

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

ANDREJA CESAR

DIPLOMSKA NALOGA
VISOKOŠOLSKI STROKOVNI ŠTUDIJ LABORATORIJSKE BIOMEDICINE

Ljubljana, 2009

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

ANDREJA CESAR

**MIKROBIOLOŠKO DOLOČANJE VSEBNOSTI ANTIBIOTIKOV V ZDRAVILIH
Z DIFUZIJSKO METODO**

Ljubljana, 2009

Diplomsko nalogo sem opravljala v Javni agenciji Republike Slovenije za zdravila in medicinske pripomočke pod mentorstvom Marije Sollner Dolenc, mag. farm.

ZAHVALA

Za pomoč pri izdelavi diplomske naloge se zahvaljujem mentorici prof. dr. Mariji Sollner Dolenc, Mojci Potočnik, univ. dipl. mikrobiol., Mariji Toplišek in vsem sodelavcem iz JAZMP. Hvala vsem za napotke in vloženi trud ter pomoč pri praktičnem delu diplomske naloge.

IZJAVA

Izjavljam, da sem diplomsko nalogo samostojno izdelala pod vodstvom mentorice prof. dr. Marije Sollner Dolenc, mag. farm.

Ljubljana, junij 2009

Andreja Cesar

Predsednik diplomske komisije: doc. dr. Darko Černe

Član diplomske naloge: asist. dr. Simon Žakelj

KAZALO

1. UVOD.....	1
1.1. MESTO IN NAČIN DELOVANJA	1
1.2. ZAVIRALCI SINTEZE CELIČNE STENE	2
1.2.1. Beta-laktami	3
1.2.2. Bacitracin.....	5
1.2.3. Glikopeptidi	5
1.3. ZAVIRALCI PROTEINSKE SINTEZE	7
1.3.1. Aminoglikozidi.....	7
1.3.2. Kloramfenikol.....	8
1.3.3. Tetraciklini	8
1.3.4. Makrolidi	9
1.3.5. Linkozamidi.....	9
1.3.6. Fucidinska kislina	10
1.4. ZAVIRALCI SINTEZE NUKLEINSKIH KISLIN.....	10
1.4.1. Sulfonamidi	10
1.4.2. Kinoloni.....	10
1.5. SUBSTANCE, KI MOTIJO DELOVANJE CITOPLAZEMSKA MEMBRANE - POLIMIKSINI	11
1.6. PROTIMIKROBNE UČINKOVINE ZA ZDRAVLJENJE TUBERKULOZE.....	11
1.7. POJAV REZISTENTNOSTI.....	12
1.7.1. Odporni enterokoki.....	13
1.7.2. Odporne bakterije rodu <i>Salmonella spp.</i>	13
1.7.3. Odporne bakterije vrste <i>Staphylococcus aureus</i>	14
1.8. PRINCIPI IN POSTOPKI DOLOČITVE PROTIMIKROBNIH UČINKOVIN.....	15
1.8.1. Turbidimetrična metoda	15
1.8.2. Metoda difuzije v agarju.....	18
1.8.3. Testni mikroorganizmi	25
2. NAMEN DELA	28
3. MATERIALI IN METODE.....	30
3.1. MATERIALI	30
3.1.1. Gojišča	30
3.1.2. Pufri	32
3.1.3. Laboratorijski pribor.....	34
3.1.4. Preučevani vzorci in referenčni standardi	34
3.1.5. Testni mikroorganizem.....	35
3.2. METODE	35
3.2.1. Priprava raztopin vzorcev in referenčnih standardov	35
3.2.2. Priprava osnovne suspenzije testnega mikroorganizma	36
3.2.3. Priprava plošč	36
3.2.4. Nanašanje raztopin na ploščo	37
3.2.5. Inkubacija	37
3.2.6. Čitanje rezultatov.....	37
3.2.7. Obdelava podatkov s programom Combistats.....	38
3.3. MIKROBIOLOŠKO DOLOČANJE MIDEKAMICINA	39
3.3.1. Priprava raztopin vzorcev in standardov	39
3.3.2. Testni mikroorganizem.....	40
3.3.3. Priprava plošč in nanos raztopin.....	40

3.3.4. Inkubacija	40
3.3.5. Čitanje rezultatov	40
3.3.6. Uporabljen gojišča in raztopine	41
3.3.7. Laboratorijska oprema in pribor	41
3.4. MIKROBIOLOŠKO DOLOČANJE FENOKSIMETILPENICILINA	42
3.4.1. Priprava raztopin vzorcev in standardov	42
3.4.2. Testni mikroorganizem	43
3.4.3. Priprava plošč in nanos raztopin	43
3.4.4. Inkubacija	43
3.4.5. Čitanje rezultatov	43
3.4.6. Uporabljen gojišča in raztopine	44
3.4.7. Laboratorijska oprema in pribor	44
3.5. MIKROBIOLOŠKO DOLOČANJE AMOKSICILINA	45
3.5.1. Priprava raztopin vzorcev in standardov	45
3.5.2. Testni mikroorganizem	46
3.5.3. Priprava plošč in nanos raztopin	46
3.5.4. Inkubacija	46
3.5.5. Čitanje rezultatov	46
3.5.6. Uporabljen gojišča in raztopine	46
3.5.7. Laboratorijska oprema in pribor	47
4. REZULTATI	48
4.1. MIKROBIOLOŠKO DOLOČANJE MIDEKAMICINA	48
4.2. MIKROBIOLOŠKO DOLOČANJE FENOKSIMETILPENICILINA	50
4.3. MIKROBIOLOŠKO DOLOČANJE AMOKSICILINA	52
4.3.1. Prvo čitanje	52
4.3.2. Drugo čitanje	54
5. RAZPRAVA	57
5.1. MIKROBIOLOŠKO DOLOČANJE MIDEKAMINICINA	57
5.2. MIKROBIOLOŠKO DOLOČANJE FENOKSIMETILPENICILINA	58
5.3. MIKROBIOLOŠKO DOLOČANJE AMOKSICILINA	58
5.3.1. Prvo čitanje	58
5.3.2. Drugo čitanje	59
6. ZAKLJUČEK	60
7. LITERATURA	62

PREGLED SLIK

- Slika 1:** Struktura bakterijske celice in mesto delovanja nekaterih antibiotikov.
- Slika 2:** Struktura peptidoglikana, na katerega delujejo antibiotiki te skupine.
- Slika 3:** Struktura streptomicina.
- Slika 4:** Struktura kloramfenikola.
- Slika 5:** Struktura tetraciklina.
- Slika 6:** Predstavniki kinolonov.
- Slika 7:** Prikaz postavitve turbidimetrične metode.
- Slika 8:** Prikaz cone inhibicije v inokuliranem agarju.
- Slika 9:** Prikaz antibiograma v petrijevki.
- Slika 10:** Grafični prikaz pojma kritični čas.
- Slika 11:** Grafični prikaz pojma kritična koncentracija.
- Slika 12:** Faze bakterijske rasti.
- Slika 13:** Shema latinskega kvadrata.
- Slika 14:** Interval zaupanja.
- Slika 15:** Grafi s krivuljami, midekamicin – 1. plošča.
- Slika 16:** Grafi s krivuljami, midekamicin – 2. plošča.
- Slika 17:** Interval zaupanja.
- Slika 18:** Grafi s krivuljami, amoksisicilin – 1. plošča.
- Slika 19:** Grafi s krivuljami, amoksisicilin – 2. plošča.
- Slika 20:** Interval zaupanja.
- Slika 21:** Grafi s krivuljami, amoksisicilin – 1. plošča.
- Slika 22:** Grafi s krivuljami, amoksisicilin – 2. plošča.
- Slika 23:** Interval zaupanja.

PREGLEDNICE

Preglednica I:	Pregled zaviralcev sinteze celične stene in zaviralcev beta-laktamaz
Preglednica II:	Pregled osnovnih mehanizmov odpornosti proti bakterijam
Preglednica III:	PEN hranljivo gojišče
Preglednica IV:	Hranljivo gojišče 2
Preglednica V:	DHS hranljivo gojišče
Preglednica VI:	Fosfatni pufer št. 1
Preglednica VII:	Fosfatni pufer št. 3
Preglednica VIII:	Redčenje osnovne raztopine vzorca
Preglednica IX:	Redčenje osnovne raztopine referenčnega standarda midekamicina
Preglednica X:	Postopek predredčitve osnovne raztopine in redčenje osnovne raztopine vzorca
Preglednica XI:	Postopek predredčitve osnovne raztopine in redčenje osnovne raztopine standarda fenoksimetilpenicila
Preglednica XII:	Postopek predrečenja do osnovne raztopine in redčenje osnovne raztopine vzorca
Preglednica XIII:	Postopek predredčitve do osnovne raztopine in redčenje osnovne raztopine standarda amoksicilina
Preglednica XIV:	Prikaz izračunane vsebnosti midekamicina na 1. plošči
Preglednica XV:	Prikaz izračunane vsebnosti midekamicina na 1. plošči
Preglednica XVI:	Velikost inhibicijskih con standarda in vzorca na 2. plošči
Preglednica XVII:	Prikaz izračunane vsebnosti midekamicina na 2. plošči
Preglednica XVIII:	Prikaz izračunane vsebnosti midekamicina na obeh ploščah
Preglednica XIX:	Velikost inhibicijskih con standarda in vzorca na 1. plošči
Preglednica XX:	Velikost inhibicijskih con standarda in vzorca na 2. plošči
Preglednica XXI:	Velikost inhibicijskih con standarda in vzorca na 1. plošči
Preglednica XXII:	Velikost inhibicijskih con standarda in vzorca na 2. plošči
Preglednica XXIII:	Statističen prikaz parametrov, ki kažejo na variabilnost

Preglednica XXIV:	Velikost inhibicijskih con standarda in vzorca na 1. plošči
Preglednica XXV:	Prikaz izračunane vsebnosti amoksicilina na 1. plošči
Preglednica XXVI:	Velikost inhibicijskih con standarda in vzorca na 2. plošči
Preglednica XXVII:	Prikaz izračunane vsebnosti amoksicilina na 2. plošči
Preglednica XXVIII:	Prikaz izračunane vsebnosti amoksicilina na obeh ploščah

OKRAJŠAVE

AIDS:	Acquired immune deficiency syndrome – sindrom pridobljene imunske pomanjkljivosti
ATCC:	American type culture collection – ameriška zbirka tipskih kultur
CIP:	Collection institut Pasteur – zbirka inštituta Pasteur
CFU:	Colony forming units – enota, iz katere se razvije posamezna kolonija
DNK:	Deoksiribonukleinska kislina
G+:	Po Gramu pozitivna bakterija
G-:	Po Gramu negativna bakterija
mRNK:	Sporočilna ribonukleinska kislina – messenger RNA
MRSA:	Methicillin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i> – na meticilin odporen <i>Staphylococcus aureus</i>
NCIB:	National collection of industrial bacteria- nacionalna zbirka industrijskih bakterij
NCTC:	National collection of type cultures – nacionalna zbirka tipskih kultur
PBP:	Penicillin binding protein – na penicilin vezujoči se protein
tRNK:	Transportna ribonukleinska kislina – transfer RNA
Ph. Eur:	Evropska farmakopeja
VRSA:	Vancomycin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i> – na vankomicin odporen <i>Staphylococcus aureus</i>
USP:	The United States Pharmacopeia – Ameriška farmakopeja

POVZETEK

V diplomski nalogi smo ugotavljali vsebnost učinkovine v antibiotičnem zdravilu. Uporabili smo metodo difuzije. Kot rezultat smo dobili inhibicijske cone, njihovo velikost pa ročno določili v fazi čitanja/branja rezultatov. Ta faza je hkrati tudi tisti del, ki je z vidika pravilne izvedbe testa tudi najbolj nezanesljiva. Glede na to, da so antibiotiki razširjena in široko uporabna zdravila, pa potrebujemo metodo, ki bo dajala zanesljive odgovore na to, ali je zdravilo primerno za uporabo ali ne.

Cilj diplomske naloge je, da vsebnost učinkovine v antibiotičnem zdravilu določimo na tak način, da z uporabo metode difuzije dobimo jasne in dobro definirane inhibicijske cone. Le take so namreč primerne za čitanje, tudi v primeru, ko test izvaja oseba z manj izkušnjami. Hkrati je bil namen, ob neuspešnih poskusih določitve vsebnosti antibiotične učinkovine, pokazati vpliv faze čitanja na končni rezultat.

Določali smo vsebnost učinkovin, ki so se nahajale v zdravilih v obliki tablet in praška. Sama izvedba testa je temeljila na predpisih iz Evropske farmakopeje. Osnovni princip difuzijske metode je primerjava inhibicijskih con rasti vzorcev in referenčnih standardov. Metoda sloni na interakciji aktivnih komponent antibiotika in inokuliranega mikroorganizma v agarju. Interakcija mora biti taka, da so inhibicijske cone rasti primerne za čitanje. Na to vplivajo številni faktorji v različnih stopnjah izvedbe, ki jih moramo upoštevati za čim bolj kredibilno izvedbo. Ti faktorji so gostota inokuluma, primerna temperatura in čas inkubacije, primerno gojišče in koncentracija antibiotika. Dobro definirane inhibicijske cone dosežemo z natančnim delom v vseh fazah izvedbe, predvsem v fazi priprave raztopin standarda in vzorca, priprava testnega mikroorganizma ter natančnim nanosom vseh raztopin na plošče z gojiščem.

Statistično smo podatke obdelali s programom Combistats.

Opravili smo meritve v antibiotičnih zdravilih z učinkovinami midekamicin, fenoksimetilpenicilin in amoksicilin. Pri merjenju vsebnosti midekamicina v antibiotičnem zdravilu smo na ploščah dobili jasno definirane inhibicijske cone. Rezultati, obdelani s programom Combistats, so bili ustrezni. Pri določanju fenoksimetilpenicilina so bile dobljene inhibicijske cone nejasne in nepravilnih oblik ter relativno majhne. Statistično obdelani podatki so bili neveljavni. Pri določanju amoksicilina smo fazo čitanja izvedli

dvakrat . Do bistvenega odstopanja je prišlo med odčitki rezultatov neizkušene osebe (prvo čitanje) in osebe, ki dnevno opravlja tovrstna merjenja (drugo čitanje). Rezultati so se razlikovali v taki meri, da je bil prvi poskus neveljaven, drugi pa veljaven.

Pri izvajanju testa za določanje občutljivosti mikroorganizmov smo ugotovili, da je faza odčitavanja rezultatov tista, pri kateri se lahko zgodi največ napak. Ugotovili smo, da so inhibicijske cone, ki so pravilne okrogle oblike veliko lažje berljive, kot tiste, ki so slabo definirane. Take lahko kvalitetno prebere le izkušena oseba. Ko na ploščah dosežemo berljive inhibicijske cone lahko kot take uporabimo za merjenje z avtomatiziranimi čitalci, ki natančno izmerijo premer inhibicijskih con. S tem se izognemo ročnemu merjenju, ki je najbolj nezanesljiva faza testa.

1. UVOD

Odkritje antibiotikov predstavlja enega večjih mejnikov v zgodovini medicine. Pionir na tem področju, Alexander Fleming, je po spletu naključij uspel vzgojiti glivo *Penicillium*, ki je izločala snov penicilin, ta pa je povzročil inhibicijo rasti kulture stafilokokov na agarški plošči. Napredek je šel nato v smeri pridobivanja sintezno pripravljenih snovi - kemoterapevtikov, ki so polsintezne protimikrobne učinkovine.

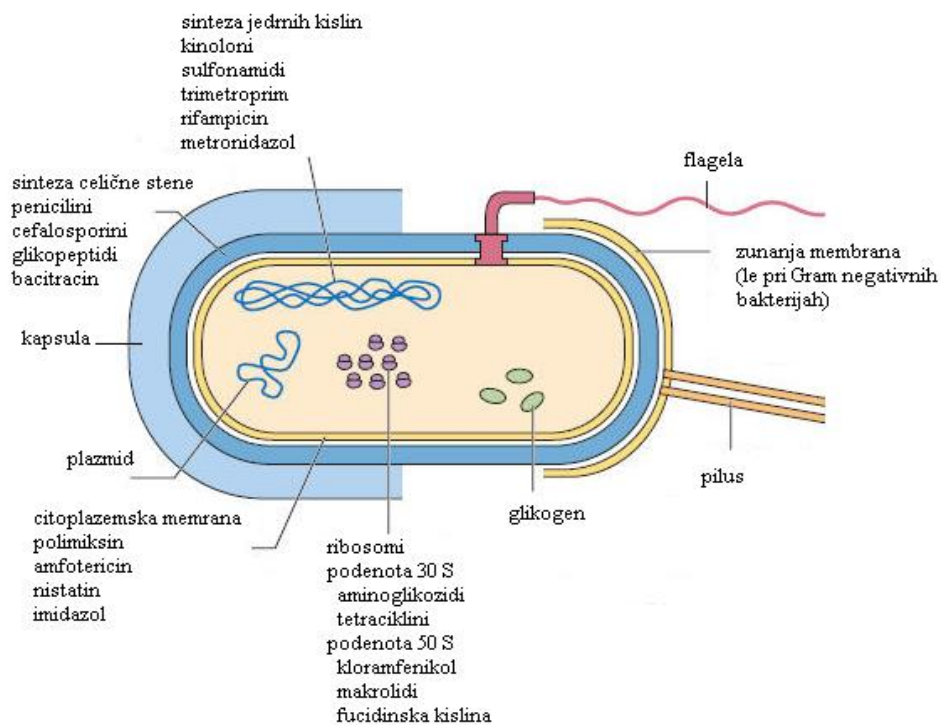
Uporaba protimikrobnih učinkovin je bistveno zmanjšala število smrti zaradi infekcijskih bolezni, vendar pa pretirana raba teh snovi vodi v razvoj neželene rezistence bakterijskih sevov na bakterijske povzročitelje. Antibiotiki (sem prištevamo vse protimikrobne učinkovine, ki so naravni produkti mikroorganizmov ali naravnim produktom enake sintetično ali polsintetično pridobljene spojine) vplivajo le na rast bakterij, ne pa tudi virusov, gliv in parazitov. V nadaljevanju sledi pregled posameznih skupin antibiotikov, njihov način delovanja in uporabnost v medicini.

1.1. Mesto in način delovanja

Antibiotiki delujejo na dva načina. Za baktericidno delovanje je značilno, da poškodujejo mikroorganizem do te mere, da ta odmre. Bakteriostatično delujejo, ko preprečujejo oz. zavirajo razmnoževanje mikroorganizma, pri znižanju koncentracije antibiotika pa se razmnoževanje nadaljuje.

Antibiotiki delujejo tako, da:

- prizadenejo sintezo celične stene,
- vplivajo na sintezo znotrajceličnih proteinov,
- vplivajo na sintezo nukleinskih kislin,
- motijo delovanje citoplazemske membrane. (1, 2)



Slika 1: Struktura bakterijske celice in mesto delovanja nekaterih antibiotikov. (3)

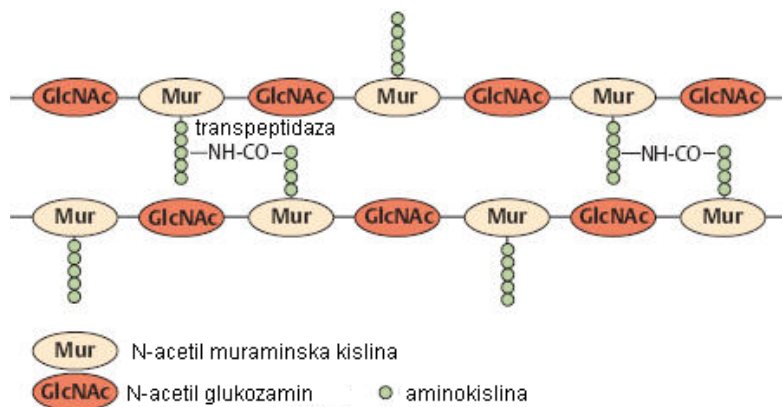
Pri antibiotikih si želimo predvsem lastnosti, ki so značilne za "idealne" antibiotike. To pa so:

- selektivnost (delujejo le na mikroorganizem ter čim manj na makroorganizem),
- širok spekter delovanja (delujejo na čim več patogenih mikroorganizmov),
- dolga razpolovna doba v plazmi,
- dobro prodiranje v medceličnino, celice in likvor,
- šibka vezava na beljakovine v plazmi in medceličnini,
- peroralno jemanje,
- odsotnost stranskih učinkov pri zdravljenju. (2)

1.2. Zaviralci sinteze celične stene

Zaviralci sinteze celične stene vplivajo na vezavo N-acetil muraminske kisline in N-acetil glukozamina v peptidoglikansko verigo. Pomembno vlogo pri tem imajo encimi, karboksiptidaze in transpeptidaze, ki se vežejo s penicilinom (penicillin binding

proteins- PBP). Če se zaviralci sinteze celične stene vežejo s PBP, pride do nakopičenja molekul, ki so potrebne za sintezo celične stene. Bakterija odreagira z avtolizo, celica se razgradi. Med najpomembnejše zaviralce celične stene sodijo beta-laktami (penicilini, cefalosporini, karbapenemi, monobaktami), v skupino pa sodijo še glikopeptidi (vankomicin, teikoplanin) ter bacitracin. Včasih kot dodatek k beta-laktamskim antibiotikom uporabimo zaviralce beta-laktamaz, ki zavirajo učinek encima beta-laktamaze. Uvrščamo jih v posebno skupino. (1, 2)



Slika 2: Struktura peptidoglikana, na katerega delujejo antibiotiki iz skupine zaviralcev sinteze celične stene. (3)

1.2.1. Beta-laktami

Zanje je značilen beta-laktamski obroč. Delujejo baktericidno, tako da zavirajo sintezo peptidoglikana. Vstopijo skozi bakterijsko steno ter se vežejo na proteine PBP na citoplazemski membrani. Na ta način preprečijo rast bakterijske stene in posledično odmrtnje bakterije. Encimi beta-laktamaze, ki jih imajo bakterije, lahko preprečijo učinek beta-laktamskih antibiotikov. G- bakterije encime izdelujejo in jih imajo v svoji steni, ter antibiotik pri vstopu v celico uničijo, za razliko od G+ bakterij, ki encime izločajo v okolico in tako antibiotik uničijo zunaj bakterije. Beta-laktami dobro prodirajo v tkiva in likvor. Izločajo se s sečem.

Delujejo na po G+ mikrobo, sintetično spremenjeni pa tudi na G-. So malo toksični, vendar pa lahko povzročijo nastanek preobčutljivosti. Med beta-laktami se lahko pojavi navzkrižna preobčutljivost. (1, 2).

Penicilini

Prvotno ozko delujoče peniciline so s pripravo polysintetičnih in sintetičnih izpeljank razvili v širokodelujoče derivate z ugodnimi farmakokinetičnimi in antibakterijskimi lastnostmi.

Ločimo:

- standardne peniciline,
(benzilpenicilin oz. penicilin G, fenoksimetilpenicilin- penicilin V)
- antistafilokokne peniciline,
(meticilin, nafcilin)
- širokospektralne peniciline,
(aminopenicilini, karboksipenicilini, ureidopenicilini). (1)

Cefalosporini

So polysintetični antibiotiki. Jedro cefalosporina je 7-aminocefalosporinska kislina. Na beta-laktamski obroč se veže šestčlenski obroč, ki vsebuje žveplo. Podobni so penicilinom, z njimi si tako delijo prednosti in slabosti. Ločimo jih v 4 skupine ali generacije. (1)

Karbapenemi

So polysintetični beta-laktamski antibiotiki. Ker se ne reabsorbirajo jih dajemo parenteralno. Imajo najširši spekter delovanja med poznanimi zaviralci sinteze celične stene. Predstavnik sta imipenem in meropenem. (2)

Monobaktami

Sintetizirajo jih bakterije. Slabo se reabsorbirajo iz prebavil, zato jih dajemo parenteralno. Dobro prehajajo v tkiva, telesne tekočine in likvor. Delujejo na G- anaerobne bakterije ter na bakterije, na katere delujejo tudi aminoglikozidi. (2)

Zaviralci beta-laktamaz

So posebna vrsta zdravil, ki se dajejo v kombinaciji z beta-laktamskimi antibiotiki. Sami po sebi nimajo protimikrobnega učinka, učinkujejo pa na encim beta-laktamazo, ki se pojavi kot rezultat odpornosti bakterije na beta-laktamske antibiotike. Delujejo tako, da se vežejo z beta-laktamazami in preprečijo njihovo aktivnost. V kombinaciji z aminopenicilini so učinkoviti proti mnogim bakterijskim sevom *Haemophilus influenzae* in stafilokokom. (2)

1.2.2. Bacitracin

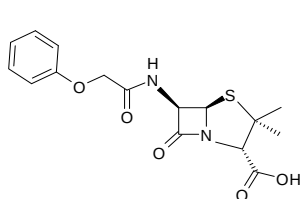
Deluje tako, da preprečuje obnovo lipidnega prenašalca sestavin celične stene. Preprečuje njegovo defosforilacijo, s tem pa ga naredi nezmožnega za prenašanje naslednjih molekul N-acetilglukozamina. Zaradi njegove toksičnosti ga uporabljamo za lokalno zdravljenje. (1, 2)

1.2.3. Glikopeptidi

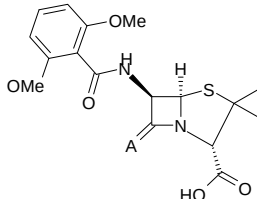
Te heterociklične molekule s kompleksno strukturo delujejo tako, da se vežejo z acil-D-alanil-D-alaninom v peptidoglikanu in preprečijo dodajanje N-acetilglukozaminskih in N-acetilmuraminskih molekul, ki so potrebne za nadaljnjo rast celične stene. Pomemben glikopeptid je vankomicin, ki ga uporabljamo pri okužbah, ki jih povzročajo proti meticilinu odporni stafilokoki in proti bakterijam, ki so odporne na druge beta-laktamske antibiotike. Uporablja se tudi teikoplanin, ki je v spektru delovanja sicer podoben vankomicinu, vendar so lahko nekateri sevi enterokokov nanj občutljivi, medtem ko so odporni na vankomicin. Oba glikopeptidna antibiotika sta potencialno oto- in nefrotoksična. (1, 2)

Preglednica I: Pregled zaviralcev sinteze celične stene in zaviralcev beta-laktamaz

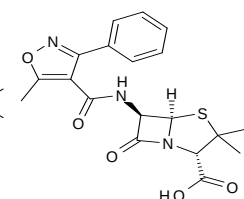
BETA-LAKTAMI



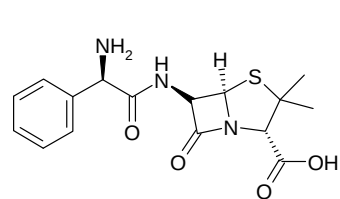
Benzilpenicilin



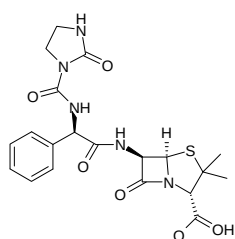
Meticilin



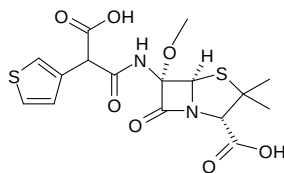
Oksacilin



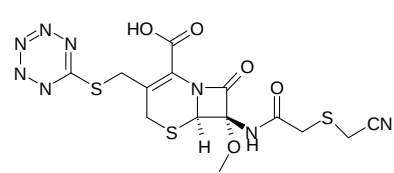
Ampicilin



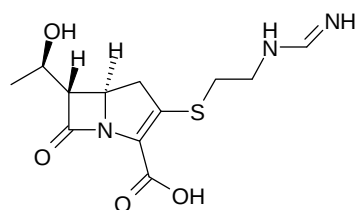
Azlocilin



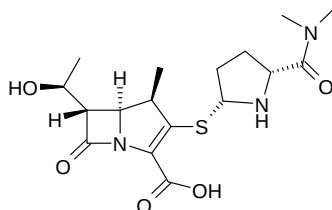
Temocilin



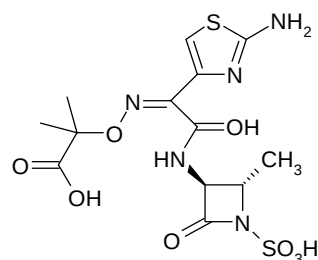
Cefmetazol



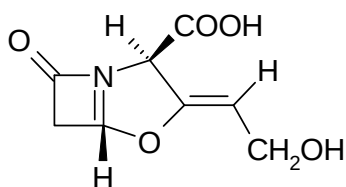
Imipenem



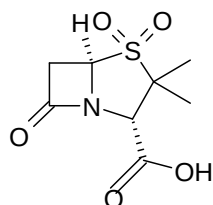
Meropenem



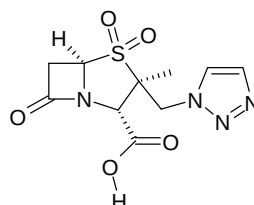
Aztreonam



Klavulanska kislina

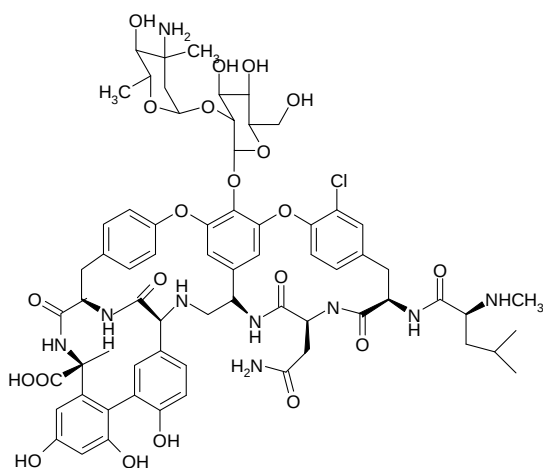


Sulbaktam

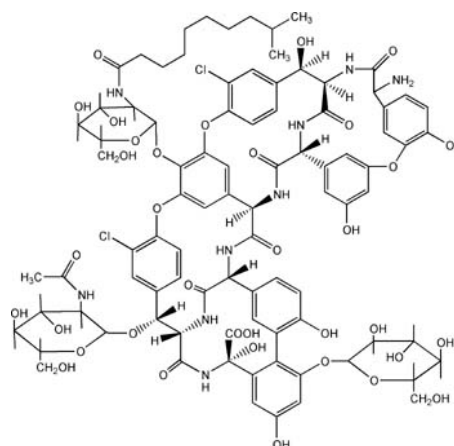


Tazobaktam

GLIKOPEPTIDI

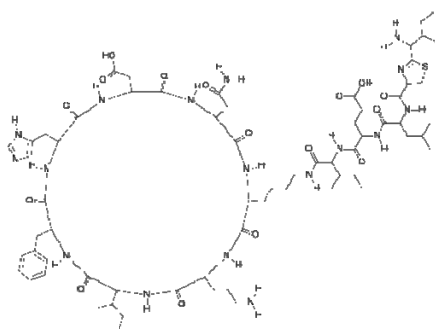


Vankomicin



Teikoplanin

BACITRACIN

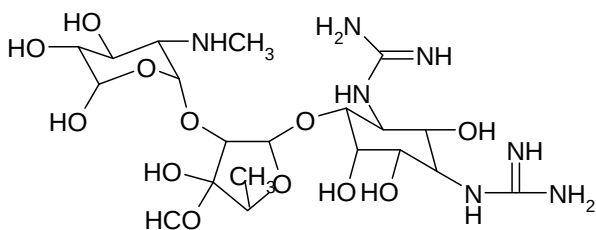


1.3. Zaviralci proteinske sinteze

1.3.1. Aminoglikozidi

Delujejo tako, da preprečujejo vezavo formilmetionil-tRNK na ribosomsko podenoto 30 S. Kompleks med mRNK, formil metioninom in tRNK se zato ne tvori, kar ima za posledico, da se sporočilo na mRNK ne prebere pravilno. V peptid se vgradi napačna aminokislina. Postane neaktiven.

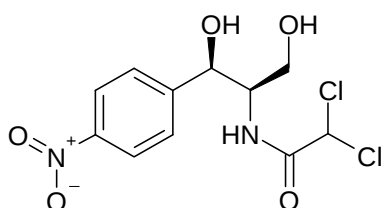
Streptomycin je najbolj znan aminoglikozid. Ker ima veliko stranskih učinkov se uporablja izključno za zdravljenje tuberkuloze, deluje pa tudi na številne G⁺ in G⁻ bakterije. V to skupino sodijo še neomicin, ki se uporablja za predoperativno dekontaminacijo črevesja, kanamicin in gentamicin. (1)



Slika 3: Struktura streptomicina.

1.3.2. Kloramfenikol

Veže se na ribosomsko podenoto 50 S in deluje tako, da zavre delovanje peptidil transferaze, ter s tem prepreči povezovanje aminokislin med seboj. Je bakteriostatičen. Dajemo ga peroralno in v veno. Dobro prodira v tkiva, celice in likvor. V jetrih se veže z glukuronsko kislino. Izloča se z urinom v neaktivni obliki. Z njim zdravimo okužbe, ki jih povzročajo G- bakterije, klamidije in rikecije, učinkovit pa je tudi pri zatiranju bakterije *S. Typhi*. Sicer pa je kloramfenikol toksičen za kostni mozeg. Pri dolgotrajnem zdravljenju z velikimi odmerki zdravila lahko povzroči aplazijo kostnega mozga. (2)

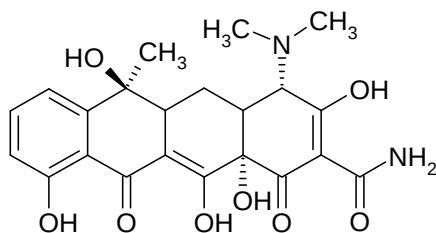


Slika 4: Struktura kloramfenikola.

1.3.3. Tetraciklini

Zgrajeni so iz 4 šestčlenskih obročev. Njihovo delovanje je bakteriostatično. Preprečijo vezavo aminoacetil tRNK na akceptorsko mesto na ribosomski podenoti 30 S in beljakovinsko sintezo. So potencialno toksični, saj se vežejo s človeškimi ribosomi v mitohondrijih. V mikrobne celice prodirajo veliko bolje kot v človeške, pri zdravljenju so zato zelo učinkoviti. Z njimi zdravimo okužbe, ki jih povzročajo klamidije, rikecije in mikoplazme. Pri nesmotrni uporabi se lahko, ravno tako kot pri vseh protimikrobnih učinkovinah, razvije odpornost, zato je njihova uporaba omejena.

Tetraciklini se vgrajujejo v rastoče kosti in zobe in povzročijo rumenkasto obarvanje teh tkiv. Rastočim otrokom in nosečnicam jih zato ne dajemo. (1, 2)



Slika 5: Struktura tetraciklina.

1.3.4. Makrolidi

Kemično so sestavljeni iz makrocikličnega laktonskega obroča. Obroč običajno vsebuje 14 do 16 členov. V nizkih koncentracijah so bakteriostatični, v večjih pa baktericidni. Eritromicin, kot najbolj znan makrolid, se veže na ribosomsko podenoto 50 S in preprečuje translacijo. V telo ga vnesemo peroralno ali intravenozno. Po telesu se dobro razporeja in prodira v telesne celice, kjer ubija znotrajcelične mikrobe. Deluje na G⁺ koke, uporablja pa se kot izbirno zdravilo pri stafilokoknih okužbah, če je bolnik alergičen na penicilin. Uspešen je tudi pri boju proti okužbam, ki jim povzročajo bakteriji *L. pneumophila* in *C. jejuni*, mikoplazme, klamidije in rikecije.

Azitromicin je novejši makrolidni antibiotik. Zelo dobro prodira v tkiva, pa tudi v nevtrofilce in makrofage, zato z njim zdravimo okužbe, kjer so povzročitelji zajeti v fagocitne celice. (2)

1.3.5. Linkozamidi

Po delovanju so podobni makrolidom. Pomemben antibiotik v tej skupini je klindamicin, ki je klorirani derivat linkomicina in učinkovitejši od njega. Dajemo ga per os ali intravenozno. V jetrih se metabolizira v razpadne produkte, ki imajo antibiotične lastnosti. Zdravilo prodira v makrofage in polimorfonuklearne levkocite. Z njim zdravimo okužbe s po G⁺ bakterijami in anaerobi. (2)

1.3.6. Fucidinska kislina

Deluje tako, da se veže z elongacijskim faktorjem, gvanozindifosfatom in ribosomi. Na ta način prepreči beljakovinsko sintezo. Z njo zdravimo okužbe, ki jih povzročajo stafilokoki, ki so odporni proti beta-laktamskim antibiotikom. Zaradi možnosti nastanka odpornosti jo dajemo v kombinaciji z drugimi učinkovitimi antibiotiki (eritromicinom, rifampicinom). (2)

1.4. Zaviralci sinteze nukleinskih kislin

V to skupino prištevamo vse protimikrobne učinkovine, ki so pridobljene s pomočjo kemične sinteze.

1.4.1. Sulfonamidi

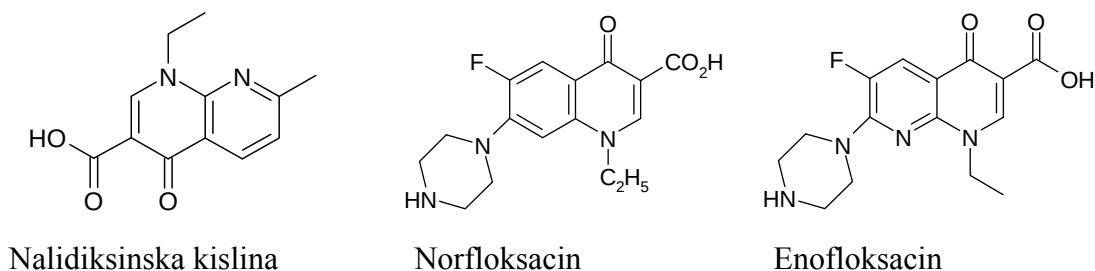
Zaradi strukturne podobnosti s para-amino benzojsko kislino sulfonamidi z njo tekmujejo kot substrat za encim dihidropteroat sintetazo. Le-ta je pomembna za sintezo dihidrofolne kisline, ta pa za sintezo tetrahidrofolne kisline, purinov in pirimidinov, ki so osnovni gradniki nukleinskih kislin. Prokariotske celice sintetizirajo tetrahidrofolno kislino same in se s tem, ko vgradijo neučinkovit ekvivalent para amino benzojeve kisline zastrupijo. Za evkariotske celice sulfonamidi niso strupeni, ker te ne morejo tvoriti lastne folne kisline in so vezane na zunanje vire že pripravljene folne kisline. (1)

Danes se sulfonamidi, predvsem v kombinaciji s trimetoprimom, uporabljajo za zdravljenje oportunističnih infekcij pri bolnikih z AIDS-om, pri zdravljenju infekcij urinarnega trakta ter opeklin. Kombinirano zdravilo je sestavljeno iz sulfametoksazola in trimetoprima. (5)

1.4.2. Kinoloni

Gre za sintezne produkte, ki delujejo proti širokemu spektru bakterij. Izvirajo iz nalidiksinske kisline. Uvrščamo jih v različne generacije glede na njihov spekter delovanja. Zdravila iz prve generacije imajo veliko ožji spekter bakterij na katere delujejo, kot poznejše generacije. V prvo generacijo uvrščamo nalidiksinsko kislino, ki je bila uvrščena na seznam toksičnih snovi. Zdravila prve generacije se danes več ne uporabljajo. Zdravila druge generacije so ciprofloksacin, enoksacin, fleroksacin, itd. V tretji generaciji sta levofloksacin, moksifloksacin, ki se danes pogosto uporabljata. V četrto generacijo uvrščamo klinefloksacin, gemifloksacin, sitafloksacin, itd.

Dobre lastnosti kinolonov se kažejo v dobri peroralni absorpciji. Novejši predstavniki kinolonov učinkujejo sistemsko. Ključna sestavina za antibakterijsko delovanje je 1,4-dihidro-4-okso-3-piridinkarboksilna kislina. Piridinski sistem mora biti povezan z aromatskim obročem. Lastnost nekaterih kinolonov je visoka občutljivost na svetlobo, pod vplivom katere postanejo toksični (npr. lomefloksacin). Kinoloni delujejo tako, da zavirajo DNA sintezo s tem, ko zavirajo delovanje DNA giraze. (1,5)



Slika 6: Predstavniki kinolonov.

1.5. Substance, ki motijo delovanje citoplazemske membrane - polimiksini

Delujejo podobno kot kationski detergenti in razgrajujejo membranski fosfolipidni dvosloj. Kemično so ciklični polipeptidi, ki delujejo baktericidno. Z njimi zdravimo okužbe, ki jih povzročajo G- bakterije. Kolistin je antibiotik, ki se uporablja za peroralno razkuževanje črevesja pred operacijo. (2)

1.6. Protimikrobne učinkovine za zdravljenje tuberkuloze

Za zdravljenje tuberkuloze se uporablja kombinacija več antibiotikov. S tem se zmanjša pojav rezistentnosti bakterije *Mycobacterium tuberculosis* na posamezen antibiotik. Sprva so uporabljali kombinacijo izoniazida in etambutola, z ali brez streptomcina, kasneje pa so začeli uporabljati rifampin, ki je nadomestil streptomicin. S tem se je čas zdravljenja bolezni iz dveh let zmanjšal na 6 - 8 mesecev. V prvi red zdravil uvrščamo izoniazid, rifampin, pirazinamid in etambutol. V drugi red uvrščamo cikloserin, kanamicin, kapreomicin in para-aminosalicilno kislino. (2, 5)

1.7. Pojav rezistentnosti

Naraščajoč problem v medicini predstavlja naraščanje števila bakterij odpornih na antibiotike. Rezistenca (odpornost na antibiotike) je stanje, ko bakterija razvije mehanizme, ki preprečijo delovanje enega ali več antibiotikov. Slikovit primer odpornosti na več antibiotikov predstavlja bakterija *Mycobacterium tuberculosis*. Brez razvijanja novih antibiotikov bi bilo odstranitev okuženih predelov pljuč edino možno zdravljenje. Mehanizmi, preko katerih bakterija razvije odpornost, so posledica mutacije ali pa pridobitve genov za odpornost od drugih organizmov. Pridobljena odpornost je rezultat spremenjene fiziologije in strukture in nastane zaradi sprememb mikroorganizma. Značilna je le za posamezne seve določene bakterijske vrste ali rodu in je nepredvidljiva. V klinični mikrobiologiji je zato potrebno testirati občutljivost bakterij za izbrane antibiotike.(12)

Preglednica II: Pregled osnovnih mehanizmov odpornosti proti bakterijam (16)

OSNOVNI MEHANIZEM	PRIMER
• Sprememba tarčnega mesta oz. prijemališča antibiotika.	Sprememba beljakovin, ki vežejo penicilin.
• Encimska razgradnja antibiotika.	Razgradnja beta-laktamskih antibiotikov z beta-laktamazami.
• Neprepustnost ali zmanjšana prepustnost celične membrane na antibiotik.	Pri po G-, sprememba purinov v celični steni.
• Sprememba presnovne poti, na katero deluje antibiotik.	Preprečena sinteza timina v bakterijski celici povzroči odpornost proti sulfonamidom in trimetoprimu.
• Aktivno izčrpavanje antibiotika iz bakterijske celice z neke vrste aktivnim transportom.	Odpornost G- in G+ bakterij proti tetraciklinom.

Vzroki za nastanek in naraščanje odpornosti bakterij so mnogi in kompleksni:

- Naraščanje števila imunsko oslabljenih bolnikov.
- Naraščanje števila starostnikov.
- Prevelika uporaba široko spektralnih antibiotikov.
- Naraščanje pogostosti potovanj po celem svetu.
- Neurejena prodaja antibiotikov.
- Uporaba antibiotikov slabše kvalitete.
- Zdravljenje z antibiotiki na lastno pest.
- Neupoštevanje doze in časa jemanja antibiotikov.
- Nepravilna uporaba antibiotikov (za zdravljenje virusnih bolezni).
- Slabo poznavanje delovanja antibiotikov.
- Pomanjkljivo spremljanje gibanja odpornosti med bakterijami.
- Velika uporaba antibiotikov pri živalih v profilaktične namene in uporaba antibiotikov v subterapevtskih dozah za pospeševanje rasti. (16)

Nizki odmerki in dolgotrajna izpostavljenost imajo dokazano večji selektivni potencial kot pravilni terapevtski odmerki, ki se dajejo krajši čas.

Bakterije in njihovi geni, vključno z geni za odpornost, krožijo med ljudmi, živalmi in drugimi ekosistemi. Čim večja je prevalenca odpornih bakterij, tem večja je verjetnost, da bo terapija infekcij z odpornimi bakterijami pri človeku neučinkovita. (16)

1.7.1. Odporni enterokoki

Enterokoki so normalni prebivalci prebavnega trakta ljudi in živali, lahko pa povzročajo bolnišnične infekcije pri človeku. Obstajajo dokazi, da lahko enterokoki prenesejo pridobljeno odpornost proti antibiotikom preko hrane na človeka in na humane patogene. Skrb predvsem zbuja enterokoki, ki so odporni proti vankomicinu. (16)

1.7.2. Odporne bakterije rodu *Salmonella* spp.

Bakterije rodu *Salmonella* spp. sodijo med najpogostejše povzročitelje bakterijskega gastroenteritisa pri človeku, ki se empirično zdravijo s fluorokinoloni. Redkeje prihaja do težkih sistemskih infekcij z bakterijo rodu *Salmonella* spp., ki se zdravijo s cefalosporini 3.

generacije. Pojavo rezistence je botrovala uporaba nekaterih antibiotikov pri človeku in njihovih veterinarskih analogov pri govedu. To je povzročilo navzkrižno odpornost proti antibiotikom, ki se uporabljajo v humani medicini. Rezistenčni geni, ki so kodirali odpornost proti široki paleti antibiotikov, so se prenašali preko plazmidov in transpozonov. (16)

1.7.3. Odporne bakterije vrste *Staphylococcus aureus*

MRSA - methicillin-resistant *S. aureus* je problematičen patogen v bolnišničnem okolju. Genomsko sekvenciniranje MRSA je potrdilo antibiotično rezistenco na mestu od 21 do 67 kb. Odpornost povzroči spremenjen receptor za penicilin (penicillin-binding protein, PBP), ki ima zmanjšano afiniteto za vse beta-laktamske antibiotike. Kodira ga kromosomski gen *mecA*. Da ugotovimo MRSA okužbo, se poslužujemo fenotipske značilnosti, da je odporen na meticilin z minimalno inhibitorno koncentracijo ali na oksacilin. Vendar pa večina sevov MRSA kaže heterogeno ekspresijo gena *mecA*, zato te odpornosti ni enostavno ugotoviti. Običajno se uporablja metoda PCR. (15) Bakterije vrste *Staphylococcus aureus* pogosto naseljujejo človeka in ob tem ne povzročajo težav, saj so lahko del normalne bakterijske flore. Naseljujejo nosno žrelno sluznico ter vlažne in poraščene dele kože (pazduha, dimlje in perianalni del). V posebnih okoliščinah (oslabljen imunski sistem) lahko povzročijo okužbe, kot so sepsa, endokarditis in pljučnica. (13)

Še bolj nevarna je rezistenca bakterije *S. aureus* na vancomicin - VRSA, ki je že globalno razširjena. Pri dajanju penicilina se je nanj razvila odpornost, saj so stafilokoki izdelovali penicilaze. Antimikrobno zdravljenje je postalo težavnejše zaradi multiplih mehanizmov za odpornost. Prav tako se je razvila odpornost na penicilinske derivate (meticilin), ki so delovali na beta-laktamaze. Kot posledica spremenjenih topoizomeraz so na bakterije postali odporni še fluorokinoloni. Vankomicin je tako postal glavna antimikrobna terapija za rezistentne seve. Novi izsledki in raziskave izolatov bolnika kažejo na prisotnost gena *mecA*, za meticilinsko odpornost, in gena *vanA* za vankomicinsko odpornost. Prisotnost *vanA* gena je bila potrjena s PCR preiskavo, in je bila locirana na 60 - kb plazmidu. DNA sekvenca gena *vanA* je bila identična kot pri vankomicin-rezistentni bakteriji vrste *Enterococcus faecalis*. Najverjetneje je prišlo do in vivo prenosa vankomicinske rezistence iz bakterije vrste *E. faecalis* na bakterijo vrste *S. aureus*. Še enkrat torej je bakteriji vrste *S. aureus* uspelo, da je postala odporna, kljub razvijanju novih antistafilokoknih zdravil. (14)

1.8. Principi in postopki določitve protimikrobnih učinkovin

Vsebnost protimikrobnih učinkovin je potrebno določiti, da poznamo jakost antibiotičnega zdravila ter njegovo uporabnost. V postopkih določitve uporabljamo referenčne standarde, katerih koncentracija je natančno določena. Pri pripravi so upoštevani mednarodni referenčni standardi oz. postopki za njihovo pripravo. Sam test mora biti zasnovan na način, da omogoča pregled veljavnosti postopka z matematičnim modelom. Na logaritemski skali morajo biti vzorci in standardi v linearni in paralelni liniji. Interval, na katerem z določeno verjetnostjo leži nek parameter, je interval zaupanja. Običajno se nahaja v območju med 95% in 105% vseh vrednosti. Kritična meja, pri kateri še dopuščamo napake, ki so se zgodile pri delu in merjenju je stopnja tveganja. Navadno znaša 5%. (7)

Za mikrobiološko določitev aktivnosti antibiotika po Ph.Eur. uporabljamo dve metodi, in sicer turbidimetrično ter metodo difuzije. (23)

1.8.1. Turbidimetrična metoda

Princip turbidimetrije:

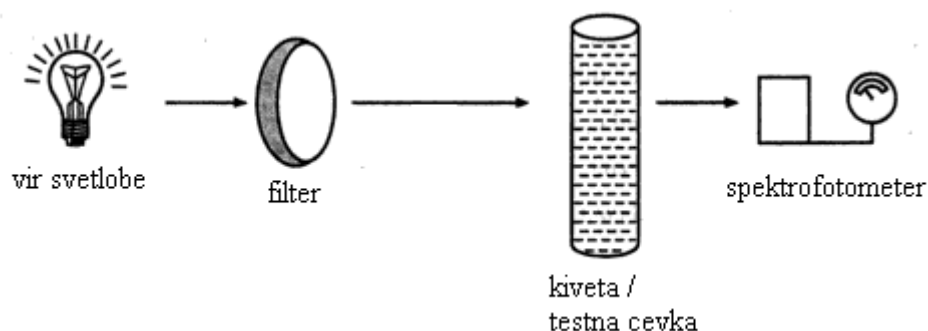
Gre za interakcijo homogene svetlobe, ki trči ob suspenzijo delcev. Del svetlobe se odbije, nekaj se je absorbira, nekaj pa se razprši in sipa. Način sipanja je odvisen od valovne dolžine svetlobe in od velikosti delcev. Pri turbidimetriji merimo jakost prepuščene svetlobe zaradi sipanja svetlobe. To merimo pod kotom 0° - detektor je v ravnini s testno cevko. Kot aparat se lahko uporablja spektrofotometer.

$$T = I / I_0$$

$$\%T = T \times 100$$

I...intenziteta prepuščene svetlobe

I_0 ...intenziteta vpadle svetlobe



Slika 7: Prikaz postavitve turbidimetrične metode. (26)

Turbidimetrična metoda sloni na določevanju inhibicije mikrobne rasti, ki jo zaznamo z merjenjem transmitance. Meri se motnost suspenzije, tekočega medija, v katerem se nahaja določena količina mikroorganizma ter testna substanca. Testna substanca povzroči spremembo transmitance, to pa primerjamo z referenčnim materialom znane koncentracije. (6)

Praktični del:

Tekoči medij s hranili inokuliramo z izbranim mikroorganizmom (občutljivim na antibiotik). Količina suspenzije mora zagotavljati merljive rezultate (po 4 urni inkubaciji). Inokuliran medij uporabimo takoj po pripravi. Pripravimo raztopine referenčne substance in raztopine antibiotika znanih koncentracij in enakovrednih aktivnosti. Da zagotovimo veljavnost testa uporabimo najmanj tri različne koncentracije teh raztopin. Priporočljivo je, da koncentracije raztopin naraščajo geometrično. V testne cevke vnesemo enake volumne vsake od raztopin in enak volumen inokuliranega gojišča. Sočasno pripravimo dve kontrolni cevki brez antibiotika. Obe vsebujeta inokulirano gojišče. Pri prvi takoj dodamo še 0,5 ml formaldehida R. Ti cevki služita za vzpostavitev primernih pogojev merjenja optičnih merilcev rasti. Cevke damo v vodno kopel - ogrejemo na temperaturo inkubacije, ki jo vzdržujemo 3 - 4 ure. Po inkubaciji ustavimo rast mikroorganizmov, tako da dodamo 0,5 ml formaldehida R v vsako cevko. Izmerimo motnost na treh signifikantnih točkah ob uporabi primerne optičnega merilca. Kot alternativo lahko uporabimo metodo, ki dovoljuje merjenje motnosti v testni cevki po enakem inkubacijskem času. Izračunamo jakost antibiotika z uporabo primernih statističnih metod. (7, 23)

Pri turbidimetrični metodi moramo paziti predvsem na:

- Pojav interferenc

Moteče snovi – interference absorbirajo svetlobo ter motijo analizo. Če vzorec razredčimo se zniža absorbcija interferenc, hkrati pa se poveča občutljivost metode.

- Motnost, obarvanost vzorca

Moti postopek določitve - z uporabo inokulirane raztopine slepe pri vsaki koncentracijski stopnji dosežemo, da to ne vpliva na analizo.

- Izbor prave valovne dolžine

Zaželjena je čimkrajša valovna dolžina. S tem se poveča intenziteta sipane svetlobe in moč signala.

- Razrast bakterij

Bakterije se morajo razrasti po celi testni cevki, da bodo rezultati zadovoljivi. Ta razrast je odvisen od karakteristik testne bakterije, sestave medija, temperature in časa inkubacije.

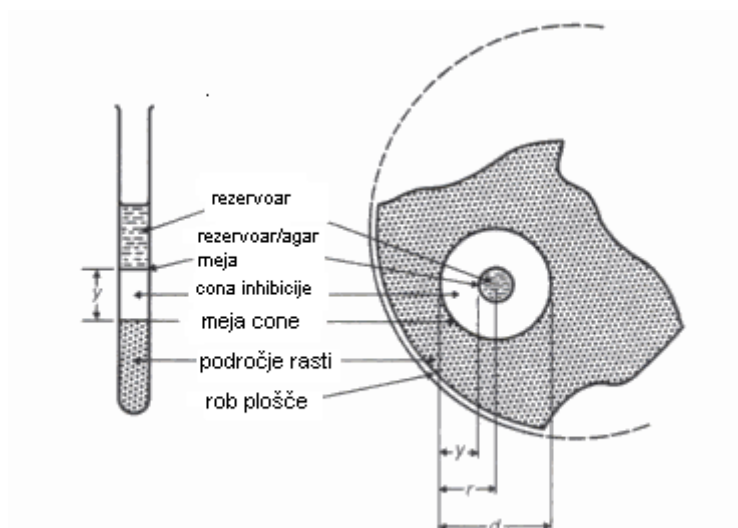
- Bakterije med rastjo tvorijo skupke

Nekateri mikroorganizmi med rastjo tvorijo skupke. Suspenzijo je v tem primeru težje pripraviti, saj morajo biti mikroorganizmi za turbidimetrično analizo enakomerno raztopljeni.

Turbidimetrična metoda se uporablja za določevanje antibiotikov, vitaminov, amino kislin ter ostalih substanc. Dobra stran metode je, da z njo lahko določamo večje število vzorcev (v primerjavi z difuzijsko metodo) z znano učinkovino ter natančno poznano koncentracijo. Vzorci ne smejo biti kontaminirani s substancami, ki bi motile analizo. Metoda je tudi bolj občutljiva za merjenje nizkih koncentracij. Izvedba je enostavna in hitra - za analizo potrebujemo 1 dan (pri metodi difuzije potrebujemo 2 dni). (27)

1.8.2. Metoda difuzije v agarju

Prav tako kot turbidimetrična metoda, tudi metoda difuzije sloni na principu primerjave rezultatov testne substance z referenčnim standardom. Metoda difuzije v agarju je običajno metoda izbora, ko preiskujemo vsebnost antibiotikov. Prednost metode je v njeni relativno preprosti izvedbi in nizkih stroških. Je metoda izbora za mikrobiološko določanje vsebnosti antibiotikov, predvsem zaradi njene natančnosti. (8)

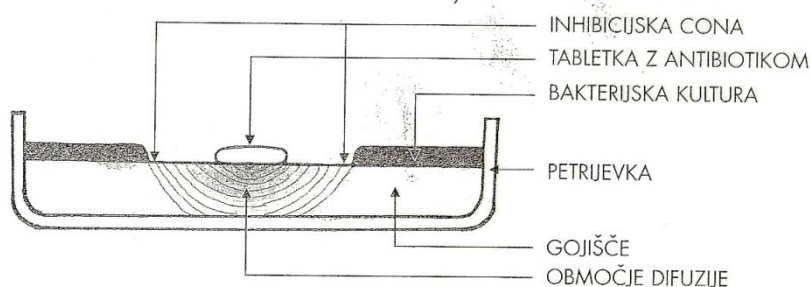


y ... širina cone

r... polmer cone

d...premer cone

Slika 8: Prikaz cone inhibicije v inokuliranem agarju. (20)



Slika 9: Prikaz antibiograma v petrijevki.

Slika prikazuje antibiogram. Je preprost in hiter test, s katerim ugotavljamo občutljivost bakterij na antibiotike. Način difuzije je drugačen kot pri določanju koncentracije antibiotika v raztopini.

Principi testa difuzije temeljijo na fizikalno-kemičnih dejavnikih, ki vplivajo na dinamiko difuzije antibiotika vzporedno z rastjo antibiotika. Cooper in Woodman, ki sta opazovala pojav difuzije, sta razvila formulo s sledečimi spremenljivkami:

X = cona inhibicije

D = koeficient difuzije (količina snovi, ki difundira skozi enoto volumna v smeri koncentracijskega gradienta na enoto časa)

T = kritičen čas (čas rasti mikroorganizma, v katerem ta doseže kritično populacijo)

M_o = koncentracija antibiotika v jamici

M = kritična koncentracija antibiotika (koncentracija antibiotika na meji cone po času T)

$$X^2 = 4DT \cdot 2.3(\log M_o/M)$$

Kritičen čas je lahko povezan s karakteristikami rasti testnega organizma ter inokuluma:

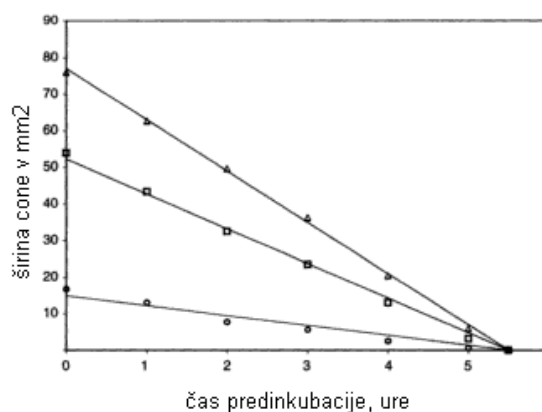
L = lag faza

n = faza generacije

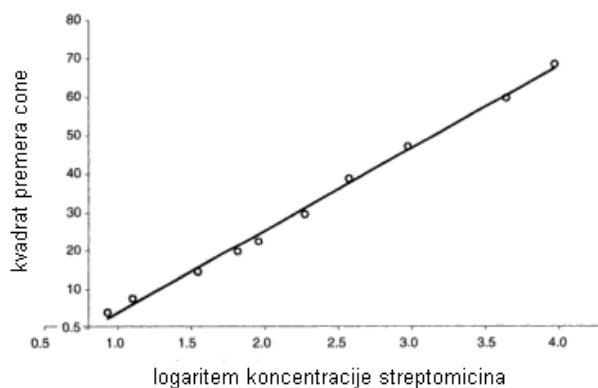
N = kritična populacija

N_o = gostota inokuluma

$$T = L + n \log N/N_o$$



Slika 10: Shema razmerja med predinkubacijo in širino inhibicijskih con iz kvantitativnega vidika. Inhibicijske cone so rezultat interakcije med različnimi koncentracijami streptomocina v agarju in stafilokokom. Črte se na abscisi sekajo v isti točki (5.36), ki predstavlja kritični čas. (20)



Slika 11: Odnos med kvadratom premera inhibicijske cone in koncentracijo antibiotika. Inhibicijske cone so rezultat interakcije med različnimi koncentracijami streptomocina v agarju in stafilokokom. (20)

Vse spremenljivke direktno vplivajo na velikost inhibicijskih con. Če želimo doseči veljavne rezultate, je potrebno standardizirati čim več spremenljivk.

Princip nastanka inhibicijskih con: antibiotik difundira v agar, ki smo ga inokulirali z določenim mikroorganizmom. Zaradi rasti mikroorganizma in difuzije antibiotika prideta ti dve komponenti v stik, kar povzroči nastanek inhibicijskih con. Mikroorganizem ima najprej fazo počasne rasti (če je v obliki spor, je pred tem še faza germinacije), nato pa se razmnoži do te mere, da celice na določeni razdalji ne zmorejo več absorbirati antibiotika. Nadaljnja difuzija je s tem preprečena. Na tej razdalji je fiksirana meja. Koncentracija antibiotika na meji je kritična koncentracija. Populacija celic, ki so potrebne za absorbcijo vsega antibiotika pri kritični koncentraciji, je kritična populacija. Čas, da mikroorganizem doseže kritično populacijo, je kritični čas. V tem času postanejo meje fiksne. Rast mikroorganizmov se nadaljuje. Nastanejo jasne inhibicijske cone. (17)

Test difuzije je široko uporaben. Kljub nezapleteni izvedbi na premer inhibicijskih con vplivajo številni faktorji:

- Količina raztopine, ki jo vnesemo v jamico v agarju

V jamico damo vedno identično količino raztopine, saj vsako odstopanje vpliva na premer con. Spremembe v količini vplivajo na koncentracijo antibiotika. S pipeto rokujemo tako, da jo z raztopino najprej speremo, nato pa željeni volumen injiciramo v jamico. Zadnjo kapljico pustimo obviseti na nastavku. Običajno volumen znaša 200 μ l.

- Velikost in širina jamice

Za preiskavo, ki jo delamo, vse jamice naredimo z istim luknjačem. Postavimo ga pravokotno na ploščo ter ga enakomerno vtisnemo v agar. Ves agar v tem krogu odstranimo, saj bi morebitni ostanki zmanjšali volumen jamice. Če naredimo večje jamice, pričakujemo večje cone in obratno.

- Karakteristike antibiotika

Dve ključni lastnosti antibiotika sta velikost molekul in naboj. Na splošno večje molekule potujejo počasneje, inhibicijske cone so zato manjše. Kot na primer glikopeptidi, kot sta vankomicin in teikoplanin, pa tudi polimiksini, kot sta polimiksin B in kolistin. Tudi močno kationske molekule imajo manjšo zmožnost difuzije zaradi interakcij s kislimi in sulfatnimi skupinami polimernega agarja. Polimiksini so močni kationi in tudi zaradi tega razloga slabše difundirajo. (10)

- Karakteristike mikroorganizma

Pomembna je njegova občutljivost in stanje (spore ali vegetativna oblika).

- Oblika in stanje agarja

Če mikroorganizmu dodamo hranila, ki ugodno vplivajo na njegovo rast, bo ta rasel hitreje. Inhibicijske cone bodo manjše.

- Globina agarja

Globina agarja ima vpliv na premer inhibicijskih con. Običajno je okoli 4 mm, s čimer je doseženo razmerje med ploščo s tanjšo plastjo agarja, pri kateri lažje dobimo neko velikost inhibicijskih con, ter med debelejšo plastjo, ki zaradi svoje debeline zmanjšuje možnost varabilnosti con (zaradi manjše možnosti variabilnosti globine te plasti). (10)

- Čas inkubacije

Pri hitro rastočih bakterijah se premer inhibicijskih con formira v nekaj urah po začetku inkubacije. Teoretično bi bilo možno branje rezultatov že, ko rast postane vidna. Z nadaljevanjem inkubacije (priporočljivo za vse mikroorganizme in vse metode) lahko pride do rahle spremembe v premeru inhibicijskih con po tistem času inkubacije, ko je bila rast prvič opazna. Te spremembe so posledica zapoznele rasti, boljše vidne delne inhibicije in/ali zapoznelega pojava rezistentnih različic bakterij.

Nekatere bakterije potrebujejo daljši čas inkubacije od 24 ur. Bakterija *H. pylori* potrebuje 3 dni in nekateri sevi bakterije *Yersinia pestis* 48 ur. Doba inkubacije 24 ur je priporočena, ko testiramo antistafilokokne peniciline (oksacilin ali meticilin) in glikopeptide (vankomicin). (10)

- Kontrola temperature

S primerno temperaturo inkubacije želimo doseči čim boljšo rast organizma, ki ga testiramo. Večina za človeka patogenih bakterij optimalno raste pri 37°C. Tako večina metod uporablja temperature od 35°C - 37°C. Temperaturna kontrola je zahtevana, ko plošče inkubiramo, od samega mikroorganizma pa je odvisno, kako natančno bomo nastavili termostat. Poleg same vrednosti temperature je pomembna tudi njena konstantnost. V primeru, da temperatura ni optimalna, lahko to povzroči upočasnjeno rast, inhibicijske cone so zato večje.

- Gostota inokuluma

Večja gostota inokuluma povzroči, da bakterije hitreje dosežejo stanje kritične populacije. Če je gostota inokuluma zelo velika, je možnost, da do pojava inhibicijskih con sploh ne pride, četudi je mikroorganizem občutljiv. Gostota je posebej pomembna v primeru, da bakterija proizvaja inaktivirane encime (kot so beta-laktamaze) in če encimi potrebujejo

indukcijo. Pri nizki gostoti inokuluma lahko antibiotik uniči vse mikroorganizme, še preden se tvorijo učinkoviti encimi, nastale pa bodo veliko večje inhibicijske cone. (10)

Velikost inhibicijske cone je obratno sorazmerna velikosti inokuluma. Če je gostota inokuluma velika, so inhibicijske cone zelo ostre. Paziti je potrebno, da gostota ni prevelika, saj bi v tem primeru prišlo do rasti bakterij v inhibicijsko cono, pri čemer bi lahko sklepali, da je antibiotik neobčutljiv oziroma deluje bakteriostatično.

- Rob inhibicijske cone

Zunanji rob inhibicijske cone bo določen glede na aktivnost antibiotika in mikroorganizma, glede na mehanizme odpornosti (če so prisotni) in glede na posebnosti ter značilnosti mikroorganizma. Nekateri antibiotiki so znani po tem, da povzročajo zabrisane in nerazločne robove inhibicijskih con, ko se inhibicija postopno zmanjšuje v razdalji 1 - 5 mm. To je običajna oblika na primer pri sulfonamidih. Pri vseh metodah, pri katerih se pojavi ta nedoločljiva meja, priporočajo, da se oceni, približno kje se pojavi 80% inhibicije. To se vzame kot meja inhibicijske cone. Za to oceno je potrebna izkušena oseba. Pri meritvi večjih inhibicijskih con je prisotna manjša variabilnost, kot pri manjših conah. Dobimo bolj zanesljiv rezultat.

- Razdalja med jamicami

Določimo jo glede na uporabljen antibiotik in stopnjo rasti organizma. Večja koncentracija antibiotika in počasnejša stopnja rasti mikroorganizma povzročita večje inhibicijske cone. Če so prevelike, pride do prekrivanja s sosednjo inhibicijsko cono. To zmanjša stopnjo natančnosti določitve premera inhibicijske cone. Zato je že pred analizo potreben razmislek o smotrnem razmaku med jamicami.

- Čas po nanosu raztopin pred inkubacijo

Po nanosu raztopin plošče takoj ne inkubiramo. Tako dopustimo možnost da antibiotik difundira v agar, še predno se mikroorganizem začne aktivno razmnoževati. Če je faza predifuzije predolga, lahko pride do prevelikih inhibicijskih con. Ploščo v ta namen navadno postavimo v hladilnik (rast mikroorganizmov je tako minimalna, prav tako pa antibiotik difundira v agar v manjši meri kot na sobni temperaturi).

- Čitanje premera con

Za čitanje plošč je potrebna dobra svetloba. Za optimalno čitanje naj bo plošča nekaj centimetrov nad črnim, neodsevajočim ozadjem. Od tod usmerimo luč na ploščo. V večini primerov je branje inhibicijskih con enostavno. Če se znotraj inhibicijske cone pojavi motnost, je ne upoštevamo. Ko se znotraj inhibicijskih con pojavijo kolonije, lahko sklepamo, da ima bakterija rezistentne seve (smatramo jo za odporno) ali pa je prišlo do mešanega inokuluma. (10)

- Uporabljeni materiali

Vsa steklovina in pripomočki morajo biti pred in po uporabi očiščeni z navadno in destilirano vodo. Pred uporabo jih dobro osušimo, da se izognemo neželenim interakcijam z vodo. Plošče in ostali material, ki pride v stik z mikroorganizmi, moramo po uporabi sterilizirati v avtoklavu.

Določanje aktivnosti antibiotikov v različnih zdravilnih oblikah

Posamezna zdravilna oblika antibiotika omogoča optimalno uporabo zdravila glede na starost uporabnika (dojenček, majhen otrok, odrasla oseba, starostnik) in tudi na mesto delovanja, saj lahko želimo, da zdravilo deluje le lokalno (npr. na koži, na sluznici očesa, nosu ali ust, ...) ali pa sistemsko. Z izbiro prave zdravilne oblike preprečimo spreminjanje učinkovine, dokler ta ne pride na mesto delovanja ali pa vplivamo na hitrost delovanja zdravila. (21)

Ko določamo aktivnost antibiotikov upoštevamo zdravilno obliko in agregatno stanje zdravila. Antibiotiki so lahko v tekoči zdravilni obliki (raztopina, suspenzija, emulzija), trdni obliki (prašek, granulat, tablete, svečke) in poltrdi obliki (mazilo, krema).

Če določamo aktivnost antibiotika v vodni raztopini, dodamo le pufer ali destilirano vodo, da razredčimo do želene koncentracije (upoštevamo deklarirano koncentracijo raztopine).

Če določamo aktivnost antibiotika v zdravilu, ki je v trdni obliki, npr. tableta, le-to najprej zdrobimo in raztopimo v primernem topilu. Če je antibiotik v vodi ali pufru slabo topen, se poslužujemo ekstrakcije s topili, kot so klorovodikova kislina, metanol, etanol, formamid in N, N-dimetilformamid.

Če je pripravek v obliki mazila uporabimo primerno topilo, s katerim raztopimo lipofilno podlago. Nato ekstrahiramo s pufrom, v katerega prehaja učinkovina. Uporabimo lahko

eter, v katerem vzorec najprej raztopimo, nato pa ekstrahiramo etrno raztopino s pufrom. V emulzijah bo uspešnost ekstrakcije odvisna od same topnosti učinkovine in deleža, ki ga bomo uspeli izolirati. Izolacija je uspešnejša, če ekstrakcijo večkrat ponovimo. Ekstrahiramo s pufrom oz. primernim organskim topilom, ekstrakt pa razredčimo do želene koncentracije.

1.8.3. Testni mikroorganizmi

Faktorji okolja, ki vplivajo na rast mikroorganizmov

Gojišče mora vsebovati primerna hranila, ki jih mikroorganizem uporabi za svojo rast. Pomembni so pH vrednost gojišča, temperatura in kontrolirana atmosfera.

A) Gojišča so lahko selektivna (omogočajo rast le nekaterim mikroorganizmom) ali obogatitvena (v ta namen lahko dodamo kri, ogljikove hidrate, dušik, minerale in ostale rastne faktorje). Za študijo metabolizma je potrebno pripraviti v celoti sintetična gojišča. Večina živečih bakterij dobro uspeva, če uporabimo kvasni ekstrakt in ostale proteinske izvlečke.

B) Večina mikroorganizmov najbolje raste pri pH od 6,0 do 8,0 (nevtrofili). Nekatere oblike (acidofili) imajo optimum, ki je nižje od pH vrednosti 3,0, medtem ko imajo nekatere oblike mikroorganizmov (alkalofili) pH višje od 10,5. Mikroorganizmi lahko med razmnoževanjem sproščajo kisle ali bazične snovi. Pride do spremembe pH, ki lahko zavre razmnoževanje. Gojiščem zato dodajamo pufre, ki preprečijo prevelike spremembe v vrednosti pH.

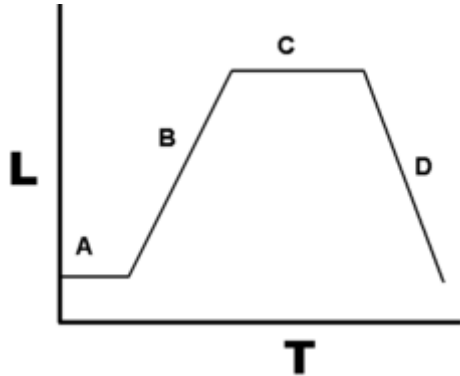
C) Za večino živečih mikroorganizmov je optimalna temperatura pri 30°C, mezofilni mikroorganizmi imajo svoj optimum med 20°C in 40°C. Telesna temperatura gostitelja je optimalna za simbiotski odnos. Nekateri mikroorganizmi najbolje rastejo pri temperaturah od 15°C - 20°C (psihrofilne oblike), spet drugi pri višjih vrednostih- od 50°C - 60°C (termofilne oblike).

D) Večina testnih mikroorganizmov spada med obligatne aerobe, ki za svoje razmnoževanje potrebujejo kisik. Mikroorganizmi, ki so se sposobni razmnoževati v aerobnem ali v anaerobnem okolju so fakultativni mikroorganizmi. Obligatni anaerobi se ob prisotnosti prostega kisika ne morejo razmnoževati ne rasti in zahtevajo drug vir. Potrebna je pravilna atmosfera. (22, 25)

Za določanje aktivnosti antibiotikov se uporabljajo standardizirani testni mikroorganizmi iz bank mikroorganizmov. Te banke so: ATCC, NCTC, CIP in NCIB.

Faze bakterijske rasti

Ko mikroorganizem inkubiramo, bo ta najprej rasel počasi. Celice se še prilagajajo na specifične pogoje v mediju. Govorimo o lag fazi. Nato sledi faza rasti, ko se celice začnejo deliti. To je logaritemska faza ali faza eksponentne rasti. Sledi stacionarna faza, ko se aktivna rast zaključi, saj pogoji v mediju tega več ne dopuščajo. Nato sledi faza upadanja. (18)



L...število mikroorganizmov (log)

T... čas

A.. lag faza

B... log faza

C... stacionarna faza

D...faza odmiranja

Slika 12: Faze bakterijske rasti. (19)

Priprava spor bakterije *Bacillus subtilis*

Osnovno suspenzijo spor mikroorganizmov bakterij *Bacillus subtilis* pripravimo na naslednji način: bakterije pustimo rasti 7 dni na temperaturi 37°C - 39°C na površini gojišča (Cm1) s pH 6,5 – 6,6, kateremu dodamo 1 µg magnezijevega sulfata R/ml. S sterilno vodo speremo rast, v kateri so večinoma spore, ter nato segrevamo 30 min na 70°C ter damo v ustrezno raztopino. Suspenzija spor se lahko daljši čas shranjuje na temperaturi okoli 4°C. Uporabimo jo kot inokulum, ki ga cepimo na gojišče, katerega smo predhodno utekočinili in ohladili na 45°C - 50°C. Zmešamo, da dobimo homogeno raztopino. (11) Količino mikroorganizma prilagajamo tako, da dosežemo optimalno rast in odziv preiskovanega vzorca in standarda glede na čas inkubacije. (23)

2. NAMEN DELA

Za določanje vsebnosti učinkovine v antibiotičnem zdravilu se po Evropski farmakopeji uporablja metoda difuzije. Kot rezultat dobimo inhibicijske cone, njihovo velikost pa moramo ročno določiti v fazi čitanja. Ta faza je najbolj nezanesljiv del izvedbe testa, mi pa potrebujemo metodo, ki bo dajala zanesljive odgovore na to ali je zdravilo primerno za uporabo ali ne. Namen dela je izboljšanje zanesljivosti difuzijske metode na podlagi izboljšanja berljivosti inhibicijskih con. Z dobro izvedbo vseh faz dela si prizadevamo, da so inhibicijske cone čim bolj definirane, saj so le take primerne za merjene z avtomatiziranim čitalcem. Na ta način bi se izognili ročnemu merjenju inhibicijskih con. Delo temelji na predpisih in postopkih iz Ph.Eur.

3. MATERIALI IN METODE

3.1. Materiali

3.1.1. Gojišča

Za pripravo hranljivih gojišč potrebujemo:

- Agar v prahu (101614, MERCK)
- Pepton (LP0085, OXOID)
- Kvasni ekstrakt (B00253M, OXOID)
- Mesni ekstrakt (103979, MERCK)
- Kalijev difosfat (104871, MERCK)
- Kalijev monofosfat (137010, MERCK)
- Puferne raztopine pH 6 in pH 8 (po USP)
- Prečiščena voda

Pri izbiri agarja se držimo navodil metode ter primernosti glede na bakterijsko vrsto, ki jo uporabimo in njenih morebitnih specifičnih zahtev po hranilih.

Priprava PEN gojišča:

Zatehtamo pepton in kvasni ekstrakt na tehtnici Exacta 2200 EB. Segrevamo v vodi. Uporabimo vodno kopel WB - 36 (KAMBIČ LABORATORIJSKA OPREMA). Raztopino nato prefiltriramo skozi Büchnerjev lij, dodamo puferno raztopino in ohladimo na sobni temperaturi. S pH metrom MP225 (METTLER TOLEDO) izmerimo pH, ki mora biti med 6,6 - 6,8. Uporabimo sondo InLab®Surface (METTLER TOLEDO), ki jo priključimo na pH meter. Po potrebi, med mešanjem na mešalu Rotamix 550 MMH, uravnavamo pH z 1M NaOH ali 1M HCl. Gojišče razdelimo na dva dela, v katera dodamo različno količino agarja. Segrevamo v vodni kopeli, dokler se v celoti ne raztopijo vse sestavine in nastane homogena raztopina. Nato gojišče razlijemo v erlenmajerice, v vsako po približno 300 ml. Zapremo z zamaški ter vsako erlenmajerico označimo z imenom gojišča, datumom priprave, pH gojišča in rokom uporabe. Za kontrolo sterilizacije uporabimo indikatorski trak. Steriliziramo 15 minut pri 121°C - 124°C, avtoklav A 500/700 (KAMBIČ LAB. OPR.), in nato preverimo pH. Do uporabe gojišče hranimo v hladilniku pri temperaturi 5°C, kjer je uporabno 3 mesece.

Preglednica III: PEN hranljivo gojišče

sestava	količina
pepton	6,0 g
kvasni ekstrakt	3,0 g
puferna raztopina pH 6	125 ml
agar v prahu	9,25 g/500 ml za spodnjo podlogo
agar v prahu	7,0 g/500 ml za zgornjo podlogo
prečiščena voda	875 ml

Kot alternativo temu gojišču lahko uporabimo gojišče 2 po USP.

Preglednica IV: Hranljivo gojišče 2 (po USP)

sestava	količina
pepton	6,0 g
kvasni ekstrakt	3,0 g
mesni ekstrakt	1,5 g
agar v prahu	15,0 g
prečiščena voda	1000 ml

Pred sterilizacijo pH uravnamo na $6,6 \pm 0,1$.

Priprava DHS gojišča:

Poslužimo se istega postopka in naprav, kot pri pripravi PEN gojišča. Drugačna je le sonda za merjenje pH. Ta se imenuje InLab® pH2 Expert pro (METTLER TOLEDO). Upoštevamo drugačne natehte komponent in drugo vrednost pH puferne raztopine. Pred sterilizacijo mora biti pH med 8,0 - 8,2. Do uporabe gojišče hranimo v hladilniku pri temperaturi 5°C, kjer je uporabno 3 mesece.

Preglednica V: DHS hranljivo gojišče

sestava	količina
pepton	10,0 g
kvasni ekstrakt	3,0 g
puferna raztopina pH 8	125 ml
agar v prahu	8,75 g/500 ml za spodnjo podlogo
agar v prahu	6,75 g/500 ml za zgornjo podlogo
prečiščena voda	875 ml

Obe omenjeni gojišči steriliziramo 15 minut na 121°C - 124°C. Pred sterilizacijo pH uravnavamo bodisi z 1M NaOH bodisi z 1M HCl, po njej pa ga še enkrat preverimo. (23, 24)

3.1.2. Pufri

Primarna naloga pufrov je, da uravnavajo kislost oziroma bazičnost raztopin. Preprečujejo spremembe pH vrednosti ob dodatku vzorca na gojišče. Izbira pufra in prava natehta sestavin vplivata na pravilnost rezultatov.

Za pripravo pufernih raztopin potrebujemo:

- K_2HPO_4 (137010, MERCK)
- KH_2PO_4 (104871, MERCK)
- Prečiščena voda
- 18 M fosforna kislina ali 1 M HCl
- 10M KOH

Priprava fosfatnega pufra št.1:

Na tehtnici Exacta 2200 EB natančno zatehtamo K_2HPO_4 in KH_2PO_4 . Dodamo prečiščeno vodo do oznake na bučki in segrevamo v vodni kopeli WB - 36 (KAMBIČ LAB. OPR.). Ohladimo na sobno temperaturo. pH vrednost izmerimo s pH metrom MP225 (METTLER TOLEDO) in sondo pH2 InLab®413 istega proizvajalca. Ob mešanju na mešalu Rotamix

550 MMH uravnavamo pH z 1M NaOH ali 1M HCl. Kisline oziroma baze dodajamo počasi, po kapljicah, ter sproti preverjamo pH puferne raztopine. pH pred sterilizacijo mora biti $6,0 \pm 0,1$. Erlenmajerico, volumna 2000 ml, označimo z imenom pufra, datumom priprave, pH vrednostjo in rokom uporabe. Za kontrolo sterilizacije uporabimo indikatorski trak. Steriliziramo 15 minut na 121°C - 124°C v avtoklavu A 500/700 (KAMBIČ LAB. OPR.). Puferno raztopino do uporabe hranimo v hladilniku pri temperaturi 5°C , kjer je uporabna 1 leto.

Preglednica VI: Fosfatni pufer št.1 (po USP, pH 6)

sestava	količina
K₂HPO₄	2,0 g
KH₂PO₄	8,0 g
prečiščena voda	1000 ml

pH uravnamo na $6,0 \pm 0,05$ z 1M NaOH ali z 1M HCl. Pufer steriliziramo 15 minut pri 121°C - 124°C .

Priprava fosfatnega pufra št.3:

Uporabimo isti postopek in naprave, kot pri pripravi fosfatnega pufra št.1, le da za merjenje pH vrednosti s pH metrom uporabimo sondo InLab® pH2 Expert pro (METTLER TOLEDO). pH pred sterilizacijo mora biti $8,0 \pm 0,1$. Puferno raztopino do uporabe hranimo v hladilniku pri temperaturi 5°C , kjer je uporabna 1 leto.

Preglednica VII: Fosfatni pufer št.3 (po USP, pH 8)

sestava	količina
K₂HPO₄	16,73 g
KH₂PO₄	0,523 g
prečiščena voda	1000 ml

pH uravnamo na $8,0 \pm 0,1$ z 1M NaOH ali z 1M HCl. Pufer steriliziramo 15 minut na 121°C - 124°C . (23, 24)

3.1.3. Laboratorijski pribor

- Steklena plošča

Pri vseh tovrstnih testih uporabljamo plošče istih dimenzij, ki so dovolj velike, da na njih izvajamo 3x3 različico testa (3 + 3 odmerki), ki nam zagotavlja boljše rezultate in boljše statistično vrednotenje. Pred uporabo mora biti plošča očiščena in suha. Ploščo naravnamo, tako, da je popolnoma vodoravna glede na podlago. S tem dosežemo enako debelino agarja po celi površini.

- Pipeta

V jamice vedno vnašamo popolnoma enake volumne raztopin. Zato vse raztopine, ki jih nanašamo na isto gojišče, apliciramo z isto kalibrirano pipeto.

- Luknjač

Z luknjačem v agarju vdolbemo jamico, ki služi kot rezervoar. Premeri luknjačev so različni, pomembno pa je, da, podobno kot pri pipeti, uporabimo isti luknjač za isto gojišče. Luknjač moramo pred uporabo sterilizirati. Cilindrične diske, ki smo jih izdoblili z luknjačem, pobereмо s sterilno spatulo.

- Pipetni nastavki

Uporabimo čiste sterilne nastavke. Nastavki so plastični in za enkratno uporabo.

- Šablona

Šablona je velikosti steklene plošče. Na njej so označeni položaji standardov in vzorcev v latinskem kvadratu.. Šablono postavimo pod ploščo in nanašamo raztopine po določenem redu. Uporabimo šablono, ki omogoča nanos treh različnih koncentracij vzorcev in standardov.

3.1.4. Preučevani vzorci in referenčni standardi

Uporabimo tri različne vzorce in referenčne standarde zanje.

- Prašek za peroralno suspenzijo 250 mg/5 ml (KRKA): shranimo ga zaščiteneга pred svetlobo pri temperaturi do 25°C; uporabljeni referenčni standard je *Amoxicillin trihydrate batch: AM-I*, koncentracija 826 µg/mg, shranjujemo pri temperaturi 5°C, (KRKA).
- Filmsko obložene tablete 1000000 i.e. (KRKA, SANDOZ): vzorec shranimo zaščiteneга pred vlago pri temperaturi do 25°C; uporabljeni referenčni standard je

- Filmsko obložene tablete 400 mg (KRKA): vzorec shranimo zaščenega pred vlago, pri temperaturi do 25°C; uporabljeni referenčni standard je *Midecamycin batch: MID-1*, koncentracija 995 µg/mg; pred uporabo ga posušimo pri temperaturi 60°C in 0,67kPa, (KRKA).

3.1.5. Testni mikroorganizem

Testni mikroorganizem je bakterija *Bacillus subtilis* ATCC 6633. Shranjuje se v banki mikroorganizmov - CRYOBANK™, pri temperaturi -70°C. Bakterije se nahajajo na peletih, na katerih je točno določeno število bakterij.

3.2. Metode

Za analizo jakosti antibiotika se po Ph.Eur. uporabljata dve metodi.

- Turbidimetrična metoda
- Metoda difuzije v agarju

Izberemo slednjo. Aktivne komponente antibiotika difundirajo v agar, ki je inokuliran z mikroorganizmom. Po inkubaciji na plošči opazimo inhibicijske cone, njihova velikost pa nakazuje stopnjo občutljivosti bakterije na antibiotik. Majhna cona oz. njena odsotnost kaže na odpornost.

Vse stopnje v testu izvajamo v paralelkah, zavrlo natančnosti in ponovljivosti.

3.2.1. Priprava raztopin vzorcev in referenčnih standardov

Pri pripravi teh raztopin moramo biti zelo pazljivi, da zagotovimo ustrezno kakovost testa. Neka koncentracija standarda nam služi za primerjavo z raztopino vzorca iste koncentracije. Govorimo o referenčni koncentraciji. Posamezne koncentracije standardnega niza pripravimo tako, da s pufrom redčimo osnovno raztopino. Osnovni standardi, ki smo jih uporabljali za nadaljnje redčitve, so deklarirani, z navedeno aktivnostjo, rokom trajanja ter načinom shranjevanja. Hranimo jih v hladilniku pri temperaturi 5°C, pred uporabo pa jih pustimo na sobni temperaturi za najmanj 10 minut, da se ogrejejo. Pripravimo tri različne koncentracije standardov in raztopin, ki so med seboj v geometričnem razmerju 1:2 (vsaka naslednja koncentracija je enkrat večja od predhodne).

Pripravljene raztopine ustrezno označimo (z zaporedno številko in koncentracijo), da se izognemo zamenjavam, hkrati pa imamo možnost, da po opravljenem testu preverimo ustreznost dela in morebitne napake iščemo v drugih stopnjah testa.

3.2.2. Priprava osnovne suspenzije testnega mikroorganizma

Iz Cryobanke s sterilno iglo vzamemo pelet, na kateri so bakterije *Bacillus subtilis* ATCC 6633. Preostalo banko mikroorganizmov hitro vrnemo v zmrzovalnik, da ne pride do njihove odtalitve. Osnovno suspenzijo testnega mikroorganizma pripravimo tako, da perlo (na kateri so zamrznjeni mikroorganizmi) damo v Caso bujon (5 ali 10 ml) Ta nam služi kot inokulum.

Na vsaki peleti je ocenjeno število bakterij, ki jih damo v določeno količino gojišča. Na podlagi tega lahko rečemo, koliko CFU/ml imamo v gojišču. Več kot imamo suspenzije, več mikroorganizmov je v njej (koncentracija pa je enaka). Z izbiro določenega volumna suspenzije torej prilagajamo količino mikroorganizmov v inokulumu.

Števnost perl se dela vsak mesec.

3.2.3. Priprava plošč

Gojišče, predhodno pripravljeno in shranjeno v hladilniku, utekočinimo s pomočjo vodne kopeli. Shladimo do sobne temperature ter inokuliramo z mikroorganizmom. To storimo tako, da suspenzijo mikroorganizmov s sterilno pipeto dodamo ohlajenemu gojišču. Po inokulaciji gojišče previdno premešamo, da preprečimo tvorbo mehurčkov. Na ploščo, ki je vodoravno uravnana z vodno tehtnico, enakomerno razlijemo 300 ml gojišča, kar ustreza debelini plasti okoli 4 mm. Pustimo stati nekaj minut na sobni temperaturi, da se gojišče strdi in prenesemo v hladilnik. Gojišče postane čvrsto in tako vanj lažje vtisnemo jamice. Poleg tega dobimo ostrejše in širše inhibicijske cone, saj učinkovina difundira še pred začetkom rasti mikroorganizma.

Kot alternativo uporabimo gojišče, ki je sestavljeno iz dveh plasti, pri kateri spodnja ni inokulirana z mikroorganizmom. Na strjeno spodnjo plast vlijemo zgornjo plast, ki je inokulirana. V tem primeru na ploščo razlijemo 2 x 160 ml gojišča. S to tehniko prilagodimo občutljivost metode.

3.2.4. Nanašanje raztopin na ploščo

Ravnamo se po shemi latinskega kvadrata. Oznake na shemi kažejo, na katera mesta nanašamo določene raztopine. Pred nanosom raztopine iz bučk prelijemo v izparilnice, iz katerih z avtomatsko pipeto Eppendorf Research pro odmerimo vedno enak volumen raztopine - 200 µl. Po nanosu ploščo nekaj časa pustimo na sobni temperaturi ali v hladilniku (difuzija antibiotika pred samo rastjo mikroorganizma).

S1	V1	V2	S3	S2	V3
V1	V3	S1	S2	V2	S3
V2	S3	S2	S1	V3	V1
S3	S2	V3	V1	S1	V2
S2	V2	S3	V3	V1	S1
V3	S1	V1	V2	S3	S2

S1 – standardna raztopina, prvo redčenje

S2 – standardna raztopina, drugo redčenje

S3 – standardna raztopina, tretje redčenje

V1 – raztopina vzorca, prvo redčenje

V2 – raztopina vzorca, drugo redčenje

V3 – raztopina vzorca, tretje redčenje

Slika 13: Shema latinskega kvadrata.

3.2.5. Inkubacija

Inkubiramo v inkubatorju, ki je že ogret na temperaturo inkubacije. Pri prenosu v inkubator pazimo, da ploščo držimo v vodoravnem položaju, da se raztopine ne razlijejo. Inkubacija traja med 16 do 18 ur, pri temperaturah, ki so specifične za posamezen organizem.

3.2.6. Čitanje rezultatov

Po končani inkubaciji s pomočjo kljunastega merila Mitutoyo digimatic izmerimo inhibicijske cone na 0,1 mm natančno. Ta faza je najpomembnejša, saj nam meritve podajo odgovor na ključne statistične parametre. Za merjenje je potrebna natančnost in izkušnost. Inhibicijske cone čita en analitik, saj je merjenje v neki meri subjektivno. Priporočljivo je, da rezultate prečitamo čim prej, saj s časom mikroorganizmi začnejo preraščati, inhibicijske cone postanejo manj jasne, čitanje rezultatov pa težavnejše.

3.2.7. Obdelava podatkov s programom Combistats

Dobljene podatke statistično obdelamo s pomočjo programa Combistats. Pod splošne podatke analize vpišemo ime substance, ki jo določamo, številko in datum analize, številka plošče in uporabljen sev. V tabelo, kjer so podatki o standardu, vpišemo njegovo ime, številko serije, rok uporabnosti, začetno koncentracijo in korake redčitve, ter premere inhibicijskih con v milimetrih. Enake podatke, le da se nanašajo na vzorec, vnesemo v tabelo s podatki za vzorec. Program izračuna parametre variance (mera statistične razpršenosti neke spremenljivke). S pomočjo inhibicijskih con se izračuna koncentracija antibiotika. Dobimo naslednje podatke:

- podatki o izračunani vsebnosti antibiotika
- delež vsebnosti antibiotika glede na predpisano koncentracijo antibiotika
- najnižja in najvišja vsebnost antibiotika glede na izračunano koncentracijo antibiotika

Za vsak parameter variance se izračuna verjetnost t.j. p-vrednost (možnost javljanja nekega dogodka). Ta nam pove kako zelo parameter vpliva na statistično sliko preiskave. Označena je z zvezdicami. Ena nam pove, da je verjetnost manjša kot 0,05 (pomembna), dve pomenita, da je manjša od 0,01 (zelo pomembna), tri pa, da je manjša od 0,001 (statistično najpomembnejša).

Izračunana regresija (mera odvisnosti dveh slučajnih spremenljivk) mora imeti vsaj eno zvezdico, da program lahko izračuna meje zaupanja. Dobimo tri grafe. Prvi je graf, ki prikazuje standard in vzorec, drugi prikazuje standard in tretji samo vzorec. Na prvem grafu se vrednosti prekrivajo, ali pa tudi ne (vsebnost antibiotika je lahko višja ali nižja od standarda).

Postopek ponovimo pri drugi plošči. Nato oba testa združimo. Glede na p-vrednost izberemo rezultate:

- če je p-vrednost $> 0,1$, se odločimo za utežno kombinacijo (weighted combination); intervali zaupanja so dovolj enaki.
- če je p-vrednost $< 0,1$, se odločimo za delno utežno kombinacijo (semi-weighted combination); intervali zaupanja so različni.
- ko imamo 6 testov, ki jih združujemo, uporabimo brez utežno kombinacijo (unweighted combination) - pri velikem sipanju rezultatov.

Ko se intervali zaupanja med seboj prekrivajo je analiza veljavna.

3.3. Mikrobiološko določanje midekamicina

Ves postopek izvajamo v paralelkah.

3.3.1. Priprava raztopin vzorcev in standardov

Vzorec je v obliki tablete. Pred samim tehtanjem tablete zdrobimo v terilniku, tako da je zmes čim bolj gladka. S tem preprečimo, da bi v fazi raztapljanja ostali neraztopljeni delci, ki bi znižali vsebnost antibiotika. Na analitski tehtnici natančno natehtamo enkratno povprečno maso 16 - ih tablet, ki znaša 0,572788 g. Vzorec kvantitativno prenesemo v 1000 ml bučko ter dodamo 200 ml metanola. Pripravljeno raztopino mešamo na stresalniku najmanj 1 uro, nato pa z prečiščeno vodo dopolnimo bučko do oznake, tako da znaša koncentracija 400 µg/ml (1 tableta namreč vsebuje 400 mg midekamicina).

$$\text{konc. osnovne raztopine} = \frac{\text{vsebnost midekamicina v 1 tableti* (}\mu\text{g)}}{V \text{ bučke (ml)}}$$

* po deklaraciji je to količina midekamicina v 1 tableti

Dobimo osnovno raztopino (označimo s črko T), naprej pa z redčenjem (predstavljeno v preglednici VIII) pripravimo tri raztopine različnih koncentracij, ki so med seboj v geometričnem razmerju.

Preglednica VIII: Redčenje osnovne raztopine vzorca

količina T	volumen bučke	uporabljen pufer	končna konc. razt.	oznaka raztopine
1 ml	20 ml	Pufer 3, pH 8	20 µg/ml	T ₃
0,5 ml	20 ml	Pufer 3, pH 8	10 µg/ml	T ₂
625 µl	50 ml	Pufer 3, pH 8	5 µg/ml	T ₁

Za referenčni standard uporabimo *Midecamycin RS Batch MID-1* (KRKA). Njegova vsebnost je 995 µg/mg. Na analitski tehtnici natehtamo izračunano količino, 25,12 mg, raztopimo v metanolu, 12 ml, ter dodamo vodo do oznake na bučki. Koncentracija znaša 500 µg/ml. Iz osnovne raztopine (označimo s črko S) pripravimo raztopine treh različnih

koncentracij (predstavljeno v preglednici IX), ki so enake kot pri vzorcu. Koncentracije morajo biti v območju med 5 µg/ml in 50 µg/ml (da so inhibicijske cone primerno velike).

Natehto referenčnega standarda izračunamo po naslednjem postopku:

$$x \text{ (mg)} = \frac{\text{želena konc. (}\mu\text{g/ml)} \times \text{volumen bučke (ml)}}{\text{konc. standarda (}\mu\text{g/ml)}}$$

Preglednica IX: Redčenje osnovne raztopine referenčnega standarda midekamicina

količina S	volumen bučke	uporabljen pufer	končna konc. razt.	oznaka raztopine
2 ml	50 ml	Pufer 3, pH 8	20 µg/ml	S ₃
1 ml	50 ml	Pufer 3, pH 8	10 µg/ml	S ₂
1 ml	100 ml	Pufer 3, pH 8	5 µg/ml	S ₁

3.3.2. Testni mikroorganizem

Uporabimo bakterijo *Bacillus subtilis* ATCC 6633, ki je občutljiva na midekamicin in smo jo namnožili v hranilnem gojišču Caso bujon. Pred uporabo naredimo osnovo suspenzijo sporogenih mikroorganizmov.

3.3.3. Priprava plošč in nanos raztopin

Gojišče inokuliramo z 2,4 ml osnovne suspenzije spor. Premešamo. Na ploščo razlijemo 300 ml DHS gojišča. Pustimo na sobni temperaturi, nato prenesemo v hladilnik. Z luknjačem naredimo jamice, kamor vnesemo raztopine vzorcev in standardov po shemi latinskega kvadrata. Volumen nanosa je 200 µl. Pustimo v hladilniku za 15 minut.

3.3.4. Inkubacija

Inkubiramo 16 ur na temperaturi 35°C.

3.3.5. Čitanje rezultatov

Z kljunastim merilom odčitamo premere inhibicijskih con na 0,1 mm natančno.

3.3.6. Uporabljena gojišča in raztopine

- a) Hranljivo gojišče za namnožitev mikroorganizma in pripravo osnovne suspenzije sporogenih mikroorganizmov: Caso bujon
- b) Hranljivo gojišče za določanje vsebnosti: DHS gojišče
- c) Puferne raztopine: fosfatni pufer št. 3, pH8 (USP)
- d) Metanol MERCK K 38 117209

3.3.7. Laboratorijska oprema in pribor

- a) Zaščitne rokavice
- b) Steklovina: bučke, čaše, valj, lijak, stekleni plošči; (Witeg Germany diffico, Fortuna Germany)
- c) Terilnica s pestilom
- d) Spatula
- e) Kristalizirke (sterilizacija: 30.9.2008)
- f) Luknjač (sterilizacija: 30.9.2008)
- g) Pipetni nastavki - plastični (sterilizacija: 28.5.2008), stekleni (Witeg Germany diffico, Fortuna Germany, Scherf)
- h) Avtomatska pipeta (Eppendorf Research pro)
- i) Stresalnik (Rotamix 550 MMH; Vibromix 403 EVT)
- j) Tehnica (AT201, METTLER TOLEDO; Exacta 2200 EB)
- k) Inkubator (I-115 C, KAMBIČ LAB. OPR.)
- l) Avtoklav (A-21 CA in A 500/700, KAMBIČ LAB. OPR.)
- m) Vodna kopel (WB – 36, KAMBIČ LAB. OPR.)
- n) pH meter (MP 225, METTLER TOLEDO)
- o) Kljunasto merilo (Mitutoyo digimatic)

Vsa oprema in instrumenti morajo biti temeljito očiščeni pred in po uporabi. Za uničevanje mikroorganizma uporabimo sterilizacijo s pomočjo pare.

3.4. Mikrobiološko določanje fenoksimetilpenicilina

Ves postopek izvajamo v paralelkah.

3.4.1. Priprava raztopin vzorcev in standardov

Vzorec v obliki tablete najprej zdrobimo v terilniku, dokler ne dobimo popolnoma razdrobljenega praška, ki ne vsebuje večjih delcev. Ti bi se v fazi raztapljanja težko raztopili, vsebnost antibiotika pa bi bila zato manjša. Na analitski tehtnici natančno natehtamo polovično povprečno maso 20 - ih tablet ki znaša 1,066727 g. Vzorec kvantitativno prenesemo v 500 ml bučko ter dodamo 75 ml formamida. Pripravljeno raztopino mešamo na stresalniku, dokler se antibiotik ne raztopi, nato pa s pufrom dopolnimo bučko do oznake. Dobimo osnovno raztopino (označimo s T^{*}). Njena koncentracija znaša 1000 i.e./ml (koncentracija 1 tablete namreč znaša 1000000 i.e.). Z redčenjem (predstavljeno v preglednici X) pripravimo tri raztopine različnih koncentracij, ki so med seboj v geometričnem razmerju. Koncentracije morajo biti v območju med 0,125 i.e./ml in 3 i.e./ml (da dosežemo optimalen premer inhibicijskih con). Pred pripravo treh končnih raztopin sledi še predredčitev:

Preglednica X: Postopek predredčitve osnovne raztopine in redčenje osnovne raztopine vzorca

količina T [*]	volumen bučke	uporabljen pufer	končna konc. razt.	oznaka raztopine
1 ml	100 ml	Pufer 2, pH 6	10 i.e./ml	T

količina T	volumen bučke	uporabljen pufer	končna konc. razt.	oznaka raztopine
4 ml	10 ml	Pufer 2, pH 6	4 i.e./ml	T ₃
2 ml	10 ml	Pufer 2, pH 6	2 i.e./ml	T ₂
1 ml	10 ml	Pufer 2, pH 6	1 i.e./ml	T ₁

Za referenčni standard uporabimo *Penicillin V Potassium*. Njegova vsebnost je 1519 i.e./mg. Na analitski tehtnici natehtamo izračunano količino, 0,0329 g, raztopimo v formamidu, 2 - 5 ml, in dodamo pufer do oznake. Iz osnovne raztopine (označimo s črko

S*), katere koncentracija znaša 1000 i.e./ml, pripravimo raztopine treh različnih koncentracij, ki so enake kot pri vzorcu (redčenje predstavljeno v preglednici XI). Računanje po računih kot pri točki 3.3.1. Pred pripravo treh končnih raztopin sledi še predredčitev:

Preglednica XI: Postopek predredčitve osnovne raztopine in redčenje osnovne raztopine standarda fenoksimetilpenicilina

količina S*	volumen bučke	uporabljen pufer	končna konc. razt.	oznaka raztopine
1 ml	100 ml	Pufer 2, pH 6	10 i.e./ml	S

količina S	volumen bučke	uporabljen pufer	končna konc. razt.	oznaka raztopine
4 ml	10 ml	Pufer 2, pH 6	4 i.e./ml	S ₃
2 ml	10 ml	Pufer 2, pH 6	2 i.e./ml	S ₂
1 ml	10 ml	Pufer 2, pH 6	1 i.e./ml	S ₁

3.4.2. Testni mikroorganizem

Uporabimo bakterijo *Bacillus subtilis* ATCC 6633, ki je občutljiva na fenoksimetilpenicilin in smo jo namnožili na hranilnem gojišču Caso bujon. Pred uporabo naredimo osnovo suspenzijo sporogenih mikroorganizmov.

3.4.3. Priprava plošč in nanos raztopin

Gojišče inokuliramo z 0,8 ml osnovne suspenzije spor. Premešamo. Na ploščo razlijemo 300 ml PEN gojišča. Pustimo na sobni temperaturi, nato prenesemo v hladilnik. Z luknjačem naredimo jamice, kamor vnesemo raztopine vzorcev in standardov po shemi latinskega kvadrata. Volumen nanosa je 200 µl. Pustimo v hladilniku za 15 minut.

3.4.4. Inkubacija

Inkubiramo 16 ur na temperaturi 30°C.

3.4.5. Čitanje rezultatov

Z kljunastim merilom odčitamo premere inhibicijskih con na 0,1 mm natančno.

3.4.6. Uporabljena gojišča in raztopine

- a) Hranljivo gojišče za namnožitev mikroorganizma in pripravo osnovne suspenzije sporogenih mikroorganizmov: Caso bujon
- b) Hranljivo gojišče za določanje vsebnosti: PEN gojišče
- c) Puferne raztopine: fosfatni pufer št. 1, pH6 (USP)
- d) N,N-Dimetilformamid K36776153 650

3.4.7. Laboratorijska oprema in pribor

Glej točko 3.3.7.

3.5. Mikrobiološko določanje amoksicilina

Ves postopek izvajamo v paralelkah.

3.5.1. Priprava raztopin vzorcev in standardov

Vzorec je v obliki praška za peroralno suspenzijo. Stekleničko s praškom rekonstuiramo s prečiščeno vodo (60 ml) in mešamo toliko časa, da se delci praška v vodi čim bolj raztopijo in dobimo suspenzijo. Tako se želimo izogniti izgubi učinkovine in delati naprej s pravo koncentracijo osnovne raztopine. Odpipetiramo 5 ml suspenzije, jo prenesemo v 250 ml bučko, ter do oznake dopolnimo s pufrom. Dobimo osnovo raztopino. Koncentracija znaša 1000 µg/ml. Označimo s T*. Z redčenjem (predstavljeno v preglednici XII) pripravimo tri raztopine različnih koncentracij, ki so med seboj v geometričnem razmerju.

Preglednica XII: Postopek predrečenja do osnovne raztopine in redčenje osnovne raztopine vzorca

količina T*	volumen bučke	uporabljen pufer	končna konc. razt.	oznaka raztopine
1 ml	50 ml	Pufer 3, pH 8	20 µg/ml	T

količina T	volumen bučke	uporabljen pufer	končna konc. razt.	oznaka raztopine
4 ml	20 ml	Pufer 3, pH 8	4 µg/ml	T ₃
5 ml	50 ml	Pufer 3, pH 8	2 µg/ml	T ₂
1 ml	20 ml	Pufer 3, pH 8	1 µg/ml	T ₁

Za referenčni standard uporabimo *Amoxicillin trihydrate Batch AM-I*. Njegova vsebnost je 862 µg/mg. Na analitski tehtnici natehtamo izračunano količino, 29,00 mg, in raztopimo v pufru. Iz osnovne raztopine (označimo s črko S*) pripravimo raztopine treh različnih koncentracij (redčenje predstavljeno v preglednici XIII), ki so enake kot pri vzorcu. Zelena končna koncentracija je 1000 µg/ml. Osnovno raztopino lahko hranimo v hladilniku 3 dni. Računanje po računih kot pri točki 3.3.1.

Preglednica XIII: Postopek predredčitve do osnovne raztopine in redčenje osnovne raztopine standarda amoksisicilina

količina S*	volumen bučke	uporabljen pufer	končna konc. razt.	oznaka raztopine
1 ml	50 ml	Pufer 3, pH 8	20 µg/ml	S

količina S	volumen bučke	uporabljen pufer	končna konc. razt.	oznaka raztopine
4 ml	20 ml	Pufer 3, pH 8	4 µg/ml	S ₃
5 ml	50 ml	Pufer 3, pH 8	2 µg/ml	S ₂
1 ml	20 ml	Pufer 3, pH 8	1 µg/ml	S ₁

3.5.2. Testni mikroorganizem

Uporabimo bakterijo *Bacillus subtilis* ATCC 6633, ki je občutljiva na amoksisicilin in smo jo namnožili na hranilnem gojišču Caso bujon. Pred uporabo naredimo osnovno suspenzijo sporogenih mikroorganizmov.

3.5.3. Priprava plošč in nanos raztopin

Gojišče inokuliramo z 1,8 ml osnovne suspenzije spor. Premešamo. Na ploščo razlijemo 300 ml PEN gojišča. Pustimo na sobni temperaturi, nato prenesemo v hladilnik. Z luknjačem naredimo jamice, kamor vnesemo raztopine vzorcev in standardov po shemi latinskega kvadrata. Volumen nanosa znaša 200 µl. Pustimo v hladilniku za 15 minut.

3.5.4. Inkubacija

Inkubiramo 16 ur na temperaturi 30°C.

3.5.5. Čitanje rezultatov

S kljunastim merilom odčitamo premere inhibicijskih con na 0,1 mm natančno.

3.5.6. Uporabljena gojišča in raztopine

- Hranljivo gojišče za namnožitev mikroorganizma in pripravo osnovne suspenzije sporogenih mikroorganizmov: Caso bujon
- Hranljivo gojišče za določanje vsebnosti: PEN gojišče

- c) Puferne raztopine: fosfatni pufer št. 3, pH8 (USP)

3.5.7. Laboratorijska oprema in pribor

Glej točko 3.3.7.

4. REZULTATI

4.1. Mikrobiološko določanje midekamicina

Preglednica XIV: Prikaz izračunane vsebnosti midekamicina na 1. plošči.

Standard				Sample 1			
Ime standarda	midecamycin			Ime vzorca	Macropen tablete		
Št. serije	MID - 1			Št. serije			
Rok uporabnosti				Rok uporabnosti			
Ass. pot.	0.995 mg / mg			Ass. pot.	400 mg / 0.573 g		
Pre-dil. 1	25.13 mg / 50 ml			Pre-dil. 1	0.57275 g / 1000 ml		
Pre-dil. 2	2 ml / 50 ml			Pre-dil. 2	1 ml / 20 ml		
Doses	S1	S2	S3	Doses	T1	T2	T3
(1)	22.83	25.71	28.64	(1)	22.93	25.82	28.75
(2)	22.84	25.73	28.67	(2)	22.95	25.87	28.71
(3)	22.84	25.75	28.75	(3)	23.00	25.85	28.72
(4)	22.91	25.82	28.72	(4)	22.89	25.85	28.72
(5)	22.94	25.82	28.64	(5)	22.88	25.92	28.69
(6)	22.85	25.80	28.65	(6)	22.87	25.89	28.70

Preglednica XV: Prikaz izračunane vsebnosti midekamicina na 1. plošči.

Sample 1			
Ime vzorca	Macropen tablete		
(mg/0.573 g)	Lower limit	Estimate	Upper limit
Potency	403.757	406.131	408.519
Rel. to Ass.	100.9%	101.5%	102.1%
Rel. to Est.	99.4%	100.0%	100.6%

Izračunana vsebnost antibiotika je 406,131 mg na 0,573 g vzorca. Delež izračunane najnižje vsebnosti antibiotika glede na predpisano koncentracijo je 101,5%. Delež izračunane najnižje koncentracije glede na izračunano koncentracijo antibiotika je 99,4%, najvišje pa 100,6%.

Preglednica XVI: Velikost inhibicijskih con standarda in vzorca na 2. plošči.

Standard				Sample 1			
Ime standarda	midecamycin			Ime vzorca	Macropen tablete		
Št. serije	MID - 1			Št. serije			
Rok uporabnosti				Rok uporabnosti			
Ass. pot.	0.995 mg / mg			Ass. pot.	400 mg / 0.573 g		
Pre-dil. 1	25.12 mg / 50 ml			Pre-dil. 1	0.57275 g / 1000 ml		
Pre-dil. 2	2 ml / 50 ml			Pre-dil. 2	1 ml / 20 ml		
Doses	S1	S2	S3	Doses	T1	T2	T3
(1)	22.42	25.66	28.76	(1)	22.43	25.65	28.83
(2)	22.43	25.61	28.80	(2)	22.50	25.74	28.89
(3)	22.43	25.66	28.80	(3)	22.47	25.74	28.89
(4)	22.38	25.76	28.88	(4)	22.43	25.72	28.81
(5)	22.39	25.71	28.75	(5)	22.43	25.62	28.76
(6)	22.43	25.63	28.76	(6)	22.46	25.62	28.74

Preglednica XVII: Prikaz izračunane vsebnosti midekamicina na 2. plošči.

Sample 1			
Ime vzorca	Macropen tablete		
(mg/0.573 g)	Lower limit	Estimate	Upper limit
Potency	399.931	402.364	404.812
Rel. to Ass.	100.0%	100.6%	101.2%
Rel. to Est.	99.4%	100.0%	100.6%

Izračunana vsebnost antibiotika je 402,364 mg na 0,573 g vzorca. Delež izračunane najnižje vsebnosti antibiotika glede na predpisano koncentracijo je 100,6%. Delež izračunane najnižje koncentracije glede na izračunano koncentracijo antibiotika je 99,4%, najvišje pa 100,6%.

1. + 2. plošča:

$p = 0,021$

Preglednica XVIII: Prikaz izračunane vsebnosti midekamicina na obeh ploščah.

Weighted combination			
(mg/0.573 g)	Lower limit	Estimate	Upper limit
Potency	402.659	404.307	405.962
Rel. to Ass.	100.7%	101.1%	101.5%
Rel. to Est.	99.6%	100.0%	100.4%



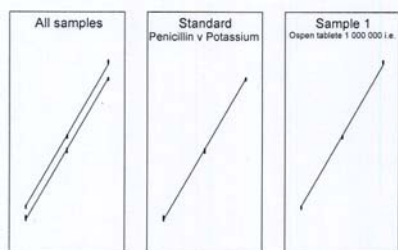
Slika 14: Interval zaupanja.

p - vrednost je 0,021. Ker je vrednost manjša od 0,1 uporabimo utežno kombinacijo (weighted combination) - intervali zaupanja se prekrivajo. Izračunana vsebnost antibiotika je 404,307 mg na 0,573 g vzorca. Delež izračunane najnižje vsebnosti antibiotika glede na predpisano koncentracijo je 101,1%. Delež izračunane najnižje koncentracije glede na izračunano koncentracijo antibiotika je 99,6%, najvišje pa 100,4%. Statistični parametri so znotraj predpisanih meja zato je test veljaven. Vzorec po deklaraciji proizvajalca ustreza predpisu.

4.2. Mikrobiološko določanje fenoksimetilpenicilina

Preglednica XIX: Velikost inhibicijskih con standarda in vzorca na 1. plošči.

Standard				Sample 1			
Ime standarda	Penicillin v Potassium			Ime vzorca	Ospen tablete 1 000 000 i.e.		
Št. serije	PEN - 1			Št. serije	V 03984		
Rok uporabnosti				Rok uporabnosti	31. 3. 2011		
Ass. pot.	1519 IE / mg			Ass. pot.	1000000 IE/1.066727 g		
Pre-dil. 1	32.87 mg / 50 ml			Pre-dil. 1	0.53336 g / 500 ml		
Pre-dil. 2	1 ml/100ml			Pre-dil. 2	1 ml / 100 ml		
Doses	S1	S2	S3	Doses	T1	T2	T3
(1)	17.76	19.55	21.45	(1)	18.07	19.90	21.95
(2)	17.70	19.60	21.47	(2)	18.09	19.97	21.97
(3)	17.74	19.60	21.44	(3)	18.08	19.90	21.90
(4)	17.79	19.61	21.45	(4)	18.02	19.92	21.92
(5)	17.82	19.55	21.50	(5)	18.09	19.91	21.89
(6)	17.79	19.51	21.50	(6)	18.08	19.94	21.89

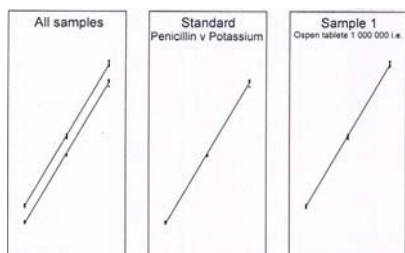


Slika 15: Krivulji standarda in vzorca skupaj, krivulja standarda in krivulja vzorca - 1. plošča.

Krivulji, kjer sta standard in vzorec predstavljena skupaj, se ne ujemata. Sipanje vrednosti je preveliko.

Preglednica XX: Velikost inhibicijskih con standarda in vzorca na 2. plošči.

Standard				Sample 1			
Ime standarda	Penicillin v Potassium			Ime vzorca	Ospen tablete 1 000 000 i.e.		
Št. serije	PEN - 1			Št. serije	V 03984		
Rok uporabnosti				Rok uporabnosti	31. 3. 2011		
Ass. pot.	1519 IE / mg			Ass. pot.	1000000 IE/1.066727 g		
Pre-dil. 1	32.87 mg / 50 ml			Pre-dil. 1	0.53342 g / 500 ml		
Pre-dil. 2	1 ml/100ml			Pre-dil. 2	1 ml / 100 ml		
Doses	S1	S2	S3	Doses	T1	T2	T3
(1)	17.60	19.10	20.65	(1)	17.99	19.56	21.23
(2)	17.62	19.13	20.79	(2)	17.95	19.52	21.20
(3)	17.64	19.14	20.80	(3)	17.98	19.49	21.11
(4)	17.63	19.14	20.78	(4)	17.99	19.55	21.15
(5)	17.59	19.10	20.78	(5)	18.01	19.55	21.14
(6)	17.60	19.12	20.75	(6)	18.02	19.58	21.10



Slika 16: Krivulji standarda in vzorca skupaj, krivulja standarda in krivulja vzorca - 2. plošča.

Krivulji, kjer sta standard in vzorec predstavljena skupaj, se ne ujemata

1. + 2. plošča:

$p = 0,000$



Slika 17: Interval zaupanja.

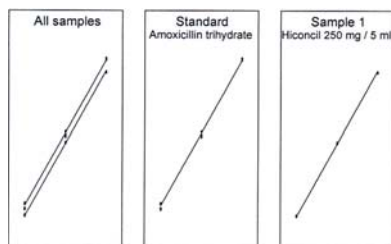
p - vrednost je nična. Krivulji na grafu, kjer sta standard in vzorec predstavljena skupaj, se ne ujemata (tako na prvi kot na drugi plošči). Intervali zaupanja se med seboj ne prekrivajo - zaradi prevelikih razlik med obema ploščama. Na tej stopnji analizo zavrnamo. Rezultate vsebnosti fenoksimetilpenicilina v zdravilu zanemarimo, saj niso veljavni. Test zavrnamo.

4.3. Mikrobiološko določanje amoksicilina

4.3.1. Prvo čitanje

Preglednica XXI: Velikost inhibicijskih con standarda in vzorca na 1. plošči.

Standard				Sample 1			
Ime standarda	Amoxicillin trihydrate			Ime vzorca	Hiconcil 250 mg / 5 ml		
Št. serije	AM - 1			Št. serije	V03979		
Rok uporabnosti				Rok uporabnosti	02/2011		
Ass. pot.	0.862 mg / mg			Ass. pot.	250 mg / 5 ml		
Pre-dil. 1	29 mg / 25 ml			Pre-dil. 1	5 ml / 250 ml		
Pre-dil. 2	1 ml / 50 ml			Pre-dil. 2	1 ml / 50 ml		
Doses	S1	S2	S3	Doses	T1	T2	T3
(1)	17.57	19.45	21.39	(1)	17.45	19.26	21.05
(2)	17.62	19.40	21.37	(2)	17.42	19.25	21.05
(3)	17.70	19.47	21.33	(3)	17.42	19.26	21.02
(4)	17.73	19.53	21.40	(4)	17.43	19.26	21.02
(5)	17.75	19.55	21.39	(5)	17.45	19.27	21.05
(6)	17.59	19.55	21.39	(6)	17.40	19.29	21.05

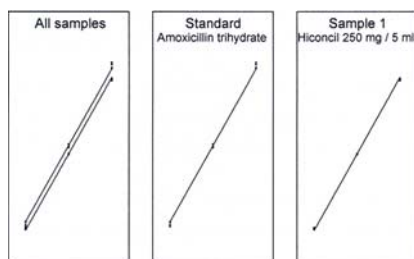


Slika 18: Krivulji standarda in vzorca skupaj, krivulja standarda in krivulja vzorca - 1. plošča.

Krivulji, kjer sta standard in vzorec predstavljena skupaj, se ne ujemata.

Preglednica XXII: Velikost inhibicijskih con standarda in vzorca na 2. plošči.

Standard				Sample 1			
Ime standarda	Amoxicillin trihydrate			Ime vzorca	Hiconcil 250 mg / 5 ml		
Št. serije	AM - 1			Št. serije	V03979		
Rok uporabnosti				Rok uporabnosti	02/2011		
Ass. pot.	0.862 mg / mg			Ass. pot.	250 mg / 5 ml		
Pre-dil. 1	29 mg / 25 ml			Pre-dil. 1	5 ml / 250 ml		
Pre-dil. 2	1 ml / 50 ml			Pre-dil. 2	1 ml / 50 ml		
Doses	S1	S2	S3	Doses	T1	T2	T3
(1)	17.60	19.46	21.41	(1)	17.47	19.22	21.01
(2)	17.50	19.40	21.36	(2)	17.44	19.23	20.98
(3)	17.54	19.40	21.27	(3)	17.46	19.23	21.02
(4)	17.60	19.41	21.28	(4)	17.45	19.22	21.01
(5)	17.60	19.39	21.28	(5)	17.45	19.24	21.03
(6)	17.61	19.39	21.29	(6)	17.43	19.23	21.03



Slika 19: Krivulji standarda in vzorca skupaj, krivulja standarda in krivulja vzorca - 2. plošča.

Krivulji, kjer sta standard in vzorec predstavljena skupaj, se ne ujemata.

1. + 2. plošča:

$p = 0,000$

Preglednica XXIII: Statističen prikaz parametrov, ki kažejo na variabilnost rezultatov.

Source of variation	Degrees of freedom	Sum of squares	Mean square	F-ratio	Probability
Preparations	1	0.368044	0.368044	315.918	0.000 (***)
Regression	1	80.0080	80.0080	>1000	0.000 (***)
Non-parallelism	1	0.0468167	0.0468167	40.186	0.000 (***)
Non-linearity	2	0.00542222	0.00271111	2.327	0.123
Standard	1	0.00537778	0.00537778	4.616	0.044 (*)
Sample 1	1	4.44444E-05	4.44444E-05	0.038	0.847
Quadratic curvature	1	0.00320000	0.00320000	2.747	0.113
Lack of quadratic fit	1	0.00222222	0.00222222	1.907	0.182
Treatments	5	80.4283	16.0857	>1000	0.000 (***)
Rows	5	0.00736667	0.00147333	1.265	0.317
Columns	5	0.00193333	0.000386667	0.332	0.888
Residual error	20	0.0233000	0.00116500		
Total	35	80.4609	2.29888		



Slika 20: Interval zaupanja.

p - vrednost je nična. Krivulji na grafu, kjer sta standard in vzorec predstavljena skupaj, se ne ujemata (na prvi in drugi plošči). Zaradi prevelike razlike med obema ploščama se intervali zaupanja ne ujemajo. Variabilnost rezultatov je posledica izvedbe postopka, statistično pa se to pokaže v parametrih regresije in paralelnosti. Parametra sta označena z

*** in sta zato statistično signifikantna. Rezultate vsebnosti amoksicilina v zdravilu zanemarimo, saj niso veljavni. Test zavrnamo.

4.3.2. Drugo čitanje

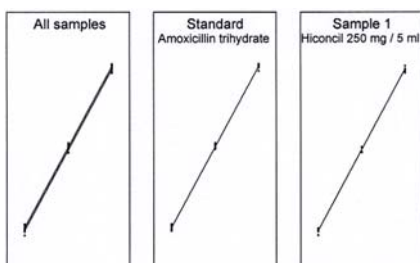
Preglednica XXIV: Velikost inhibicijskih con standarda in vzorca na 1. plošči.

Standard				Sample 1			
Ime standarda	Amoxicillin trihydrate			Ime vzorca	Hiconcil 250 mg / 5 ml		
Št. serije	AM - 1			Št. serije	V03979		
Rok uporabnosti				Rok uporabnosti	02/2011		
Ass. pot.	0.862 mg / mg			Ass. pot.	250 mg / 5 ml		
Pre-dil. 1	29 mg / 25 ml			Pre-dil. 1	5 ml / 250 ml		
Pre-dil. 2	1 ml / 50 ml			Pre-dil. 2	1 ml / 50 ml		
Doses	S1	S2	S3	Doses	T1	T2	T3
(1)	16.15	18.12	20.13	(1)	15.99	18.04	20.17
(2)	16.12	18.12	20.05	(2)	16.09	18.03	20.05
(3)	16.19	18.20	20.19	(3)	16.08	18.16	20.00
(4)	16.10	18.15	20.16	(4)	16.16	18.16	20.10
(5)	16.24	18.23	20.23	(5)	16.10	18.14	20.05
(6)	16.27	18.27	20.20	(6)	16.12	18.16	20.17

Preglednica XXV: Prikaz izračunane vsebnosti amoksicilina na 1. plošči.

Sample 1			
Ime vzorca	Hiconcil 250 mg / 5 ml		
(mg/5 ml)	Lower limit	Estimate	Upper limit
Potency	240.534	243.551	246.606
Rel. to Ass.	96.2%	97.4%	98.6%
Rel. to Est.	98.8%	100.0%	101.3%

Izračunana vsebnost antibiotika je 243,551 mg na 5 ml vzorca. Delež izračunane najnižje vsebnosti antibiotika glede na predpisano koncentracijo je 97,4%. Delež izračunane najnižje koncentracije glede na izračunano koncentracijo antibiotika je 98,8%, najvišje pa 101,3%.



Slika 21: Krivulji standarda in vzorca skupaj, krivulja standarda in krivulja vzorca - 1. plošča.

Krivulji, kjer sta standard in vzorec predstavljena skupaj, se ujemata.

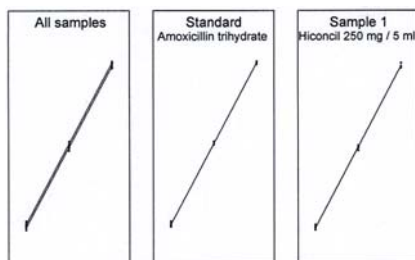
Preglednica XXVI: Velikost inhibicijskih con standarda in vzorca na 2. plošči.

Standard				Sample 1			
Ime standarda	Amoxicillin trihydrate			Ime vzorca	Hiconcil 250 mg / 5 ml		
Št. serije	AM - 1			Št. serije	V03979		
Rok uporabnosti				Rok uporabnosti	02/2011		
Ass. pot.	0.862 mg / mg			Ass. pot.	250 mg / 5 ml		
Pre-dil. 1	29 mg / 25 ml			Pre-dil. 1	5 ml / 250 ml		
Pre-dil. 2	1 ml / 50 ml			Pre-dil. 2	1 ml / 50 ml		
Doses	S1	S2	S3	Doses	T1	T2	T3
(1)	16.65	18.71	20.69	(1)	16.57	18.58	20.65
(2)	16.69	18.65	20.62	(2)	16.57	18.48	20.52
(3)	16.60	18.63	20.67	(3)	16.52	18.57	20.52
(4)	16.60	18.63	20.67	(4)	16.57	18.57	20.53
(5)	16.62	18.63	20.66	(5)	16.60	18.54	20.56
(6)	16.74	18.70	20.67	(6)	16.65	18.61	20.64

Preglednica XXVII: Prikaz izračunane vsebnosti amoksicilina na 2. plošči.

Sample 1			
Ime vzorca	Hiconcil 250 mg / 5 ml		
(mg/5 ml)	Lower limit	Estimate	Upper limit
Potency	240.448	242.493	244.555
Rel. to Ass.	96.2%	97.0%	97.8%
Rel. to Est.	99.2%	100.0%	100.9%

Izračunana vsebnost antibiotika je 242,493 mg na 5 ml vzorca. Delež izračunane najnižje vsebnosti antibiotika glede na predpisano koncentracijo je 97,0%. Delež izračunane najnižje koncentracije glede na izračunano koncentracijo antibiotika je 99,2%, najvišje pa 100,9%.



Slika 22: Krivulji standarda in vzorca skupaj, krivulja standarda in krivulja vzorca - 2. plošča.

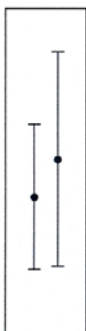
Krivulji, kjer sta standard in vzorec predstavljena skupaj, se ujemata.

1. + 2. plošča:

$$p = 0,547$$

Preglednica XXVIII: Prikaz izračunane vsebnosti amoksicilina na obeh ploščah.

Weighted combination			
(mg/5 ml)	Lower limit	Estimate	Upper limit
Potency	241.184	242.827	244.480
Rel. to Ass.	96.5%	97.1%	97.8%
Rel. to Est.	99.3%	100.0%	100.7%



Slika 23: Interval zaupanja.

p- vrednost je 0,547. Izberemo utežno kombinacijo, saj je p- vrednost večja od 0,1. Izračunana vsebnost amoksicilina je 242,872 mg na 5 ml vzorca. Delež izračunane vsebnosti glede na predpisano koncentracijo je 97,2%, s spodnjo mejo 96,5% in zgornjo 97,8%. Intervali zaupanja se ujemajo, krivulji na grafu standarda in vzorca se prekrivata. Zaradi veljavnih statističnih parametrov je test veljaven. Vzorec ustreza zahtevam, ki jih proizvajalec predpisuje v deklaraciji.

5. RAZPRAVA

Za mikrobiološko določanje vsebnosti midekamicina, fenoksimetilpenicilina in amoksicilina v antibiotičnih zdravilih, smo uporabili metodo difuzije, ki jo za tovrstne meritve določa tudi Evropska farmakopeja. Metoda je namreč natančna in daje zelo dobre rezultate (če bi test opravili z metodo HPLC bi bili rezultati primerljivi, vendar pa ta metoda za tovrstna merjenja ni predpisana).

5.1. Mikrobiološko določanje midekaminicina

Intervali zaupanja se med seboj ujemajo – plošči po rezultatih ne odstopata dosti. Krivulji na grafu standarda in vzorca se prekrivata. Manjše odstopanje v ploščah je posledica napak, ki so se pojavile pri delu. Faza redčenja je lahko tista, ki vpliva na spremembe, predvsem zaradi človeškega faktorja. Nenatančno pipetiranje v tej fazi lahko v neki meri vpliva na končni rezultat vsebnosti antibiotika v zdravilu. Kljub vsemu so bile inhibicijske cone dobro definirane in berljive, tudi za neizkušenega bralca. Razmerje med gostoto inokuluma in koncentracijo antibiotika v jamici je bilo ustrezno. Gostota inokuluma mora sicer biti taka, da je rob inhibicijske cone dovolj oster, hkrati pa bakterije ne preraščajo vanjo. Količina suspenzije bakterij, s katero smo inokulirali gojišče, je bila 2,4 ml. Pri izbrani koncentraciji antibiotika so nastale dokaj velike inhibicijske cone (od 22,38 do 28,89 milimetrov). S tega vidika je bila prisotna manjša variabilnost pri merjenju. Če bi dobili manjše inhibicijske cone, bi spremembo v premeru težje opazili, kot pri merjenju večjih inhibicijskih con, kjer se vpliv človeškega faktorja zmanjša.

Izračunana vsebnost antibiotika je 404,307 mg na 0,573 g vzorca. Delež izračunane najnižje vsebnosti antibiotika glede na predpisano koncentracijo je 101,1%. Delež izračunane najnižje koncentracije glede na izračunano koncentracijo antibiotika je 99,6%, najvišje pa 100,4%.

Dobljeni rezultati, obdelani s programom Combistats, statistično ustrezajo predpisanim zahtevam. Vzorec je ustrezen. Test je veljaven.

5.2. Mikrobiološko določanje fenoksimetilpenicilina

Intervali zaupanja se med seboj ne prekrivajo. Statistični parametri so pokazali signifikantno razliko med prvo in drugo ploščo. Krivulji na grafu, kjer sta standard in vzorec predstavljena skupaj, se ne ujemata. Meritvi obeh plošč sta različni. V postopku smo verjetno naredili večje število manjših napak, ki so bistveno vplivale na rezultat. Pri redčenju, standarda in vzorca, smo v fazi predrečenja uporabili redčitev 1 ml/100 ml. S to osnovno raztopino smo pripravili ostale raztopine. Majhna napaka pri predredčitvi bi pomenila veliko odstopanje koncentracij končnih raztopin. Napaka je lahko storjena pri pipetiranju. Uporabljali smo steklene pipete. Pri nekaterih je po pipetiranju v njih preostal volumen raztopine (v obliki kapljic na steni pipete). Če je prišlo do nenatančno odčitane meniskusa raztopine v bučki (posebno pri predrečenju) se razlika med paralelno pripravljeni raztopinami še poveča. Koncentracija končnih raztopin odstopa od izračunane vrednosti. Inhibicijske cone na prvi plošči se razlikujejo od tistih na drugi plošči. Razliko med ploščama lahko ustvarjamo tudi v ostalih fazah. Pri razlivanju gojišča je lahko prišlo do neenakomerne globine plasti. Vsi ti faktorji so vplivali na to, da so v končni fazi nastale slabo definirane inhibicijske cone. Dodatno smo, zaradi neizkušenosti, naredili napako pri merjenju inhibicijskih con. Čitanje smo dvakrat ponovili, plošča je medtem stala na sobni temperaturi. Bakterije so sčasoma začele preraščati v samo področje inhibicijskih con. Te so postajale slabše definirane. Pogojem sta sicer bili izpostavljeni obe plošči, a napake pri merjenju lažno zmanjšanih inhibicijskih con ne gre zanemariti. Kljub vsemu sklepamo, da je bila ključna napaka storjena v sami pripravi vzorca in standarda, predvsem pri pipetiranju, kar je vplivalo na nastanek slabo definiranih inhibicijskih con. Test je neveljaven.

5.3. Mikrobiološko določanje amoksisilina

Pri določevanju vsebnosti amoksisilina v antibiotiku smo plošči čitali dvakrat. Meritev sta izvajali različni osebi.

5.3.1. Prvo čitanje

Intervali zaupanja se ne ujemajo, saj je razlika med ploščama prevelika. Krivulji standarda in vzorca se ne prekrivata. V postopku smo naredili napako/-e.

5.3.2. Drugo čitanje

Drugo čitanje izvede oseba s 15 leti izkušenj na tem področju. Rezultati se bistveno razlikujejo. Intervali zaupanja se ujemajo, krivulji na grafu standarda in vzorca se prekrivata. Izračunana vsebnost amoksicilina je 242,872 mg na 5 ml vzorca. Delež izračunane vsebnosti glede na predpisano koncentracijo je 97,2%, s spodnjo mejo 96,5% in zgornjo 97,8%. Zaradi veljavnih statističnih parametrov je test veljaven.

Očitno gre tako veliko razliko med rezultati iskati prav v načinu čitanja inhibicijskih con. Ta faza ima tako velik vpliv na statistične parametre, da lahko odloči o sami (ne)veljavnosti testa. Nastale inhibicijske cone so bile slabše definirane, vzrok za to pa gre deloma iskati v sami izvebi vseh faz testa. Oseba, ki je izvajala prvo čitanje, je brez izkušenj, medtem ko druga oseba dnevno izvaja tovrstne meritve. Opazimo razliko med izmerjeno velikostjo inhibicijskih con med obema ploščama. Ta znaša okoli 1,4 mm. Faza merjenja je subjektivna. Pred meritvijo se moramo odločiti, kje je tista meja, ki jo upoštevamo kot rob inhibicijske cone. Ta ocena ni vedno lahka in kaže na izkušnost tistega, ki čita rezultate. Vidimo, da so rezultati med ploščama drugačni tudi glede njihove razpršenosti. Na prvi plošči so veliko bolj variabilni, tudi zavaljo dokaj majhnih inhibicijskih con (od 17,40 do 21,40 mm), kar natančnost neizkušenega bralca še poslabša. Paziti moramo, da merjenje izvajamo ob primerni svetlobi, nekaj centimetrov nad črnim ozadjem. Napako naredimo, če merimo izven direktne svetlobe, ki sije na ploščo.

Vse ugotovitve kažejo na pomembnost izkušnosti pri čitanju slabše definiranih inhibicijskih con, ki nastanejo kot posledica slabše izvedbe testa. Priprava, tehtanje sestavin in vsi postopki do čitanja posredno vplivajo na rezultat testa, saj določijo obliko inhibicijskih con.

6. ZAKLJUČEK

V tej diplomski nalogi smo določali vsebnost učinkovine v antibiotičnem zdravilu. Skušali smo izboljšati zanesljivost, v fazi čitanja, izmerjenih rezultatov. Osredotočili smo se na določevanje vsebnosti antibiotikov v treh različnih zdravilih z namenom, da ugotovimo njihovo jakost in terapevtsko uporabnost. Z dobro izvedbo smo skušali doseči izboljšanje berljivosti inhibicijskih con, kar pa nam je uspelo le na primeru določanja midekamicina. Če primerjamo metodo difuzije z turbidimetrično metodo, ugotovimo, da sta obe metodi hitri in enostavni za izvedbo. Metoda difuzije je počasnejša, saj za analizo potrebujemo 2 dni, pri turbidimetrični pa 1 dan. Če bi uporabili turbidimetrično metodo, bi imeli težave z interferencami, ki bi se kot primesi pojavile v vzorcu. Težave bi predstavljala tudi morebitna motnost in obarvanost vzorca. Ker smo delali z majhnim številom vzorcev smo za analizo uporabili metodo difuzije. Da bi jo izvedli čimbolje, smo se osredotočili na faktorje, ki vplivajo na analizo in končni rezultat. Predvsem ima velik vpliv gostota inokuluma. Ta vpliva na ostrino inhibicijskih con. Pomembna faza je priprava raztopin in pipetiranje, saj je tu velika možnost človeške napake. Zmotimo se lahko tudi pri računanju koncentracij posamezne raztopine. Metoda v celoti zahteva veliko ročnega dela, pri katerem je pomembno, da smo natančni in dosledni. Vsi ti faktorji vplivajo na to ali bodo nastale inhibicijske cone dobro definirane ali ne. To v veliki meri vpliva na fazo čitanja in na končno vrednost rezultatov. Če so cone nejasne bo neizkušen bralec težko ocenil njihov premer. Rezultati so v tem primeru neuporabni. S pridobivanjem izkušenj je napak, ki jih naredimo pri merjenju, manj. Če bi želeli metodo izboljšati, bi izboljšanje te faze bistveno pripomoglo k manjši variabilnosti rezultatov, ki so posledica merjenja inhibicijskih con. V ta namen sicer obstajajo optimizirane aparature, ki so natančne, vendar le v primeru, da so inhibicijske cone pravilne okrogle oblike, kar pa se v praksi ne zgodi vedno. Da bi metodo torej bolje izvedli, bi morali izboljšati vse predhodne faze, ki imajo vpliv na obliko inhibicijskih con. Najpomembnejša je sama natančnost izvedbe testa. Poleg tega bi v gojišče lahko dodali več hranil - bakterije bi zato lepše rasle ter ne bi preraščale v samo inhibicijsko cono. Pravilnejše oblike bi lahko dosegli, če bi uporabljali mikroorganizme vrhunske kakovosti, katerih kvaliteta se s časom ne bi spreminjala (v inokulumu pa bi bila dodana količina zato vedno ista). Ob tej predpostavki bi lahko lažje določili razmerje med antibiotikom in gostoto inokuluma ter s tem dosegli ustrezen premer in obliko inhibicijske cone. Na ta način bi bile primerne za branje z avtomatsko napravo za čitanje, mi pa bi se s tem izognili ročnemu čitanju rezultatov.

Kljub vsemu metoda daje zelo dobre rezultate. Njena uporaba je predpisana z Evropsko in Ameriško farmakopejo. Tako se uporablja tudi v uradnem kontrolnem laboratoriju, delujočem v okviru Javne agencije RS za zdravila in medicinske pripomočke, ki izvaja nadzorstvene naloge glede kakovosti zdravil v Sloveniji. Uporabna vrednost metode je velika, zato je tudi zelo razširjena in uporabna v številnih izvedbah.

7. LITERATURA

1. Manica Müller-Premru, Marija Gubina: Mikrobi in antibiotiki 2001, Ljubljana, MF v Ljubljani, 22.-23. junij 2001: 18-24.
2. Marija Gubina, Alojz Ihan: Medicinska bakteriologija z imunologijo in mikologijo, Ljubljana, Medicinski razgledi, 2002: 427-438.
3. <http://www.arabslab.com/vb/showthread.php?t=577> (4.8.2008).
4. <http://encyclopedia.thefreedictionary.com/beta-lactam> (11.8.2008).
5. Jamie N. Delgado, William A. Remers: Wilson and Gisvold's textbook of organic medicinal and pharmaceutical chemistry, tenth edition, Lippincott Williams Wilkins, Philadelphia, 1998: 196-210, 223-224, 253.
6. Remington: The Science and Practice of Pharmacy, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 2005: 561-562.
7. Rosamund M. Baird, Norman A. Hodges, Stephen P. Denyer: Handbook of Microbiological Quality Control: Pharmaceuticals and Medical Devices, CRC Press, 2000: 200-201.
8. Jeffrey C. Pommerville, Edward Alcamo: Alcamo's Fundamentals of Microbiology: A Comprehensive Review, Jones & Bartlett Publishers, 2004: 903.
9. <http://www.pasteur.fr/icono/RAR/RAR2006/courvalin.jpg> (26.11.2008).
10. Victor Lorian: Antibiotics in Laboratory Medicine: Making a Difference, Lippincott Williams & Wilkins, 2005: 33.
11. Organisation mondiale de la santé, World Health Organization, World Health Organization: The International Pharmacopoeia, World Health Organization, 2006: 1230.
12. Simon P. Hardy: Human Microbiology, CRC Press, 2002: 249, 250.
13. Christopher Walsh: Antibiotics: Actions, Origins, Resistance, Založnik ASM Press, 2003: 288.
14. <http://www.medscape.com/viewarticle/442206> (2.12.2008).
15. <http://vestnik.szd.si/st2-9/543-547.pdf> (2.12.2008).
16. Ingrid Berce, Ljudmila Sarjanović, Sonja Smole Možina: Naraščajoča odpornost proti antibiotikom pri mikroorganizmih v prehranski verigi, Zavod za zdravstveno varstvo Nova Gorica, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo.
17. Richard Schwalbe, Lynn Steele-Moore, Avery C. Goodwin: Antimicrobial Susceptibility Testing Protocol, CRC Press, 2007: 55-59.

18. Daan J. A. Crommelin, Robert D. Sindelar, Bernd meibohm: Pharmaceutical Biotechnology: Fundamentals and Applications, Informa Health Care, 2007: 20.
19. http://content.answers.com/main/content/wp/en/thumb/0/0e/250px-Bacterial_growth.png (26.12.2008).
20. William Hewitt: Microbiological Assay for Pharmaceutical Analysis: A Rational Approach, CRC Press, 2004: 12-16.
21. <http://www.lek.si/slo/skrb-za-zdravje/o-zdravilih/oblake-odmerki> (26.12.2008).
22. George F. Brooks, Janet S. Butel, Stephen A. Morse, Joseph L. Melnick, Ernest Jawetz, Edward A. Adelberg: Jawetz, Melnick, & Adelberg's Medical Microbiology, McGraw-Hill Professional, 2004: 64-66.
23. Council of Europe (COR), Council of Europe Staff, European, European Pharmacopoeia Commission, Council of Europe, European Department for the Quality of Medicines: European Pharmacopoeia 6th Edition, 2007: 210-215.
24. United States Pharmacopeial Convention Committee of Revision, United States Pharmacopeial Convention: The United States Pharmacopeia, United States Pharmacopeial Convention, Inc., 2006: poglavje 81.
25. <http://www.bfro.uni-lj.si/gost/smd/mikroslo/frame.htm> (15.3.2009).
26. Chandrakant R. Kokare: Pharmaceutical microbiology principles and applications, Nirali Prakashan: poglavje 5.
27. Clifton E. Meloan: Food analysis: theory and practice, Chapman & Hall, 1994: 536, 537.