s produkcí beta-laktamázy, která je inhibována kyselinou klavulanovou nebo sulbaktamem. Výskyt rezistence k aminopenicilinům je v některých státech poměrně častý. V posledních letech stoupá výskyt kmenů, jejichž rezistence k beta-laktamům je způsobena genetickou mutací proteinu PBP3. Důsledkem je snížená vazba aminopenicilinů a ztráta jejich účinnosti. Kmeny s tímto typem rezistence označujeme jako beta-laktamáza negativní ampicilin rezistentní (BLNAR). Na rozdíl od kmenů hemofilů produkujících beta-laktamázu, snížená citlivost k aminopenicilinům není ovlivnitelná inhibitory beta-laktamáz. Rezistence k cefalosporinům 3. generace, které se používají pro terapii závažných invazivních infekcí, je celosvětově velice vzácná. Dále je u tohoto kmene uváděna rezistence na chloramfenikol, erytromycin a tetracyklin [23,24].



Obrázek 5: Kolonie *Haemophilus influenzae* na čokoládovém agaru (24 hodin při 37 °C v 5 % CO₂)^[59]

Pseudomonas aeruginosa

Pseudomonády jsou gramnegativní, pohyblivé, striktně aerobní, nesporulující tyčinky. Řadí se do čeledi *Pseudomonadaceae*. *Pseudomonas (P.) aeruginosa*, je kultivovatelná na běžných půdách, kde vytváří kovově lesklý vzhled. Vytváří řadu pigmentů, např. modrozelený pigment, který je kombinací dvou metabolitů, modrého pyocyaninu a zeleného pyoverdinu (Obrázek 6). *P. aeruginosa* je klasickým příkladem oportunního patogenu. Zřídka způsobuje problémy zdravým osobám, může však vyvolat řadu závažných onemocnění u kojenců, nemocných nebo imunokompromitovaných osob^[25]. Je častou příčinou bakteriemií u postižených s popáleninami, u infekcí močových cest katetrovaných pacientů a také u nozokomiálních pneumonií pacientů na respirátorech. Také je převládající příčinou morbidity a mortality u pacientů s cystickou fibrózou, jejichž abnormální epitel v dýchacích cestách umožňuje dlouhodobou kolonizaci plic. Tyto infekce nelze eradikovat, z důvodu přirozené rezistence bakterie na antibiotika^[26]. Současná antibiotická léčba infekcí zahrnuje fluorochinolony, anti-pseudomonádové beta-laktamy a aminoglykosidy. U druhů *Pseudomonas aeruginosa*, které jsou rezistentní vůči těmto antibiotikům s k léčbě infekcí používá kolistin^[31].



Obrázek 6: Kolonie *Pseudomonas aeruginosa*, CHROMaga™ *Pseudomonas* (24 hodin, 37 °C) [60]

Streptococcus pneumoniae

Streptococcus (Str.) pneumoniae, se taxonomicky řadí k rodu *Streptococcus*. Streptokoky jsou grampozitivní koky, nepohyblivé, nesporulující. Jsou nepohyblivé a nesporulující. V mikroskopickém preparátu jsou uspořádány do dvojic nebo řetízků. Po 18 – 24 hodinové inkubaci při teplotě 35 – 37 °C vyrůstají na krevním agaru v šedo-bílých, hladkých, lesklých a průsvitných koloniích (Obrázek 7). *Str. pneumoniae* je α -hemolytický streptokok nazýván též jako pneumokok. Pneumokoky osidlují respirační trakt a mohou být izolovány z nasofaryngu zdravých osob [29,30,31].

Infekce způsobené *Str. pneumoniae* byly po mnoho let léčeny penicilinem nebo ampicilinem. Avšak expozice antimikrobiálními látkami vedla ke tvorbě rezistentních kmenů a jejich klonů. Vznik rezistence vůči penicilinu a dalším beta-laktamovým antibiotikům v 80. a 90. letech 20. století vedl ke zvýšenému užívání makrolidů, fluorochinolonů a dalších non-beta-laktamových antibiotik. Současná léčba pneumokoků rezistentních na penicilin zahrnuje vysoké dávky beta-laktamových antibiotik, podávaných parenterálně. Perorální podání antibiotik může selhat. Pneumokoky rezistentní na makrolidy nelze léčit ani parenterálním, ani orálním užíváním makrolidových antibiotik. Rezistence na fluorochinolony je vzácná. U pacientů, kteří fluorochinolonová antibiotika užívali již dříve, může léčba selhat. Zvýšení míry antimikrobiální rezistence bylo částečně způsobeno selekčním tlakem spojeným s přehnaným používáním antibiotik a klonální expanzí a šířením multirezistentních pneumokokových kmenů. Nedávné zavedení očkování konjugovanými vakcínami u kojenců snižuje riziko rezistence [32].



Obrázek 7: Kolonie *Streptococcus pneumoniae*, Columbia krevní agar s 5 % defibrinované ovčí krve (48 hodin při 37 °C v 5 % CO₂) [převzato a upraveno 61]

Escherichia coli

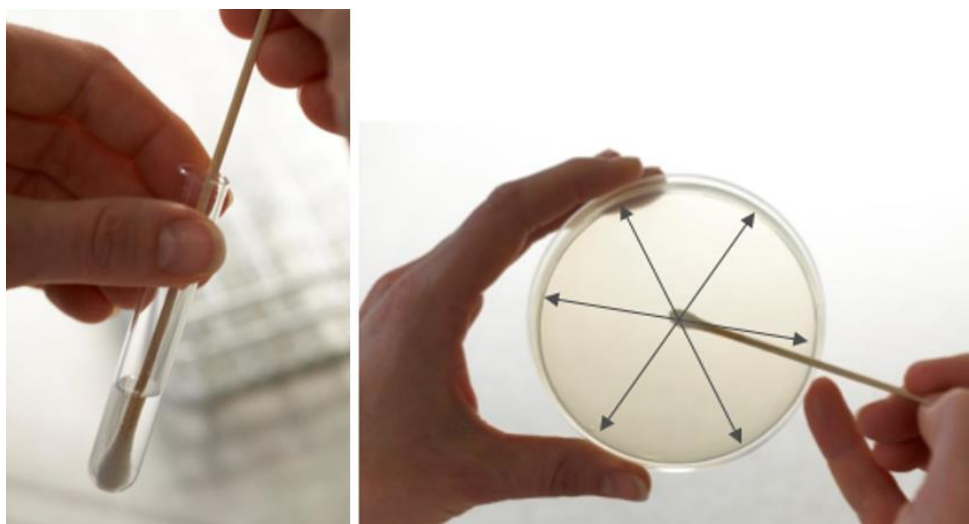
Escherichia (E.) coli, byla poprvé izolována a popsána bakteriologem Theodorem Escherichem na konci 19. století^[33]. Řadí se do čeledi *Enterobacteriaceae*. Je to gramnegativní, krátká tyčinka. Obvykle je pohyblivá, má peritrichálně uložené bičíky, fimbrie a patří mezi fakultativně anaerobní bakterie. Na živných půdách roste dobře do 18 hodin v hladkých bezbarvých koloniích *E. coli* je běžnou součástí střevní mikroflóry zdravých lidí. Je přirozeně citlivá k řadě antibiotik s výjimkou benzylpenicilinu. Mezi účinná antibiotika řadíme ampicilin, cefalosporiny, tetracyklin, trimethoprim, sulfonamidy a další. Může však získat plazmid s geny rezistence buď k jednomu, nebo k více antibiotikům. Obzvláště často se vyskytují kmeny rezistentní k ampicilinu, tetracyklinům, sulfonamidům a trimethoprimu.^[34,6]

1.2.3 Inokulace

Čerstvě připravené plotny se před očkovaním krátce suší při 36 °C. Plotny, které byly skladovány při 4 °C se ponechají při pokojové teplotě až do vyrovnání teploty. Obsahují-li kapky kondenzované vody, suší se při 36 °C. Inokulum se nejdéle do 15 minut po přípravě očkuje roztěrem, pomocí rotačního stolku nebo přelivem^[7].

INOKULACE ROZTĚREM

Sterilní bavlněný tampón se ponoří do suspenze (Obrázek 8). Přebytečné množství suspenze je odstraněno přitlačením a otáčením tampónu po vnitřní stěně zkumavky. U gram pozitivních bakterií se tampón nepřitlačuje a neotáčí proti stěně zkumavky. Inokulum se nanáší rovnoměrně po celém povrchu plotny ve třech směrech (Obrázek 8). Inokulum musí být rozetřeno po celém povrchu agarů. Při roztěru se tampón nesmí dotknout okrajů Petriho misky, aby se snížila možnost vzniku aerosolu [7, 14, 15]. Byla popsána modifikace Stokesovy metody, ve které je pro inokulaci použit rotační stolek (Obrázek 9). Testované mikroorganismy jsou na plotnu inokulovány tamponem, kterým je pohybováno směrem od okraje Petriho misky ke středu, zatímco se plotna otáčí na otočné destičce. Jako vodítko tamponu je použita tyč, která je dlouhá přes 2/3 Petriho misky. Sterilní tampón se musí pohybovat rovnoměrně, aby bylo zajištěno, že je inokulum konfluentní a nevznikají žádné mezery [35,36].



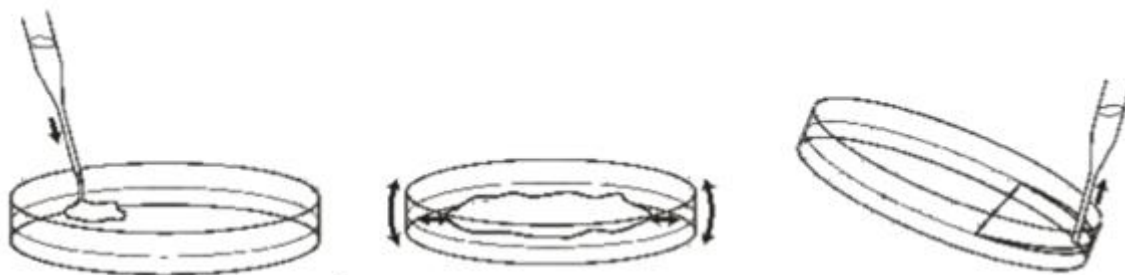
Obrázek 8: Inokulace roztěrem [37]



Obrázek 9: Rotační stolek pro inokulaci roztěrem [62]

INOKULACE PŘELIVEM

Na agarovou plotnu se přenese Pasteurovou pipetou nebo sterilním kapátkem asi 2 ml inokula. Přelití celého povrchu agaru je docíleno nakláněním na všechny strany. Přebytečné inokulum je odsáto stejnou pipetou, nebo kapátkem (Obrázek 10). Inokulací přelivem se získají ostřejší okraje inhibičních zón ^[7].



Obrázek 10: Inokulace přelivem ^[55]

1.2.4 Aplikace disků s antibiotiky

Antibiotické disky je důležité nejprve temperovat na laboratorní teplotu, abychom předešli kondenzaci. Aplikace disků je provedena do 15 minut od inokulace ploten. Disky jsou aplikovány tak, aby držely pevně na povrchu inokulované agarové plotny. K aplikaci antibiotických disků lze využít jehlu nebo raznici (Obrázek 11, Obrázek 12) ^[37].

Při diskové difúzní metodě používáme antibiotické disky s konkrétním, jedním obsahem daného antibiotika. Optimální obsah disku se stanovuje klinickými a laboratorními zkouškami. Přípustné rozmezí obsahu antibiotika v disku podle WHO je 67 – 150 %. To znamená, že disk obsahující 30 µg dané látky, může skutečně obsahovat tuto látku v rozmezí 20 – 45 µg. Sestavy disků na jednotlivé mikroorganismy doporučuje a pravidelně aktualizuje pracovní skupina pro monitorování rezistence při Národní referenční laboratoři pro antibiotika, která je součástí SZÚ. Doporučené sestavy obsahují právě taková antibiotika, která aktuálně vyhovují většině požadavků na vyšetření citlivosti diskovou difúzní metodou v rutinní praxi v mikrobiologických laboratořích. Sestavy se aktualizují a doplňují o nově zavedená antibiotika. Sestavy jsou vytvářeny podle vyšetřované bakterie a podle druhu klinického vzorku. Protože hlavním cílem je získat podrobné informace o mikrobech, jsou do sestav zařazována také antibiotika, která nejsou vhodná pro klinické použití, nicméně jsou důležitá pro identifikaci mikroorganismu. Doporučené sestavy si v souladu s místní antibiotickou politikou mohou mikrobiologické laboratoře upravit ^[7].

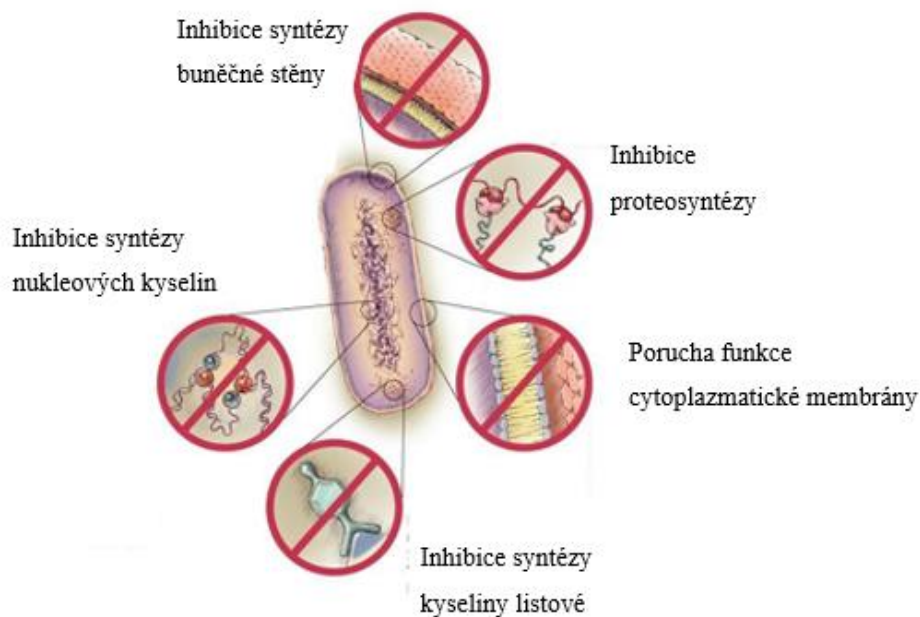


Obrázek 11: Raznice pro aplikaci antibiotických disků ^[37]

ANTIBIOTIKA

Antibiotika jsou chemické látky, jež produkují určité druhy mikroorganismů jako sekundární produkty metabolismu. Jsou produkovány bakteriemi (okolo 950 typů antibiotik), aktinomycetami (okolo 4 600 druhů antibiotik) a houbami (okolo 1 600 typů antibiotik). Tyto látky inhibují růst nebo usmrcují jiné mikroorganismy, dokonce i při nízkých koncentracích (Obrázek 12). Některá méně efektivní antibiotika jsou účinnější až po chemické modifikaci, vznikají tzv. polysyntetická antibiotika. Grampozitivní bakterie jsou vůči nim vzhledem ke stavbě buněčné stěny citlivější než bakterie gramnegativní ^[38]. Mezi antibakteriální látky můžeme zařadit také chemoterapeutika. Rozdíl mezi chemoterapeutiky a antibiotiky je v jejich výrobě. Antibiotika se získávají biosyntetickou nebo polysyntetickou cestou. Chemoterapeutika jsou vyráběna pouze synteticky. Mezi nejčastěji používaná chemoterapeutika patří sulfonamidy a chinolony ^[43].

V závislosti na způsobu působení mohou být antibiotika rozdělena na baktericidní a bakteriostatická (Obrázek 13). Baktericidní antibiotika jsou obvykle zacílena na buněčné struktury. Inhibují syntézu buněčné stěny (beta-laktamová antibiotika) a syntézu DNA (fluorochinolony). Bakteriostatická antibiotika běžně zasahují do syntézy proteinů nebo inhibují proliferaci bakteriálních buněk. Mezi bakteriostatická antibiotika patří makrolidy, telithromycin, sulfonamidy a tetracykliny ^[39].



Obrázek 12: Mechanismus účinku antibiotik ^[63]

Beta-laktamová antibiotika

Všechna antibiotika v této skupině obsahují tzv. beta-laktamový kruh. Jedná se o cyklický amid, skládající se ze tří atomů uhlíku a jednoho atomu dusíku. Jednotlivé typy beta-laktamů se liší složením dalšího kruhu napojeného na beta-laktamový cyklus. Peniciliny mají strukturu pětičlenného kruhu zahrnujícího atom síry, cefalosporiny obsahují šestičlennou strukturu taktéž s atomem síry ^[40].

Beta-laktamová antibiotika primárně inhibují syntézu buněčné stěny blokací funkce transpeptidáz. Transpeptidázy se nacházejí v periplasmatickém prostoru, který je u grampozitivních bakterií přímo přístupný. U gramnegativních bakterií musí beta-laktamová antibiotika nejdříve projít vnější membránou. Poruchy indukované beta-laktamy při tvorbě buněčné stěny vysvětlují inhibici růstu bakterií. Baktericidní účinek ovšem vyplývá spíše z nepřímých mechanismů, většinou se jedná o aktivaci autolytických enzymů ^[41].

Mezi peniciliny řadíme Penicilin G, který je účinný na pyogenní koky a většinu anaerobních bakterií. Velkou nevýhodou je citlivost k beta-laktamázám. Peniciliny rezistentní k beta-laktamázám, konkrétně methicilin a oxacilin jsou účinné k léčbě stafylokokových infekcí. Původní penicilinová molekula byla postupně modifikována, kvůli vylepšení farmakologických vlastností a rozšíření spektra účinku. Peniciliny s širším spektrem účinku zahrnují aminopeniciliny, ureidopeniciliny a karboxypeniciliny. Jako peniciliny druhé generace

se označují semisyntetické aminopeniciliny (ampicilin, amoxicilin). Účinkují na enterokoky, hemofily, listerie a některé fermentující gramnegativní tyčinky. Nicméně nemají žádný účinek na *Pseudomonas aeruginosa*. Proto byla vyvinuta skupina karboxypenicilinů, které se označují také jako protipseudomonádové peniciliny, nebo peniciliny 3. generace. Dnes je z této skupiny převážně používán tikarcilin. Čtvrtá generace penicilinů zahrnuje ureidopeniciliny (azlocilin, mezlocilin a piperacilin). Pro skupinu cefalosporinů je charakteristické široké spektrum účinku pro grampozitivní i gramnegativní mikroorganismy. Jednotlivá cefalosporinová antibiotika však mají specifické spektrum účinnosti různé šíře. Cefalosporiny první generace zahrnují cefalotin, cefazolin a cefalexin. Mezi cefalosporiny druhé generace řadíme cefaklor, cefuroxim a cefoxitin. Mají širší spektrum účinnosti než první generace. Dobře účinkují na hemofily, *Moraxella catarrhalis*, neiserie, klebsiely a *Escherichia coli*. Třetí generace cefalosporinů vykazuje relativní odolnost k beta-laktamázám a má tedy rozšířené spektrum účinnosti na gramnegativní bakterie. Na enterokoky a stafylokoky nepůsobí. K této generaci patří cefotaxim, ceftriaxon a moxalaktam. Žádné z těchto antibiotik není vhodné k léčbě pseudomonádových infekcí. [42].

Tetracykliny

Jsou prototypem antibiotik se širokým spektrem účinku. Působí bakteriostaticky na většinu grampozitivních a gramnegativních bakterií, včetně anaerobů, dále na rickettsie, chlamydie, mykoplazmata a améby. Do skupiny patří tetracyklin, oxytetracyklin, rolitetracyklin, doxycyklin a minocyklin [46]. Principem účinku je inhibice proteosyntézy – tetracykliny brání vazbě komplexu aminoacyl-tRNA na příslušné místo ribosomu. Takto by mohly působit i v eukaryotních buňkách. Selektivní toxicita je dána snazším přijetím látky bakteriálními buňkami než buňkami lidskými. Řada běžných bakterií je na tetracykliny rezistentní. Podkladem rezistence je změněná propustnost zevní membrány, ochrana ribosomů zvláštními proteiny a aktivní eflux antibiotika z buňky [27].

Makrolidy

Makrolidová antibiotika mají středně široké antibakteriální spektrum účinku a působí primárně bakteriostaticky. Vážou se na ribosomální RNA a inhibují proteosyntézu, neboť po vzniku peptidické vazby brání uvolnění tRNA. Makrolidy jsou málo toxické, jsou rychle vstřebávány ze zažívacího traktu. Antimikrobiálně působí především na grampozitivní mikroorganismy i na bakterie bez buněčné stěny (chlamydie). K rezistenci dochází nejčastěji změnou vazebného místa, enzymatickou modifikací antibiotika nebo změnou permeability

buněčné stěny (efluxem). Makrolidy jsou indikovány hlavně u onemocnění dýchacích cest, především u pacientů s alergií na penicilin a u infekcí vyvolaných chlamydiemi. Nejčastěji u nás podávaným makrolidovým antibiotikem je erythromycin. Společně např. se spiramycinem a josamycinem patří k makrolidům 1. generace. Mezi makrolidová antibiotika 2. generace patří azithromycin, roxythromycin, klarithromycin a dirithromycin. Všechny tyto látky lépe pronikají do buněk a mají v porovnání s klasickými látkami, tedy makrolidy 1. generace, vyšší terapeutickou účinnost proti intracelulárním mikroorganismům, ale jsou i lépe snášena (menší gastrointestinální problémy). Řadí se mezi bezpečná antibiotika a mezi nežádoucí účinky zařazujeme zejména trávicí potíže [27,47,28].

Linkosamidy

Linkosamidy jsou svými mechanismy účinku a antimikrobiálním spektrem velice podobné makrolidům. Linkosamidy jsou třídou antibiotik, jejichž název je odvozený od linkomycinu, který byl prvně izolován z bakterie *Streptomyces lincolnensis*. Mechanismem účinku je inhibice bakteriální proteosyntézy vazbou na 23S část 50S ribosomální podjednotky. Inhibuje peptidyltransferasu a brání tak vzniku peptidické vazby, a tím prodlužování molekuly proteinu. Působí bakteriostaticky na grampozitivní mikroorganismy, včetně penicilin-rezistentních kmenů. Vyznačují se velmi výrazným účinkem na anaerobní mikroorganismy. Mezi nejznámější antibiotika, patřící do skupiny linkosamidů, řadíme linkomycin a klindamycin (větší antimikrobiální účinnost). Linkomycin a klindamycin jsou terapeuticky využívány hlavně v případech, kdy se očekává směsná mikroflóra aerobních a anaerobních bakterií. Vzhledem ke své účinnosti a dobrému průniku do kostní tkáň jsou předepisovány u stafylokokových osteomyelitid. Mechanismem rezistence na linkosamidy je methylace specifického místa na molekule rRNA [27,44].

Sulfonamidy

Sulfonamidy jsou širokospektrá, bakteriostaticky působící chemoterapeutika, využívající se v terapii infekcí dýchacích a močových cest. Nepřímo působí na syntézu DNA tím, že zasahují do metabolismus kyseliny listové. Mechanismem účinku sulfonamidů je kompetitivní vytěsnění kyseliny paraaminobenzoové, kterou citlivé mikroorganismy potřebují pro syntézu kyseliny listové, jakožto růstového faktoru. Trimethoprim, patřící ke skupině diaminopyrimidinu, působí se sulfonamidy synergicky tím, že přeměňuje kyselinu dihydrofolovou na kyselinu tetrahydrofolovou. Kyselina dihydrofolová je nutná k syntéze nukleových kyselin [47,6]. Účinkují na některé gramnegativní tyčky (*Escherichia coli*, *Klebsiella*

pneumoniae), dále na *Streptococcus pyogenes*, *Nocardia asteroides*, *Chlamydia pneumoniae*. Kombinací trimethoprimu a sulfamethoxazolu se dosahuje vyššího účinku. Citlivé jsou i enteobakterie, *Haemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis*, *Yersinia enterocolitica*, *Listeria monocytogenes* a další [42].

Chinolony

Chinolony jsou analogy kyseliny nalidixové a mají baktericidní účinky. Mechanismus jejich účinku spočívá v inhibici bakteriální DNA-gyrázy, enzymu, který je nutný k prostorovému uspořádání DNA. Účinkují na α – podjednotku DNA-gyrázy. Kyselina nalidixová a genericky příbuzné látky mají úzké spektrum účinku a působí jen na gramnegativní bakterie. Podle šířky antibakteriálního spektra a průniku do tkání je lze rozdělit na látky 1 – 4. generace [6].

Dříve měly omezené spektrum antibakteriální aktivity, zejména proti gramnegativním bakteriím. Novější látky mají zvýšenou aktivitu vůči grampozitivním bakteriím a anaerobům. Vznik rezistence na fluorochinolonová antibiotika je způsoben hlavně mutacemi v oblasti QRDR, kde vzniká fenotypová rezistence v důsledku postupných mutací [47].

1.2.5 Inkubace

Inkubace by měla být zahájena do 15 minut od aplikace disků [37]. Počet ploten ve sloupci by měl být co nejnižší k potlačení rozdílné teploty uvnitř sloupce. Agarové plotny jsou inkubovány podle odpovídajících podmínek testovaného mikroorganismu. MH se inkubuje při normální atmosféře a MHF se inkubuje v atmosféře obohacené o 4 – 6 % CO₂ [45].

1.2.6 Měření zón a interpretace citlivosti

Okraje zón se odečítají ve vzdálenosti 30 cm od oka. Změří se průměr inhibiční zóny od okraje se zřetelnou inhibicí růstu. Neobohacené agarové plotny se odečítají proti tmavému pozadí ze spodní strany v procházejícím světle. Obohacené plotny se odečítají ze svrchní strany s odstraněným víčkem v odraženém světle. Průměry zón se měří pravítkem nebo posuvným měřítkem na nejbližší milimetr (Obrázek 14). K měření zón může být použit automatický odečítač, který je kalibrován podle manuálního odečítání (Obrázek 15). Pokud jsou plotny odečítány s pomocí šablon, je zapotřebí umístit šablonu na plotnu a zóny interpretovat podle breakpointů EUCAST či CLSI vyznačených na šabloně. Vyskytnou-li se dvojité zóny nebo odlišné kolonie uvnitř zóny, kontroluje se čistota kultury a test se případně opakuje. Pokud je

kultura čistá, pak se při měření berou do úvahy kolonie uvnitř inhibičních zón. Přítomnost drobných kolonií uvnitř inhibiční zóny se hodnotí jako rezistence. Zvláštní pozornost je třeba věnovat inhibičním zónám kolem oxacilinu a vankomycinu u stafylokoků, kolem vankomycinu a vysokých koncentrací aminoglykosidů u enterokoků [7,37].



Obrázek 13: Měření inhibiční zóny posuvným měřítkem [37]

Disková difúzní metoda může být i poloautomatizovaná s použitím obrazových analyzátorů ke čtení zón, se ziskem objektivnějších a reprodukovatelnějších výsledků. Automatické systémy, které se běžně používají obvykle spojují identifikaci s testováním. Často probíhá v kratší době než při manuálním čtení. Zkrácení doby čtení zajišťuje citlivý optický detekční systém umožňující detekci jemných změn bakteriálního růstu [49].



Obrázek 14: BACMED G2 [64]

1.3 OVLIVNĚNÍ VÝSLEDKŮ DISKOVÉ DIFÚZNÍ METODY

Existuje několik faktorů, které mohou ovlivnit přesnost výsledků. Nejdůležitější jsou obsah antibiotika v disku, velikost disku, difúze antimikrobiální látky, výška agaru, rychlost růstu bakterie, hustota inokula a aktivita léčiva proti testovanému kmeni [51]. K dalším faktorům ovlivňujícím přesnost metody řadíme pH, vlhkost a složení média [49].

1.3.1 Velikost disku

Rozsah difúze léčiva je zřejmě ovlivněn šířkou disku. Papírové disky jsou nyní téměř univerzálně vyráběny s průměrem 6 mm. Dalším faktorem je povaha použitého papíru, protože různé druhy papíru mají vliv na uvolňování antibiotika ^[51].

1.3.2 Difúze antimikrobiální látky

Velikost a náboj léčiva jsou dvě rozhodující vlastnosti. Obecně platí, že větší molekuly difundují pomaleji a inhibiční zóny jsou následkem toho menší. Antimikrobiální látky s velkými molekulami jsou glykopeptidová antibiotika (vankomycin, teikoplanin, polymyxin B, kolistin). Zároveň silně kationtové molekuly budou inhibovány v jejich difúzi kvůli interakcím s kyselými nebo sulfátovými skupinami na agarovém polymeru. Polymyxiny jsou silně kationtové a jejich difúze je proto snížena. Aminoglykosidy jsou méně kationtové, a proto je schopnost difúze snížena jen mírně ^[50,51].

Velikost zón může dále ovlivnit také obsah kationtů v médiu. Příliš velké množství kationtů má za následek zmenšení zón, a naopak nízký obsah kationtů v médiu vede k nepřiměřeně velkým inhibičním zónám ^[49].

1.3.3 Hloubka (výška) agaru

Výška agaru v Petriho misce také ovlivňuje zónu inhibice, v důsledku větší účinné koncentrace antibiotika a nerovnoměrné difúze v agaru. Pokud je agar příliš tenký bude zřejmě větší inhibiční zóna než v případě vyššího agaru. Pro většinu metod je optimální výška agaru 4 mm. Agar o výšce 3 mm a méně je považován za tenký ^[50,51].

1.3.4 Doba mezi inokulací ploten a položením disků

Časová prodleva mezi inokulací suspenze na povrch agaru a aplikací antibiotických disků má významný vliv na konečný průměr zóny. Mnoho bakterií roste i při laboratorní teplotě, což je teplota, při které jsou plotny inokulovány. Obecně se doporučuje při diskové difúzní metodě, aby se disky aplikovaly během 15 minut od inokulace ploten. Výjimkou je švédská metoda, která vyžaduje umístění disků během 45 minut. Také vyžaduje dobu 30 – 60 minut předběžné difúze, během které jsou plotny s aplikovanými disky ponechány na laboratorním stole, aby se umožnila dostatečná difúze léčiva před umístěním půdy do inkubátoru ^[51].

1.3.5 Inkubace

U rychle rostoucích bakterií se inhibiční zóna vytváří během několika hodin po zahájení inkubace. Teoreticky je tedy možné odečítat průměry zón v momentu, kdy je viditelný růst. Při

další inkubaci, která je doporučena pro všechny mikroorganismy, může dojít k jemným změnám v průměru inhibiční zóny. Tyto změny jsou výsledkem opožděného růstu, lepšího zobrazení částečné inhibice nebo zpožděného růstu rezistentních kmenů. Protože velikosti breakpointů jsou určeny k hodnocení citlivosti až po konkrétní inkubační době, není obvykle možné tyto hodnoty použít dříve. Je-li však inhibiční zóna jednoznačně rezistentní, další inkubace pravděpodobně zónu pouze zmenší, a proto by bylo možné odečíst kmen jako rezistentní, ve chvíli, kdy se růst stane viditelným. Delší inkubace agarové plotny nemá významný vliv na interpretaci výsledků ^[51]. Pokud jsou plotny ponechány po aplikaci disků delší dobu při laboratorní teplotě, může dojít k tzv. pre-difuzi a inhibiční zóny mohou být chybně větší. Je důležité, aby v inkubátoru nebylo skládáno velké množství ploten na sebe. Tato skutečnost by mohla ovlivnit výsledky v důsledku nerovnoměrného zahřívání. Inkubační doba by neměla přesáhnout doporučené časové limity. Delší inkubace by mohla mít za následek růst v inhibičních zónách a mikroorganismus by se jevil jako falešně rezistentní ^[37].

1.3.6 pH

Hodnota pH média je důležitým faktorem, který ovlivňuje přesnost testování antimikrobiální citlivosti. Pokud je pH média příliš nízké, některá léčiva, jako jsou aminoglykosidy, chinolony a makrolidy, ztrácejí svou účinnost. Naproti tomu tetracykliny, mají větší aktivitu při nižším pH a v případě vyššího pH ztrácejí svou účinnost ^[49].

1.3.7 Vlhkost

Přítomnost přebytečné vlhkosti na médiu může způsobovat rozmývání zón, což může vést k nepřesnostem při testování citlivosti. Kultivační média je proto nutné před použitím vysušit v inkubátoru nebo v laminárním boxu. Naopak příliš suché médium má vliv na schopnost difúze antibiotika přes agar ^[49,50].

1.3.8 Složení média

Pokud média vybraná pro testování citlivosti obsahují nadbytečné množství thyminu nebo thymidinu, budou reverzibilně inhibovat působení antimikrobiálních látek, jako jsou například trimethoprimová antibiotika. Reverzibilní inhibice způsobuje ovlivnění velikosti zón, které mohou být menší nebo méně zřetelné nebo dokonce zóny vůbec nevznikají a je chybně interpretována rezistence. Mueller-Hinton agar má nízký obsah thyminu i thymidinu, a proto je používán k testování citlivosti ^[49].

1.4 NORMY

Existují dva různé schválené referenční postupy pro testování citlivosti na antimikrobiální látky - CLSI a EUCAST. Disková difúze je jednou z nejstarších metod k testování antimikrobiální citlivosti a zůstává jednou z nejrozšířenějších metod používaných v klinických laboratořích. Mezi hlavní společnosti zabývající se testováním antimikrobiální citlivosti patří BSAC (Velká Británie), CA-SFM (Francie), DIN (Německo) a SRGA (Švédsko). Tyto společnosti si vyvinuly vlastní postup pro testování antimikrobiální citlivosti diskovou difúzní metodu pro testování antimikrobiální citlivosti, protože nebyly určeny žádné evropské standardní postupy pro testování. Evropský výbor pro testování citlivosti na antimikrobiální látky (EUCAST), zahájil vývoj standardizované metody. Stejně jako u většiny jiných metod, je disková difúze podle EUCAST metody založena na definovaných zásadách mezinárodní spolupráce.

Technické parametry diskové difúzní metody EUCAST a CLSI jsou téměř identické. Existuje malý rozdíl ve standardní době inkubace, 16 – 18 hodin podle CLSI a 16-20 hodin podle EUCAST metody. Pro několik bakterií doporučuje EUCAST nižší obsahy antibiotik v discích, v porovnání s CLSI společností. Pro testování kontrolních kmenů přijala společnost EUCAST kritéria společnosti CLSI. Pro případy, kdy EUCAST doporučuje pro kontrolní testování jiné kmeny, jiná média nebo odlišný obsah disků než doporučuje CLSI metoda, byla společností vytvořena vlastní specifická kritéria. Cílové hodnoty pro odečítání výsledků jsou stanoveny podle CLSI společností a byly znovu pečlivě kontrolovány při vývoji EUCAST metody [48].

1.4.1 EUCAST

European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing neboli Evropská komise pro testování antimikrobiální citlivosti. Je pod záštitou Evropské společnosti pro klinickou mikrobiologii a infekční nemoci (ESCMID) a Evropského střediska pro prevenci a kontrolu nemocí (ECDC). Organizace vznikla v roce 1997 [37].

Cíle organizace

Cílem společnosti je stanovit, přezkoumat a revidovat evropské mezní hodnoty antibiotik (breakpoint) a epidemiologické hraniční hodnoty pro sledování antimikrobiální rezistence. Podporovat vývoj a standardizaci metod *in vitro* testování na antimikrobiální citlivosti, používaných v Evropě. Podporovat zajištění kvality testování antimikrobiální citlivosti *in vitro*. Podporovat vzdělávání a školení v oblasti testování antimikrobiální citlivosti.

Radit ECDC a dalším zdravotnickým agenturám Evropské unie v otázkách týkajících se testování antimikrobiální citlivosti a detekce determinantů rezistence relevantních pro veřejné zdraví. Spolupracovat s mezinárodními skupinami, ECDC a dalšími zdravotnickými agenturami Evropské unie zapojenými do testování antimikrobiální citlivosti a také epidemiologie antimikrobiální rezistence u lidských patogenů. Usilovat o mezinárodní konsensus a harmonizaci klinických breakpointů a testování antimikrobiální citlivosti [37].

1.4.2 CLSI

The Clinical and Laboratory Standards neboli Klinický a laboratorní standardizační institut. CLSI je nezisková členská organizace, která sdružuje různorodou perspektivu a odborné znalosti celosvětové laboratorní komunity. Vyvíjí a provádí klinické laboratorní normy a pokyny, které pomáhají laboratořím plnit jejich odpovědnosti za efektivitu a použitelnost [52].

Historie vzniku

V polovině 60. let vedla skupina zainteresovaných jedinců diskuse, které vedly ke koncepci nezávislé organizace, která by byla schopná připravit standardy přijatelné pro jejich použití. Tato organizace se posléze stala známou jako Národní Výbor pro Klinické Laboratorní Standardy (NCCLS – National Committee for Clinical Laboratory Standards). Později v lednu 2005 došlo k přejmenování organizace. Nyní je známá jako Klinický a Laboratorní Standardizační institut (CLSI – Clinical and Laboratory Standards institute), tento název je považován za přesnější. Klinické laboratorní normy měly připravovat výbory složené z odborníků akademické sféry a průmyslu. Jakmile byla norma napsána a schválena radou CLSI, měla být publikována jako navrhovaná norma a všichni zainteresovaní jednotlivci byli požádáni, aby odpověděli na všechny připomínky a provedli příslušné změny nebo písemně vysvětlili, proč některé návrhy nebyly přijaty. Po úvodním procesu přezkoumání byly všechny dokumenty schváleny. Dokumenty jsou každé tři roky pečlivě přezkoumávány a podle výsledku je ukončeny nebo revidovány [53].

Cíle organizace

Vypracování standardních referenčních metod pro testy antimikrobiální citlivosti. Poskytování parametrů kontroly kvality pro standardní zkušební metody. Stanovení interpretačních kritérií pro výsledky standardních antimikrobiálních testů citlivosti.

Poskytování návrhů pro strategie testování a hlášení, které jsou klinicky relevantní a nákladově efektivní. Neustálé vylepšování standardů a pokynů, čímž se optimalizuje detekce ^[52].

2 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

2.1 Kontrolní kmeny

Inovace diskové difúzní metody byla prováděna na následujících kontrolních kmenech - *Escherichia coli* (CCM 3954/ATCC 25922), *Haemophilus influenzae* (CCM 4457/ATCC 49766), *Pseudomonas aeruginosa* (CCM 3955/ATCC 27853), *Staphylococcus aureus* (CCM 4223/ATCC 29213), a *Streptococcus pneumoniae* (CCM 4501/ATCC 49619). Kontrolní kmeny ve formě želatinových disků byly získány z České sbírky mikroorganismů (CCM) Brno.

2.2 Antibiotické disky

- Amoxicilin/klavulanová kyselina (OXOID, č.š. 1853839)
- Ampicilin (OXOID, č.š. 1894715)
- Aztreonam (OXOID, č.š. 1894707)
- Cefadroxil (OXOID, č.š. 1879489)
- Cefepim (OXOID, č.š. 1890784)
- Cefotaxim (OXOID, č.š. 1890057)
- Cefoxitin (OXOID, č.š. 1894831)
- Cefuroxim (OXOID, č.š. 1883386)
- Ciprofloxacin (OXOID, č.š. 2111129)
- Klindamycin (OXOID, č.š. 1894873)
- Doxycyklin (OXOID, č.š. 1872713)
- Erythromycin (OXOID, č.š. 1861812)
- Oxacilin (OXOID, č.š. 1894822)
- Penicilin G (OXOID, č.š. 1876242)
- Sulphamethoxazol/trimethoprim (OXOID, č.š. 2000920)
- Tetracyklin (OXOID, č.š. 1876565)
- Tikarcilin/klavulanová kyselina (OXOID, č.š. 1693579)

2.3 Přístroje a pomůcky

• Přístroje

Laminární box MSC 12 (JOUAN SA, Francie), třepačka Vortex V-1 plus (BIOSAN, EU), CO₂ inkubátor Biocenter (SalvisLab, Švýcarsko), inkubátor Memmert INE 500

(Memmert, Německo), digitální váhy 440-43 (KERN, Německo) AEG SANTO chladnička a mraznička (Electrolux, Švédsko), denzitometr DEN – 1B (bioSan, Lotyšsko), BACMED G2 (Aspiag s.r.o, Litomyšl). Sterilizace skla (Sterimat HS202A, BMT Medical Technology s.r.o., ČR), plastů (parní sterilizátor PS20A, Chirana, ČR) prováděny v rámci Univerzity Pardubice.

- **Pomůcky**

Jednokanálové pipety (0,5 – 10 µl, 100 – 1000 µl, 500 – 5000 µl; Sartorius – family Biohit, Německo), špičky 10 µl, 100 µl, 5000 µl (Sartorius – family Biohit, Německo), jednorázové sterilní očkovací kličky 10 µl (Kartell s.p.a., Itálie), plastová jednorázová kapátka, sterilní jednorázové tampóny CLASSIQSwabs (COPAN, Itálie) , plastové zkumavky 15 cm PS – sterilní (GAMA group a.s., České Budějovice), Mueller – Hinton agar a Mueller – Hinton agar s koňskou krví a NAD (LabMediaServis s.r.o., Jaroměř), Mueller – Hinton E agar a Mueller – Hinton agar + 5% horse blood + 20 mg/l β-NAD (bioMérieux SA, Francie), antibiotické disky (Oxoid cz s.r.o., Brno).

Skleněné láhve se šroubovacím uzávěrem 250 ml, 500 ml (Fisher Scientific, spol. s.r.o., ČR), odměrné válce 25 ml (SIMAX – Kavalierglass, a.s., ČR), skleněné Petriho misky 9 cm, skleněné kádinky (SIMAX – Kavalierglass, a.s., Československá republika), skleněné zkumavky, stojany na zkumavky, gumové zátky.

2.4 KULTIVAČNÍ MÉDIA A ROZTOKY

2.4.1 Fyziologický roztok

4,25g NaCl (PENTA s.r.o., č.š. 1801310113) bylo rozpuštěno v 500 ml destilované vody. Připravený roztok byl sterilizován v parním sterilizátoru po dobu 15 minut při teplotě 121 °C. Po vychladnutí na laboratorní teplotu byl roztok uchováván v lednici při teplotě 4 °C.

2.4.2 BHI bujón (HiMedia Laboratories Pvt. Ltd., č.š. 0000140607)

7,4g bujónového prášku bylo rozpuštěno ve 200 ml destilované vody. Připravený roztok byl sterilizován v parním sterilizátoru po dobu 15 minut při teplotě 121 °C. Po vychladnutí na laboratorní teplotu byl bujón uchováván v lednici při teplotě 4 °C.

2.5 TESTOVÁNÍ CITLIVOSTI DISKOVOU DIFÚZNÍ METODOU

2.5.1 Oživení a pomnožení testovaných kmenů

Bakteriální kmeny uchovávané podle pokynů na lahvičce, byly vytemperovány na laboratorní teplotu. Želatinový disk byl přenesen do 3 ml živného bujónu (BHI bujón) vytemperovaného na laboratorní teplotu. Po úplném rozpuštění disku v BHI bujónu, byla část inokula odebrána do čistého BHI bujónu a část byla přenesena na agarové plotny. Nejprve bylo odebráno 50 µl inokula a přeneseno na krevní agar. Inokulum s kmeny *Haemophilus influenzae* a *Streptococcus pneumoniae* bylo přeneseno i na čokoládový agar. Inokulum bylo rozizolováno pomocí jednorázové plastové kličky. Následně byl 1 ml inokula přenesen do čistého BHI bujónu. Kmeny *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* byly inkubovány v normální atmosféře při 37 °C. Kmeny *Streptococcus pneumoniae* a *Haemophilus influenzae* byly inkubovány v atmosféře obohacené o 5 % CO₂. Doba inkubace trvala v případě všech pěti kmenů 24 hodin. Kmeny byly opakovaně pasážovány na kultivačním médiu. Revitalizace kontrolních kmenů byla provedena 3x.

Příprava inokula

Do 50 ml sterilní zkumavky bylo napipetováno 25 ml fyziologického roztoku. Z 24 hodinové kultury byl připraven zákal ve fyziologickém roztoku o hustotě 0,5 McFarlanda. Hodnota zákalu byla ověřena denzitometricky.

Do 15 minut od vytvoření bakteriální suspenze proběhla inokulace předem označených agarových ploten. Inokulace byla provedena dvěma odlišnými technikami. Inokulace přelivem byla použita u kultivačních médií, které byly předem zahřáty na teplotu 37 °C. Inokulace roztěrem sterilním vatovým tampónem byla provedena dle postupu uváděným normou EUCAST. Každý testovaný kmen byl očkován na celkem 20 kultivačních médií. Z toho 10 kultivačních médií bylo inokulováno přelivem a 10 roztěrem.

1) Inokulace přelivem

Sterilním plastovým kapátkem bylo odebráno 1,5 – 2 ml bakteriální suspenze, kterou byla následně přelita agarová plotna. Agarovou plotnou bylo otáčeno tak, aby došlo k dokonalému rozprostření suspenze po celém povrchu agaru. Zbývající tekutina byla opatrně odsáta stejným kapátkem a vypuštěna do odpadu.

2) Inokulace roztěrem

Sterilní vatový tampón byl ponořen do bakteriální suspenze, lehce osušen o stěny zkumavky a přiložen na agarovou plotnu. Roztěr byl veden 4 směry, aby došlo k dokonalému pokrytí plotny suspenzí.

2.5.2 Aplikace antibiotických disků

Aplikace disků proběhla do 15 minut od inokulace. V raznici byla připravena sestava šesti antibiotických disků podle konkrétního bakteriálního kmene (Tabulka 3). Disky byly do raznice vkládány po směru hodinových ručiček. Na inokulované plotny byly postupně raženy antibiotické disky. Agarové plotny byly následně ukládány do inkubátoru.

Tabulka 3 - Skupiny antibiotik použité pro jednotlivé kontrolní kmeny

Testovaný mikroorganismus	Testovaná antibiotika					
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	AMP 10 µg	AMC 30 µg	CXM 30 µg	SXT 25 µg	DO 30 µg	CFR 30 µg
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	FOX 30 µg	CTX 5 µg	TIM 85 µg	ATM 30 µg	FEP 30 µg	CIP 5 µg
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213	FOX 30 µg	DA 2 µg	E 15 µg	SXT 25 µg	TE 30 µg	CIP 5 µg
<i>Haemophilus influenzae</i> ATCC 49766	P 1 µg	AMC 30 µg	E 15 µg	SXT 25 µg	TE 30 µg	CIP 5 µg
<i>Streptococcus pneumoniae</i> ATCC 49619	OX 1 µg	DA 2 µg	E 15 µg	SXT 25 µg	TE 30 µg	CIP 5 µg

Legenda: AMP – Ampicillin, AMC – Amoxycilin/klavulanová kyselina, CXM – Cefuroxim, SXT – Sulfamethoxazol/trimethoprim, DO – Doxycyklin, CFR – Cefadroxil, FOX – Cefoxitin, CTX – Cefotaxim, TIM – Tikarciin / klavulanová kyselina, ATM – Aztreonam, FEP – Cefepim, CIP – Ciprofloxacín, DA – Klindamycin, E – Erythromycin, TE – Tetracyklin, P – Penicilin, OX - Oxacilin

2.5.3 Inkubace

Naočkovaná kultivační média byla umístěna do inkubátoru nejpozději do 15 minut od aplikace antibiotických disků. Petriho misky s kultivačními médii byly vkládány do inkubátoru ve sloupcích po třech. Kmeny byly inkubovány při teplotě 37 °C. Podmínky inkubace byly voleny dle druhu naočkovaného kmene. Kontrolní kmeny rodu *Escherichia*, *Pseudomonas* a *Staphylococcus* byly inkubovány na vzduchu. Kontrolní kmeny *Haemophilus* a *Streptococcus* byly inkubovány v 5 % CO₂. Délka inkubace byla 4, 5, 6, 7 a 24 hodin.

Po stanovené době inkubace byly změřeny inhibiční zóny na přístroji BACMED. Ve stanovenou hodinu byla odečítána celkem 4 kultivační média s jedním kontrolním kmenem. Z toho dvě kultivační média byla inokulována roztěrem a dvě přelivem. Kultivační média, která byla vyndána z inkubátoru, se již znovu neinkubovala.

3 VÝSLEDKY A DISKUZE

Citlivost na antibiotika u vybraných referenčních kmenů (*Escherichia coli*, *Haemophilus influenzae*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus pneumoniae*) byla testována diskovou difúzní metodou. Každý referenční kmen byl testován na dvaceti Petriho miskách s Mueller – Hinton agarem. Polovina těchto kultivačních médií byla před samotným testováním vyndána z lednice a minimálně 15 minut skladována za laboratorních podmínek za účelem vytemperování kultivačních médií na laboratorní teplotu. Druhá polovina kultivačních médií byla přes noc předeřívána na teplotu 37 °C umístěním do inkubátoru. Z inkubátoru byla vyndána těsně před inokulací suspenze referenčního kmene. Suspenze byla inokulována dvojím způsobem – metodou přelivu inokula a metodou roztěru inokula. Všechna měření byla prováděna na přístroji BACMED a odečet výsledků probíhal po 4, 5, 6, 7 a 24 hodinách.

Cílem práce bylo zkrátit dobu potřebnou k odečtu inhibičních zón. Z toho důvodu byla snaha o zajištění kontinuálního množení testovaného referenčního kmene zamezením teplotních šoků a dostatečně silného nárůstu testovaného kmene správně zvoleným způsobem inokulace.

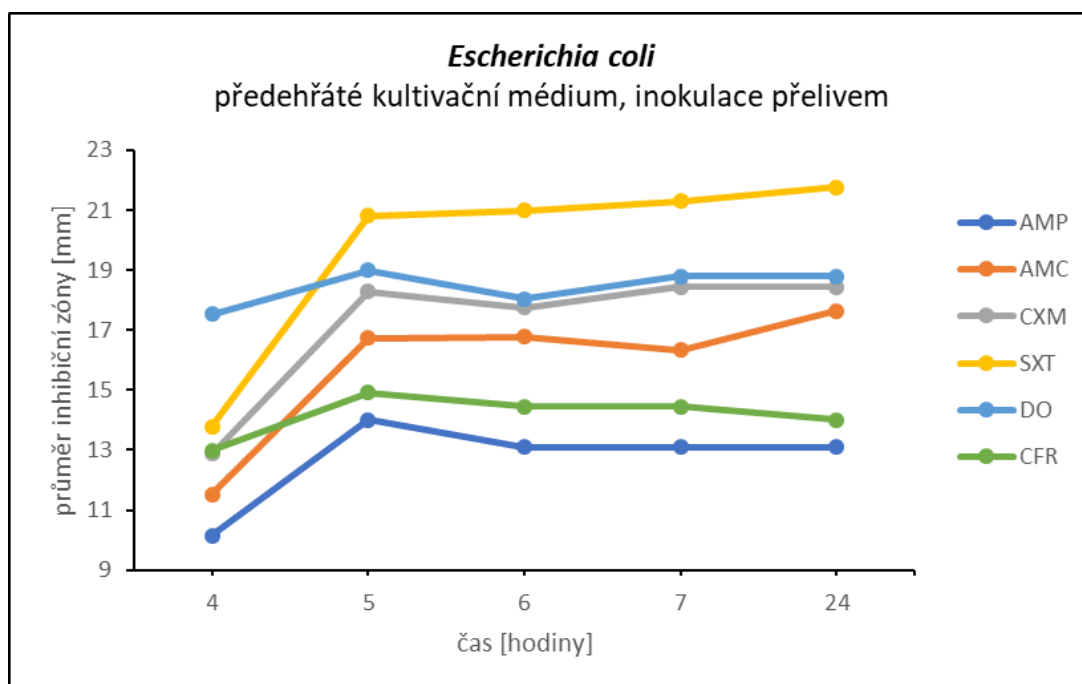
-Testování citlivosti referenčního kmene *Escherichia coli* na vybraná antibiotika

Tabulka 4 – Průměr inhibičních zón – *Escherichia coli*, předehřáté kultivační médium, inokulace přelivem

<i>Escherichia coli</i> – předehřáté kultivační médium, inokulace přelivem						
Čas [h]	AMP	AMC	CXM	SXT	DO	CFR
4	10,2 ± 3,9	11,5 ± 5,3	12,9 ± 6,7	13,8 ± 7,6	17,5 ± 6,6	12,9 ± 3,9
5	14 ± 0	16,7 ± 2,0	18,3 ± 0,7	20,8 ± 1,5	18,9 ± 0,8	14,9 ± 0,9
6	13,1 ± 0,9	16,8 ± 2,1	17,8 ± 1,3	20,9 ± 1,4	18,0 ± 0,7	14,5 ± 0,8
7	13,1 ± 0,9	16,3 ± 2,1	18,4 ± 0,8	21,3 ± 1,3	18,8 ± 1,2	14,5 ± 0,8
24	13,1 ± 0,9	17,6 ± 2,6	18,4 ± 0,8	21,8 ± 1,5	18,8 ± 1,2	14 ± 0

Legenda: AMP – Ampicilin, AMC – Amoxycilin/klavulanová kyselina, CXM – Cefuroxim, SXT – Sulfamethoxazol Trimethoprim, DO – Doxycyklin, CFR – Cefadroxil

Graf 1 – Citlivost *Escherichia coli* na antibiotika – předehřáté kultivační médium, inokulace přelivem



Legenda: AMP – Ampicilin, AMC – Amoxycilin/klavulanová kyselina, CXM – Cefuroxim, SXT – Sulfamethoxazol/trimethoprim, DO – Doxycyklin, CFR – Cefadroxil

Prvním testovaným referenčním kmenem byla *E.coli* ATCC 25922. Suspenze kmene byla inokulována přelivem na kultivačním médiu předehřátém na teplotu 37 °C. V grafu 1 jsou uvedeny změny průměrů inhibičních zón, které byly naměřeny přístrojem BACMED po 4, 5, 6, 7 a 24 hodinách inkubace při 37 °C. Průměry inhibičních zón se po 6 hodinách inkubace již

téměř neměnily s výjimkou amoxicilin/klavulanové kyseliny. Kolem disku s tímto antibiotikem byl naměřen nepatrně větší průměr inhibiční zóny po 24 hodinách než po 7 hodinách inkubace.

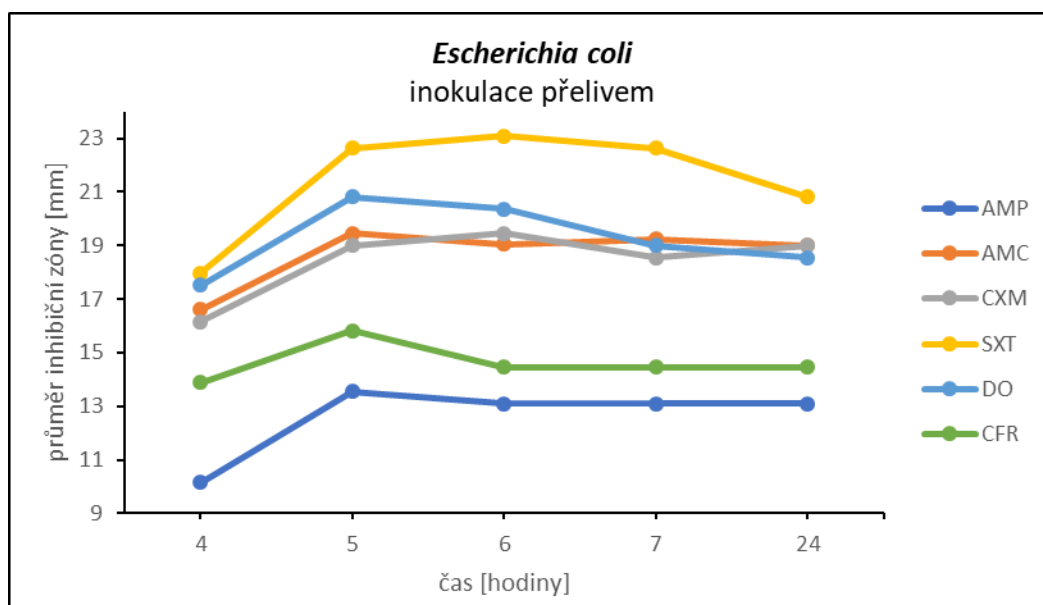
V Tabulce 4 jsou zaznamenány průměrné hodnoty inhibičních zón se směrodatnou odchylkou každého antibiotika v průběhu času odečtu. Tyto hodnoty byly využity jako zdrojová data k vytvoření grafu 1. Největší odchylka byla zjištěna u všech antibiotik po 4 hodinách inkubace. Naopak nejmenší odchylka, tedy nejpodobnější velikosti inhibičních zón byly naměřeny u cefuroximu od 5. hodiny inkubace.

Tabulka 5 – Průměr inhibičních zón – *Escherichia coli*, inokulace přelivem

<i>Escherichia coli</i> – inokulace přelivem						
Čas [h]	AMP	AMC	CXM	SXT	DO	CFR
4	10,2±3,9	16,6±6,0	16,2±5,8	17,9±7,7	17,5±6,5	13,9±4,4
5	13,5±0,8	19,5±1,3	18,9±0,8	22,6±1,9	20,8±0,8	15,8±0
6	13,1±0,9	19,1±0,8	19,5±0	23,1±0	20,4±0,9	14,5±0,8
7	13,1±0,9	19,2±1,0	18,5±0,9	22,6±0,8	18,9±0,8	14,5±0,8
24	13,1±0,9	18,9±1,5	18,9±0,8	20,8±0,8	18,5±0,9	14,5±0,8

Legenda: AMP – Ampicilin, AMC – Amoxicilin/klavulanová kyselina, CXM – Cefuroxim, SXT – Sulfamethoxazol/trimethoprim, DO – Doxycyklin, CFR – Cefadroxil

Graf 2 – Citlivost *Escherichia coli* na antibiotika – inokulace přelivem



Legenda: AMP – Ampicilin, AMC – Amoxicilin/klavulanová kyselina, CXM – Cefuroxim, SXT – Sulfamethoxazol/trimethoprim, DO – Doxycyklin, CFR – Cefadroxil

V Tabulce 5 jsou zaznamenány průměrné hodnoty inhibičních zón se směrodatnou odchylkou každého antibiotika v průběhu času odečtu. Tyto hodnoty byly využity jako zdrojová data k vytvoření grafu 2. Velikosti inhibičních zón s nejmenší odchylkou byly naměřeny od 6 hodiny inkubace.

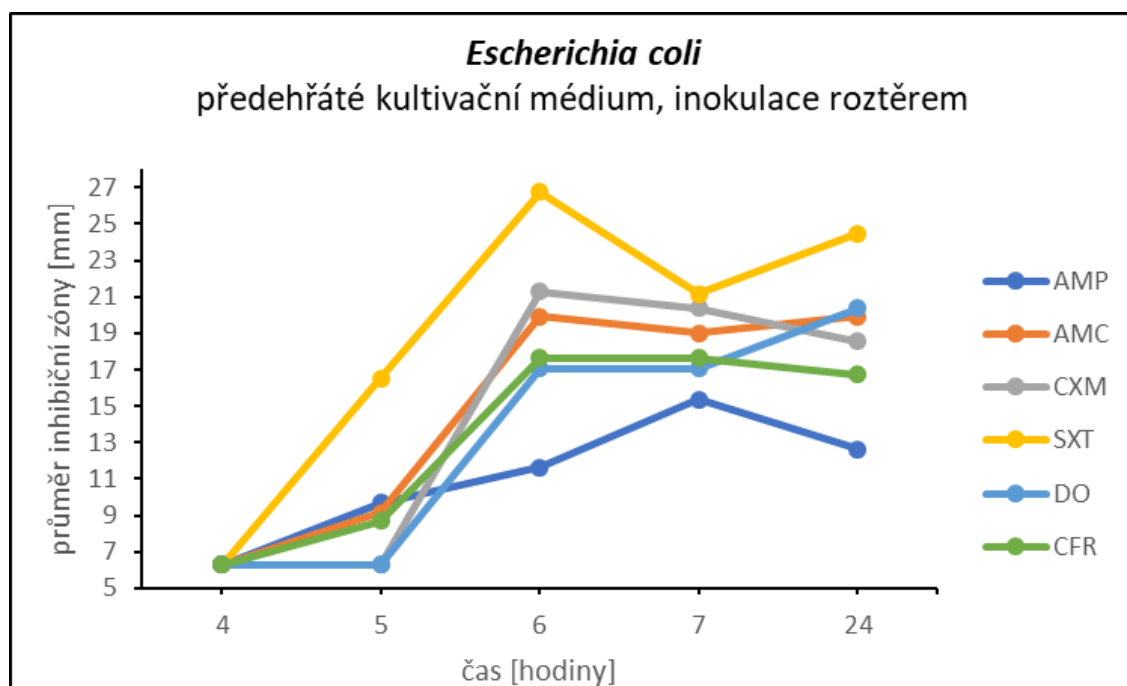
Suspenze *E.coli* byla inokulována přelivem na nepředehřáté kultivační médium. V grafu 2 vidíme průměry inhibičních zón, které se po 7 hodinách inkubace téměř nemění s výjimkou antibiotika sulfamethoxazol/trimethoprimu. U sulfamethoxazolu/trimethoprimu dochází ke zmenšení inhibiční zóny, patrně v důsledku přerůstání původní velikosti inhibiční zóny.

Tabulka 6 – Průměr inhibičních zón – *Escherichia coli*, předehřáté kultivační médium, inokulace roztěrem

<i>Escherichia coli</i> – předehřáté kultivační médium, inokulace roztěrem						
Čas [h]	AMP	AMC	CXM	SXT	DO	CFR
4	6,3±0	6,3±0	6,3±0	6,3±0	6,3±0	6,3±0
5	9,7±3,5	9,1±4,9	6,3±0	16,5±10,2	6,3±0	8,7±4,1
6	11,6±3,2	19,9±0,8	21,3±1,3	26,7±0	17,1±6,4	17,6±2,2
7	15,4±2,4	18,9±0,8	20,4±0,9	21,2±8,6	17,1±6,3	17,6±3,1
24	12,6±0,8	19,9±0,8	18,5±2,7	24,5±1,5	20,3±0,9	16,7±0,9

Legenda: AMP – Ampicilin, AMC – Amoxycilin/klavulanová kyselina, CXM – Cefuroxim, SXT – Sulfamethoxazol/trimethoprim, DO – Doxycyklin, CFR – Cefadroxil

Graf 3 – Citlivost *Escherichia coli* na antibiotika – přehřáté kultivační médium, inokulace roztěrem



Legenda: AMP – Ampicilin, AMC – Amoxycilin/klavulanová kyselina, CXM – Cefuroxim, SXT – Sulfamethoxazol/trimethoprim, DO – Doxycyklin, CFR – Cefadroxil

V tabulce 6 jsou zaznamenány průměrné hodnoty inhibičních zón se směrodatnou odchylkou každého antibiotika v průběhu času odečtu. Tyto hodnoty byly využity jako zdrojová data k vytvoření grafu 3. Po 4 hodinách inkubace nebyly změřeny inhibiční zóny u žádného antibiotika.

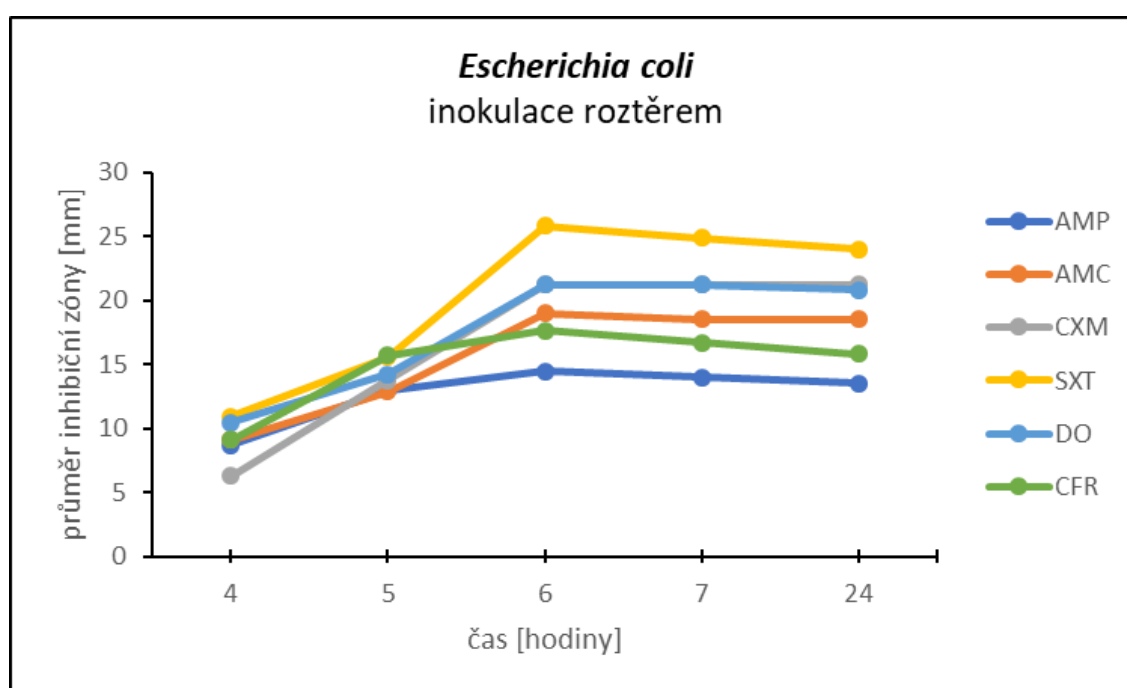
Suspenze *E.coli* byla v tomto případě inokulována roztěrem na kultivační médium přehřáté na 37 °C. V grafu 3 jsou uvedeny průměrné velikosti inhibičních zón, které se mezi 7 a 24 hodinou inkubace významně měnily. Největší rozdíl ve velikosti byl zaznamenán u antibiotik sulfamethoxazol/trimethoprimu a doxycyklinu, jejichž inhibiční zóny se po 7 hodinách inkubace významně zvětšily. Průměrná inhibiční zóna ampicilinu se po 24. hodinách inkubace zmenšila.

Tabulka 7 – Průměr inhibičních zón – *Escherichia coli*, inokulace roztěrem

<i>Escherichia coli</i> – inokulace roztěrem						
Čas [h]	AMP	AMC	CXM	SXT	DO	CFR
4	8,7 ± 4,1	9,1±4,9	6,3±0	10,9±8,1	10,5±7,3	9,1±4,9
5	12,9 ± 3,9	12,9±6,7	13,8±7,5	15,6±9,3	14,2±7,9	15,7±5,8
6	14,5±0,8	19,0±1,5	21,3±0	25,8±0,9	21,3±0	17,6±1,3
7	14±1,8	18,5±0,9	21,3±0	24,9±1,3	21,3±0	16,7±0,9
24	13,5±0,8	18,5±0,9	21,3±0	24±0,9	20,8±0,8	15,8±0

Legenda: AMP – Ampicilin, AMC – Amoxycilin/klavulanová kyselina, CXM – Cefuroxim, SXT – Sulfamethoxazol/trimethoprim, DO – Doxycyklin, CFR – Cefadroxil

Graf 4 – Citlivost *Escherichia coli* na antibiotika – inokulace roztěrem



Legenda: AMP – Ampicilin, AMC – Amoxycilin/klavulanová kyselina, CXM – Cefuroxim, SXT – Sulfamethoxazol/trimethoprim, DO – Doxycyklin, CFR – Cefadroxil

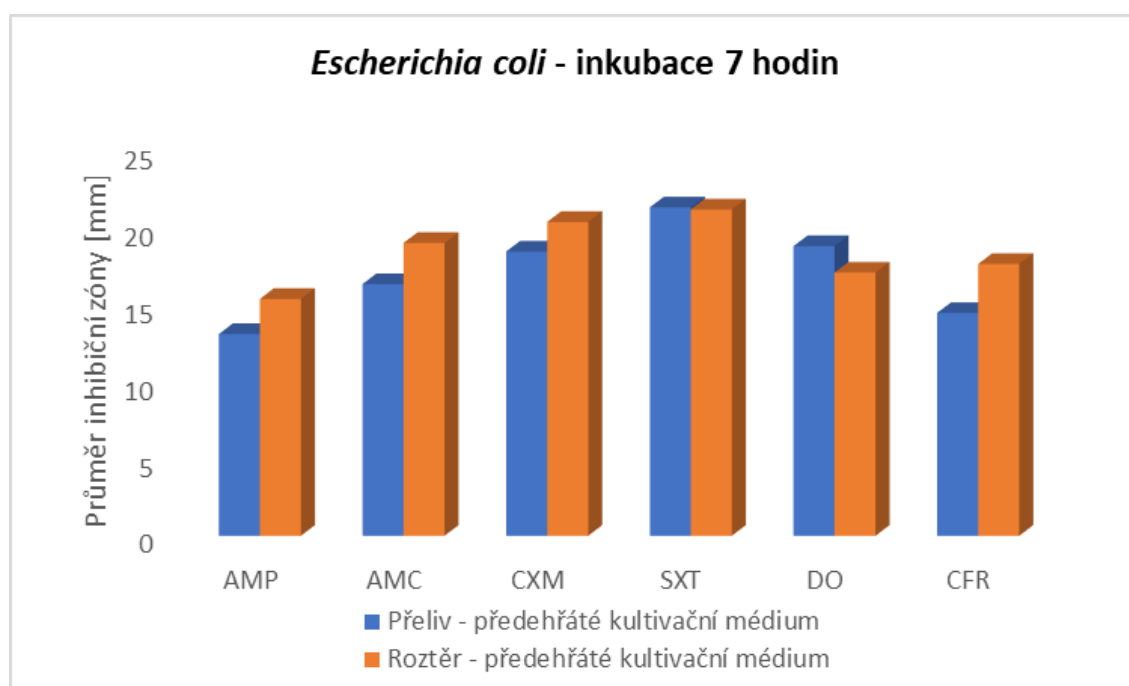
V tabulce 7 jsou zaznamenány průměrné hodnoty inhibičních zón se směrodatnou odchylkou každého antibiotika v průběhu času odečtu. Tyto hodnoty byly využity jako zdrojová data k vytvoření grafu 4. U antibiotika CXM byly naměřené hodnoty u všech testování od 6 hodiny neměnné, vyplývá to z nulové směrodatné odchylky.

Inokulum bylo nanášeno roztěrem na nepředehřátá kultivační média. Průměry inhibičních zón, viditelné v grafu 4 zůstaly od 6. hodiny téměř neměnné. Největší nárůst velikosti inhibičních zón byl zaznamenán mezi 4. a 6. inkubační hodinou.

Tabulka 8 - Rozmezí breakpointů podle EUCAST tabulek pro *Escherichia coli* ATCC 25922

Antibiotikum	Obsah látky [μg]	C [mm] ≥	R [mm] <
Ampicilin	10	14	14
Amoxicilin-klavulanát	20 - 10	19	19
Cefuroxim	30	26	20
Sulfamethoxazol - trimethoprim	1,25 – 23,75	14	11
Doxycyklin	-	-	-
Cefadroxil	30	12	12

Graf 5 – Porovnání velikostí inhibičních zón po 7 hodinách inkubace *Escherichia coli* - inokulace přelivem a roztěrem na předehřátém kultivačním médiu



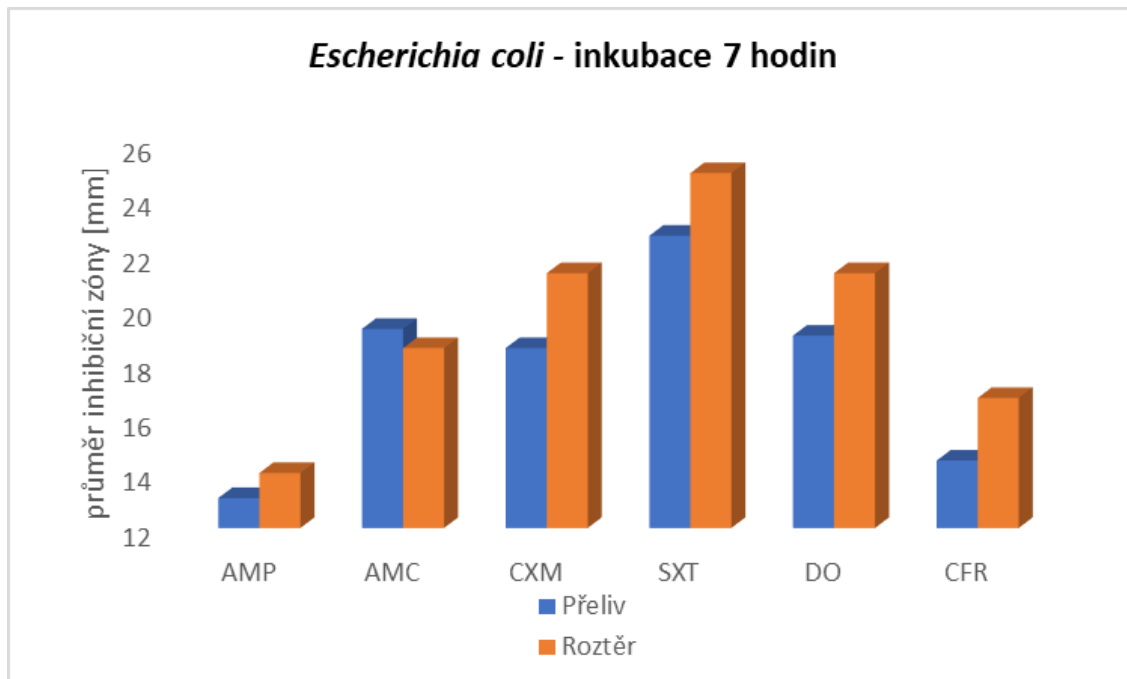
Legenda: AMP – Ampicilin, AMC – Amoxicilin/klavulanová kyselina, CXM – Cefuroxim, SXT – Sulfamethoxazol/trimethoprim, DO – Doxycyklin, CFR – Cefadroxil

V grafu 5 je srovnání mezi inokulací roztěrem a přelivem na předehřátém kultivačním médiu při teplotě 37 °C po 7 hodinách inkubace. V tabulce 8 jsou referenční rozmezí breakpointů, převzaty z tabulek EUCASTu. Pro antibiotikum doxycyklin nejsou definované breakpointy.

Při metodě přelivu byla *E.coli* středně citlivá pouze na antibiotika sulfamethoxazole/trimethoprim a cefuroxim. Metodou roztěru bylo dosaženo lepších výsledků. Referenční kmen byl citlivý na ampicilin, sulfamethoxazol/trimethoprim a cefuroxim, středně

citlivý na cefadroxil. Z grafu je patrné, že při inokulaci roztěrem byly inhibiční zóny větší než při inokulaci přelivem.

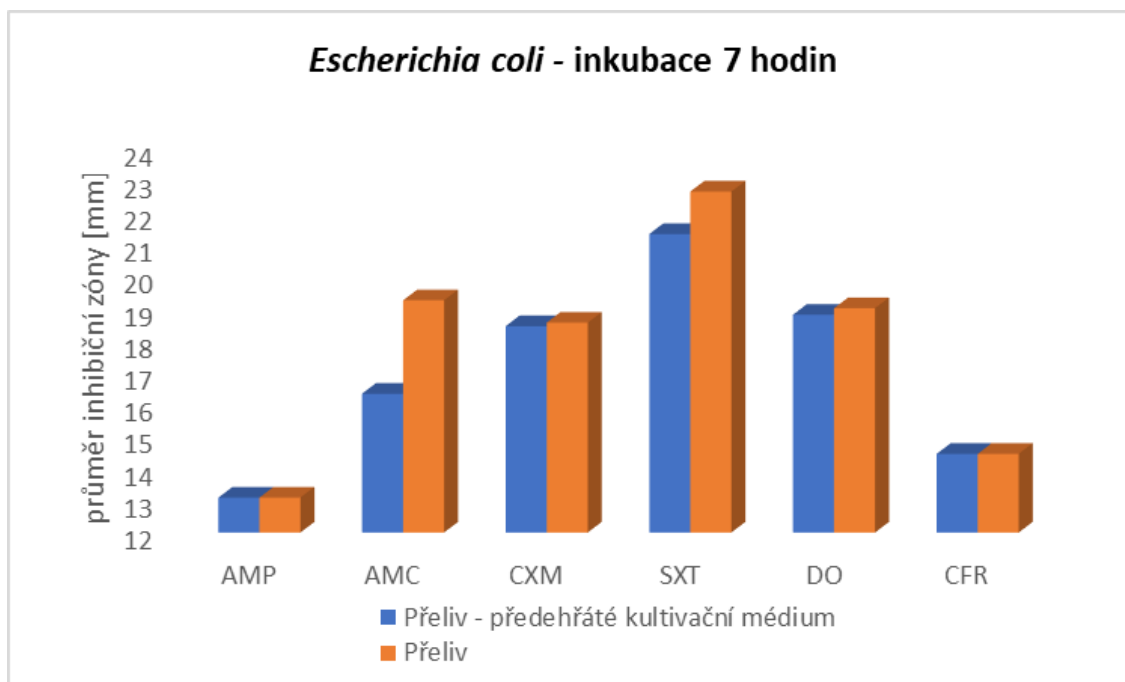
Graf 6 - Porovnání velikostí inhibičních zón po 7 hodinách inkubace *Escherichia coli* – inokulace přelivem a roztěrem



Legenda: AMP – Ampicilin, AMC – Amoxicilin/klavulanová kyselina, CXM – Cefuroxim, SXT – Sulfamethoxazol/trimethoprim, DO – Doxycyklin, CFR – Cefadroxil

Graf 6 zobrazuje porovnání mezi inokulací přelivem a roztěrem po 7 hodinách inkubace. Hodnoty byly porovnány s tabulkou 8. Při srovnání inhibičních zón s breakpointy uvedenými v tabulce 8 lze říci, že inokulace roztěrem poskytuje přesnější výsledky. Rezistentní byl referenční kmen pouze na antibiotikum amoxicilin/klavulanová kyselina. Ostatní průměry zón byly vyhodnoceny jako citlivé, cefuroxim jako středně citlivý. Inokulací přelivem byly jako citlivé vyhodnoceny průměry zón u sulfamethoxazol/trimethoprimu, cefadroxilu a amoxicilin/klavulanové kyseliny. Kmen *E.coli* byl na zbylá antibiotika rezistentní. Kromě průměru inhibiční zóny u amoxicilin/klavulanové kyseliny byly zóny při inokulaci roztěrem větší než při inokulaci přelivem.

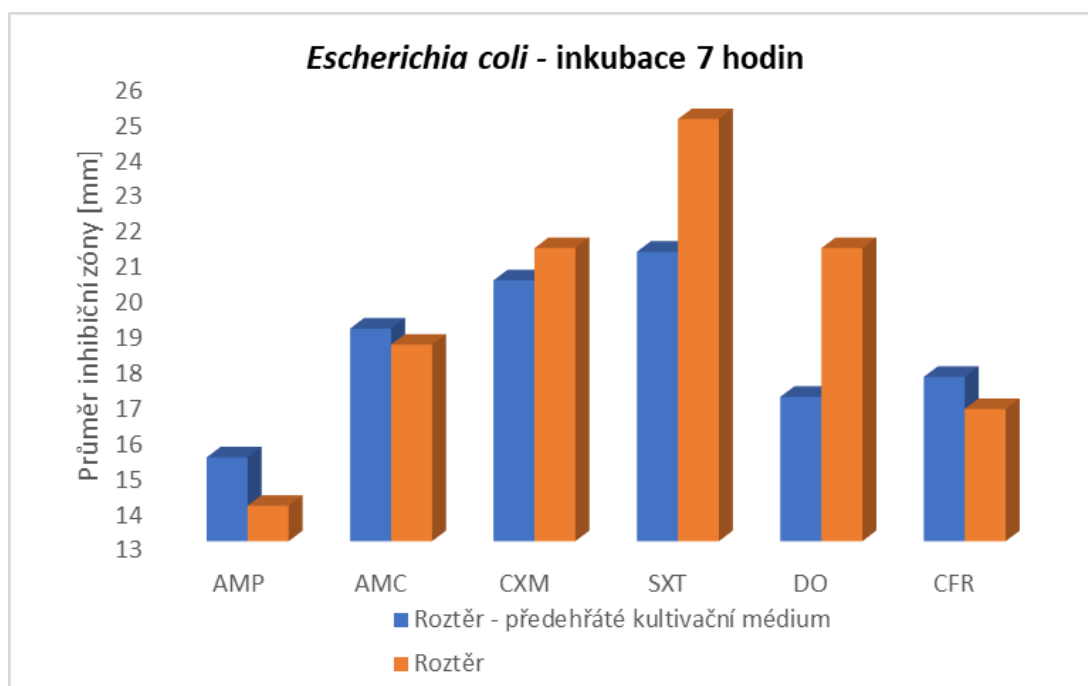
Graf 7 - Porovnání velikostí inhibičních zón po 7 hodinách inkubace *Escherichia coli* – inokulace přelivem s předehřátým kultivačním médiem a nepředehřátým kultivačním médiem



Legenda: AMP – Ampicilin, AMC – Amoxycilin/klavulanová kyselina, CXM – Cefuroxim, SXT – Sulfamethoxazol/trimethoprim, DO – Doxycyklin, CFR – Cefadroxil

V grafu 7 je zobrazeno srovnání inokulace přelivem na předehřátém kultivačním médiu při 37 °C a na kultivačním médiu laboratorní teploty. Na antibiotika ampicilin, cefuroxim a cefadroxil neměla teplota média žádný vliv, průměry inhibičních zón byly stejné. U amoxycilin/klavulanové kyseliny, sulfamethoxazole/trimethoprimu a doxycyklinu byly průměry inhibičních zón větší na kultivačním médiu uchovávaném před testem v lednici. V obou případech byla *E. coli* citlivá na sulfamethoxazol/trimethoprim a cefadroxil. S výjimkou amoxycilin/klavulanové kyseliny, byl referenční kmen k ostatním antibiotikům rezistentní.

Graf 8 - Porovnání velikostí inhibičních zón po 7 hodinách inkubace *Escherichia coli* – inokulace roztěrem s přehřátým kultivačním médiem a nepřehřátým kultivačním médiem



Legenda: AMP – Ampicilin, AMC – Amoxycilin/klavulanová kyselina, CXM – Cefuroxim, SXT – Sulfamethoxazol Trimethoprim, DO – Doxycylin, CFR – Cefadroxil

Graf 8 zobrazuje srovnání průměrů inhibičních zón po 7 hodinách inkubace inokulací roztěrem na přehřátém kultivačním médiu při 37 °C a nepřehřátém kultivačním médiu. Na nepřehřátém kultivačním médiu se kolem antibiotických disků vytvořily větší inhibiční zóny u amoxycilin-klavulanátu, cefuroximu, sulfamethoxazole/trimethoprimu a doxycylinu. Referenční kmen byl v tomto případě rezistentní pouze na amoxycilin-klavulanát. V případě přehřátého kultivačního média byl referenční kmen rezistentní k doxycylinu a sulfamethoxazol/trimethoprimu.

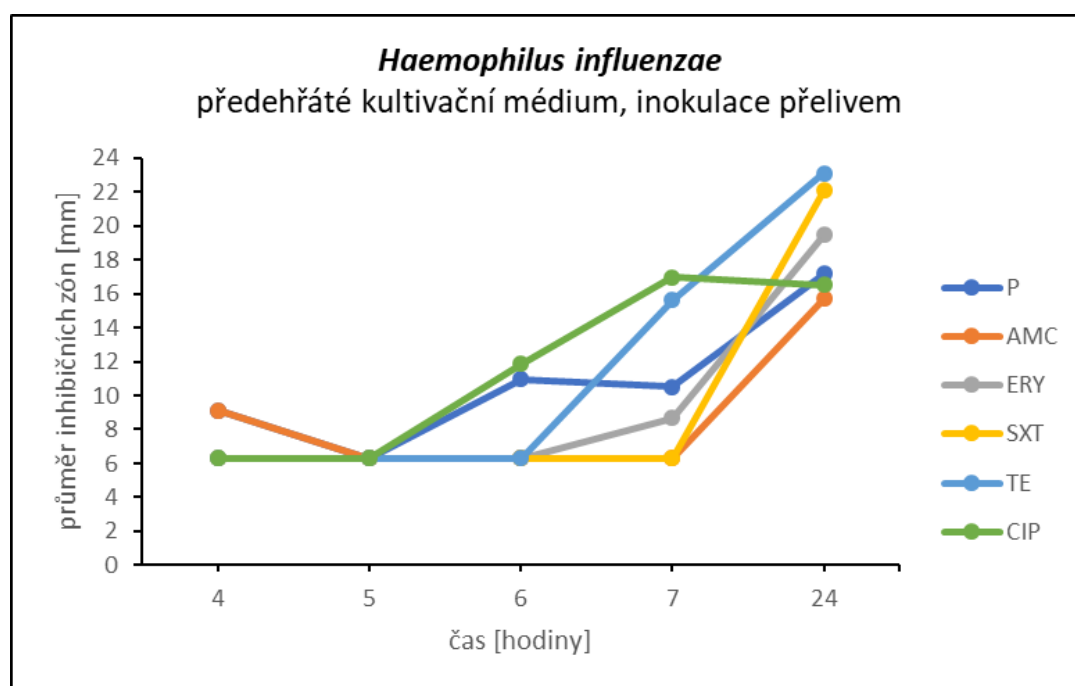
Testování citlivosti referenčního *Haemophilus influenzae* na vybraná antibiotika

Tabulka 9 – Průměr inhibičních zón – *Haemophilus influenzae*, předeřtávané kultivační médium, inokulace přelivem

<i>Haemophilus influenzae</i> – předeřtávané kultivační médium, inokulace přelivem						
Čas [h]	P	AMC	ERY	SXT	TE	CIP
4	9,1±4,9	9,1±4,9	6,3±0	6,3±0	6,3±0	6,3±0
5	6,3±0	6,3±0	6,3±0	6,3±0	6,3±0	6,3±0
6	10,9±8,06	6,3±0	6,3±0	6,3±0	6,3±0	11,9±9,6
7	10,5±7,3	6,3±0	8,7±4,1	6,3±0	15,6±9,3	16,9±10,7
24	17,2±1,5	15,7±5,5	19,5±1,8	22,1±9,1	23,1±5,3	16,5±10,2

Legenda: P – Penicilin, AMC – Amoxycilin/klavulanová kyselina, ERY – Erythromycin, SXT – Sulfamethoxazol/trimethoprim, TE – Tetracyklin, CIP – Ciprofloxacin

Graf 9 – Citlivost *Haemophilus influenzae* na antibiotika – předeřtávané kultivační médium, inokulace přelivem



Legenda: P – Penicilin, AMC – Amoxycilin/klavulanová kyselina, ERY – Erythromycin, SXT – Sulfamethoxazol/trimethoprim, TE – Tetracyklin, CIP – Ciprofloxacin

V Tabulce 9 jsou zaznamenány průměrné hodnoty inhibičních zón (v mm) se směrodatnou odchylkou každého antibiotika v průběhu času odečtu. Tyto hodnoty byly využity jako zdrojová data k vytvoření grafu 9. Směrodatné odchylky u zón, které byly

změřeny, tedy u hodnot, které nemají průměr 6,3 mm, jsou velké. Důvodem je velká diverzita výsledků jednotlivých měření.

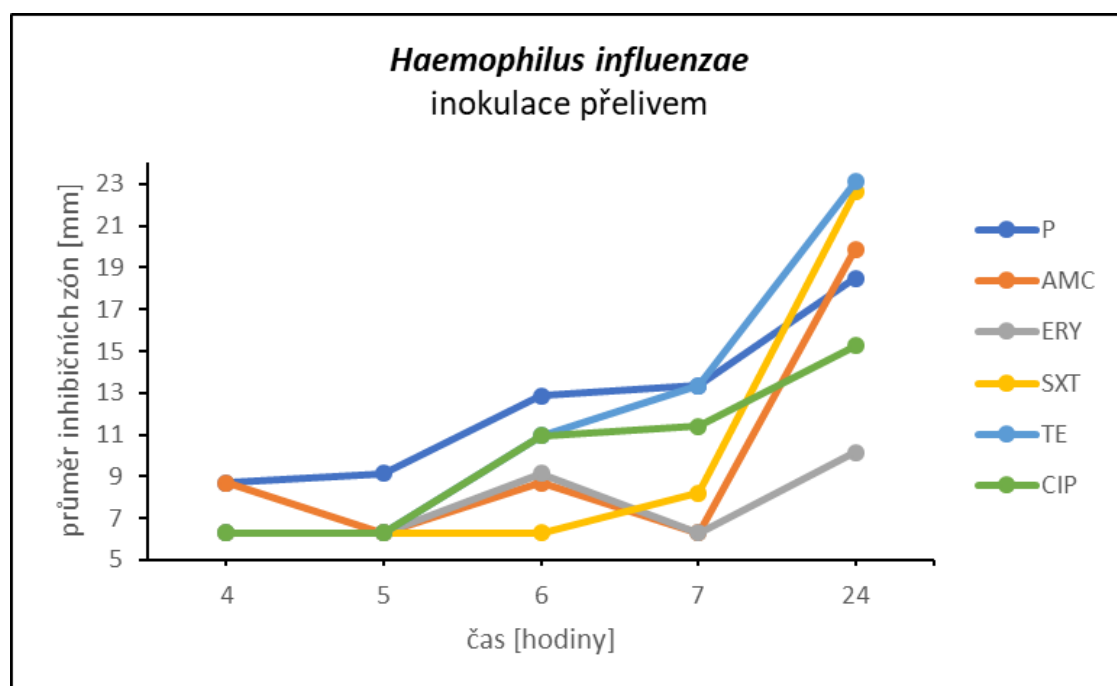
Dalším testovaným referenčním kmenem byl *H. influenzae* ATCC 49766. Suspenze tohoto referenčního kmene byla inokulována přelivem na předehřátém kultivačním médiu (37 °C). V grafu 9 jsou zaznamenány průměrné velikosti inhibičních zón měnících se v závislosti na čase odečtu. Největší nárůst inhibičních zón byl zaznamenán od 7 hodin inkubace do 24 hodin inkubace, s výjimkou ciprofloxacinu. Velikost inhibiční zóny se u tohoto antibiotika mezi 7 hodinou a 24 hodinou inkubace významně nemění. U antibiotik erythromycin, sulfamethoxazole/trimethoprim, tetracyklin a ciprofloxacin nebyl viditelný nárůst kolem antibiotického disku až do 7. hodiny inkubace.

Tabulka 10 – Průměr inhibičních zón – *Haemophilus influenzae*, inokulace přelivem

<i>Haemophilus influenzae</i> – inokulace přelivem						
Čas [h]	P	AMC	ERY	SXT	TE	CIP
4	8,7±4,1	8,7±4,1	6,3±0	6,3±0	6,3±0	6,3±0
5	9,1±4,9	6,3±0	6,3±0	6,3±0	6,3±0	6,3±0
6	12,9±7,1	8,7±4,1	9,1±4,9	6,3±0	10,9±8,1	10,9±8,1
7	13,3±7,7	6,3±0	6,3±0	8,2±3,3	13,3±8,3	11,4±8,8
24	18,5±4,8	19,9±1,6	10,1±4,1	22,6±2,4	23,1±4,2	15,2±8,9

Legenda: P – Penicilin, AMC – Amoxycilin/klavulanová kyselina, ERY – Erythromycin, SXT – Sulfamethoxazol/trimethoprim, TE – Tetracyklin, CIP – Ciprofloxacin

Graf 10 – Citlivost *Haemophilus influenzae* na antibiotika – inokulace přelivem



Legenda: P – Penicilin, AMC – Amoxicilin/klavulanová kyselina, ERY – Erythromycin, SXT – Sulfamethoxazol/Trimethoprim, TE – Tetracyklin, CIP – Ciprofloxacin

V Tabulce 10 jsou zaznamenány průměrné hodnoty inhibičních zón (v mm) se směrodatnou odchylkou každého antibiotika v průběhu času odečtu. Tyto hodnoty byly využity jako zdrojová data k vytvoření grafu 10.

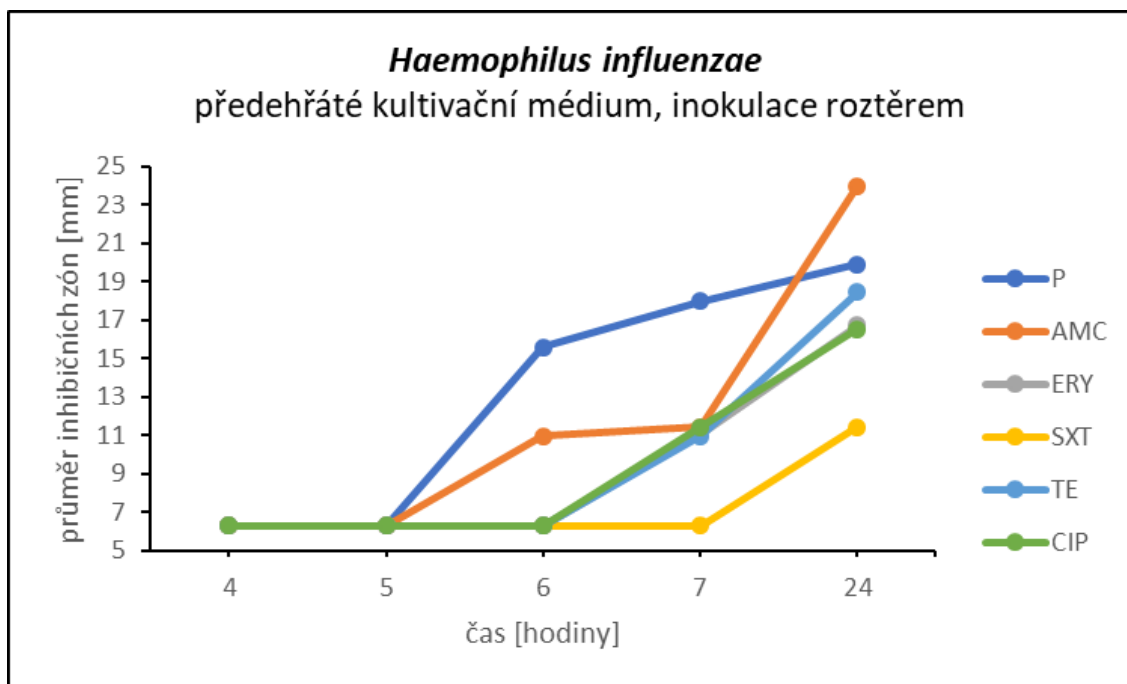
Dále bylo inokulum *H. influenzae* nanášeno na kultivační médium o laboratorní teplotě. Stejně jako u grafu 9 byl u grafu 10 zaznamenán největší nárůst velikosti inhibiční zóny mezi 7. a 24. hodinou. Největší rozdíl ve velikostech inhibičních zón byl u antibiotik sulfamethoxazole/trimethoprim a amoxicilin/klavulanové kyseliny.

Tabulka 11 - Průměr inhibičních zón – *Haemophilus influenzae*, předeřáté kultivační médium, inokulace roztěrem

<i>Haemophilus influenzae</i> – předeřáté kultivační médium, inokulace roztěrem						
Čas [h]	P	AMC	ERY	SXT	TE	CIP
4	6,3±0	6,3±0	6,3±0	6,3±0	6,3±0	6,3±0
5	6,3±0	6,3±0	6,3±0	6,3±0	6,3±0	6,3±0
6	15,6±9,3	11,0±8,1	6,3±0	6,3±0	6,3±0	6,3±0
7	18,0±7,3	11,4±8,8	11,1±4,7	6,3±0	10,9±8,1	11,4±8,8
24	19,9±4,3	24,0±3,0	16,7±2,7	11,4±8,8	18,4±8,8	16,5±10,2

Legenda: P – Penicilin, AMC – Amoxicilin/klavulanová kyselina, ERY – Erythromycin, SXT – Sulfamethoxazol/trimethoprim, TE – Tetracyklin, CIP – Ciprofloxacin

Graf 11 – Citlivost *Haemophilus influenzae* na antibiotika – předeřáté kultivační médium, inokulace roztěrem



Legenda: P – Penicilin, AMC – Amoxicilin/klavulanová kyselina, ERY – Erythromycin, SXT – Sulfamethoxazol/trimethoprim, TE – Tetracyklin, CIP – Ciprofloxacin

V Tabulce 11 jsou zaznamenány průměrné hodnoty inhibičních zón se směrodatnou odchylkou každého antibiotika v průběhu času odečtu. Tyto hodnoty byly využity jako zdrojová data k vytvoření grafu 11. Hodnoty směrodatných odchylek jsou v tomto případě opět vysoké. Důvodem je velká diverzita výsledků měření. Hodnota velikosti inhibiční zóny penicilinu po 24 hodinách inkubace se změnila v porovnání s ostatními antibiotiky nejméně od inkubace po 7 hodinách.

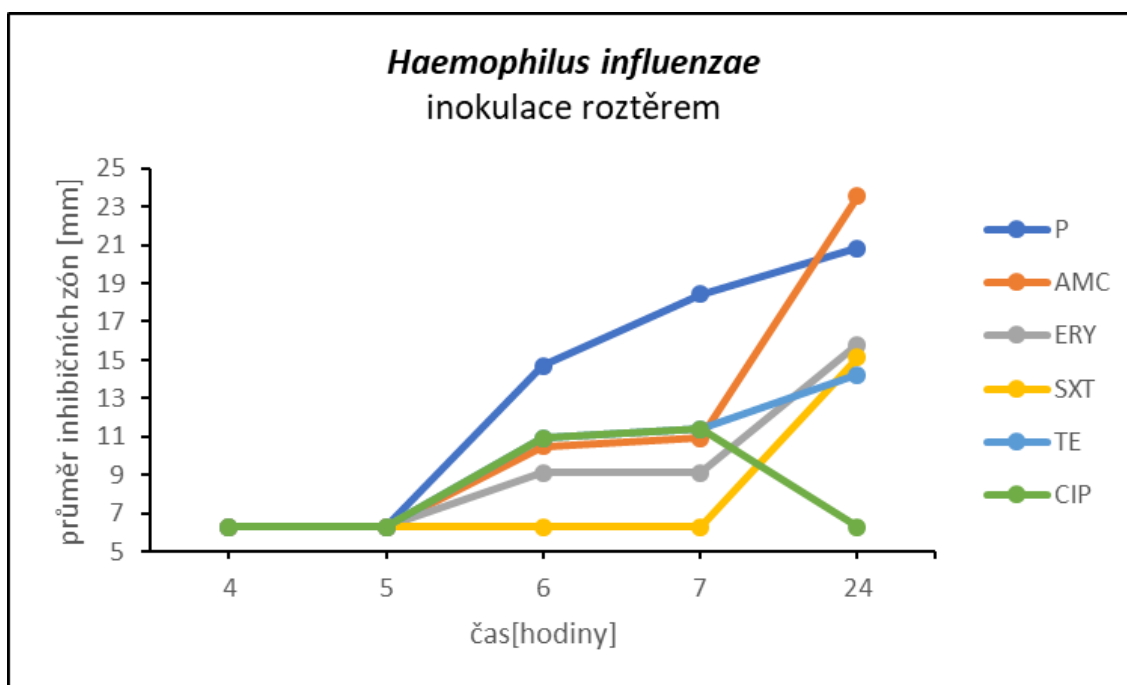
V grafu 11 jsou zaznamenány inhibiční zóny *H. influenzae*, které se vytvořily po inokulaci roztěrem na kultivační médium předeřáté na 37 °C. Z grafu je patrné, že kolem antibiotického disku u antibiotik erythromycin, tetracyklin a ciprofloxacin nenarostla inhibiční zóna až do 6. hodiny inkubace. U antibiotik penicilin a amoxicilin/klavulanová kyseliny byla hodnota velikostí inhibičních zóny poprvé změřena po 6. hodině inkubace v porovnání s grafem 9 a grafem 10, kdy byly velikosti inhibičních zón naměřeny už po 4 hodinách inkubace. Nejmenší změnu průměrné hodnoty velikosti inhibiční zóny zaznamenáváme u penicilinu po 6. hodinách inkubace.

Tabulka 12 – Průměr inhibičních zón – *Haemophilus influenzae*, inokulace roztěrem

<i>Haemophilus influenzae</i> – inokulace roztěrem						
Čas [h]	P	AMC	ERY	SXT	TE	CIP
4	6,3±0	6,3±0	6,3±0	6,3±0	6,3±0	6,3±0
5	6,3±0	6,3±0	6,3±0	6,3±0	6,3±0	6,3±0
6	14,7±8,4	10,5±7,3	9,1±4,9	6,3±0	10,9±8,1	10,9±8,1
7	18,4±7,6	10,9±8,1	9,1±4,9	6,3±0	11,4±8,8	11,4±8,8
24	20,8±3,9	23,5±1,5	15,8±2,2	15,2±9,1	14,2±9,1	6,3±0

Legenda: P – Penicilin, AMC – Amoxycilin/klavulanová kyselina, ERY – Erythromycin, SXT – Sulfamethoxazol/trimethoprim, TE – Tetracyklin, CIP – Ciprofloxacin

Graf 12 – Citlivost *Haemophilus influenzae* na antibiotika – inokulace roztěrem



Legenda: P – Penicilin, AMC – Amoxycilin/klavulanová kyselina, ERY – Erythromycin, SXT – Sulfamethoxazol/trimethoprim, TE – Tetracyklin, CIP – Ciprofloxacin

V Tabulce 12 jsou zaznamenány průměrné hodnoty inhibičních zón se směrodatnou odchylkou každého antibiotika v průběhu času odečtu. Tyto hodnoty byly využity jako zdrojová data k vytvoření grafu 12.

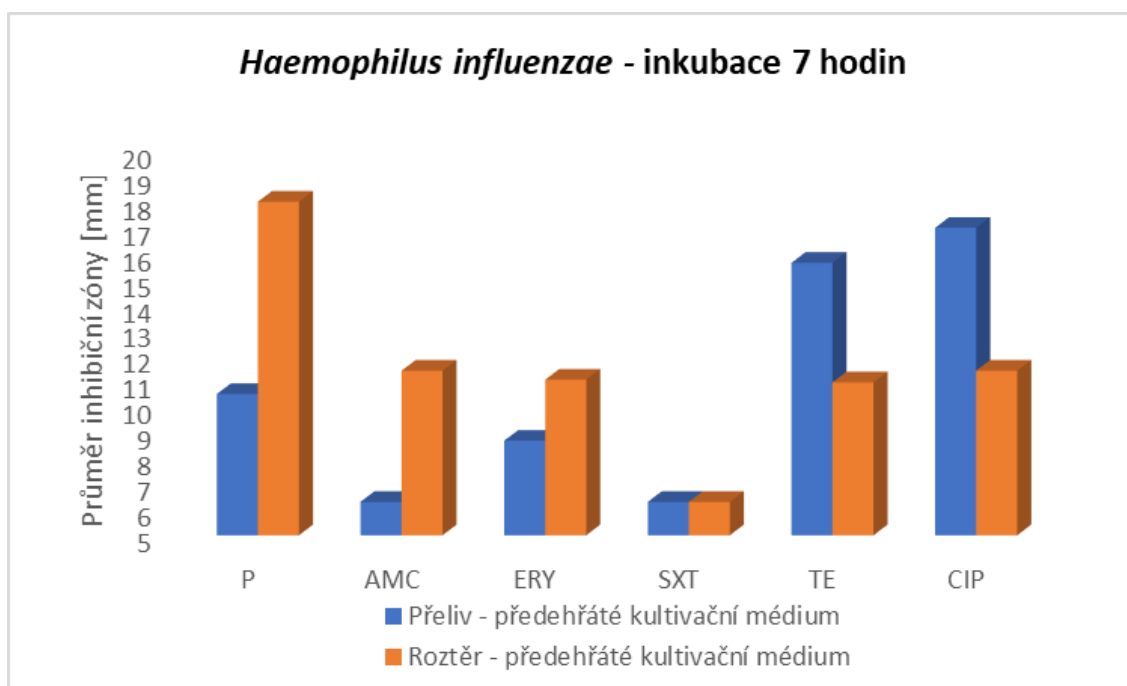
V grafu 12 jsou zaznamenány průměrné hodnoty inhibičních zón pro inokulaci roztěrem na kultivačním médium uchované přes noc v lednici. Průměrné hodnoty inhibičních zón byly neměnné pouze mezi 6. a 7. hodinou inkubace, výjimku tvořil penicilin. Průměry inhibičních zón pro antibiotikum sulfamethoxazole/trimethoprim se až do 7. hodiny inkubace nemění.

Inhibiční zóna kolem disku nebyla po tuto dobu viditelná. Největší nárůst průměrné inhibiční zóny byl zaznamenán u amoxicilin/klavulanové kyseliny mezi 7. a 24. hodinou odečtu.

Tabulka 13 - Rozmezí breakpointů dle EUCAST pro *Haemophilus influenzae* ATCC 49766

Antibiotikum	Obsah látky [μg]	C [mm] ≥	R [mm] <
Penicilin	-	-	-
Amoxicilin-klavulanát	20 - 10	15	15
Erythromycin	-	-	-
Sulfamethoxazol - trimethoprim	1,25 – 23,75	23	20
Tetracyklin	30	25	22
Ciprofloxacin	5	30	30

Graf 13 - Porovnání velikostí inhibičních zón po 7 hodinách inkubace *Haemophilus influenzae* - inokulací přelivem a roztěrem na předeřátém kultivačním médiu

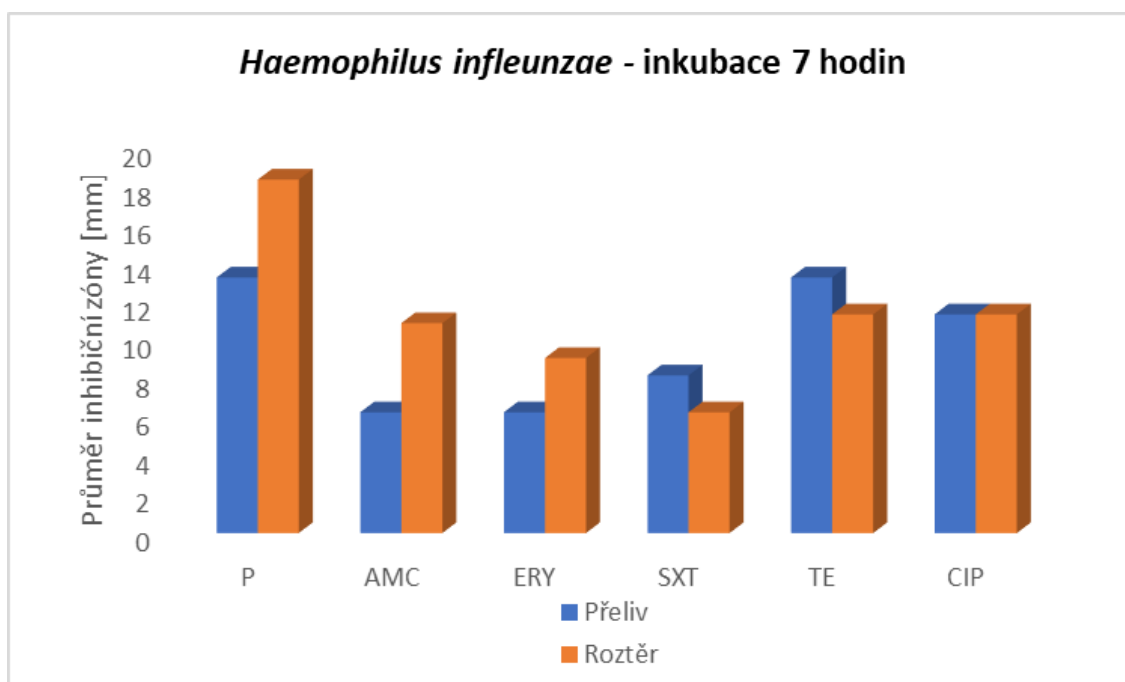


Legenda: P – Penicilin, AMC – Amoxicilin/klavulanová kyselina, ERY – Erythromycin, SXT – Sulfamethoxazol/Trimethoprim, TE – Tetracyklin, CIP – Ciprofloxacin

V tabulce 13 jsou referenční rozmezí breakpointů, převzaty z tabulek EUCASTu. Pro penicilin nebyly určeny mezní hodnoty velikosti inhibičních zón.

V grafu 13 je uvedeno srovnání mezi inokulací roztěrem a přelivem na předeřátém kultivačním médiu při teplotě 37 °C po 7 hodinách inkubace. Velikosti inhibičních zón byly u penicilinu, amoxicilin/klavulanové kyseliny a erythromycinu větší při inokulaci roztěrem. V případě sulfamethoxazol/trimehtoprimu se inhibiční zóna kolem disku vůbec nevytvořila. U tetracyklinu a ciprofloxacinu se vytvořily větší inhibiční zóny při inokulaci přelivem. *Haemophilus influenzae* byl středně citlivý pouze na antibiotikum erythromycin při inokulaci roztěrem. Na ostatní antibiotika byl kmen při testování rezistentní.

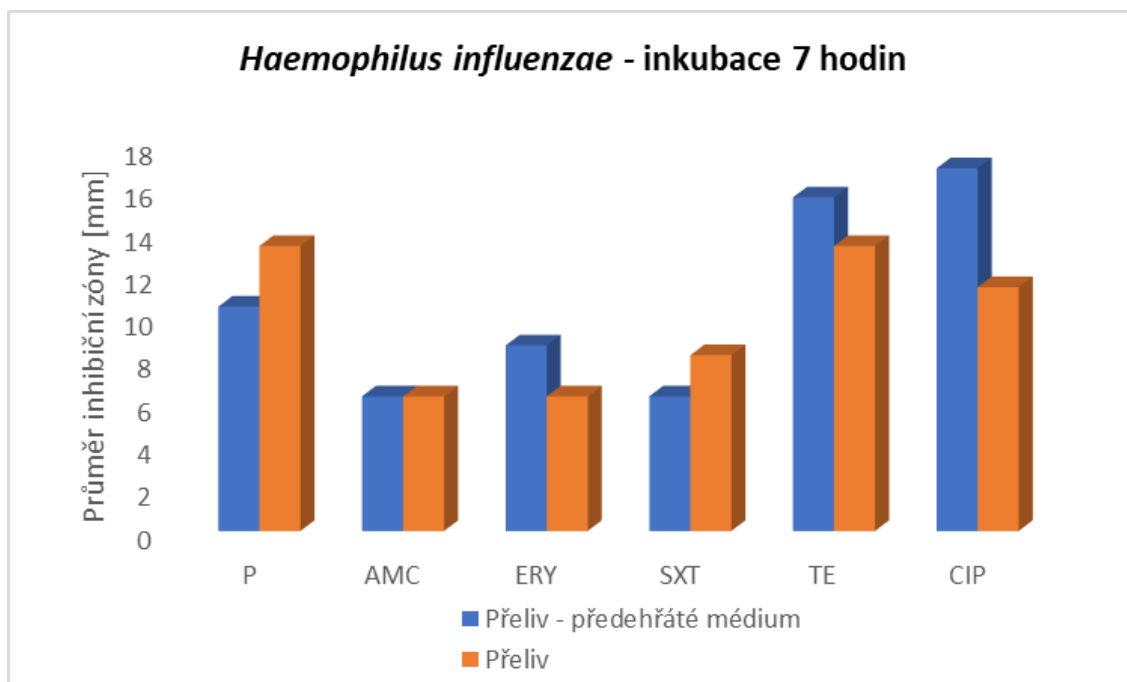
Graf 14 - Porovnání velikostí inhibičních zón po 7 hodinách inkubace *Haemophilus influenzae* - inokulace přelivem a roztěrem



Legenda: P – Penicilin, AMC – Amoxicilin/klavulanová kyselina, ERY – Erythromycin, SXT – Sulfamethoxazol/Trimethoprim, TE – Tetracyklin, CIP – Ciprofloxacin

Srovnání inokulace roztěrem a přelivem pro kmen *H. influenzae* zobrazuje graf 14. Při inokulaci přelivem byly velikosti inhibičních zón větší pouze u sulfamethoxazol/trimethoprimu a tetracyklinu. U penicilinu, amoxicilin/klavulanové kyseliny a erythromycinu se vytvořily větší průměry inhibiční zóny při inokulaci roztěrem. Referenční kmen byl rezistentní na všechna antibiotika.

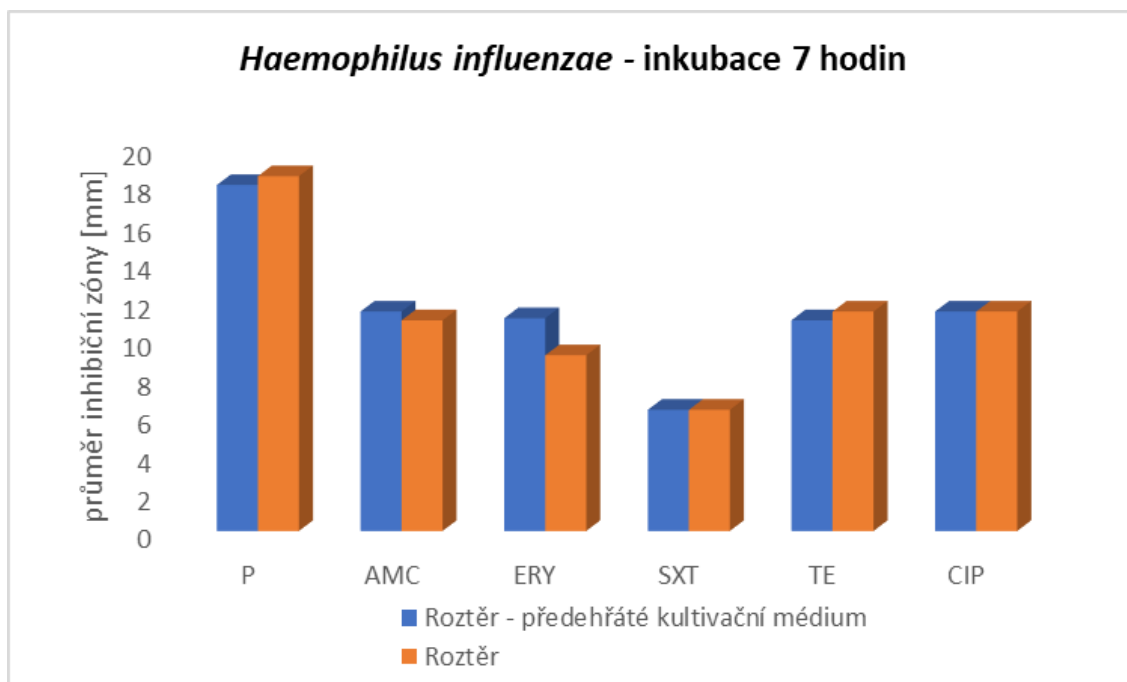
Graf 15 - Porovnání velikostí inhibičních zón po 7 hodinách inkubace *Haemophilus influenzae* inokulací přelivem s přehřátým kultivačním médiem a nepřehřátým kultivačním médiem



Legenda: P – Penicilin, AMC – Amoxycilin/klavulanová kyselina, ERY – Erythromycin, SXT – Sulfamethoxazol/trimethoprim, TE – Tetracyklin, CIP – Ciprofloxacin

V grafu 15 je zobrazeno srovnání inokulace přelivem na přehřátém médiu při 37 °C a nepřehřátém kultivačním médiu. V porovnání velikosti inhibičních zón mezi médiem přehřátým a nepřehřátým, se na přehřátém médiu vytvořily větší zóny pro erythromycin, tetracyklin a ciprofloxacin. Bohužel je *Haemophilus influenzae* při inokulaci přelivem rezistentní ke všem antibiotikům. Vzhledem k citlivosti kmene je teplota kultivačního média nevýznamná.

Graf 16 - Porovnání velikostí inhibičních zón po 7 hodinách inkubace *Haemophilus influenzae* inokulací roztěrem s předeřtým kultivačním médiem a nepředeřtým kultivačním médiem



Legenda: P – Penicilin, AMC – Amoxycilin/klavulanová kyselina, ERY – Erythromycin, SXT – Sulfamethoxazol/Trimethoprim, TE – Tetracyklin, CIP – Ciprofloxacin

V grafu 16 vidíme porovnání inokulace roztěrem při rozdílných teplotách kultivačního média. Je patrné, že teplota nemá v tomto případě na měření vliv. Velikosti inhibičních zón jsou téměř stejné. *H. influenzae* je středně citlivý pouze k antibiotiku erythromycin a to pouze při inokulaci roztěrem na nepředeřtávané kultivační médium.

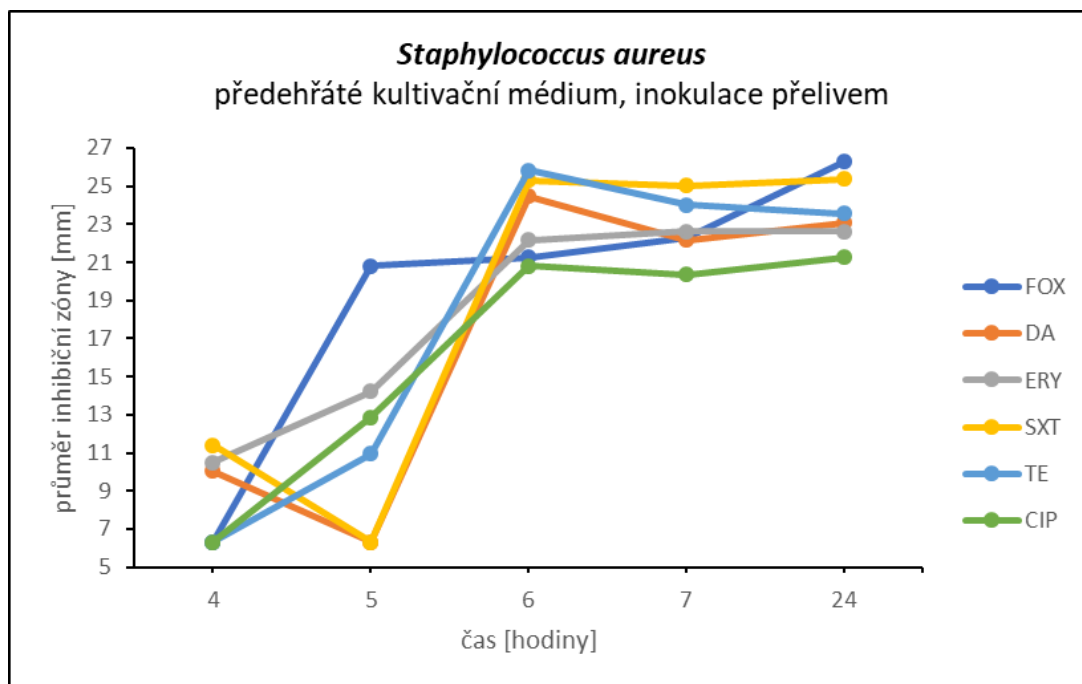
Testování citlivosti referenčního kmene *Staphylococcus aureus* na vybraná antibiotika

Tabulka 14 – Průměr inhibičních zón – *Staphylococcus aureus*, předeřtávané kultivační médium, inokulace přelivem

<i>Staphylococcus aureus</i> – předeřtávané kultivační médium, inokulace přelivem						
Čas [h]	FOX	DA	ERY	SXT	TE	CIP
4	6,3±0	10,0±6,5	10,5±7,3	11,4±8,8	6,3±0	6,3±0
5	20,8±1,5	6,3±0	14,2±8,2	6,3±0	10,9±8,1	12,9±6,6
6	21,3±0	24,5±0,8	22,2±1,6	25,3±0,8	25,82±0,9	20,8±1,5
7	22,3±1,7	22,2±0,9	22,6±0,8	25,0±2,1	24±0,9	20,4±0,9
24	26,3±1,5	23,1±2,1	22,6±1,5	25,4±1,5	23,5±0,8	21,3±0

Legenda: FOX – Cefoxitin, DA – Klindamycin, ERY – Erythromycin, SXT – Sulfamethoxazol/trimethoprim, TE – Tetracyklin, CIP – Ciprofloxacin

Graf 17 – Citlivost *Staphylococcus aureus* na antibiotika – předeřáté kultivační médium, inokulace přelivem



Legenda: FOX – Cefoxitin, DA – Klindamycin, ERY – Erythromycin, SXT – Sulfamethoxazol/trimethoprim, TE – Tetracyklin, CIP – Ciprofloxacin

V tabulce 14 jsou zaznamenány průměrné hodnoty inhibičních zón se směrodatnou odchylkou každého antibiotika v průběhu času odečtu. Tyto hodnoty byly využity jako zdrojová data k vytvoření grafu 17. Rozdíly v hodnotách velikostí inhibičních zón se mezi 7 hodinou inkubace a 24 hodinou inkubace se kromě penicilinu liší minimálně.

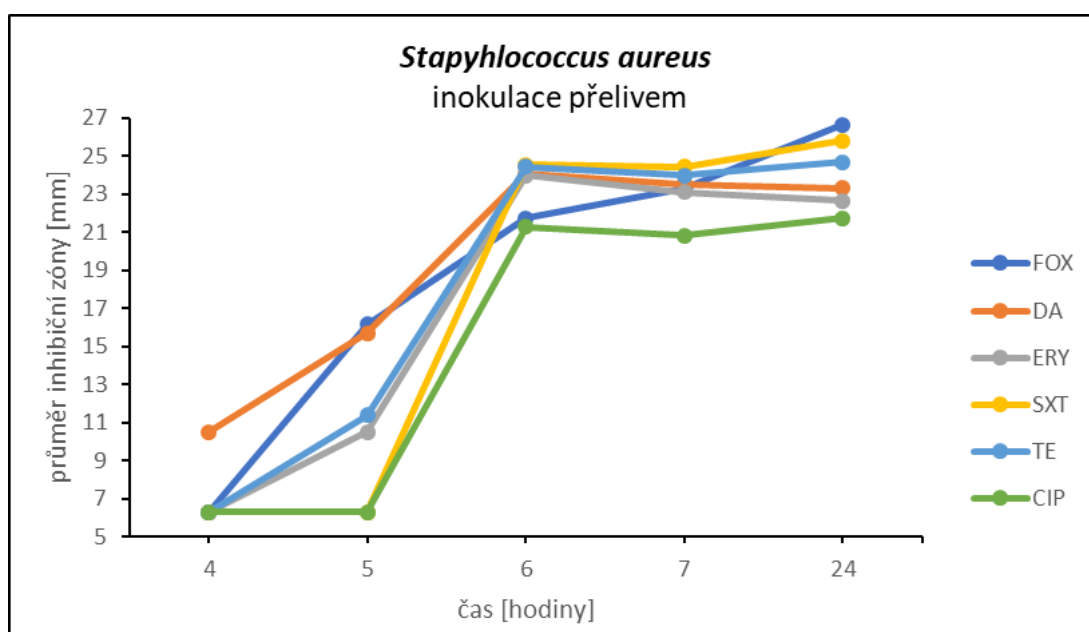
S. aureus ATCC 29213 je dalším testovaným referenčním kmenem. Suspenze inokula byla nejprve inokulována na kultivační médium předeřáté na 37 °C. V grafu 17 můžeme vidět jak se průměry velikostí inhibičních zón od 6. inkubační hodiny ustálily a do 24. hodiny inkubace se téměř neměnily. Výjimkou je cefoxitin, jehož inhibiční zóna se mezi 5. a 7. hodinou téměř nezměnila a po 24 hodinách inkubace byl rozdíl v nárůstu inhibiční zóny v porovnání s ostatními antibiotiky větší.

Tabulka 15 – Průměr inhibičních zón – *Staphylococcus aureus*, inokulace přelivem

<i>Staphylococcus aureus</i> – inokulace přelivem						
Čas [h]	FOX	DA	ERY	SXT	TE	CIP
4	6,3±0	10,5±7,3	6,3±0	6,3±0	6,3±0	6,3±0
5	16,2±6,1	15,7±5,5	10,5±7,3	6,3±0	11,4±8,8	6,3±0
6	21,7±0,8	24,0±0,9	24±1,6	24,6±0,6	24,5±3,2	21,3±1,3
7	23,3±2,3	23,5±2,4	23,1±2,2	24,5±2,4	24±1,6	20,8±1,9
24	26,7±3,9	23,3±1,4	22,6±1,5	25,8±1,6	24,7±1,9	21,7±0,8

Legenda: FOX – Cefoxitin, DA – Klindamycin, E – Erythromycin, SXT – Sulfamethoxazol/trimethoprim, TE – Tetracyklin, CIP – Ciprofloxacin

Graf 18 – Citlivost *Staphylococcus aureus* na antibiotika – inokulace přelivem



Legenda: FOX – Cefoxitin, DA – Klindamycin, ERY – Erythromycin, SXT – Sulfamethoxazol/Trimethoprim, TE – Tetracyklin, CIP – Ciprofloxacin

V Tabulce 15 jsou zaznamenány průměrné hodnoty inhibičních zón se směrodatnou odchylkou každého antibiotika v průběhu času odečtu. Tyto hodnoty byly využity jako zdrojová data k vytvoření grafu 18. Hodnoty odchylek jsou největší v 5 hodině odečítání. V tuto dobu byly naměřeny nejrozdílnější průměry inhibičních zón.

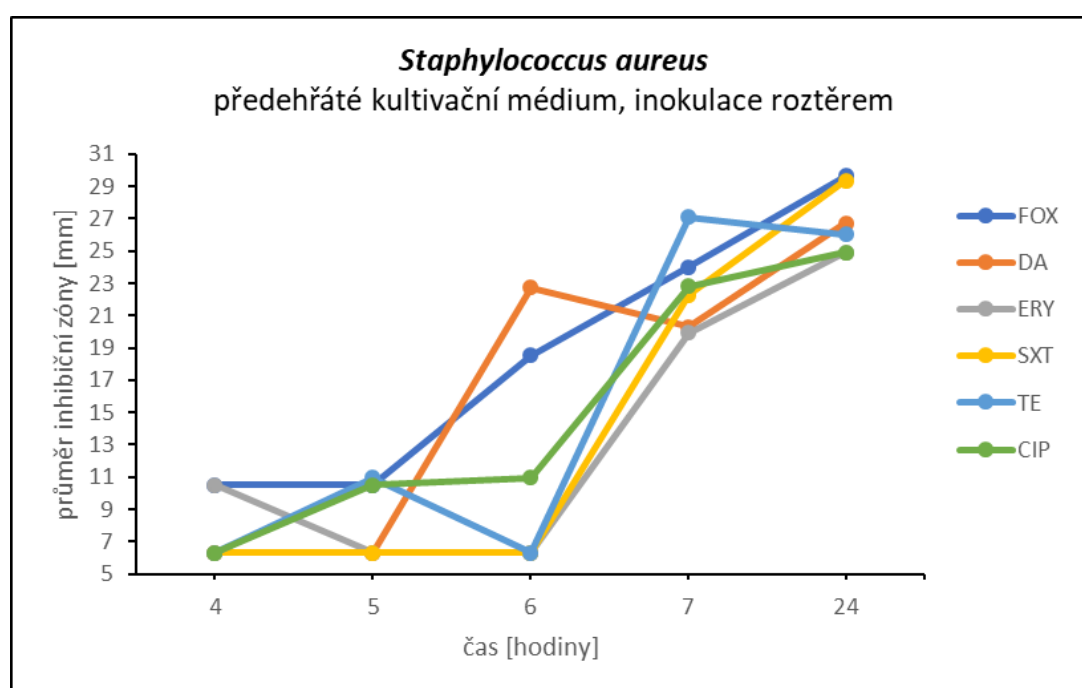
Suspenze inokula *S.aureus* byla v tomto případě inokulována přelivem na nepředehřáté kultivační médium (Graf 18). Stejně jako v grafu 17 se velikosti inhibičních zón po 6 hodině inkubace téměř nezměnily. Průměr inhibiční zóny kolem disku s cefoxitem byl po 24 hodinách inkubace znatelně větší než po 7 hodinách inkubace. V porovnání s ostatními antibiotiky se jeho zóny významně zvětšila.

Tabulka 16 – Průměr inhibičních zón – *Staphylococcus aureus*, předeřtá kulturační médium, inokulace roztěrem

<i>Staphylococcus aureus</i> – předeřtá kulturační médium, inokulace roztěrem						
Čas [h]	FOX	DA	ERY	SXT	TE	CIP
4	10,5±7,3	6,3±0	10,5±7,3	6,3±0	6,3±0	6,3±0
5	10,5±7,3	6,3±0	6,3±0	6,3±0	10,9±8,1	10,5±7,3
6	18,5±7,1	22,7±2,0	6,3±0	6,3±0	6,3±0	10,9±8,1
7	24±2,7	20,3±8,5	19,9±8,1	22,3±9,3	27,1±3,2	22,8±2,7
24	29,7±4,3	26,7±1,3	24,9±2,2	29,4±1,9	26,0±1,7	24,9±1,3

Legenda: FOX – Cefoxitin, DA – Klindamycin, ERY – Erythromycin, SXT – Sulfamethoxazol/Trimethoprim, TE – Tetracyklin, CIP – Ciprofloxacín

Graf 19 – Citlivost *Staphylococcus aureus* na antibiotika – předeřtá kulturační médium, inokulace roztěrem



Legenda: FOX – Cefoxitin, DA – Klindamycin, ERY – Erythromycin, SXT – Sulfamethoxazol/trimethoprim, TE – Tetracyklin, CIP – Ciprofloxacín

Zdrojová data ke grafu 19 jsou uvedena v tabulce 16. Dále jsou v tabulce zaznamenány hodnoty směrodatných odchylek průměrných inhibičních velikostí. Z tabulky 13 je patrné, že inhibiční zóna kolem antibiotického disku sulfamethoxazole/trimethoprim nebyla viditelná až do 7 hodiny inkubace.

V grafu 19 jsou zaznamenány průměrné hodnoty inhibičních zón pro inokulaci roztěrem na kulturačním médium předeřtátem přes noc ve 37 °C. Průměrné hodnoty inhibičních zón se

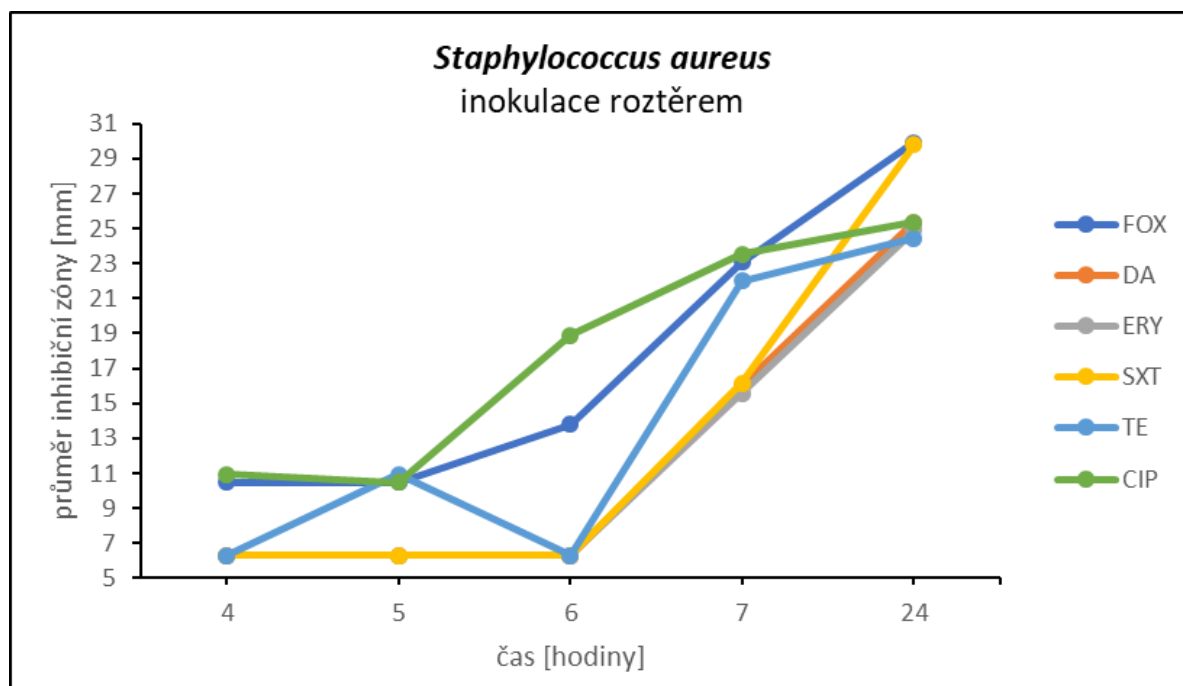
výrazně měnily až do 24 inkubační hodiny. Antibiotikum cefoxitin vykazuje téměř lineární závislost růstu průměrné hodnoty inhibiční zóny.

Tabulka 17 – Průměr inhibičních zón – *Staphylococcus aureus*, inokulace roztěrem

<i>Staphylococcus aureus</i> – inokulace roztěrem						
Čas [h]	FOX	DA	ERY	SXT	TE	CIP
4	10,5±7,3	6,3±0	6,3±0	6,3±0	6,3±0	10,9±8,1
5	10,5±7,3	6,3±0	6,3±0	6,3±0	10,9±8,1	10,5±7,3
6	13,8±7,5	6,3±0	6,3±0	6,3±0	6,3±0	18,9±7,3
7	23,1±1,8	16,1±9,8	15,6±9,4	16,2±9,9	22,0±9,4	23,5±1,5
24	29,9±3,2	25,4±1,5	24,9±1,3	29,8±2,2	24,5±0,8	25,4±0,8

Legenda: FOX – Cefoxitin, DA – Klindamycin, ERY – Erythromycin, SXT – Sulfamethoxazol/trimethoprim, TE – Tetracyklin, CIP – Ciprofloxacin

Graf 20 – Citlivost *Staphylococcus aureus* na antibiotika – inokulace roztěrem



Legenda: FOX – Cefoxitin, DA – Klindamycin, ERY – Erythromycin, SXT – Sulfamethoxazol/trimethoprim, TE – Tetracyklin, CIP – Ciprofloxacin

Zdrojová data ke grafu 20 jsou uvedena v tabulce 17. Dále jsou v tabulce zaznamenány hodnoty směrodatných odchylek průměrných inhibičních velikostí. Průměrné hodnoty inhibičních zón pro klindamycin, erytromycin a sulfamathoxazole/trimethoprim od 4. do 6. hodiny inkubace nebyly zaznamenány, protože se kolem disků žádné zóny nevytvořily.

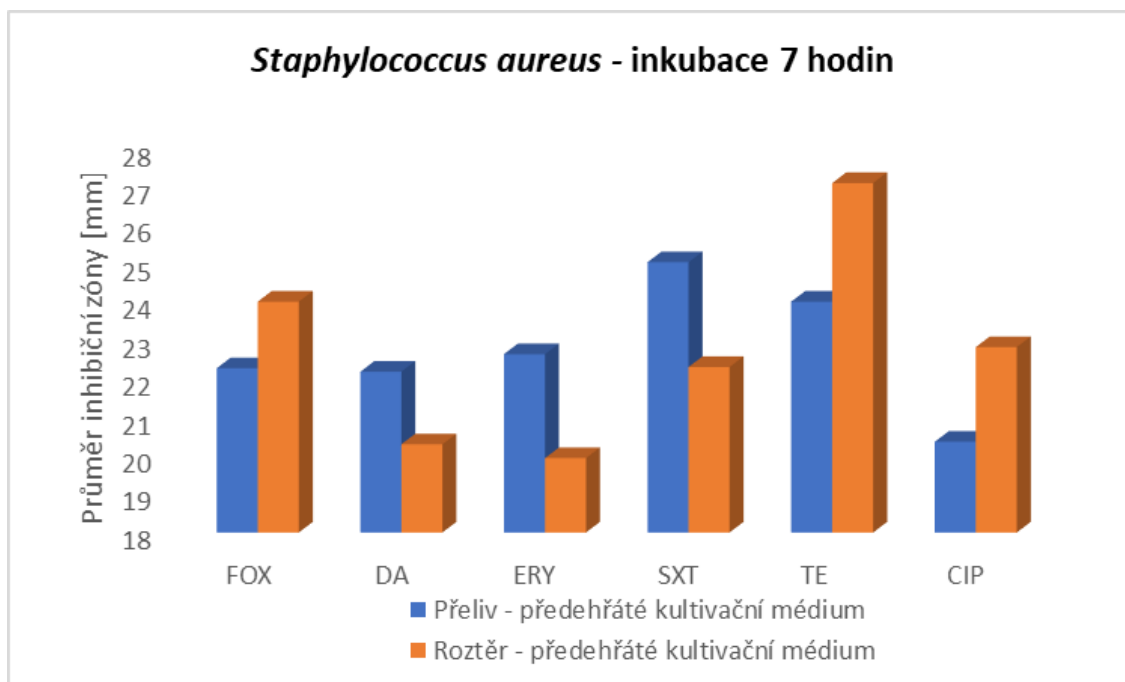
Suspenze inokula *S.aureus* byla v tomto případě inokulována roztěrem (Graf 20). V grafu můžeme vidět, že velikosti inhibičních zón byly až do 6 hodiny inkubace relativně neměnné. Poté průměr inhibičních zón začal strmě růst.

Tabulka 18 - Rozmezí breakpointů dle EUCAST pro *Staphylococcus aureus* ATCC 29213

Antibiotikum	Obsah disku [μg]	C [mm] ≥	R [mm] <
Cefoxitin	30	22	22
Klindamycin	2	22	19
Erythromycin	15	21	18
Sulfamethoxazol - trimethoprim	1,25 – 23,75	17	14
Tetracyklin	30	22	19
Ciprofloxacin	5	21	21

V tabulce 18 jsou referenční rozmezí breakpointů, převzaty z tabulek EUCASTu. Pro penicilin nebyly určeny mezní hodnoty velikosti inhibičních zón. Grafy (21 – 24) byly porovnány s tabulkovými hodnotami.

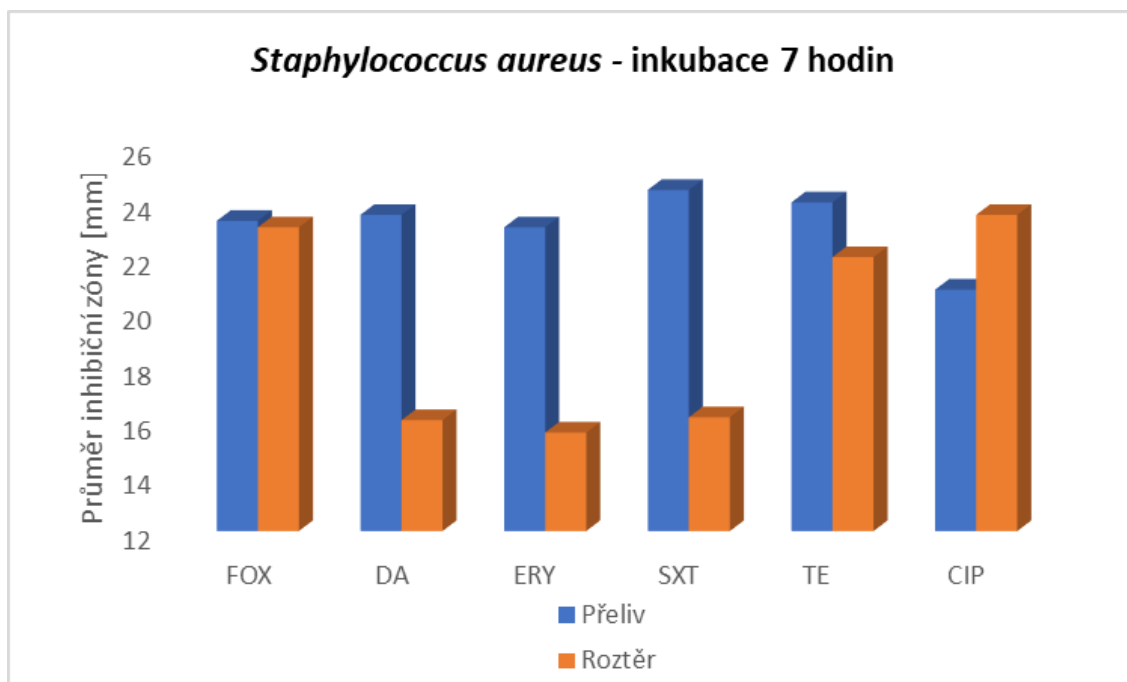
Graf 21 - Porovnání velikostí inhibičních zón po 7 hodinách inkubace *Staphylococcus aureus* - inokulace přelivem a roztěrem na předeřtém kultivačním médiu



Legenda: FOX – Cefoxitin, DA – Klindamycin, ERY – Erythromycin, SXT – Sulfamethoxazol/trimethoprim, TE – Tetracyklin, CIP – Ciprofloxacin

Graf 21 zobrazuje rozdíl mezi inokulací přelivem a inokulací roztěrem na předeřtém kultivačním médiu. *S.aureus* je v obou případech na všechna antibiotika citlivý. U referenčního kmene je odečítání průměrů velikostí inhibičních zón možné již po 7 hodině oběma metodami na předeřtém kultivačním médiu. Kontrolní kmen je při inokulaci přelivem ke všem antibiotikům citlivý, pouze k ciprofloxacinu je středně citlivý. Při inokulaci roztěrem je kmen středně citlivý ke klindamycinu a erythromycinu a citlivý ke zbylým antibiotikům.

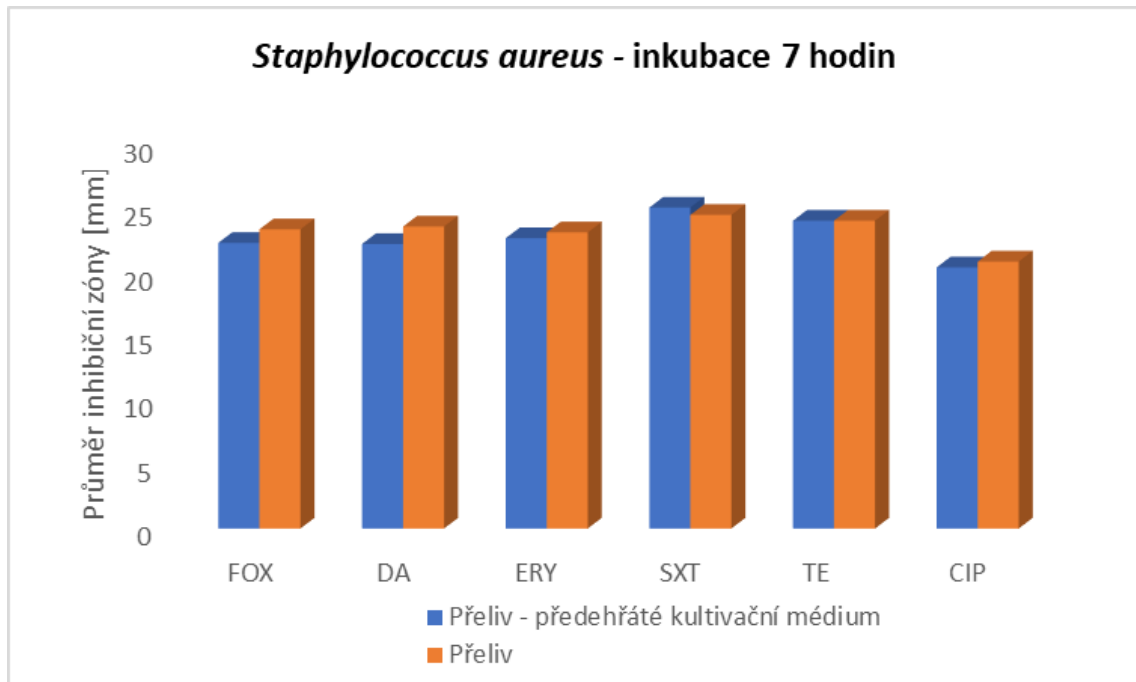
Graf 22 - Porovnání velikostí inhibičních zón po 7 hodinách inkubace *Staphylococcus aureus* - inokulace přelivem a roztěrem



Legenda: FOX – Cefoxitin, DA – Klindamycin, ERY – Erythromycin, SXT – Sulfamethoxazol/Trimethoprim, TE – Tetracyklin, CIP – Ciprofloxacin

V grafu 22 jsou zobrazeny srovnány dvě inokulační techniky, inokulace přelivem a inokulace roztěrem. Na první pohled je vidět, že při inokulaci přelivem jsou inhibiční zóny větší než inhibiční zóny při inokulaci roztěrem. *S. aureus* je při inokulaci přelivem citlivý ke všem antibiotikům s výjimkou ciprofloxacinu, na který je středně citlivý. Při inokulaci roztěrem byl kontrolní kmen rezistentní ke klindamycinu a erythromycinu, středně citlivý k cefoxitinu a sulfamethoxazol/trimethiprimu, citlivý k tetracyklinu a ciprofloxacinu. Při inokulaci roztěrem není možné zkrátit čas odečtu.

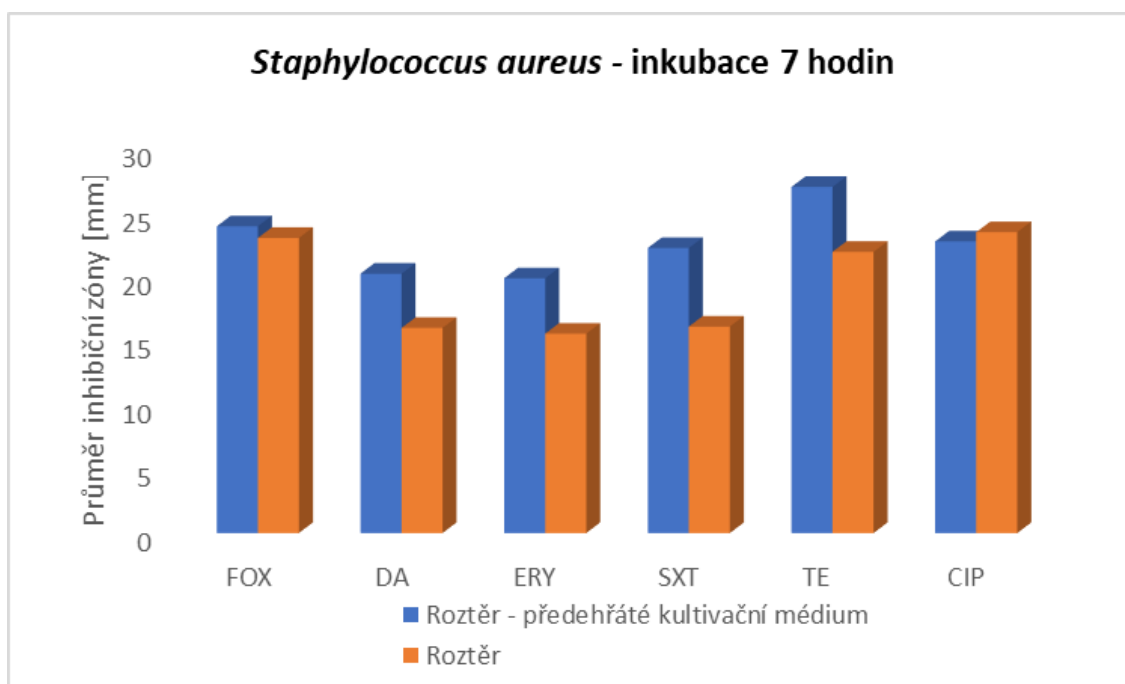
Graf 23 - Porovnání velikostí inhibičních zón po 7 hodinách inkubace *Staphylococcus aureus* - inokulace přelivem s přehřátým kultivačním médiem a nepřehřátým kultivačním médiem



Legenda: FOX – Cefoxitin, DA – Klindamycin, ERY – Erythromycin, SXT – Sulfamethoxazol/Trimethoprim, TE – Tetracyklin, CIP – Ciprofloxacin

V grafu 23 je srovnána inokulace přelivem na přehřátých a nepřehřátých kultivačních médiích. Rozdíly v teplotě kultivačního média v tomto případě nemají velký vliv na velikost inhibičních zón. Při inokulaci přelivem byl na přehřátém i nepřehřátém kultivačním médiu *S. aureus* citlivý ke všem antibiotikům, pouze k ciprofloxacinu byla prokázána pouze střední citlivost.

Graf 24 - Porovnání velikostí inhibičních zón po 7 hodinách inkubace *Staphylococcus aureus* - inokulace roztěrem s přehřátým kultivačním médiem a nepřehřátým kultivačním médiem



Legenda: FOX – Cefoxitin, DA – Klindamycin, ERY – Erythromycin, SXT – Sulfamethoxazol/Trimethoprim, TE – Tetracyklin, CIP – Ciprofloxacin

Graf 24 zobrazuje rozdíly v inokulaci přelivem na kultivačních médiích uchovaných před testem v různých teplotách. V porovnání s grafem 23 je zde rozdíl v teplotách médií důležitý. Při kultivaci kmene na přehřátých médiích byly inhibiční zóny mnohem větší. Tomuhle faktu odpovídá i citlivost kmene k daným antibiotikům. Na přehřátých kultivačních médiích byl *S. aureus* středně citlivý a citlivý ke všem antibiotikům, na rozdíl od kultivačních médií uchovávaných v chladu, kde byla jasná rezistence na klindamycin a erythromycin.

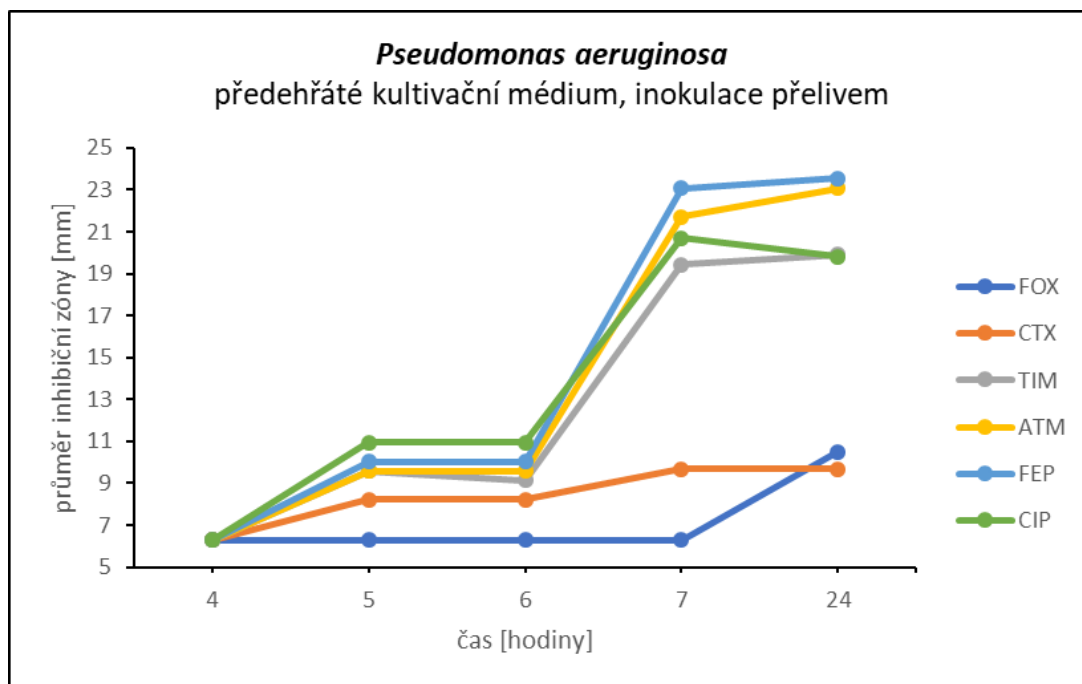
Testování citlivosti referenčního kmene *Pseudomonas aeruginosa* na vybraná antibiotika

Tabulka 19 – Průměr inhibičních zón – *Pseudomonas aeruginosa*, přehřáté kultivační médium, inokulace přelivem

<i>Pseudomonas aeruginosa</i> – přehřáté kultivační médium, inokulace přelivem						
Čas [h]	FOX	CTX	TIM	ATM	FEP	CIP
4	6,3±0	6,3±0	6,3±0	6,3±0	6,3±0	6,3±0
5	6,3±0	8,2±3,3	9,6±5,7	9,6±5,7	10,0±6,5	10,9±8,1
6	6,3±0	8,2±3,3	9,1±4,9	9,6±5,7	10,0±6,5	10,9±8,1
7	6,3±0	9,7±3,5	19,5±0	21,7±1,5	23,1±1,3	20,7±8,4
24	10,5±7,3	9,7±3,5	19,9±0,8	23,1±3,6	23,5±2,7	19,8±7,8

Legenda: FOX – Cefoxitin, CTX – Cefotaxim, TIM – Tikarcilin/klavulanová kyselina, ATM – Aztreonam, FEP – Cefepim, CIP – Ciprofloxacin

Graf 25 – Citlivost *Pseudomonas aeruginosa* na antibiotika – předeřtáé kultivační médium, inokulace přelivem



Legenda: FOX – Cefoxitin, CTX – Cefotaxim, TIM – Tikarcilin/klavulanová kyselina, ATM – Aztreonam, FEP – Cefepim, CIP – Ciprofloxacín

Zdrojová data ke grafu 25 jsou uvedena v tabulce 19. Dále jsou v tabulce zaznamenány hodnoty směrodatných odchylek průměrných inhibičních velikostí. Inhibiční zóna kolem disku cefoxitinu byla viditelná až po 24 hodinách inkubace. Hodnoty velikostí inhibičních zón pro antibiotika CTX, ATM, FEP a CIP jsou mezi 5 a 6 hodinou inkubace úplně stejné včetně směrodatných odchylek. To znamená, že ve všech měřeních byly naměřeny stejné hodnoty pro velikosti inhibičních zón.

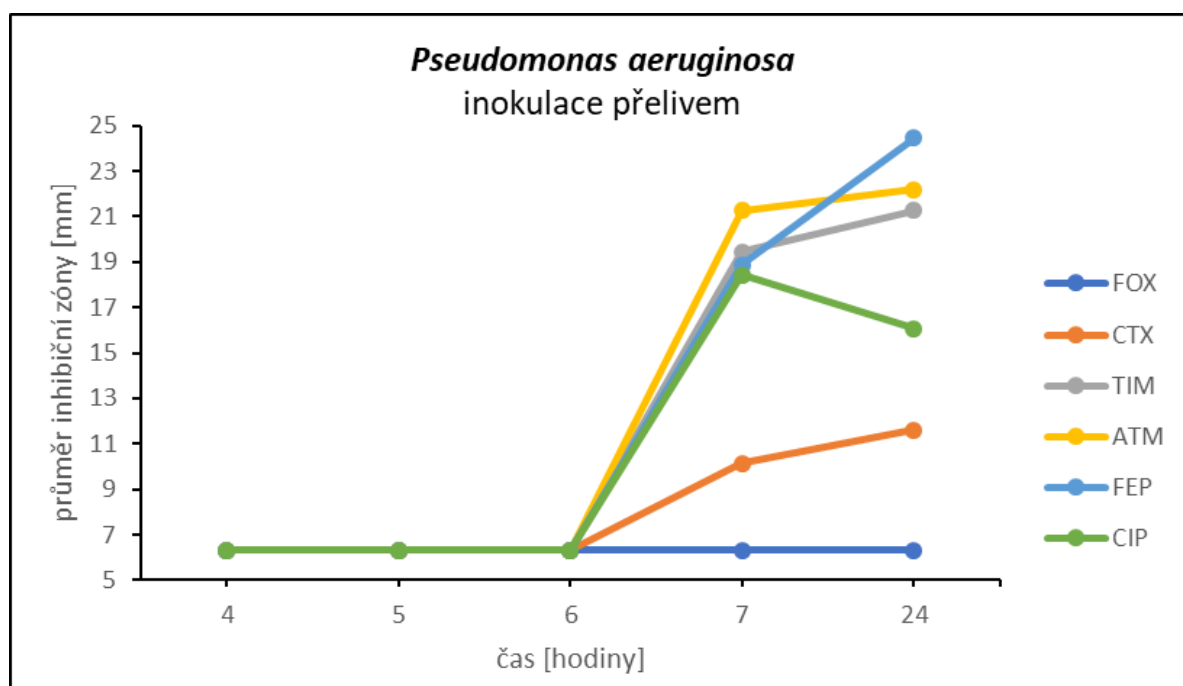
P. aeruginosa ATCC 27853 je čtvrtým testovaným referenčním kmenem. Suspenze inokula byla nejprve inokulována na kultivačním médiu předeřtáém na 37 °C. V grafu 25 můžeme vidět, jak průměry velikostí inhibičních zón nejvíce narůstají mezi 6 a 7 hodinou inkubace. Výjimkou je cefoxitin a cefotaxim, jejichž inhibiční zóna se mezi 6 a 7. hodinou téměř nezmění. Velikost inhibičních zón se od 7 hodiny inkubace příliš nezměnila. Pouze u cefoxitinu byl zaznamenán větší nárůst inhibiční zóny ve 24 hodině inkubace v porovnání se 7 hodinou inkubace.

Tabulka 20 – Průměr inhibičních zón – *Pseudomonas aeruginosa*, inokulace přelivem

<i>Pseudomonas aeruginosa</i> – inokulace přelivem						
Čas [h]	FOX	CTX	TIM	ATM	FEP	CIP
4	6,3±0	6,3±0	6,3±0	6,3±0	6,3±0	6,3±0
5	6,3±0	6,3±0	6,3±0	6,3±0	6,3±0	6,3±0
6	6,3±0	6,3±0	6,3±0	6,3±0	6,3±0	6,3±0
7	6,3±0	10,2±3,9	19,5±0	21,3±1,3	18,9±7,3	18,4±8,1
24	6,3±0	11,6±3,2	21,27±0	22,2±2,0	24,5±1,5	16,1±9,8

Legenda: FOX – Cefoxitin, CTX – Cefotaxim, TIM – Tikarcilin/klavulanová kyselina, ATM – Aztreonam, FEP – Cefepim, CIP – Ciprofloxacín

Graf 26 – Citlivost *Pseudomonas aeruginosa* na antibiotika – inokulace přelivem



Legenda: FOX – Cefoxitin, CTX – Cefotaxim, TIM – Tikarcilin/klavulanová kyselina, ATM – Aztreonam, FEP – Cefepim, CIP – Ciprofloxacín

V Tabulce 20 jsou zaznamenány průměrné hodnoty inhibičních zón se směrodatnou odchylkou každého antibiotika v průběhu času odečtu. Tyto hodnoty byly využity jako zdrojová data k vytvoření grafu 26. Z tabulky je patrné, že pro antibiotikum cefoxitin nebyla změřena inhibiční zóna ani v jedné hodině odečtu. Dále si můžeme všimnout, že u antibiotika tikarcilin/klavulanová kyselina byla všechna měření stejná o čemž vypovídá nulová hodnota směrodatné odchylky.

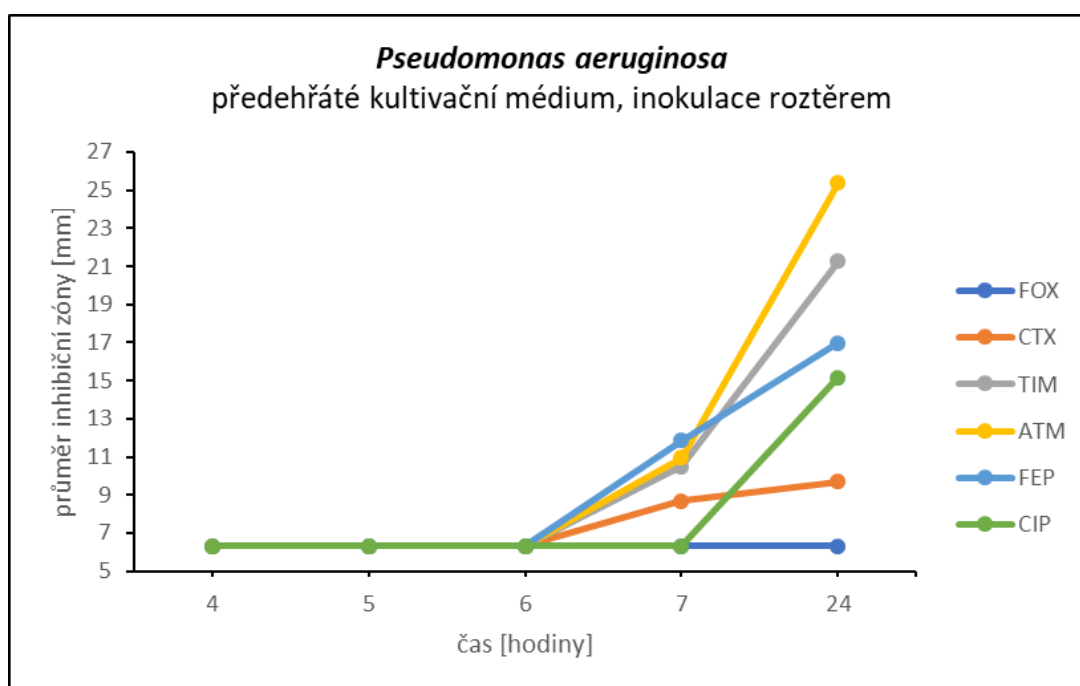
Inokulum bylo v tomto případě nanášeno na kultivační média uchována přes noc v lednici (Graf 26). Velikosti inhibičních zón byly odečteny až po 7 hodinách inkubace. Kolem disku s cefoxitinem se nevytvořila inhibiční zóna ani po 24 hodinách inkubace. U ciprofloxacinu byla po 24 hodině naměřena menší velikost inhibiční zóny než po 7 hodinách inkubace. Důvodem může být přerůstání inhibiční zóny v důsledku hustého nárůstu kmene.

Tabulka 21 – Průměr inhibičních zón – *Pseudomonas aeruginosa*, předeřtávané kultivační médium inokulace roztěrem

<i>Pseudomonas aeruginosa</i> – předeřtávané inkubační médium, inokulace roztěrem						
Čas [h]	FOX	CTX	TIM	ATM	FEP	CIP
4	6,3±0	6,3±0	6,3±0	6,3±0	6,3±0	6,3±0
5	6,3±0	6,3±0	6,3±0	6,3±0	6,3±0	6,3±0
6	6,3±0	6,3±0	6,3±0	6,3±0	6,3±0	6,3±0
7	6,3±0	8,7±4,1	10,5±7,3	10,9±8,1	11,8±9,6	6,3±0
24	6,3±0	9,7±3,5	21,3±4,2	25,4±0,8	16,9±10,7	15,2±8,9

Legenda: FOX – Cefoxitin, CTX – Cefotaxim, TIM – Tikarcilin/klavulanová kyselina, ATM – Aztreonam, FEP – Cefepim, CIP – Ciprofloxacin

Graf 27 – Citlivost *Pseudomonas aeruginosa* na antibiotika – předeřtávané kultivační médium, inokulace roztěrem



Legenda: FOX – Cefoxitin, CTX – Cefotaxim, TIM – Tikarcilin/klavulanová kyselina, ATM – Aztreonam, FEP – Cefepim, CIP – Ciprofloxacin

V Tabulce 21 jsou zaznamenány průměrné hodnoty inhibičních zón se směrodatnou odchylkou každého antibiotika v průběhu času odečtu. Tyto hodnoty byly využity jako zdrojová data k vytvoření grafu 27.

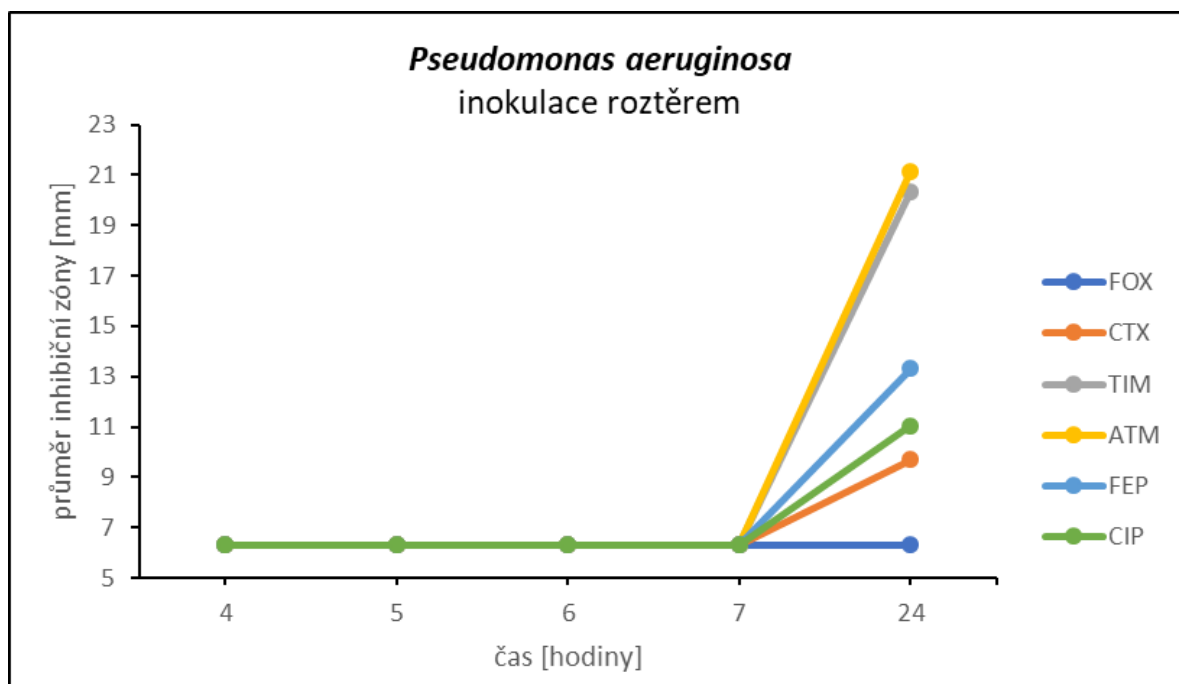
V grafu 27 jsou zaznamenány průměrné hodnoty inhibičních zón při inokulaci roztěrem na kultivačním médiu předehřátém na 37 °C. S výjimkou cefoxitinu, pro který nebyla naměřena inhibiční zóna ani po 24 hodinách inkubace, byly inhibiční zóny viditelné až po 7 hodinách inkubace. Kolem disku s ciprofloxacinem se vytvořila inhibiční zóna až po 24 hodinách inkubace. Cefotaxim byl jediný, u kterého byla průměrná inhibiční zóna po 7 hodinách inkubace téměř shodná s inhibiční zónou po 24 hodinách inkubace.

Tabulka 22 – Průměr inhibičních zón – *Pseudomonas aeruginosa*, inokulace roztěrem

<i>Pseudomonas aeruginosa</i> – inokulace roztěrem						
Čas [h]	FOX	CTX	TIM	ATM	FEP	CIP
4	6,3±0	6,3±0	6,3±0	6,3±0	6,3±0	6,3±0
5	6,3±0	6,3±0	6,3±0	6,3±0	6,3±0	6,3±0
6	6,3±0	6,3±0	6,3±0	6,3±0	6,3±0	6,3±0
7	6,3±0	6,3±0	6,3±0	6,3±0	6,3±0	6,3±0
24	6,3±0	9,7±3,5	20,4±1,6	21,2±8,6	13,3±7,1	11,1±4,8

Legenda: FOX – Cefoxitin, CTX – Cefotaxim, TIM – Tikarcilin/klavulanová kyselina, ATM – Aztreonam, FEP – Cefepim, CIP – Ciprofloxacín

Graf 28 – Citlivost *Pseudomonas aeruginosa* na antibiotika – inokulace roztěrem



Legenda: FOX – Cefoxitin, CTX – Cefotaxim, TIM – Tikarcilin / klavulanová kyselina, ATM – Aztreonam, FEP – Cefepim, CIP – Ciprofloxacín

Jako zdrojová data pro graf 28 jsou uvedeny hodnoty v tabulce 22. Tabulka zobrazuje průměrné hodnoty naměřených inhibičních zón s hodnotami směrodatných odchylek. Jak je patrné z tabulky 22 s výjimkou antibiotika FOX byly inhibiční zóny naměřeny až po 24 hodinách inkubace.

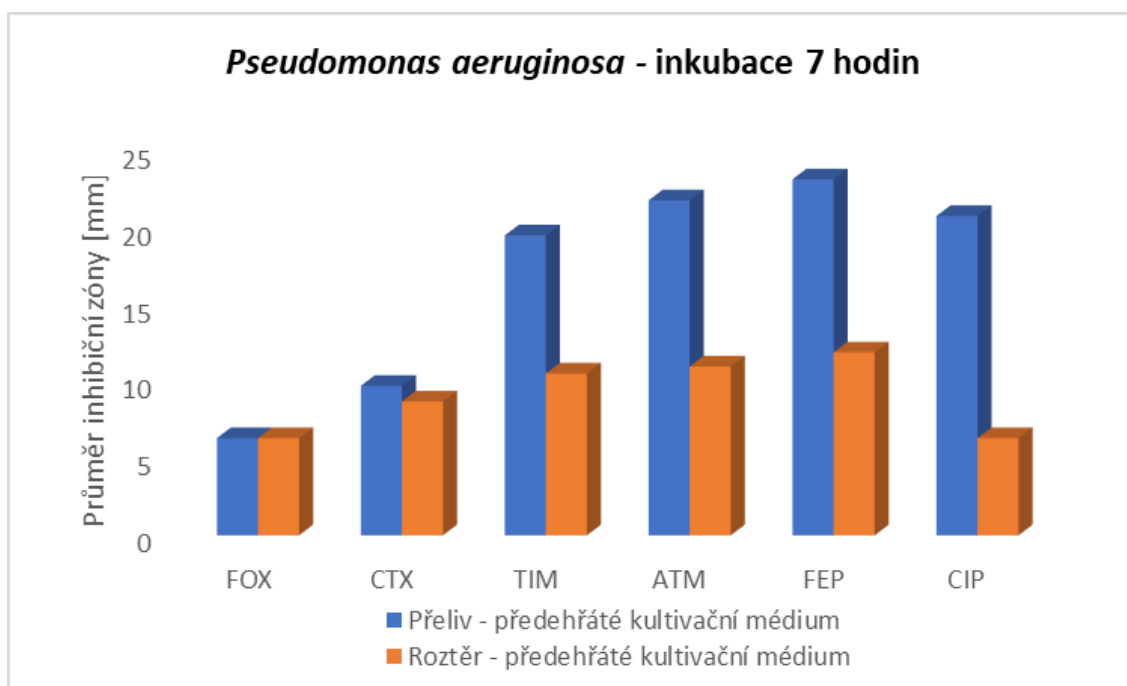
V grafu 28 jsou zaznamenány průměrné hodnoty inhibičních zón při inokulaci roztěrem. Inhibiční zóny v tomto případě byly viditelné až po 24 hodinách inkubace, kromě inhibiční zóny cefoxitinu. U tohoto antibiotika se inhibiční zóna nevytvořila vůbec.

Tabulka 23 - Rozmezí breakpointů dle EUCAST pro *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853

Antibiotikum	Obsah disku [μg]	C [mm] \geq	R [mm] <
Cefoxitin	-	-	-
Cefotaxim	-	-	-
Tikarcilin/klavulanová kyselina	75 - 10	18	18
Aztreonam	30	50	16
Cefepim	30	21	21
Ciprofloxacin	5	26	26

V tabulce 23 jsou referenční rozmezí breakpointů, převzaty z tabulek EUCASTu. Pro cefoxitin a cefotaxim nebyly určeny mezní hodnoty velikosti inhibičních zón. Grafy (29 – 32) byly porovnány s tabulkovými hodnotami.

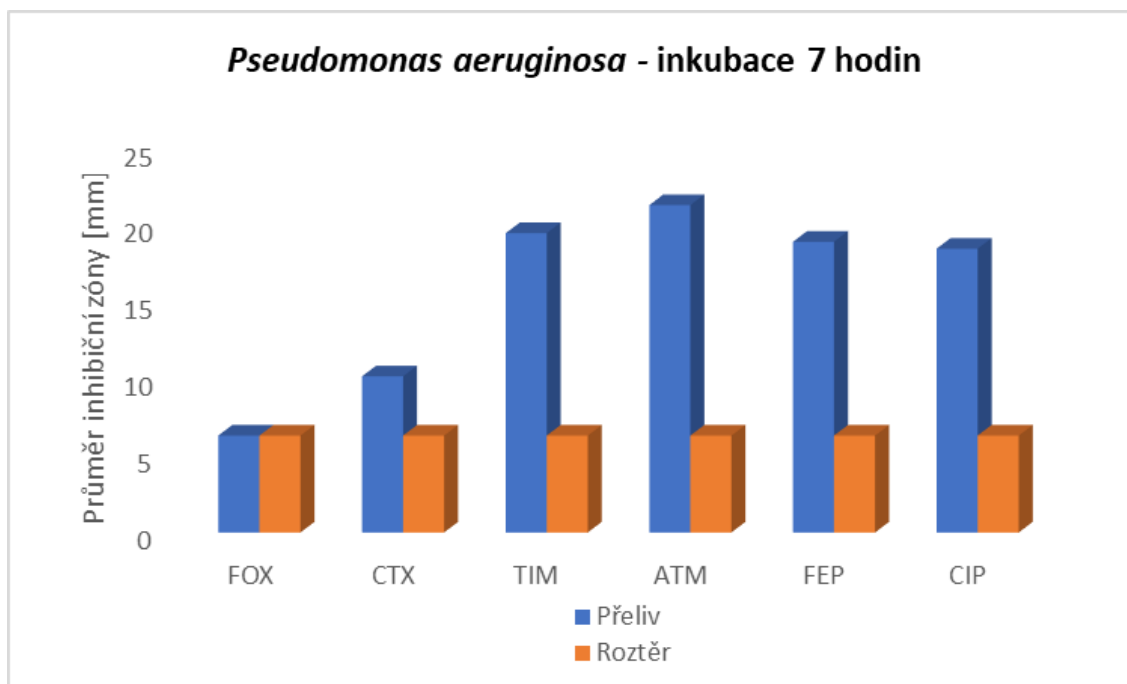
Graf 29 - Porovnání velikostí inhibičních zón po 7 hodinách inkubace *Pseudomonas aeruginosa* - inokulace přelivem a roztěrem na předehřátém kultivačním médiu



Legenda: FOX – Cefoxitin, CTX – Cefotaxim, TIM – Tikarcilin/klavulanová kyselina, ATM – Aztreonam, FEP – Cefepim, CIP – Ciprofloxacin

V grafu 29 vidíme srovnání mezi inokulací přelivem a roztěrem na předehřátých kultivačních médiích. Je patrné, že při inokulaci přelivem byly průměry inhibičních zón větší než u inokulace roztěrem. *P. aeruginosa* je při inokulaci roztěrem rezistentní ke všem antibiotikům. U inokulace přelivem je středně citlivá k tikarcilin/klavulanové kyselině, aztreonamu a cefepimu. Pouze k ciprofloxacinu je rezistentní. Dřívější odečet výsledných průměrů inhibičních zón je v tuto hodinu možný pouze při inokulaci přelivem.

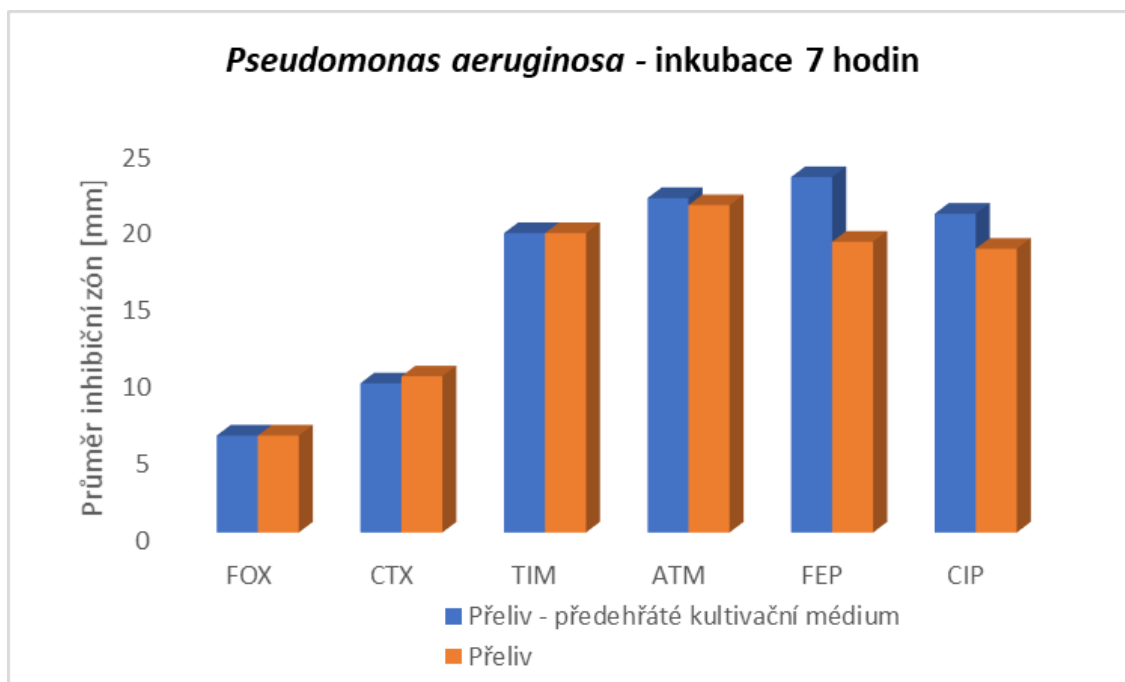
Graf 30 - Porovnání velikostí inhibičních zón po 7 hodinách inkubace *Pseudomonas aeruginosa* - inokulace přelivem a roztěrem



Legenda: FOX – Cefoxitin, CTX – Cefotaxim, TIM – Tikarcilin/klavulanová kyselina, ATM – Aztreonam, FEP – Cefepim, CIP – Ciprofloxacin

V grafu 30 je porovnána inokulace přelivem a roztěrem na kultivačních médiích uchovaných před testem přes noc v lednici. Stejně jako v grafu 29 i zde si můžeme všimnout, že inhibiční zóny při inokulaci přelivem mají větší průměr než inhibiční zóny při inokulaci roztěrem. *P. aeruginosa* je i v tomto případě u inokulace roztěrem rezistentní ke všem antibiotikům. Rezistence je úplná, protože se kolem antibiotických disků nevytvořila žádná inhibiční zóna. U metody inokulace přelivem je kmen středně citlivý k tikarcilin-klavulanátu a aztreonamu. Rezistenci vykazuje na cefepim a ciprofloxacin. Inokulace přelivem je v porovnání výsledných hodnot lepší, ale pro odečet po 7 hodině inkubace není dostatečně vhodná.

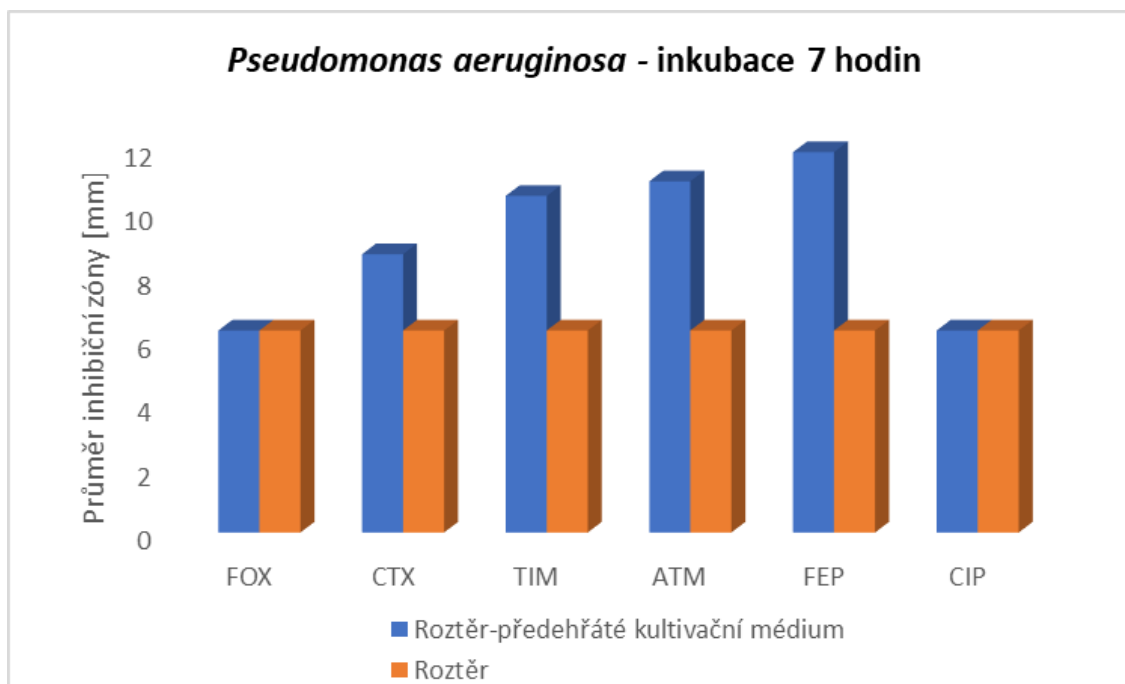
Graf 31 - Porovnání velikostí inhibičních zón po 7 hodinách inkubace *Pseudomonas aeruginosa* - inokulace přelivem s předeřtým kultivačním médiem a nepředeřtým kultivačním médiem



Legenda: FOX – Cefoxitin, CTX – Cefotaxim, TIM – Tikarcilin/klavulanová kyselina, ATM – Aztreonam, FEP – Cefepim, CIP – Ciprofloxacin

Porovnání inokulace přelivem na předeřtém kultivačním médiu a nepředeřtém kultivačním médiu zobrazuje graf 31. V tomto grafu si lze všimnout, že teplota kultivačního média má malý vliv pouze na antibiotikum cefepim. V celkovém měřítku je ale zanedbatelná. Průměry inhibičních zón jsou téměř totožné. Rozdíl v citlivosti referenčního kmene je u antibiotika cefepim, který je na předeřtém kultivačním médiu středně citlivý. Na kultivačním médiu bez předeřtí je kmen rezistentní.

Graf 32 - Porovnání velikostí inhibičních zón po 7 hodinách inkubace *Pseudomonas aeruginosa* - inokulace roztěrem s přehřátým kultivačním médiem a nepřehřátým kultivačním médiem



Legenda: FOX – Cefoxitin, CTX – Cefotaxim, TIM – Tikarcilin/klavulanová kyselina, ATM – Aztreonam, FEP – Cefepim, CIP – Ciprofloxacin

Porovnání inokulací roztěrem na kultivačních médiích přehřátých i nepřehřátých zobrazuje graf 32. Je zřejmé, že v tomto případě má teplota na testování vliv. Na přehřátých kultivačních médiích byl viditelný bakteriální nárůst a inhibiční zóny mohly být odečteny. Na zbylých médiích byl nárůst *P.aeruginosa* slabý a přístroj nedokázal odečíst průměry inhibičních zón. Metoda roztěru není vhodná pro dřívější získávání výsledků.

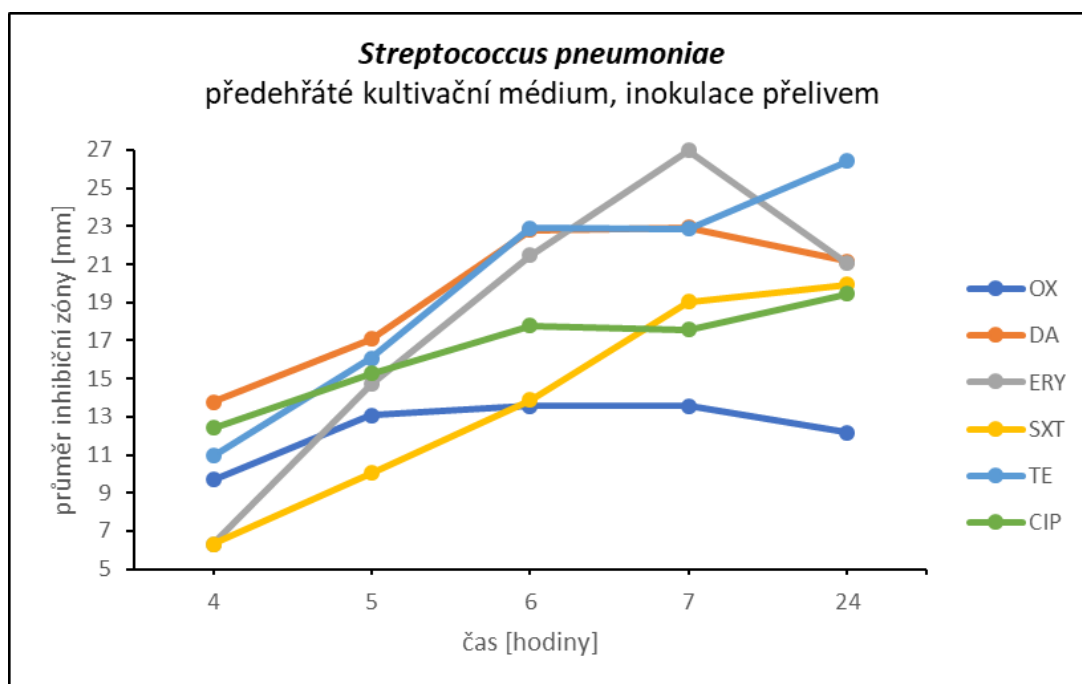
Testování citlivosti referenčního kmene *Streptococcus pneumoniae* na vybraná antibiotika

Tabulka 24 – Průměr inihibiční zóny – *Streptococcus pneumoniae*, přehřáté kultivační médium, inokulace přelivem

<i>Streptococcus pneumoniae</i> – přehřáté kultivační médium, inokulace přelivem						
Čas [h]	OX	DA	ERY	SXT	TE	CIP
4	9,7±3,5	13,8±7,5	6,3±0	6,3±0	10,9±8,1	12,4±6,2
5	13,1±0,9	17,1±6,4	14,7±8,4	10,0±6,5	16,1±9,8	15,3±5,2
6	13,5±0,8	22,8±1,5	21,5±8,9	13,9±7,6	22,9±9,6	17,8±6,6
7	13,5±0,8	22,9±1,3	26,9±1,1	19,0±7,7	22,9±9,6	17,6±6,6
24	12,2±0	21,2±2,6	21,0±4,7	19,9±3,9	26,4±3,3	19,4±3,4

Legenda: OX - Oxacilin, DA – Clindamycin, ERY – Erythromycin, SXT – Sulfamethoxazol/trimethoprim, TE – Tetracyklin, CIP – Ciprofloxacin

Graf 33 – Citlivost *Streptococcus pneumoniae* na antibiotika – předeřáté kultivační médium, inokulace přelivem



Legenda: OX - Oxacilin, DA - Clindamycin, ERY - Erythromycin, SXT - Sulfamethoxazol/trimethoprim, TE - Tetracyklin, CIP - Ciprofloxacin

V Tabulce 24 jsou zaznamenány průměrné hodnoty inhibičních zón se směrodatnou odchylkou každého antibiotika v průběhu času odečtu. Tyto hodnoty byly využity jako zdrojová data k vytvoření grafu 33. Můžeme si všimnout, že u oxacilinu jsou nejmenší hodnoty směrodatných odchylek, což znamená, že velikosti inhibičních zón byly nejpodobnější.

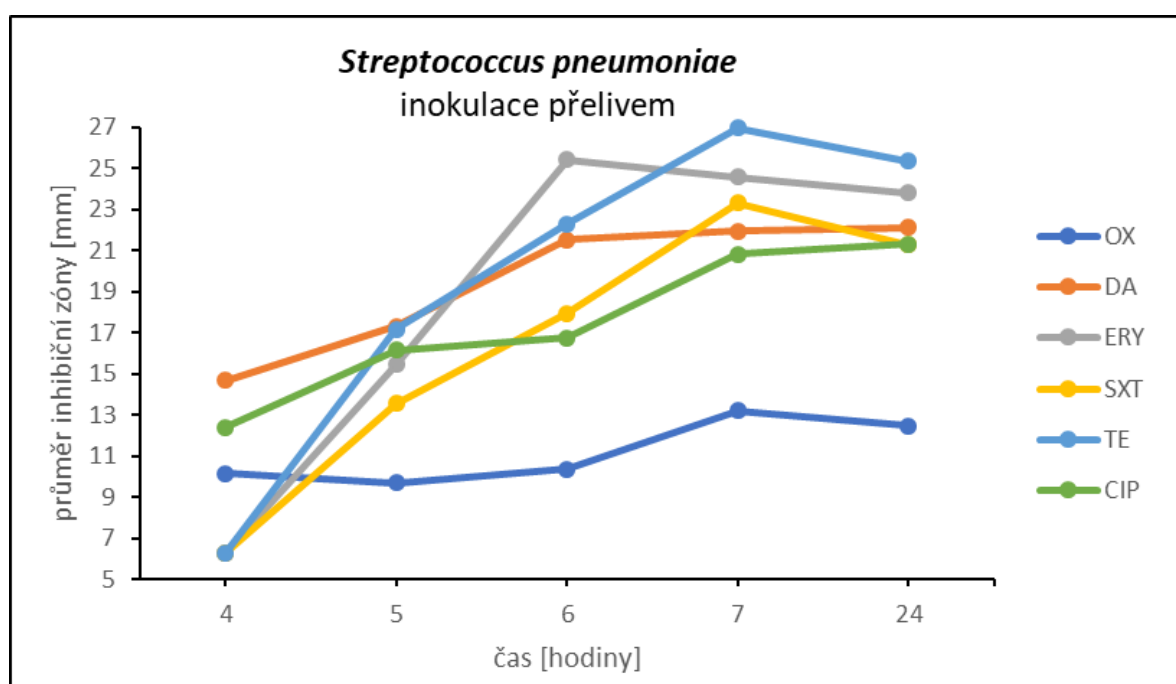
S. pneumoniae ATCC 49619 je posledním testovaným referenčním kmenem. Suspenze inokula byla nejprve inokulována na kultivačním médiu předeřátém na 37 °C. V grafu 33 vidíme že průměrná inhibiční zóna mezi 6 a 7 hodinou inkubace rostla nejméně. Výjimku tvoří erythromycin a sulfamethoxazol/trimethoprim. Inhibiční zóny těchto antibiotik se mezi 6 a 7 hodinou inkubace docela zvětšily. Po 7 hodinách inkubace se velikosti inhibičních zón u antibiotik oxacilin, klindamycin, sulfamethoxazol/trimethoprim a ciprofloxacin dále příliš nezvětšovaly. Průměrná inhibiční zóna erythromycinu se po 7 hodinách inkubace výrazně zmenšila, a naopak inhibiční zóna tetracyklinu se po 7 hodinách inkubace výrazně zvětšila.

Tabulka 25 – Průměr inhibiční zóny – *Streptococcus pneumoniae*, inokulace přelivem

<i>Streptococcus pneumoniae</i> – inokulace přelivem						
Čas [h]	OX	DA	ERY	SXT	TE	CIP
4	10,2±3,9	14,7±8,4	6,3±0	6,3±0	6,3±0	12,4±6,2
5	9,7±3,5	17,3±6,5	15,5±9,2	13,6±7,3	17,2±10,9	16,2±5,9
6	10,4±2,4	21,5±0,9	25,4±1,5	17,9±7,0	22,3±9,3	16,8±6,1
7	13,2±0,8	21,9±1,2	24,6±2,7	23,3±1,6	26,9±1,6	20,8±1,0
24	12,5±0,5	22,1±3,4	23,8±6,6	21,3±4,6	25,4±7,1	21,3±1,4

Legenda: OX - Oxacillin, DA – Clindamycin, ERY – Erythromycin, SXT – Sulfamethoxazol/trimethoprim, TE – Tetracyklin, CIP – Ciprofloxacin

Graf 34 – Citlivost *Streptococcus pneumoniae* na antibiotika – inokulace přelivem



Legenda: OX - Oxacillin, DA – Clindamycin, ERY – Erythromycin, SXT – Sulfamethoxazol/trimethoprim, TE – Tetracyklin, CIP – Ciprofloxacin

V Tabulce 25 jsou zaznamenány průměrné hodnoty inhibičních zón se směrodatnou odchylkou každého antibiotika v průběhu času odečtu. Tyto hodnoty byly využity jako zdrojová data k vytvoření grafu 34. Nejmenší směrodatné odchylky jsou u všech antibiotik po 7 hodinách inkubace. V této době, byly naměřeny u každého antibiotika téměř totožné hodnoty průměrů inhibičních zón.

V grafu 34 bylo inokulum nanášeno na kultivační média uchována přes noc v lednici. Průměry inhibičních zón se po 7 hodinách inkubace téměř nemění s výjimkou antibiotika

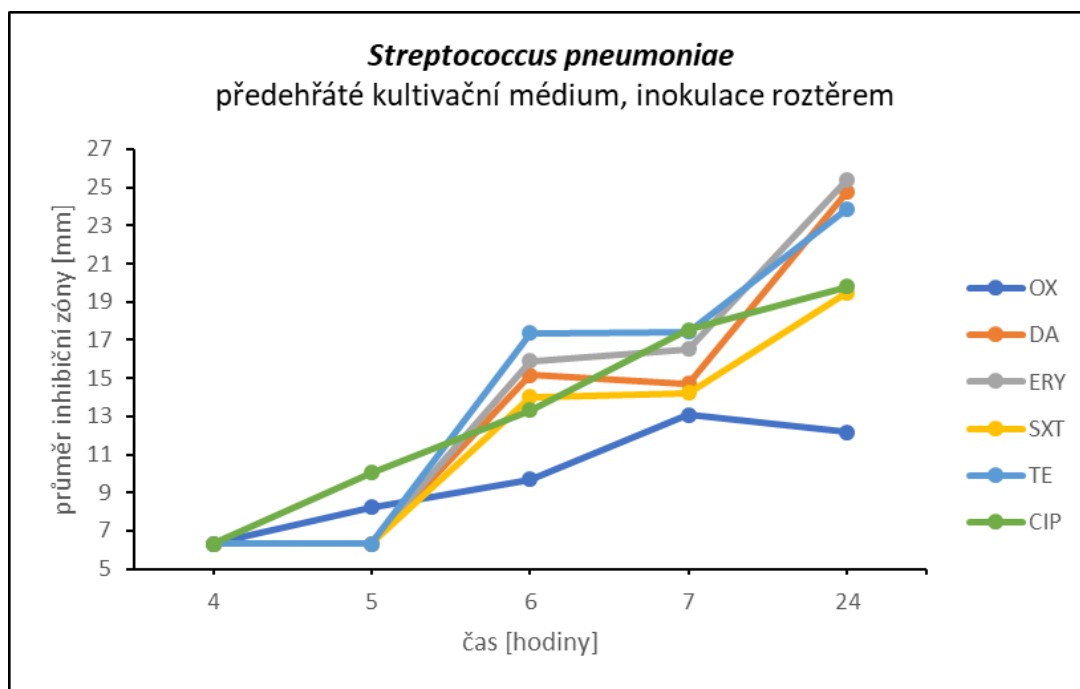
sulfamethoxazol/trimethoprim. U tohoto antibiotika dochází k výraznému zmenšení průměru inhibiční zóny po 7 hodinách inkubace.

Tabulka 26 – Průměr inhibičních zón – *Streptococcus pneumoniae*, předeřtáé kultivační médium, inokulace roztěrem

<i>Streptococcus pneumoniae</i> – předeřtáé kultivační médium, inokulace roztěrem						
Čas [h]	OX	DA	ERY	SXT	TE	CIP
4	6,3±0	6,3±0	6,3±0	6,3±0	6,3±0	6,3±0
5	8,2±3,3	6,3±0	6,3±0	6,3±0	6,3±0	10,0±6,5
6	9,7±3,5	15,2±8,9	15,9±9,7	14,0±7,8	17,4±11,1	13,3±7,1
7	13,1±0,9	14,7±8,4	16,5±10,2	14,2±7,9	17,4±11,1	17,5±6,6
24	12,2±0	24,8±1,3	25,4±4,5	19,5±7,6	23,9±10,7	19,8±3,5

Legenda: OX - Oxacillin, DA - Clindamycin, ERY - Erythromycin, SXT - Sulfamethoxazol/trimethoprim, TE - Tetracyklin, CIP - Ciprofloxacin

Graf 35 – Citlivost *Streptococcus pneumoniae* na antibiotika – předeřtáé kultivační médium, inokulace roztěrem



Legenda: OX - Oxacillin, DA - Clindamycin, ERY - Erythromycin, SXT - Sulfamethoxazol/trimethoprim, TE - Tetracyklin, CIP - Ciprofloxacin

V Tabulce 26 jsou zaznamenány průměrné hodnoty inhibičních zón se směrodatnou odchylkou každého antibiotika v průběhu času odečtu. Tyto hodnoty byly využity jako zdrojová data k vytvoření grafu 35.

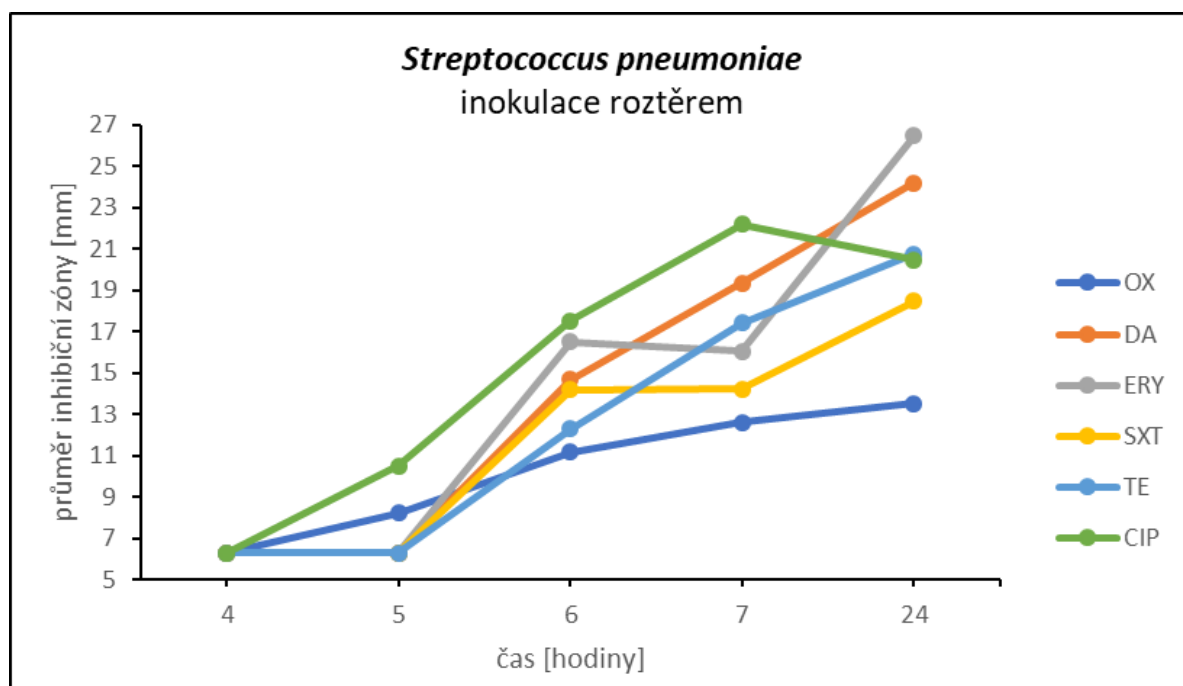
Suspenze referenčního kmene byla v tomto případě inokulována roztěrem na kultivační médium predehřáté na 37 °C. V grafu 35 můžeme vidět jak se inhibiční zóny erythromycinu, klindamycinu, tetracyklinu a sulfamethoxazole/trimethoprimu po 7 hodině inkubace zvětšují. Naopak velikost inhibiční zóny oxacilinu je po 24 hodinách inkubace menší než po 7 hodinách inkubace.

Tabulka 27 – Průměr inhibičních zón – *Streptococcus pneumoniae*, inokulace roztěrem

<i>Streptococcus pneumoniae</i> – inokulace roztěrem						
Čas [h]	OX	DA	ERY	SXT	TE	CIP
4	6,3±0	6,3±0	6,3±0	6,3±0	6,3±0	6,3±0
5	8,2±3,3	6,3±0	6,3±0	6,3±0	6,3±0	10,5±7,3
6	11,2±2,9	14,7±8,4	16,5±10,2	14,2±7,9	12,3±10,4	17,5±6,5
7	12,6±0,8	19,3±7,8	16,1±9,8	14,2±7,9	17,4±11,1	22,2±1,6
24	13,5±0,8	24,2±1,5	26,5±3,6	18,5±7,1	20,7±10,6	10,5±2,7

Legenda: OX - Oxacillin, DA – Clindamycin, ERY – Erythromycin, SXT – Sulfamethoxazol/trimethoprim, TE – Tetracyklin, CIP – Ciprofloxacin

Graf 36 – Citlivost *Streptococcus pneumoniae* na antibiotika – inokulace roztěrem



Legenda: OX - Oxacillin, DA – Clindamycin, ERY – Erythromycin, SXT – Sulfamethoxazol/trimethoprim, TE – Tetracyklin, CIP – Ciprofloxacin

V Tabulce 27 jsou zaznamenány průměrné hodnoty inhibičních zón se směrodatnou odchylkou každého antibiotika v průběhu času odečtu. Tyto hodnoty byly využity jako zdrojová data k vytvoření grafu 36.

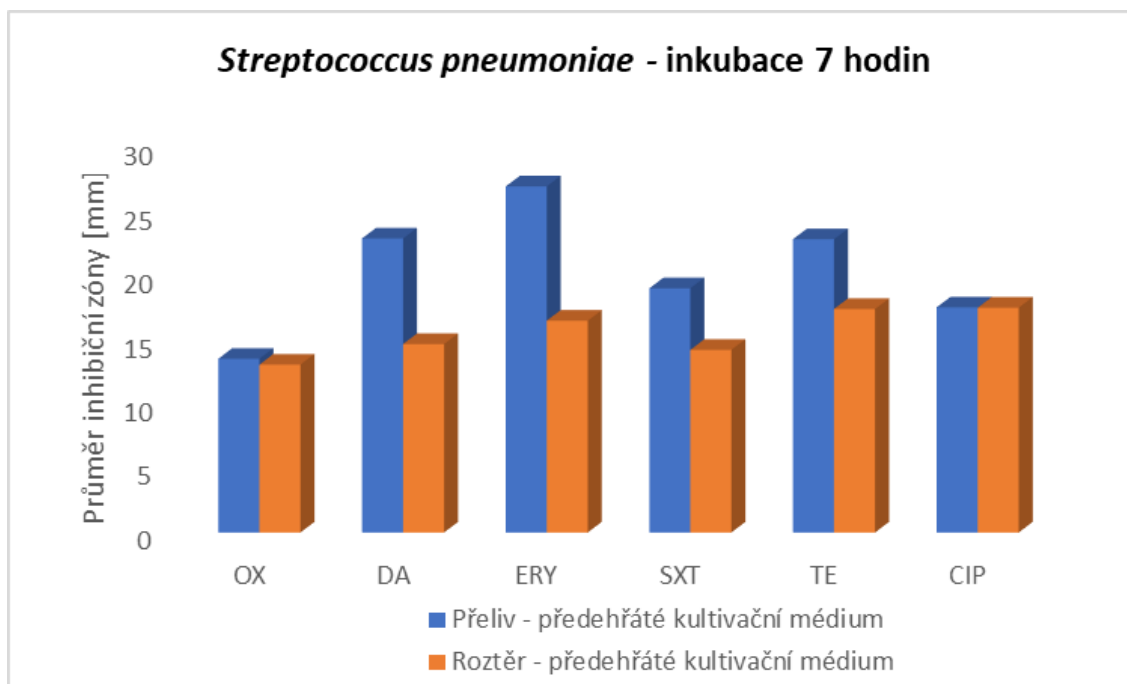
V grafu 36 jsou zaznamenány průměrné hodnoty inhibičních zón při inokulaci roztěrem na kultivační médium uchované přes noc v lednici. Stejně jako u grafu 35 se velikost inhibiční zóny erythromycinu po 7 hodinách inkubace výrazně zvětšila. Velikost inhibiční zóny ciprofloxacinu byla po 24 hodinách inkubace menší než po 7 hodinách inkubace. Velikost inhibiční zóny oxacilinu se od 7 hodiny inkubace příliš nezměnila.

Tabulka 28 - Rozmezí breakpointů dle EUCAST pro *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619

Antibiotikum	Obsah disku [µg]	C [mm] ≥	R [mm] <
Oxacilin	1	20	-
Klindamycin	2	19	19
Erythromycin	15	22	19
Sulfamethoxazol - trimethoprim	1,25 – 23,75	18	15
Tetracyklin	30	25	22
Ciprofloxacin	-	-	-

V tabulce 28 jsou referenční rozmezí breakpointů, převzaty z tabulek EUCASTu. Pro cefoxitin a cefotaxim nebyly určeny mezní hodnoty velikosti inhibičních zón. Grafy (37 – 40) byly porovnány s tabulkovými hodnotami. U ciprofloxacinu nebyly určeny mezní hodnoty pro citlivost. U oxacilinu nebyla stanovena hranice pro rezistenci.

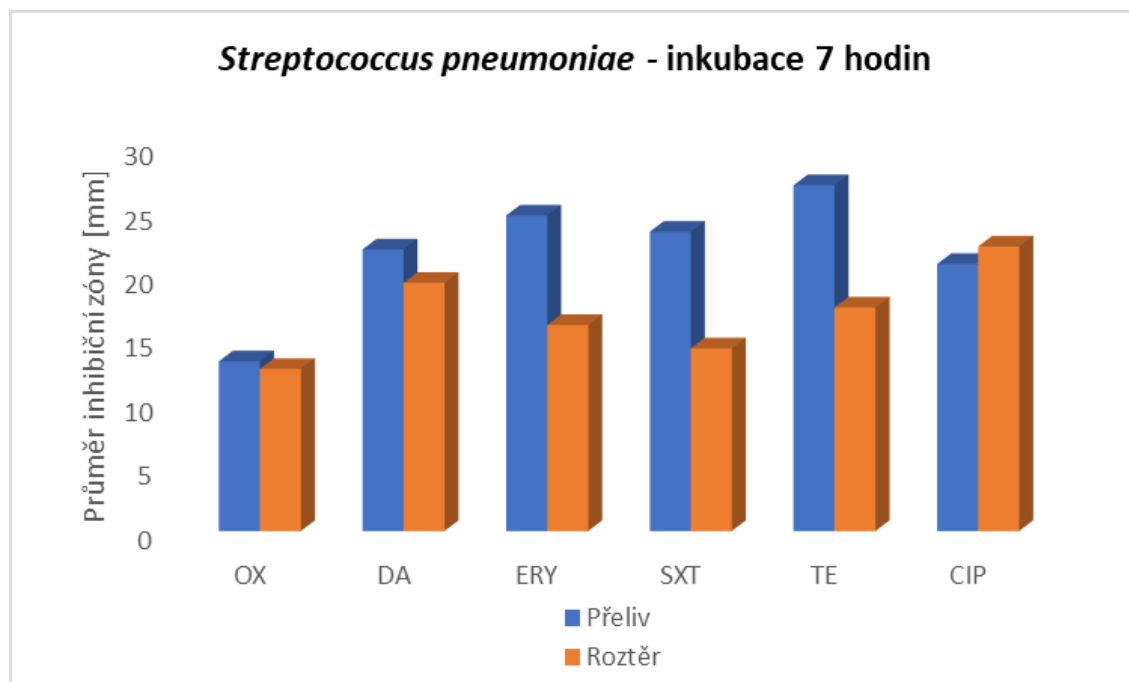
Graf 37 - Porovnání velikostí inhibičních zón po 7 hodinách inkubace *Streptococcus pneumoniae* - inokulace přelivem a roztěrem na předeřtém kultivačním médiu



Legenda: OX - Oxacillin, DA - Clindamycin, ERY - Erythromycin, SXT - Sulfamethoxazol/trimethoprim, TE - Tetracyklin, CIP - Ciprofloxacin

Graf 37 porovnává průměrné hodnoty inhibičních zón při inokulaci přelivem a roztěrem na předeřtých kultivačních médiích. Při inokulaci přelivem narostly kolem disků větší inhibiční zóny než při inokulaci roztěrem. S výjimkou oxacilinu je *Str. pneumoniae* citlivý ke všem antibiotikům v případě, že je inokulace provedena přelivem. K ciprofloxacinu je streptokok středně citlivý. Při inokulaci roztěrem je kontrolní kmen ke všem antibiotikům rezistentní. Inhibiční zóny kolem disků se vytvořily, ale jejich průměry nebyly dostatečně velké.

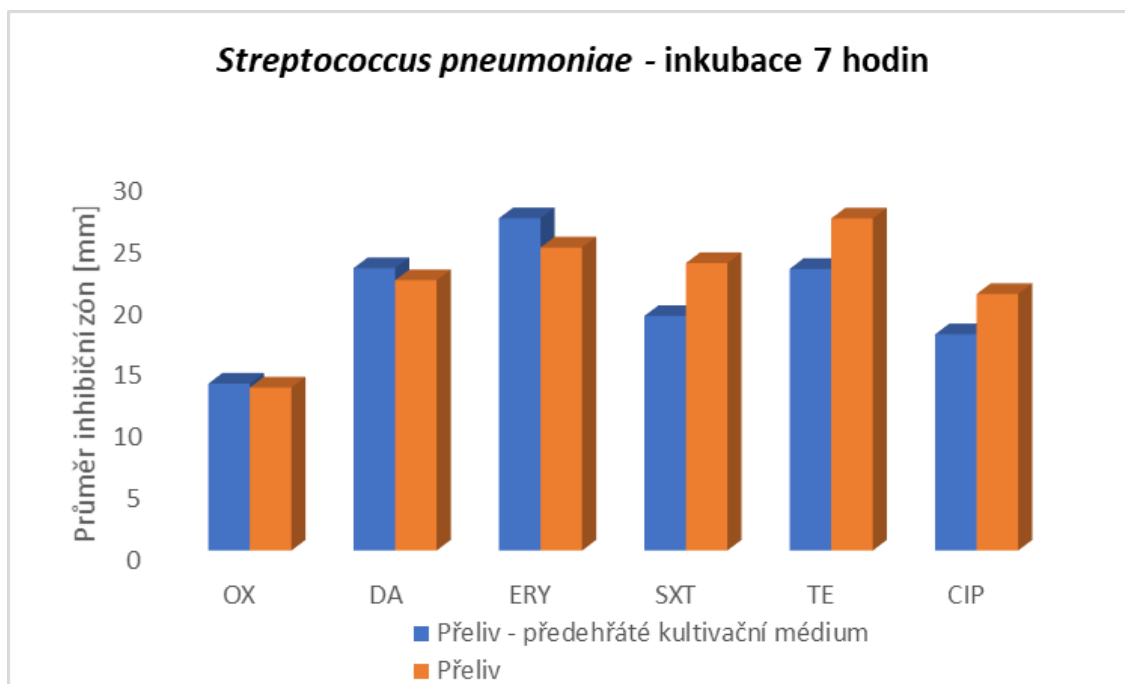
Graf 38 - Porovnání velikostí inhibičních zón po 7 hodinách inkubace *Streptococcus pneumoniae* - inokulací přelivem a roztěrem



Legenda: OX - Oxacillin, DA - Clindamycin, ERY - Erythromycin, SXT - Sulfamethoxazol/trimethoprim, TE - Tetracyklin, CIP - Ciprofloxacin

Graf 38 představuje srovnání mezi způsoby inokulace. Při inokulaci přelivem byly stejně jako v předchozím grafu (graf 37) naměřeny větší průměry inhibičních zón. *Str. pneumoniae* je rezistentní pouze k oxacilinu, ke všem ostatním antibiotikům je citlivý, pokud je inokulace provedena přelivem. Při inokulaci roztěrem je kmen na všechna antibiotika rezistentní. Rozdíl v inokulaci má velký vliv na výsledky testování.

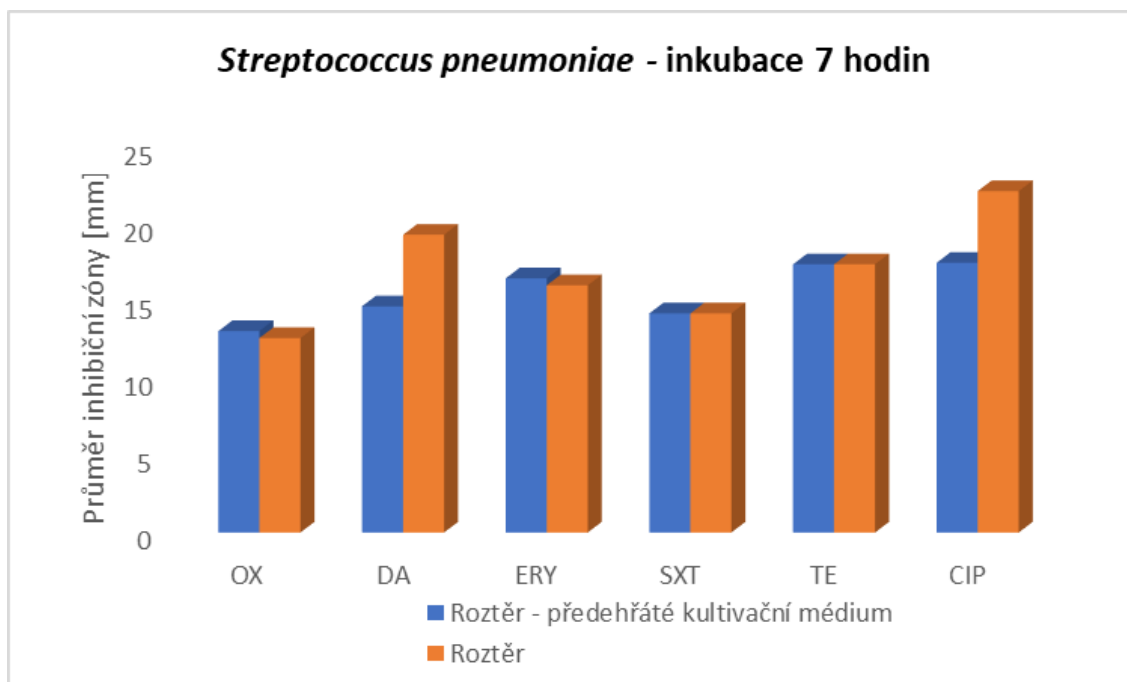
Graf 39 - Porovnání velikostí inhibičních zón po 7 hodinách inkubace – *Streptococcus pneumoniae* inokulace přelivem s předehřátým kultivačním médiem a nepředehřátým kultivačním médiem



Legenda: OX - Oxacillin, DA – Clindamycin, ERY – Erythromycin, SXT – Sulfamethoxazol/trimethoprim, TE – Tetracyklin, CIP – Ciprofloxacin

Srovnání jednoho způsobu inokulace na předehřátém kultivačním médiu a nepředehřátém kultivačním médiu uvádí graf 39. Rozdíly v teplotách kultivačních médií mají pouze malý vliv na výsledné hodnoty průměrů inhibičních zón. Jediným rozdílem je citlivost kmene k tetracyklinu. Na předehřátém médiu je *Str. pneumoniae* středně citlivý v porovnání s ostatními kultivačními médii, kde je citlivý. Metoda přelivu je v případě kmene *Str. pneumoniae* vhodná pro odečet průměrů inhibičních zón již po 7 hodině inkubace.

Graf 40 - Porovnání velikostí inhibičních zón po 7 hodinách inkubace *Streptococcus pneumoniae* - inokulace roztěrem s přehřátým kultivačním médiem a nepřehřátým kultivačním médiem



Legenda: OX - Oxacillin, DA - Clindamycin, ERY - Erythromycin, SXT - Sulfamethoxazol/trimethoprim, TE - Tetracyklin, CIP - Ciprofloxacin

Při inokulaci roztěrem nebyla teplota kultivačního média významná pro odečet průměrů inhibičních zón (graf 40). *Str. pneumoniae* je na všechna antibiotika rezistentní bez rozdílu teploty kultivačního média. Inokulace roztěrem není vhodná u referenčního kmene *Streptococcus pneumoniae* pro zkrácení času k získání výsledků.

ZÁVĚR

Cílem této diplomové práce byla úprava podmínek diskové difúzní metody za účelem zkrácení doby odečtu výsledků. Testovány byly referenční kmeny *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*. Změna podmínek proběhla v kroku inokulace. Polovina kultivačních médií byla předeřtá na teplotu 37 °C a z inkubátoru byla vyndána těsně před inokulací referenčního kmene. Druhá polovina kultivačních médií byla skladována v lednici při teplotě 4 °C a před samotným testem byla vytemperována na laboratorní teplotu. Inokulace proběhla dvojím způsobem, metodou roztěru a přelivu.

Pro referenční kmen *Escherichia coli* ATCC 25922 jsou výsledky při inokulaci roztěrem vhodné pro odečet výsledků po 7 hodinách inkubace. V případě tohoto mikroorganismu není důležité předeřtí kultivačního média což je dáno tím, že se jedná o nenáročný rychle rostoucí druh bakterie. V případě inokulace přelivem je bakteriální nárůst masivní a velikosti inhibičních zón jsou přerostlé, proto se bakterie jeví jako rezistentní.

Testování citlivosti referenčního kmene *Haemophilus influenzae* ATCC 49766 na antibiotika není možné zkrátit. Kmen byl vyhodnocen jako rezistentní na všechna testovaná antibiotika ve všech modifikacích metody. Důvodem této rezistence je to, že při inkubaci kratší než 24 hodin je nárůst testovaného kmene na kultivačním médiu velmi slabý, a tudíž není možné přístrojem BACMED změřit velikost inhibičních zón a výsledek se jeví jako rezistentní.

Dřívější odečet citlivosti referenčního kmene *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 je možný pouze při správně zvolené metodě inokulace. Při inokulaci roztěrem byl kmen po 7 hodinách inkubace vyhodnocen jako rezistentní. Je to dáno slabým nárůstem inokula, což neumožňuje přístroji odečíst skutečnou velikost inhibičních zón. Vhodnou technikou očkování kultivačních médií se u *Pseudomonas aeruginosa* jeví metoda inokulace přelivem. Teplota média před inokulací neměla příliš velký vliv na velikost inhibičních zón a samotné testování.

Testování citlivosti referenčního kmene *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 je ovlivněno opět způsobem inokulace kultivačního média. Při inokulaci přelivem bylo možné po 7 hodinách inkubace odečíst velikost inhibičních zón, které se při prodloužené inkubaci již téměř neměnily. Referenční kmen byl citlivý na všechna antibiotika. Vliv počáteční teploty kultivačního média na čas odečtu byl zanedbatelný. Při inokulaci roztěrem docházelo k pomalému nárůstu testovaného kmene na kultivačním médiu, a tudíž byl odečet inhibičních zón možný až po 24hodinové inkubační době.

Kmen *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619 je příkladem kultivačně náročnější bakterie, u které je důležitý správně zvolený způsob inokulace kultivačního média. Při inokulaci přelivem bylo možné výsledky testování odečíst po 7 hodinách inkubace a kmen byl citlivý ke všem antibiotikům s výjimkou oxacilinu.

Z výsledků vyplývá, že nejlépe lze ovlivnit dřívější odečet velikosti inhibičních zón metodou inokulace přelivem. Hustota bakteriálního inokula je na kultivačním médiu větší než při inokulaci roztěrem. Vliv teploty kultivačních médií nebyl v tomto testování prokázán. Těchto výsledků bylo dosaženo u referenčních kmenů, které jsou připravovány laboratorně. Dalším krokem v ověření výsledků by bylo testování na mikroorganismech izolovaných z klinických vzorků. V případě pozitivní shody by bylo možné výsledky odečítat po 7 inkubační hodině.

ZDROJE

- [1] HUDZICKI, J. Kirby-Bauer disk diffusion susceptibility test protocol. *American Society Microbiology*, 2009.
- [2] BEADLE, G. W.; MITCHELL, H. K.; BONNER, D. Improvements in the cylinder-plate method for penicillin assay. *Journal of bacteriology*, 1945, 49.1: 101.
- [3] SCHMIDT, W. H.; MOYER, A. J. Penicillin: I. Methods of assay. *Journal of Bacteriology*, 1944; 47(2): 199 – 209.
- [4] BROWNLEE, K. A., aj. The Biological Assay of Streptomycin by Modified Cylinder Plate Method. *Microbiology*, 1948, 2.1: 40 – 53.
- [5] BAUER, A. W., aj. Antibiotic Susceptibility Testing by a Standardized Single Disk Method. *The American Journal of Clinical Pathology*, 1966, Vol. 45, No. 4, 493 – 496.
- [6] GREENWOOD, D.; SLACK, R. C. B.; PEUTHERER, J. F. a kolektiv. *Lékařská Mikrobiologie – Přehled infekčních onemocnění: patogeneze, imunita, laboratorní diagnostika a epidemiologie*. GRADA Publishing, 1999, 69 – 76. ISBN: 80-7169-365-0.
- [7] URBÁŠKOVÁ, P. *Rezistence bakterií k antibiotikům*. TRIOS, 1998. Kapitola 5: 5.1. – 5.10.
- [8] CHAUHAN, N. P. S. *Biocidal Polymers*. Smithers Rapra Technology, 2016. 11.3.1.1: 259 – 260. ISBN: 978-1-5231-05397.
- [9] O'BRYAN, C. A., aj. Lactic acid bacteria (LAB) as antimicrobials in food products: analytical methods and applications. *Handbook of Natural Antimicrobials for Food Safety and Quality*, 2015, 138 – 139. ISBN: 978-1-78242-042-2.
- [10] MUELLER, J. H.; HINTON, J. A protein-free medium for primary isolation of gonococcus and meningococcus. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 1941, 48.1: 330 – 333.
- [11] Microbiology | Ready prepared Media | Prepared Media Plates. *Object moved* [online]. [cit. 09.05.2018] Dostupné z WWW: <www.himedialabs.com/intl/en/products/Microbiology/Ready-prepared-Media-Prepared-Media-Plates/100000175>
- [12] *LabMediaServis* [online]. c2007 [cit. 01.05.2018]. Dostupné z WWW: <<http://labmediaservis.cz/zbozi/id-1349>>

- [13] SANDLE, T. *Pharmaceutical Microbiology – Essentials for Quality Assurance and Quality Control*. Elsevier, 2016, 14.2.2: 173 – 174. ISBN: 978-0-08100-044-1.
- [14] Vyšetření antibiotické citlivosti bakterií, SZÚ. SZÚ [online]. Copyright © 2007 [cit. 01.05.2018]. Dostupné z www.szu.cz/vysetreni-antibioticke-citlivosti-bakterii
- [15] HARVEY, J.; GILMOUR, A. Staphylococcus aureus. *Encyclopedia of Food Microbiology, Volumes 1 – 3*. Elsevier, 2000; 2066 – 2070. ISBN: 978-0-08-052359-0.
- [16] MATTHEWS, K.; KNIEL, K. E.; MONTVILLE, T. J. *Food Microbiology – An Introduction (4th Edition)*. American Society for Microbiology, 2017. Chapter 16: 271 – 280. ISBN: 978-1-5231-1257-9.
- [17] LOWY, F. D.; Antimicrobial resistance: the example of Staphylococcus aureus. *The Journal O clinical investigation*, 2003. 111.9: 1265 – 1273.
- [18] CAMERON, D. R.; HOWDEN, B. P.; PELEG, A. Y. The interface between antibiotic resistance and virulence in Staphylococcus aureus and its impact upon clinical outcomes. *Clinical Infectious Diseases*, 2011. 53.6: 576 – 582.
- [19] DUELL, B. L.; SU, Y. C.; RIESBECK, K.. Host-pathogen interactions of nontypeable Haemophilus influenzae: from commensal to pathogen. *FEBS letters*, 2016. 590.21: 3840 – 3853.
- [20] NØRSKOV – LAURITSEN, N.. Classification, identification and clinical significance of Haemophilus influenzae and Aggregatibacter species with host specificity for humans. *Clinical mikrobiology reviews*, 2014. 27.2: 214 – 240.
- [21] SWETHA, R. G., aj. Haemophilus influenzae Genome Database (HIGDB) a single point web resource for Haemophilus influenzae. *Computers in biology and medicine*, 2014. 55: 86 – 91.
- [22] BENEŠ, Č.; KRÍŽOVÁ, P.; LEBEDOVÁ, V.. Závažná onemocnění způsobená Haemophilus influenzae v České republice v roce 2012. *Zprávy CEM (SZÚ)*, 2013. 22 (4): 137 – 141.
- [23] ŽEMLIČKOVÁ, H.. Antibiotická rezistence u původců komunitních infekcí. *Pediatric pro praxi*, 2015. 16 (5): 296 – 298.
- [24] FINCH, R. G., aj. *Antibiotic and Chemotherapy E-Book*. Elsevier Health Sciences, 2010. Chapter 14: 216 s. ISBN: 978-0-7020-4064-1.
- [25] WAREING, P.; STUART, F.; RERNANDES, R. *Micro-Facts – The Working Companion for Food Microbiologists, 7th Edition*. Royal Society of Chemistry,

2010. 3. Other Bacteria That May Be Foodborne and Have Health Implications, 182s. ISBN: 978-1-905224-84-5.
- [26] STOVER, C. K., aj. Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. *Nature*, 2000. 406 (6799): 959 – 963.
- [27] VOTAVA, M. *Lékařská mikrobiologie obecná, 2. přepracované vydání*. Neptun, 2005, 252 – 256. ISBN: 80-86850-00-5.
- [28] HAVLÍK, J. Makrolidová antibiotika a jejich využití v ambulantní praxi. *Medicina pro praxi*, 2010, 7(10): 365 – 367.
- [29] MOTARJEMI, Y.; MOY, G.; TODD E. *Encyclopedia of food safety*. Academic Press, 2013. Bacteria: Streptococcus: 535 – 545. ISBN: 9780123786135.
- [30] DAINTITH, J.; MARTIN, E. *Dictionary of Science, 6th Edition*. Oxford University Press, 2010. 788s. ISBN: 978-0-19-956146-9
- [31] BYERS, K. B.; WOOLEY D. P. *Biological safety – Principles and Practices, 5th Edition*. American Society for Microbiology, 2017. ISBN: 9781555819637.
- [32] MAYERS D. L., aj. *Antimicrobial Drug Resistance – Clinical and Epidemiological Aspect, Volume 2*. Second edition. Springer, 2017. 49 . Resistance in *Streptococcus pneumoniae*: 777 – 784. ISBN 978-3-319-47264-5.
- [33] ADAMS, M. R; MOSS, M. O. *Food Microbiology (3rd Edition)*. Royal Society of Chemistry, 2008, 7.8: 217 – 224. ISBN 978-1-62198-161-9.
- [34] McCLURE, P. *Escherichia coli: virulence, stress response and resistance. Understanding pathogen behaviour: virulence, stress response and resistance*. Woodhead Publishing Series in Food Science and Technology, 2005: 240 – 278. ISBN: 9781845690229.
- [35] PEARSON, C. H.; WHITEHEAD, J. E. Antibiotic sensitivity testing: a modification of the Stokes method using a rotary plater. *Journal of clinical pathology*, 1974, 27.5: 430.
- [36] ANDREWS, J. M. BSAC standardized disc susceptibility testing method. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2001, 48(suppl_1): 43 – 57.
- [37] EUCAST: Disk diffusion methodology. *EUCAST: EUCAST* [online]. [cit. 09.05.2018].

Dostupné z WWW:

<http://www.eucast.org/ast_of_bacteria/disk_diffusion_methodology/>

- [38] NIGAM, P. S.-N.; SINGH A. Metabolic Pathways: Production of Secondary Metabolites – Fungi. *Encyclopedia of Food Microbiology (Second Edition)*, 2014, 570 – 573. ISBN: 9780123847300.
- [39] ZHANG, L., aj. Antimicrobial Resistance. *Food Microbiology – Fundamentals and Frontiers (4th Edition)*, American Society for Microbiology, 2013. ISBN: 978-1-62870-225-5.
- [40] VOTAVA, M. *Lékařská mikrobiologie speciální*. Neptun, 2003. ISBN: 9788090289666
- [41] BAMBEKE, F. V., aj. Mechanisms of Action. *Infectious Diseases (3d Edition)*, Elsevier/Mosby, 2010, 1288 – 1289. ISBN: 978-0-323-04579-7.
- [42] BEDNÁŘ, M., aj. *Lékařská mikrobiologie: bakteriologie, virologie, parazitologie*. 1. vydání. Marvil, 1999. 164s. ISBN 80-238029-7-6.
- [43] MÁLEK, I., aj. *Obecná mikrobiologie lékařská*. Státní zdravotnické nakladatelství, 1953.
- [44] VARDANYAN, R.; HRUBY, V. *Synthesis of Best-Seller Drugs*. Elsevier, 2016, 30(6): 616 – 617. ISBN: 978-0-12-411524-8.
- [45] SCHWALBE, R.; STEELENMOORE, L.; GOODWIN, C. *Antimicrobial Susceptibility Testing Protocols*. CRC Press, 2007. ISBN: 9781420014495
- [46] MARTÍNKOVÁ, J. a kolektiv. *Farmakologie pro studenty zdravotnických oborů*. 1. vydání. Grada Publishing a.s., 2007. 309s. ISBN: 978-80-247-1356-4.
- [47] HYNIE, S.. *Farmakologie v kostce*. 2. přepracované vydání. Triton, 2001. 383 – 415. ISBN 80-7254-181-1.
- [48] MATUSCHEK, E.; BROWN, D. F. J.; KAHLMETER, G. Development of the EUCAST disk diffusion antimicrobial susceptibility testing method and its implementation in routine microbiology laboratories. *Clinical Microbiology and Infection*, 2014, 20(4): O255 – O256.
- [49] SANDLE, T. *Pharmaceutical Microbiology – Essentials for Quality Assurance and Quality Control*. Elsevier, 2016, 14.2.5 Test variability: 175 – 176. ISBN: 978-0-08100-044-1.
- [50] CHAPMAN, J.; SULIVAN, T.; REGAN, F. *Nanoparticles in Ant-Microbial Materials – Use and Characterisation*. Royal Society of Chemistry, 2012. ISBN: 978-1-62198-145-9.
- [51] LORIAN, V. *Antibiotics in Laboratory Medicine (5th Edition)*. Lippincott Williams & Wilkins, 2005. ISBN: 9780781749831.

- [52] M100Ed28 | Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing, 28th Edition. *Clinical & Laboratory Standards Institute: CLSI Guidelines* [online]. c2018 [cit. 02.05.2018].
Dostupné z WWW: <<https://clsi.org/standards/products/microbiology/documents/m100/>>
- [53] History of the Clinical Laboratory Standards Institute. *Clinical & Laboratory Standards Institute: CLSI Guidelines* [online]. c2018 [cit. 02.05.2018].
Dostupné z WWW: <<https://clsi.org/about/clsis-history/>>
- [54] About Micra Biotechnologies. *About Micra Biotechnologies* [online]. c2008. [cit. 09.05.2018].
Dostupné z WWW: <<http://micra-biotechnologies.com/abassays.html>>
- [55] The CDS Antibiotic Susceptibility Test. *The CDS Antibiotic Susceptibility Test* [online]. [cit. 09.05.2018]. Dostupné z WWW: <<http://cdstest.net/>>
- [56] Mueller Hinton Agar Plate at Rs 420/14 plate | Agar Plates – Putus Media, New Delhi | ID: 13072267655. *IndiaMART – Indian Manufacturers Suppliers Exporters Directory, India Exporter Manufacturer* [online]. c1996 [cit. 09.05.2018].
Dostupné z WWW: <<https://www.indiamart.com/proddetail/mueller-hinton-agar-plate-13072267655.html>>
- [57] Blood Agar – prepared, tubes & plates | Ward’s Science. *Ward* [online]. c2016 [cit. 09.05.2018].
Dostupné z WWW: <<https://www.wardsci.com/store/product/8868019/prepared-blood-agar-media>>
- [58] Kontrola kvality EUCAST, SZÚ. *SZÚ* [online]. c2007 [cit.09.05.2018]. Dostupné z WWW: <<http://www.szu.cz/tabulky-pro-rutinni-kontrolu-kvality-eucast>>
- [59] Haemophilus influenzae growing on chocolate agar plate. Pure H.influenzae culture streaked on chocolate agar plate. Haemophilus influenzae cultivation. *Microbiology pictures - photo gallery of medically important bacteria. Microbiology in pictures, bacteria images and photographs with texts. On-line photo atlas of bacteria.* [online]. [cit. 09.05.2018] Dostupné z WWW: <<https://www.microbiologyinpictures.com/bacteria%20photos/haemophilus%20influenzae%20photos/HAIN1.html>>
- [60] *CHROMagar Chromogenic Media* [online]. [cit. 09.05.2018]. Dostupné z WWW: <<http://www.chromagar.com/food-water-chromagar-pseudomonas-ps820-ps822-focus-on-pseudomonas-36.html#.Wu3G7HtuLIU>>

- [61] Streptococcus pneumoniae (pneumococcus) growing on blood agar plate. Alpha hemolysis. Pure Streptococcus pneumonia culture streaked on blood agar plate. S.pneumoniae (pneumococcus) cultivation in a lab. *Microbiology pictures - photo gallery of medically important bacteria. Microbiology in pictures, bacteria images and photographs with texts. On-line photo atlas of bacteria.* [online]. [cit. 09.05.2018].
Dostupné z WWW: <<https://www.microbiologyinpictures.com/bacteria%20photos/streptococcus%20pneumoniae%20photos/STPN1.html>>
- [62] QMS releases new lab equipment | Laboratory Talk. *Laboratory Talk* [online]. c2018 [cit. 09.05.2018].
Dostupné z WWW: <<http://laboratorytalk.com/article/319527/qms-releases-new-lab-equipment>>
- [63] Citlivost a rezistence mikroorganismů na antimikrobiální léčiva – PDF. *Představujeme Vám pohodlné a bezplatné nástroje pro publikování a sdílení informací.* [online]. [cit. 10.05.2018].
Dostupné z WWW: <<http://docplayer.cz/44066570-Citlivost-a-rezistence-mikroorganismu-na-antimikrobiani-leciva.html>>
- [64] BacmedAST. *Aspiag - Innovation, Intelligence, Implementation* [online]. [cit. 09.05.2018].
Dostupné z WWW: <<http://www.aspiag.cz/BacmedAST.htm>>