## **Difuzijski antibiogram**

# 1. UVOD

 Zaradi zdravljena bolnikov določimo posameznim bakterijam, ki jih izoliramo občutljivost na posamezne antibiotike. Antibiotiki lahko delujejo na bakterije **bakteriocidno** (jih uničijo), oziroma **bakteriostatičn**o (zavirajo njihovo rast).

**Difuzijski antibiogram** je preprosta metoda s katero ugotavljamo odpornost posameznih bakterij na antibiotike.

V šoli smo naredili en **antibiogram**, tako da smo okužili gojišče v petrijevki, nato pa smo na okuženi agar položili štiri diske, ki so bili prepojeni z različnimi antibiotiki. Antibiotiki nato difundirajo na gojišče. Okoli tek diskov so se pojavile cone na katerih niso uspevale bakterije. To cono imenujemo **inhibicijska cona** (območje, kjer se bakterije ne morejo razmnoževati). Te cone nato izmerimo z ravnilom in ugotovimo, kateri antibiotik je najbolj primeren za uničevanje te bakterije (tisti ki ima največjo inhibicijsko cono).

Bakterijska kolonija

Različni antibiotiki

Inhibicijske cone

Slika 1: Primer difuzijskega antibiograma

Glede na vrsto pozvročitelja lahko naredimo tri vrste atibiogramov:

1. **Difuzijski antibiogram** (opisan zgoraj)
2. **Inkorporacijski antibiogram** (uporabljamo pri počasi rastajočih mikrobih)
3. **Dilucijski antibiogram** (pa uporabljamo pri mikrobih, ki se razmnožujejo le v tekočih gojiščih in kadar antibiotiki slabo difundirajo v agar)

Mehanizmi delovanja antibiotikov na bakterije so sledeči:

* Preprečujejo sintezo beljakovin
* Preprečujejo sintezo baterijske celične stene
* Preprečujejo sintezo nukleinskih kislin
* Preprečujejo sintezo citoplazmatske membrane

Če pa antibiotik na neko bakterijo ne deluje govorimo o **rezistenci** oz. odpornost na določen antibiotik. **Primarna rezistenca** je genetsko determinirana, sekundarna pa pridobljena. **Sekundarna rezistenca** – zaradi prisotnosti antibiotika se bakterije ne morejo razmnoževati. Antibiotik deluje na njih bakteriostatično, potem za začno bakterije izločati encime, ki razgradijo antibiotik in bakterije se začno razmnoževat. V inhibicijski coni se pojavijo kolonije.

# 2. NAMEN VAJE

 Namen vaje je bil naučiti se pripraviti difuzijski antibiogram ter ugotavljati odpornost bakterij na različne antibiotike. Ugotoviti smo hoteli, kako so bakterije odporne na antibiotike kot so amikacin (AN 10), norfloxacin (NOR 10) in cefaxin (FOX 10), nato njihovo odpornost na različne začimbe (origano, česen, muškatni orešček,cimet,lovor, pehtran…), zobne paste (vademekum, signal, aquafresh, colgate…). Nazadnje pa smo ugotavljali še odpornost na razna mila.

**3. POSTOPEK**

 **a) Material in pripomočki:**

- Sterilne petrijevke

* Bakterije (Bacilius Cereus)
* Hranilni agar
* Antibiotični diski (opisani zgoraj)
* Začimbe
* Mila
* Sterilna pinceta
* Zobne paste
* Ravnilo
* Alkohol
* Eza (bakteriološka zanka)
* Gorilnik
* Epruvete
* Terilnica

# b) Metode dela

UČINEK ANTIBIOTIKOV:

Najprej smo vse petrijevke sterilizirali, in sicer tako da smo jih dali za 10 min v mikrovalovno pečico. Tako smo uničili vse mikroorganizme. Pripravili smo tudi sterilni agar, ki smo ga še tekočega nalili v epruvete in jih potem zamašili za papirnim robčki, tega pa še ovili z folijo, da se ni namočil. Nato smo dali vse skupaj v ekonom lonec. Ker z agarjem nismo delali takoj po sterilizaciji smo ga morali pred vajo še segreti da se je utekočinil, nato smo morali počakati da se malo shladi, saj bi drugače lahko uničili bakterije, vendar ne smemo čakati predolgo, saj bi se agar strdil in ga nebi mogli prenesti v petrijevko. Preden smo agar prenesli v petrijevko, smo vanj mogli dati tudi bakterije. To smo naredili tako da smo prijeli v eno roko epruveto z sterilnim agarjem in epruveto z bakterijem. Nato smo naredile prenos z ezo, ki smo jo držali v drugi roki. Ezo smo najprej pomočili v alkohol in jo prežarili (tako smo jo sterilizirali), malo počakali da ni bila prevroča in vzeli vzorec iz poševnega agarja, ter ga prenesli v tekoči agar. Ter ga porazdelili po tekočem agarju enakomerno. Preden smo naredili prenos in po njem smo ustje epruvte deflamirali (ustje smo potegnili skozi plamen, tako smo ga sterilizirali). Potem smo tekoči agar prelili v petrijevko, na katero smo napisali ime, datum ter razred in jo razdelili na tri dele , na katere smo dali antibiotike. Nato smo naredili osmico in počakali da se je agar strdil. Na strjen agar smo z sterilno pinceto prenesli antibiotične diske. Nato smo počakali nekaj dni da smo lahko analizirali rezultate.

UČINEK ZAČIMB:

 V tem primeru smo imeli gojišča z bakterijami že pripravljena , pripraviti smo morali le še diske in urediti petrijevke (ime razred, datum, razdeliti na štiri dele). Antibiotike pa smo zamenjali z diski namočenimi v zeliščne ekstrakte. Začimbe (pehtran, muškatni orešček kumina in brinove jagode) smo najprej zdrobili v terilnici in dodali malo vode. Iz filca smo izrezali kroge, ki so bili veliki cca 7 mm in jih dali v pripravljene ekstrakte. Počakali smo da so se diski napojili, nato pa smo jih s sterilizirano pinceto vzeli ven in jih dali na gojišče. Tako pripravljen antibiogram smo pustili stati nekaj dni da je antibiotik difundiral na gojišče in da se je pojavila inhibicijska cona.

UČINEK ZOBNIH PAST:

Tudi v tem primeru smo imeli gojišča že pripravljena in naše delo je bilo le, da smo uredili petrijevko (ime, razred, datum in razdelili na štiri dele) in na gojišča prenesli zobno pasto. Na vsak del svoj vzorec. Tako pripravljen antibiogram smo pustili stati nekaj dni da je antibiotik difundiral na gojišče in da se je pojavila inhibicijska cona.

UČINEK MIL:

 Pri milih smo uporabili isti postopek, kot pri zeliščih. V vodo malo mila in ga z njim namočili disk iz filca. Počakali smo da se je disk napojil in ga z pinceto prenesli na gojišče ter počakali na rezultate.

# REZULTATI

UČINEK ANTIBIOTIKOV:

 Po tem ko smo dali diske na površino agarja je antibiotik z diska difundiral v okoliški agar. Pri večini se je okrog diskov pojavila inhibicijska cona. Največja v našem primeru je bila pri norfloxacinu (in sicer premer cone je bil 35mm), temu je sledil amikacin (25mm) pri cfoxitinu pa se ta cona ni pojavila, kar pomeni da je bakterije odporna (rezistentna) na ta antibiotik.

Slika 2: Odpornost baterij na antibiotike

UČINEK ZAČIMB

 Tudi tu se je okoli nekaterih pojavila inhibicijska cona, ki pa je bila po večini nepravilnih oblik. Do tega je prišlo, ker nismo počakali dovolj veliko časa da bi antibiotik enakomerno difundiral na gojišče. Ugotovili smo, da je največja inhibicijska cona okoli česna (36 mm), takoj za njim je cimet (26 mm). Najmanjša cona pa je bila okoli lovora (9 mm). Na timijan pa so bakterije popolnoma odporne, saj se ni pojavila inhibicijska cona.

Slika 3: Delovanje začimb na bakterije

UČINEK ZOBNIH PAST

 Pri zobnih pastah se je pojavila inhibicijska cona pri vseh primerih. Največja je bila okoli aqaufresh (42mm), sledi mu vademekum (40mm), za njim je signal (38mm), najmanj uspečen pa je bil colgate (30mm).

Slika 4: Delovanje zobnih past na bakterije

UČINEK MIL

 Ta poizkus na žalost ni uspel. Razlogov za to je pa več. Prišlo je do prevelikega razhajanje podatkov. Možna je kontaminacije vzorca, nespretno narejena vaja…

**5. ZAKLJUČEK**

 Pri tej vaji smo ugotovili zanimivih stvari. Pri antibiotikih smo ugotovili kateri izmed treh je najbolj primeren za uničevanje bakterije Bacilius Cereus. In sicer to je norfoxacin. Ostali pa mu sledijo. Edino antibiotik cefoxin ni imel nobenega učinka na to bakterijo, saj je bakterije na ta antibiotik odporna.

 V drugem delu smo ugotovili da imajo začimbe poleg tega,da dodajo naši hrani okus tudi še eno bolj pomembno funkcijo. In sicer da imajo antibakterični učinek. Največji učinek je imel česen, ki je nekakšen naravni antibiotik. Sledijo mu cimet in lovor. Timijan pa ni imel nobenega učinka na bakterije.

 Pri zobnih pastah smo ugotovili da so zelo primerne za nego naših ust, saj so vse delovale na bakterije. Najučinkovitejša pa se je izkazala Aquafresh, ki je imela največjo inhibicijsko cono. Najmanj na se je izkazala zobna pasta Colgate.

 Za milo pa ne moremo reči kakšen učinek ima na baterije, ker poizkus na žalost ni uspel.