

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Darja KLEP

**VPLIV RAZLIČNIH GOSTOT BAKTERIJSKIH
SUSPENZIJ IN RAZLIČNIH ČASOV INKUBACIJE
NA REZULTATE TESTIRANJA OBČUTLJIVOSTI
ZA ANTIBIOTIKE PRI BAKTERIJAH *Streptococcus
pneumoniae* IN *Staphylococcus aureus***

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

Ljubljana, 2014

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Darja KLEP

**VPLIV RAZLIČNIH GOSTOT BAKTERIJSKIH SUSPENZIJ IN
RAZLIČNIH ČASOV INKUBACIJE NA REZULTATE TESTIRANJA
OBČUTLJIVOSTI ZA ANTIBIOTIKE PRI BAKTERIJAH
Streptococcus pneumoniae IN *Staphylococcus aureus***

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**INFLUENCE OF DIFFERENT BACTERIAL SUSPENSION
DENSITIES AND INCUBATION TIME ON ANTIMICROBIAL
SUSCEPTIBILITY TESTING RESULTS OF *Streptococcus pneumoniae*
AND *Staphylococcus aureus***

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2014

Diplomsko delo je zaključek Univerzitetnega študija mikrobiologije na Biotehniški fakulteti Univerze v Ljubljani. Opravljeno je bilo v Laboratoriju za respiratorno mikrobiologijo na Univerzitetni kliniki za pljučne bolezni in alergijo Golnik.

Za mentorico diplomskega dela je imenovana prof. dr. Nina Gunde-Cimerman, za somentorico doc. dr. Viktorijo Tomič in za recenzentko prof. dr. Katjo Seme.

Mentorica: prof. dr. Nina Gunde-Cimerman, univ. dipl. biol

Somentorica: doc. dr. Viktorija Tomič, dr. med.

Recenzentka: prof. dr. Katja Seme, dr. med

Komisija za oceno in zagovor diplomskega dela:

Predsednica: prof. dr. Darja ŽGUR-BERTOK
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Članica: prof. dr. Nina GUNDE-CIMERMAN
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Članica: doc. dr. Viktorija TOMIČ, dr. med.
Univerzitetna klinika za pljučne bolezni in alergijo Golnik, Laboratorij za respiratorno mikrobiologijo

Članica: prof. dr. Katja SEME, dr. med.
Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo

Datum zagovora:

Diplomsko delo je rezultat lastnega raziskovalnega dela. Podpisana Darja Klep se strinjam z objavo svojega diplomskega dela v polnem tekstu na spletni strani Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete. Izjavljam, da je delo, ki sem ga oddala v elektronski obliki, identično tiskani verziji.

Darja Klep

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Dn
DK	UDK 579.61 + 579.24: 615.33 (043) = 163.6
KG	<i>Staphylococcus aureus</i> / <i>Streptococcus pneumoniae</i> /občutljivost za antibiotike/oksacilin/cefoksitin/eritromicin/klindamicin/linezolid/ciprofloksacin/moksifloksacin/trimetoprim-sulfametoksazol/odpornost proti antibiotikom/disk difuzijski test
AV	KLEP, Darja
SA	GUNDE-CIMERMAN, Nina (mentorica)/TOMIČ, Viktorija (somentorica)/SEME Katja (recenzentka)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija mikrobiologije
LI	2014
IN	VPLIV RAZLIČNIH GOSTOT BAKTERIJSKIH SUSPENZIJ IN RAZLIČNIH ČASOV INKUBACIJE NA REZULTATE TESTIRANJA OBČUTLJIVOSTI ZA ANTIBIOTIKE PRI BAKTERIJAH <i>Streptococcus pneumoniae</i> IN <i>Staphylococcus aureus</i>
TD	Diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP	XIV, 83 str., 24 pregl., 3 sl., 2 pril., 176 vir.
IJ	sl
JI	sl/en
AI	Bakterija <i>Staphylococcus aureus</i> je pogosta povzročiteljica resnih bolnišničnih in zunajbolnišnično pridobljenih okužb. Zaradi visoke pojavnosti, obolevnosti in odpornosti proti antibiotikom je zdravljenje teh okužb vedno večji problem. Bakterija <i>Streptococcus pneumoniae</i> (pnevmokok) povzroča različne invazivne in neinvazivne okužbe in je kljub novim razpoložljivim antibiotikom in cepivom za zdravljenje in preprečevanje pnevmokoknih okužb še vedno vodilna povzročiteljica obolevnosti in umrljivosti po vsem svetu. Običajno so laboratorijski podatki testiranja občutljivosti bakterij za antibiotike prvo opozorilo, da se delež odpornih bakterijskih sevov zvišuje, zato je izredno pomembno redno testiranje izolatov ter spremljanje novega pojavljanja in širjenja odpornih sevov. Namen naše raziskave je bil ugotoviti, ali so rezultati testiranja občutljivosti bakterij <i>S. aureus</i> in <i>S. pneumoniae</i> za antibiotike s standardiziranim disk difuzijskim testom po navodilih CLSI (angl. Clinical and Laboratory Standards Institute) primerljivi z rezultati disk difuzijskega testa, ki smo ga modificirali tako, da smo spremenili gostoto bakterijskih suspenzij in čas inkubacije. Testirali smo občutljivost 32 kliničnih izolatov bakterije <i>S. pneumoniae</i> za oksacilin, eritromicin, klindamicin, moksifloksacin in TMP-SMX in občutljivost 31 kliničnih izolatov bakterije <i>S. aureus</i> za cefoksitin, eritromicin, klindamicin, linezolid, ciprofloksacin ter TMP-SMX. Na podlagi dobljenih rezultatov menimo, da so pri testiranju občutljivosti kliničnih izolatov bakterije <i>S. aureus</i> za klindamicin, linezolid in TMP-SMX rezultati modificiranega disk difuzijskega testa (gostota bakterijske suspenzije 2,0 McF, 4,0 McF, čas inkubacije 6 h in 7 h) primerljivi s standardiziranim disk difuzijskim testom, saj je bilo ujemanje med njima 100 %. Prav tako menimo, da so rezultati primerljivi tudi za tiste antibiotike, razen za cefoksitin, ki pri določenih parametrih presegajo 90 % ujemanje. Pri testiranju občutljivosti kliničnih izolatov bakterije <i>S. pneumoniae</i> so bili najvišji deleži ujemanja za vse testirane antibiotike med 75 % in 80 %, pri gostotah bakterijskih suspenzij 2,0 McF, 4,0 McF in 7-urni inkubaciji. Zaradi nižjega deleža ujemanja menimo, da so rezultati med obema testoma le pogojno primerljivi.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dn
 DC UDC 579.61 + 579.24: 615.33 (043) = 163.6
 CX *Staphylococcus aureus*/*Streptococcus pneumoniae*/antimicrobial susceptibility testing/oxacillin/cefoxitin/erythromycin/clindamycin/linezolid/ciprofloxacin/moxifloxacin/trimethoprim-sulfamethoxazole/antimicrobial resistance/disk diffusion test
 AU KLEP, Darja
 AA GUNDE-CIMERMAN, Nina (supervisor)/TOMIČ, Viktorija (co-advisor)/SEME, Katja (reviewer)
 PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
 PB University of Ljubljana, Biotechnical faculty, Interdepartmental Programme in Microbiology
 PY 2014
 TI INFLUENCE OF DIFFERENT BACTERIAL SUSPENSION DENSITIES AND INCUBATION TIME ON ANTIMICROBIAL SUSCEPTIBILITY TESTING RESULTS OF *Streptococcus pneumoniae* AND *Staphylococcus aureus*
 DT Graduation Thesis (University Studies)
 NO XIV, 83 p., 24 tab., 3 fig., 2 ann., 176 ref.
 LA sl
 AL sl/en
 AB *Staphylococcus aureus* frequently causes severe nosocomial and community – acquired infections. Because of high incidence, morbidity and antimicrobial resistance those infections are difficult to treat. *Streptococcus pneumoniae* causes different invasive and noninvasive infections. Although there are new available antibiotics and vaccines for treatment of pneumococcal infections *S. pneumoniae* is still a leading cause of morbidity and mortality worldwide. Laboratory bacterial susceptibility testing results are usually the first sign that percentages of resistant strains are rising, that is why it is highly important to regularly test the isolates and monitor new emergence and spreading of resistant strains. In this study, we tested the influence of different bacterial suspension densities and incubation times on antimicrobial susceptibility testing results of *S. aureus* and *S. pneumoniae*. We used standard disk diffusion test and disk diffusion test in which we modified bacterial suspension densities and incubation times. We tested susceptibility of 32 clinical isolates of *S. pneumoniae* to oxacillin, erythromycin, clindamycin, moxifloxacin and trimethoprim-sulfamethoxazole and the susceptibility of 31 clinical isolates of *S. aureus* to cefoxitin, erythromycin, clindamycin, linezolid, ciprofloxacin and trimethoprim-sulfamethoxazole with both tests. Based on the results obtained we believe that the modified (density of bacterial suspension 2.0 McF, 4.0 McF, time of incubation 6 h and 7 h) susceptibility testing results of *S. aureus* to clindamycin, linezolid and trimethoprim-sulfamethoxazole, are comparable with standard disk diffusion test results as the matching between them was 100 %. We also believe that the results are comparable for those antibiotics, except for cefoxitin where certain parameters exceed 90 % of the match. For the susceptibility testing results of *S. pneumoniae* the highest percentage of matching for all antibiotics tested were between 75 and 80 % at density of bacterial suspension of 2.0 McF, 4.0 McF and 7 h incubation. Due to lower percentage of matching we believe that the results between those two tests are only conditionally comparable.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA.....	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO PREGLEDNIC.....	VIII
KAZALO SLIK.....	X
KAZALO PRILOG	XI
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	XII
1 UVOD	1
1.1 NAMEN IN CILJI DIPLOMSKEGA DELA	2
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 ANTIBIOTIKI.....	3
2.1.1 Betalaktamski antibiotiki.....	4
2.1.1.1 Mehanizmi odpornosti proti betalaktamskim antibiotikom	4
2.1.1.2 Oksacilin.....	7
2.1.1.3 Cefoksitin	8
2.1.2 Makrolidni antibiotiki.....	9
2.1.2.1 Mehanizmi odpornosti proti makrolidnim antibiotikom	9
2.1.2.2 Eritromicin.....	10
2.1.3 Linkozamidi	11
2.1.3.1 Klindamicin	11
2.1.4 Oksazolidinoni	13
2.1.4.1 Linezolid.....	14
2.1.5 Kinoloni	16
5.1.5.1 Mehanizmi odpornosti proti kinolonom.....	18
5.1.5.2 Ciprofloksacin	19
5.1.5.3 Moksifloksacin	20
2.1.6 Sulfonamidi in trimetoprim.....	21
2.1.6.1 Sulfonamidi – mehanizem delovanja	21
2.1.6.2 Trimetoprim – mehanizem delovanja.....	21

2.1.6.3	Mehanizmi odpornosti proti sulfonamidom in trimetoprimu	22
2.1.6.4	Trimetoprim-sulfametoksazol	23
2.2	ZNAČILNOSTI TESTIRANIH BAKTERIJ	24
2.2.1	Stafilokoki	24
2.2.1.1	<i>Staphylococcus aureus</i>	24
2.2.1.2	Mehanizmi odpornosti bakterije <i>S. aureus</i> proti antibiotikom	25
2.2.2	Streptokoki	29
2.2.2.1	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	29
2.2.2.2	Mehanizmi odpornosti bakterije <i>S. pneumoniae</i> proti antibiotikom	30
2.2.3	Razširjenost odpornosti proti antibiotikom pri bakterijah <i>S. aureus</i> in <i>S. pneumoniae</i> v Evropi v letu 2011	33
2.3	METODE ZA DOLOČANJE OBČUTLJIVOSTI BAKTERIJ ZA ANTIBOTIKE	36
3	MATERIALI IN METODE	37
3.1	MATERIALI	37
3.1.1	Bakterijski izolati	37
3.1.2	Gojišča, raztopine in reagenti	37
3.1.3	Laboratorijski pribor in oprema	38
3.2	METODE	39
3.2.1	Disk difuzijski test	39
3.2.1.1	Priprava bakterijskih izolatov in bakterijske inokulacijske suspenzije	39
3.2.1.2	Polaganje standardiziranih diskov z antibiotiki in inkubacija	40
3.2.1.3	Odčitavanje in interpretacija rezultatov	40
4	REZULTATI	42
4.1	IDENTIFIKACIJA BAKTERIJ IN PREGLED REZULTATOV TESTIRANJA OBČUTLJIVOSTI ZA IZBRANE ANTIBIOTIKE	42
4.2	REZULTATI TESTIRANJA OBČUTLJIVOSTI REFERENČNIH SEVOV ZA IZBRANE ANTIBIOTIKE	42
4.3	REZULTATI TESTIRANJA OBČUTLJIVOSTI KLINIČNIH IZOLATOV BAKTERIJE <i>S. aureus</i> ZA IZBRANE ANTIBIOTIKE	44

4.4	REZULTATI TESTIRANJA OBČUTLJIVOSTI KLINIČNIH IZOLATOV BAKTERIJE <i>S. pneumoniae</i> ZA IZBRANE ANTIBIOTIKE	52
4.5	PRIMERJAVA REZULTATOV MODIFICIRANEGA DISK DIFUZIJSKEGA TESTA OBČUTLJIVOSTI KLINIČNIH IZOLATOV BAKTERIJE <i>S. aureus</i> S STANDARDIZIRANIM TESTOM	57
4.6	PRIMERJAVA REZULTATOV MODIFICIRANEGA DISK DIFUZIJSKEGA TESTA OBČUTLJIVOSTI KLINIČNIH IZOLATOV BAKTERIJE <i>S. pneumoniae</i> S STANDARDIZIRANIM TESTOM	61
5	RAZPRAVA.....	65
5.1	RAZPRAVA.....	65
5.2	SKLEPI.....	70
6	POVZETEK	71
7	VIRI	73
ZAHVALA		
PRILOGE		

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Mehanizmi odpornosti bakterije <i>S. aureus</i> proti testiranim antibiotikom (Reinert, 2009; Jacobs, 2004; Ambrose in sod., 2005; Leclercq, 2002; Pentosti in sod., 2007; Billal in sod., 2011; Huovinen, 2001; Boncoeur in sod., 2012; Eliopoulus, 2004).....	28
Preglednica 2: Mehanizmi odpornosti bakterije <i>S. pneumoniae</i> proti testiranim antibiotikom (Reinert, 2009; Jacobs, 2004; Ambrose in sod., 2005; Leclercq, 2002; Pentosti in sod., 2007; Billal in sod., 2011; Huovinen, 2001; Boncoeur in sod., 2012; Eliopoulus, 2004).	32
Preglednica 3: Število testiranih in odstotek invazivnih izolatov bakterije <i>S. aureus</i> odpornih proti meticilinu in rifampicinu za posamezne države, upoštevajoč 95 % interval zaupanja (EARS–Net, 2012: 55).....	34
Preglednica 4: Število invazivnih izolatov bakterije <i>S. pneumoniae</i> testiranih na občutljivost za penicilin in makrolide in deleži odpornih in zmerno odpornih izolatov skupaj proti posameznemu antibiotiku in za oba hkrati za posamezne države upoštevajoč 95 % interval zaupanja (EARS–Net, 2012: 47).....	36
Preglednica 5: Koncentracije standardiziranih diskov z antibiotiki testiranih pri izolatih bakterij <i>S. aureus</i> in <i>S. pneumoniae</i> (CLSI, 2008).	38
Preglednica 6: Rezultati standardiziranega disk difuzijskega testa občutljivosti sevov bakterij <i>S. aureus</i> ATTC 25923 in <i>S. pneumoniae</i> ATTC 49619 za izbrane antibiotike in razpon zaviralnih con.	43
Preglednica 7: Rezultati (premeri zaviralnih con v mm) standardiziranega in modificiranega disk difuzijskega testa občutljivosti (gostota bakterijske suspenzije 0,5 McF, 1,0 McF, 2,0 McF in 4,0 McF ter po 6-, 7- in 24-urni inkubaciji) referenčnega seva bakterije <i>S.pneumoniae</i> ATTC 49619 za izbrane antibiotike.....	44
Preglednica 8: Rezultati (premeri zaviralnih con v mm) standardiziranega in modificiranega disk difuzijskega testa občutljivost (gostota bakterijske suspenzije 0,5 McF, 1,0 McF, 2,0 McF in 4,0 McF ter po 5-, 6-, 7- in 18-urni inkubaciji) referenčnega seva bakterije <i>S.aureus</i> ATTC 25923 za izbrane antibiotike.....	44
Preglednica 9: Število in deleži bakterije <i>S. aureus</i> občutljivih, zmerno odpornih in odpornih proti izbranim antibiotikom. Rezultati modificiranega disk difuzijskega testa z gostoto bakterijske suspenzije 0,5 McF po 5-, 6- in 7-urni inkubaciji ter standardiziranega disk difuzijskega testa z gostoto bakterijske suspenzije 0,5 McF po 18-urni inkubaciji.	46
Preglednica 10: Število in deleži bakterije <i>S. aureus</i> občutljivih, zmerno odpornih in odpornih proti izbranim antibiotikom. Rezultati modificiranega disk difuzijskega testa z gostoto bakterijske suspenzije 1,0 McF po 5-, 6-, 7- in 18-urni inkubaciji.	48
Preglednica 11: Število in deleži bakterije <i>S. aureus</i> občutljivih, zmerno odpornih in odpornih proti izbranim antibiotikom. Rezultati modificiranega disk difuzijskega testa z gostoto bakterijske suspenzije 2,0 McF po 5-, 6-, 7- in 18-urni inkubaciji.	50

Preglednica 12: Število in deleži bakterije <i>S. aureus</i> občutljivih, zmerno odpornih in odpornih proti izbranim antibiotikom. Rezultati modificiranega disk difuzijskega testa z gostoto bakterijske suspenzije 4,0 McF po 5-, 6-, 7- in 18-urni inkubaciji.	52
Preglednica 13: Število in deleži bakterije <i>S. pneumoniae</i> občutljivih, zmerno odpornih in odpornih proti izbranim antibiotikom. Rezultati modificiranega disk difuzijskega test z gostoto bakterijske suspenzije 0,5 McF po 6- in 7-urni inkubaciji ter standardiziranega disk difuzijskega test z gostoto bakterijske suspenzije 0,5 McF po 24-urni inkubaciji.	54
Preglednica 14: Število in deleži bakterije <i>S. pneumoniae</i> občutljivih, zmerno odpornih in odpornih proti izbranim antibiotikom. Rezultati modificiranega disk difuzijskega test z gostoto bakterijske suspenzije 1,0 McF po 6-, 7- in 24-urni inkubaciji.	55
Preglednica 15: Število in deleži bakterije <i>S. pneumoniae</i> občutljivih, zmerno odpornih in odpornih proti izbranim antibiotikom. Rezultati modificiranega disk difuzijskega test z gostoto bakterijske suspenzije 2,0 McF po 6-, 7- in 24-urni inkubaciji.	56
Preglednica 16: Število in deleži bakterije <i>S. pneumoniae</i> občutljivih, zmerno odpornih in odpornih proti izbranim antibiotikom. Rezultati modificiranega disk difuzijskega test z gostoto bakterijske suspenzije 4,0 McF po 6-, 7- in 24-urni inkubaciji.	57
Preglednica 17: Ujemanje rezultatov modificiranega disk difuzijskega testa občutljivosti bakterije <i>S. aureus</i> (gostota bakterijske suspenzije 0,5 McF po 5-, 6- in 7-urni inkubaciji) s standardiziranim testom.	58
Preglednica 18: Ujemanje rezultatov modificiranega disk difuzijskega testa občutljivosti bakterije <i>S. aureus</i> (gostota bakterijske suspenzije 1,0 McF po 5-, 6- in 7-urni inkubaciji) s standardiziranim testom.	59
Preglednica 19: Ujemanje rezultatov modificiranega disk difuzijskega testa občutljivosti bakterije <i>S. aureus</i> (gostota bakterijske suspenzije 2,0 McF po 5-, 6- in 7-urni inkubaciji) s standardiziranim testom.	60
Preglednica 20: Ujemanje rezultatov modificiranega disk difuzijskega testa občutljivosti bakterije <i>S. aureus</i> (gostota bakterijske suspenzije 4,0 McF po 5-, 6- in 7-urni inkubaciji) s standardiziranim testom.	61
Preglednica 21: Ujemanje rezultatov modificiranega disk difuzijskega testa občutljivosti bakterije <i>S. pneumoniae</i> (gostota bakterijske suspenzije 0,5 McF po 6- in 7-urni inkubaciji) s standardiziranim testom.	62
Preglednica 22: Ujemanje rezultatov modificiranega disk difuzijskega testa občutljivosti bakterije <i>S. pneumoniae</i> (gostota bakterijske suspenzije 1,0 McF po 6- in 7-urni inkubaciji) s standardiziranim testom.	63
Preglednica 23: Ujemanje rezultatov modificiranega disk difuzijskega testa občutljivosti bakterije <i>S. pneumoniae</i> (gostota bakterijske suspenzije 2,0 McF po 6- in 7-urni inkubaciji) s standardiziranim testom.	64
Preglednica 24: Ujemanje rezultatov modificiranega disk difuzijskega testa občutljivosti bakterije <i>S. pneumoniae</i> (gostota bakterijske suspenzije 4,0 McF po 6- in 7-urni inkubaciji) s standardiziranim testom.	64

KAZALO SLIK

Slika 1: Shematični prikaz beljakovin, ki posredujejo odpornost proti betalaktamskim antibiotikom (Wilke in sod., 2005).....	7
Slika 2: Kemijska struktura klindamicina (Kasten, 1999).....	12
Slika 3: Prikaz sinteze bakterijskih beljakovin in mesta delovanja oksazolidinonov (Bozdogan in Appelbaum, 2004).....	14

KAZALO PRILOG

Priloga A: Prikaz rezultatov (premeri zaviralnih con v mm) testiranja občutljivosti 31 kliničnih izolatov bakterije *S. aureus* s standardiziranim in modificiranim disk difuzijskim testom

Priloga B: Prikaz rezultatov (premeri zaviralnih con v mm) testiranja občutljivosti 32 kliničnih izolatov bakterije *S. pneumoniae* s standardiziranim in modificiranim disk difuzijskim testom

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

A	baza adenin
ABC	ABC prenašalci (angl. ATP binding cassette)
ATP	adenozin-trifosfat (angl. adenosine 3 - phosphate)
ATTC	angl. The American Type Culture Collection
CA-MRSA	zunajbolnišnična proti meticilinu odporna bakterija <i>Staphylococcus aureus</i> (angl. community acquired methicillin-resistant <i>S. aureus</i>)
CFU	enote, ki tvorijo kolonije (angl. colony formnig units)
CLSI	angl. Clinical and Laboratory Standards Institute
CO ₂	ogljikov dioksid
CŽS	centralno - živčni sistem
DHFR	dihidrofolat reduktaza (angl. dihydrofolate reductase)
DHPS	dihidropteroat sintaza(angl. dihydropteroate synthetase)
DNA	deoksiribonukleinska kislina (angl. deoxyribonucleic acid)
dsDNA	dvoverižna DNA (angl. double-stranden deoxyribonucleic acid)
EARS-Net	angl. European Antimicrobial Resistance Surveillance Network
ESBL	beta-laktamaze z razširjenim delovanjem (angl. extended spectrum beta-lactamases)
Fab	podenota protitelesa, ki se veže na antigen
fMet-tRNA	N-formilmetionin tRNA (angl. N - Formylmethionine tRNA)
G	baza gvanin
GTP	gvanozin-trifosfat (angl. guanosine 3 - phosphate)
HA	hranilni agar
I	zmerno odporen (angl. intermediate)
IF1	začetni dejavnik 1 (angl. initiation factor 1)
IF2	začetni dejavnik 2 (angl. initiation factor 2)
IF3	začetni dejavnik 3 (angl. initiation factor 3)
IgA	protitelo razreda A (imunoglobulin A)
KA	krvni agar
KNS	koagulaza negativni stafilokoki
McF	McFarland (enota)

MDR	odporni priti več snovem (angl. multi-drug resistant)
MEGA	genetski sestav za črpanje makrolidov (angl. Macrolide efflux gene assembly)
MHA	Mueller-Hinton agar
MIK	minimalna zaviralna koncentracija
MLS _B	makrolidi, linkozamidi in streptogramin B
mRNA	sporočilna RNA (angl. messenger RNA)
MRSA	proti meticilinu odporna bakterija <i>Staphylococcus aureus</i> (angl. Methicillin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i>)
MSSA	za meticilin občutljiva bakterija <i>Staphylococcus aureus</i> (angl. Methicillin-susceptible <i>Staphylococcus aureus</i>)
NaCl	natrijev klorid
NADPH	nikotinamid adenozin dinukleotid fosfat (angl. nicotinamide adenine dinucleotide phosphate)
NCCLS	angl. National Committee for Clinical Laboratory Standards
PABA	para-aminobenzojeva kislina (angl. para-aminobenzoic acid)
PBP	penicilin vezoče beljakovine (angl. Penicillin binding protein)
QRDR	regije, ki določajo odpornost proti kinolonom (angl. Quinolone resistance-determining regions)
R	odporen (angl. resistant)
RNA	ribonukleinska kislina (angl. ribonucleic acid)
rRNA	ribosomska RNA (angl. ribosomal RNA)
S	občutljiv (angl. sensitive)
SCCmec	stafilokokna kromosomska kaseta <i>mec</i> (angl. staphylococcal cassette chromosome <i>mec</i>)
ssDNA	enoverižna DNA (angl. single-stranded deoxyribonucleic acid)
TMP-SMX	trimetoprim-sulfametoksazol
tRNA	prenašalna RNA (angl. transfer RNA)
U	baza uracil
VRE	proti vankomicinu odporni enterokoki (angl. Vancomycin-resistant enterococci)

VRSA proti vankomicinu odporna bakterija *Staphylococcus aureus* (angl.
Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*)

1 UVOD

Bakterija *Staphylococcus aureus* se nahaja v različnih okoljih, najpogosteje na koži in sluznicah sesalcev. Povzroča okužbe kože, mehkega tkiva, kosti, sklepov, pljuč, centralnega živčnega sistema (CŽS), kolonizira proteze in katetre ter poslabšuje zapletena zdravstvena stanja kot je endokarditis (Bomberberg in Boyd, 2005). Kljub temu je več kot 20 odstotkov odrasle populacije ljudi zdravih prenašalcev te bakterije (Cole in sod., 2001). Okužbe z bakterijo *S. aureus* so po odkritju penicilina uspešno zdravili, vendar pa so že leto dni kasneje pri bolniku Albertu Alexandru osamili sev bakterije *S. aureus* odporen proti temu zdravilu. Okužbe, ki jih je povzročala bakterija *S. aureus* odporna proti penicilinu, so se sprva prenašale le med hospitaliziranimi bolniki, s časom pa so se splošno razširile. Izvor problema pri obvladovanju okužb, ki jih povzroča bakterija *S. aureus* in je kasneje dobil globalne razsežnosti, sega v začetek 60. let dvajsetega stoletja, ko je bila identificirana proti meticilinu odporna bakterija *S. aureus* (angl. Methicillin-resistant *S. aureus*, MRSA) (Deresinski, 2005). Pri hospitaliziranih bolnikih okuženih z MRSA je bolnišnična umrljivost 5-krat višja kot pri hospitaliziranih bolnikih, ki z njim niso okuženi. Dodatno skrb pa povzroča širjenje MRSA v zunajbolnišničnem okolju (angl. community-acquired MRSA, CA-MRSA). Danes zaradi visoke pojavnosti, obolevnosti in odpornosti proti antibiotikom predstavlja zdravljenje okužb, ki jih povzroča bakterija *S. aureus*, vedno večji problem, zato je potrebno previdno in preudarno predpisovanje antibiotikov. Zdravljenje okužb z MRSA mora biti podkrepljeno z rezultati testiranja občutljivosti bakterije za antibiotike (Bomberger in Boyd, 2005).

Podobna usoda je doletela zdravljenje okužb z bakterijo *Streptococcus pneumoniae* (pnevmokok), ki je od odkritja prvega seva konec 19. stoletja in vse do danes vodilna povzročiteljica obolevnosti in umrljivosti po vsem svetu. Sprva občutljiva za penicilin je v 60. in 70. letih dvajsetega stoletja, ko so odkrili prve izolate neobčutljive za penicilin, postala problem za javno zdravstvo po vsem svetu (Jacobs, 1999). Danes odpornost pnevmokokov proti antibiotikom še vedno narašča, predvsem proti betalaktamom in makrolidom (Reinert, 2009). Bakterija *S. pneumoniae* je najpogostejša povzročiteljica zunajbolnišničnih okužb dihal, ki pa se večinoma zdravijo izkustveno. Za takšen način

zdravljenja je potrebna velika mera razsodnosti, saj lahko v nasprotnem primeru pripomore k širjenju odpornosti proti antibiotikom (Appelbaum, 2000). Običajno so laboratorijski podatki testiranja občutljivosti bakterij za antibiotike prvo opozorilo, da se delež odpornih bakterijskih sevov zvišuje, zato je izredno pomembno redno testiranje izolatov ter spremljanje novega pojavljanja in širjenja odpornih sevov (Tenover, 2010).

1.1 NAMEN IN CILJI DIPLOMSKEGA DELA

Raziskavo v sklopu diplomskega dela smo izvedli z namenom, da bi ugotoviti ali so rezultati modificiranega testiranja občutljivosti bakterij *S. aureus* in *S. pneumoniae* za antibiotike primerljivi z rezultati standardiziranega disk difuzijskega testa po priporočilih ameriškega Inštituta za laboratorijske standarde (angl. Clinical Laboratory Standard Institute – CLSI). Disk difuzijski test smo modificirali tako, da smo spremenili gostoto bakterijskih suspenzij in čas inkubacije. Testirali smo občutljivost bakterije *S. pneumoniae* za antibiotike oksacilin, eritromicin, klindamicin, moksifloksacin in trimetoprim-sulfametoksazol in občutljivost bakterije *S. aureus* za antibiotike cefoksitin, eritromicin, klindamicin, linezolid, ciprofloksacin ter trimetoprim-sulfometoksazol. Želeli smo ugotoviti, kakšen vpliv imajo različne gostote bakterijskih suspenzij in različni časi inkubacije na rezultate testiranja občutljivosti za antibiotike pri bakterijah *S. pneumoniae* in *S. aureus*.

Predvidevali smo, da bomo pri višji gostoti bakterijske suspenzije in krajšem času inkubacije dobili rezultate primerljive z rezultati standardiziranega disk difuzijskega testa.

2 PREGLED OBJAV

2.1 ANTIBIOTIKI

Antibiotiki so presnovni produkti bakterij, gliv, lišajev ali višjih rastlin, ki zavirajo rast (bakteriostatičen učinek) in preprečujejo razmnoževanje (baktericiden učinek) mikroorganizmov. Najpogostejše zastopane bakterije, ki proizvajajo naravne antibiotike, so iz rodu *Streptomyces*. Naravni antibiotiki pa niso edine protimikrobne učinkovine, ki se uporabljajo za zdravljenje bakterijskih okužb. Danes vse pogostejše najdemo na tržišču sintetične in polsintetične protimikrobne učinkovine. Slednje so proizvedene s kemijsko modifikacijo naravnega antibiotika, ki jim z izboljšanjem protimikrobnih in farmakoloških lastnosti povečamo učinkovitost. Sintetične protimikrobne učinkovine niso naravnega izvora in po principu selektivne toksičnosti uničujejo patogene mikroorganizme ter ob tem niso škodljive za gostitelja. Takšne protimikrobne učinkovine imenujemo kemoterapevtiki (v nadaljevanju antibiotiki) (Madigan in sod., 2003).

Ena izmed pomembnih lastnosti antibiotikov je spekter delovanja, ki nam pove, za katere vrste mikroorganizmov je njihovo delovanje baktericidno oz. bakteriostatično. Tako ločimo antibiotike ozkega spektra, kar pomeni, da delujejo na manjše število vrst bakterij in antibiotike širokega spektra, ki delujejo na več različnih vrst bakterij. Delovanje posameznih antibiotikov vrednotimo z minimalno zaviralno koncentracijo (MIK), ki nam pove, katera je najmanjša koncentracija (mg/ml) posameznega antibiotika potrebna za zaviranje rasti mikroorganizma. Antibiotiki se odlikujejo tudi po selektivni toksičnosti, kar pomeni, da zaviralno delujejo na bakterijske življenjsko pomembne procese, hkrati pa ne poškodujejo gostiteljskih celic. Na bakterijske življenjsko pomembne procese delujejo tako, da zavirajo sintezo celične stene, citoplazemske membrane in beljakovin ter motijo sintezo jedrnih kislin (Ryan in Drew, 2010).

2.1.1 Betalaktamski antibiotiki

Peniciline in cefalosporine uvrščamo med klasične betalaktamske antibiotike, ki zavirajo sintezo bakterijske celične stene. Zanje je značilen kemijsko reaktiven betalaktamski obroč, ki je strukturni analog dipeptida D-alanil-D-alanin (D-ala-D-ala) in ga encim D-alanin-transpeptidaza prepozna kot substrat. D-alanin-transpeptidazo uvrščamo v skupino penicilin vezočih beljakovin (angl. Penicillin-binding proteins, PBP). Naloga transpeptidaze je uvrščanje N-acetil muraminske kisline in N-acetil glukoamina v peptidoglikansko verigo (Chambers in Deck, 2009).

Sinteza bakterijske celične stene poteka v treh stopnjah. Pri bakteriji *S. aureus* se v prvi stopnji v citoplazmi sintetizirajo nukleotidni prekursorji (UDP-acetilmuramil pentapeptid in UDP-N-acetilglukozamin) (Scheffers in Pinho, 2005). Reakcije v tej stopnji zavira antibiotik cikloserin (Wang in Walsh, 1978). V drugi stopnji se povežeta UDP-acetilmuramil pentapeptid in UDP-N-acetilglukozamin, pri čemer nastane linearni peptidoglikan, ki se nato prenese na zunanjo stran citoplazemske membrane (Scheffers in Pinho, 2005). Reakcije v tej stopnji sinteze celične stene zavira antibiotik vankomicin (Johnston in Neuhaus, 1975). V tretji stopnji poteka prehod novo sintetiziranih glikopeptidov v celično steno in prečno povezovanje z obstoječim peptidoglikanom (transpeptidacija) (Scheffers in Pinho, 2005). Reakcijo transpeptidacije zavirajo penicilini in cefalosporini. Ti antibiotiki zavzamejo D-ala-D-ala substratno mesto transpeptidaze in se tako nepovratno vežejo na encim ter onemogočijo nadaljnjo sintezo peptidoglikana, kar posledično pripelje do lize bakterijske celice (Tipper in Strominger, 1965). Betalaktamski antibiotiki delujejo baktericidno, vendar še vedno ni popolnoma pojasnjeno, kako oz. zaradi česa celica lizira (Bayles, 2000).

2.1.1.1 Mehanizmi odpornosti proti betalaktamskim antibiotikom

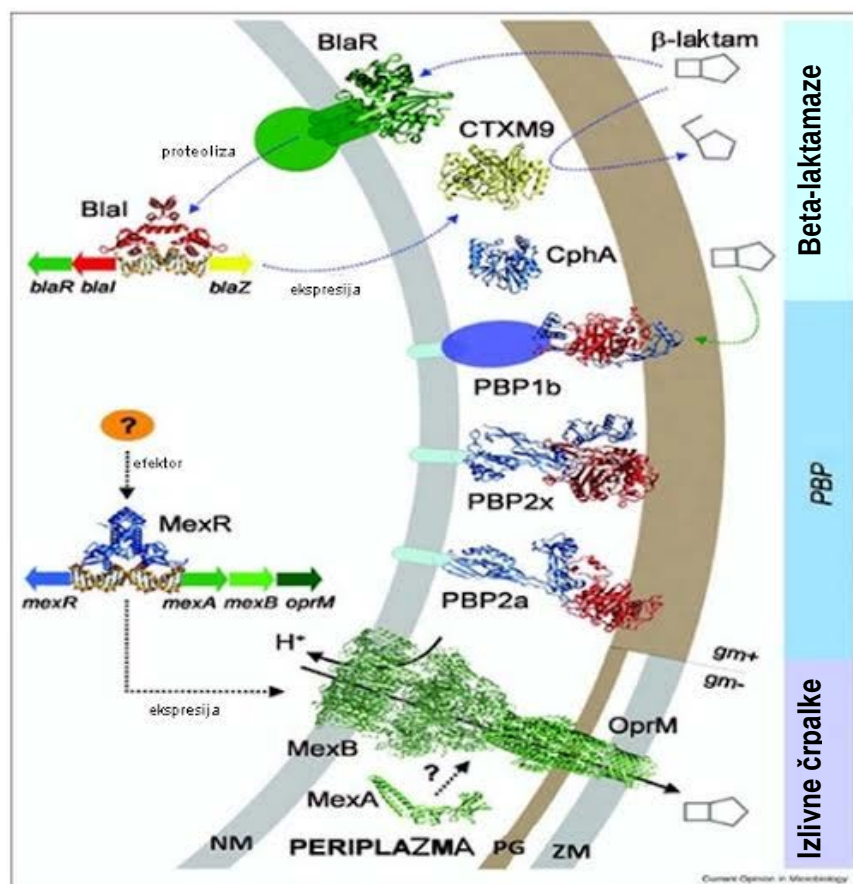
Odpornost proti betalaktamskim antibiotikom je v prvi vrsti posledica encimske razgradnje antibiotika. Odporne bakterije sintetizirajo beta-laktamaze. Genski zapis zanje leži na kromosomu (vrstno specifične beta-laktamaze) ali na plazmidu. Genski zapis za sintezo

beta-laktamaz, ki leži na plazmidu, se lahko s transdukcijo prenese na bakterije, ki le-teh ne sintetizirajo, zaradi česar se poveča število odpornih bakterijskih sevov. Pri po Gramu pozitivnih bakterijah so beta-laktamaze vezane na citoplazemsko membrano ali se izločijo v okolico, pri po Gramu negativnih bakterijah pa se izločajo v periplazemski prostor. Pri slednjih so zastopane v večjem številu. Beta-laktamaze hidrolizirajo ciklične amidne vezi betalaktamskega obroča in ker je nedotaknjen betalaktamski obroč antibiotika nujen za vezavo na PBP, je zaradi tega protimikrobno delovanje onemogočeno (Pitout in sod., 1997). Beta-laktamaze delimo glede na strukturo in funkcijo v več skupin. Najbolj funkcionalno shemo za klasifikacijo beta-laktamaz, ki se neprestano dopolnjuje, je oblikoval Bush (1989). V molekulsko skupino A uvrščamo klinično pomembne najenostavnejše beta-laktamaze kot sta penicilinaza in cefalosporinaza ter beta-laktamaze z razširjenim delovanjem (angl. extended spectrum beta-lactamases, ESBL). Te beta-laktamaze so različnih tipov (TEM, SHV) in hidrolizirajo večino penicilinov ter vse cefalosporine razen cefamicina (Miller in sod., 2001). Obstajajo naravni in sintetični zaviralci beta-laktamaze. Prva med njimi je bila klavulanska kislina, ki ima šibko protimikrobno delovanje, učinkovito pa zavira beta-laktamaze (Brown in sod., 1976). *In vitro* s penicilini in cefalosporini delujejo sinergistično proti izolatom bakterije *S. aureus*, ki sintetizirajo beta-laktamaze in proti po Gramu negativnim bakterijam (Wise in sod., 1978). Beta-laktamaze zavirata tudi tazobaktam in sulbaktam. Kombinacija piperacilin-tazobaktam ima širši spekter protimikrobnega delovanja kot kombinacija amoksisicilin-klavulanska kislina (Tzouveleakis in sod., 1996). Novejši zaviralci beta-laktamaze so 6-alkiliden-substituirani penemi in penicilin sulfoni, BAL29880 monobaktam ter biciklični N-hidroksi-O-sulfate ester (NXL104) (Llarrull in sod., 2010).

Odpornost proti betalaktamskim antibiotikom posredujejo še dva mehanizma. Pri po Gramu negativnih bakterijah sta to zmanjšana prepustnost celične membrane in sprememba tarčnega mesta za antibiotik. Slednji mehanizem se pojavlja tudi pri po Gramu pozitivnih bakterijah. Spremembe v PBP so dobro raziskane pri po Gramu negativnih bakterijah: *Haemophilus influenzae*, *Neisseria gonorrhoeae* in pri po Gramu pozitivnih bakterijah: *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, viridans streptokokih in enterokokih (Spratt, 1994). Sprememba tarčnega mesta je posledica mutacij v kromosomskih genih, ki nosijo zapis za sintezo PBP ali

pridobitve tujih genov, ki nosijo zapis za sintezo novih PBP (Georgopapadakou, 1993). Odpornost proti betalaktamskim antibiotikom se je pri pnevmokokih razvila zaradi medvrstnega prenosa genov *pbp* s homologno rekombinacijo (Reichmann in sod., 1997). Pnevmonoki imajo 5 PBP z visoko molekulsko težo (1A, 1B, 2A, 2B in 2X) in enega z nizko molekulsko težo (PBP3) (Spratt, 1994). Zapis za sintezo PBP pri odpornih izolatih nosijo mozaični geni, katerih zaporedja se razlikujejo od zaporedij genov pri občutljivih sevih. (Reichmann in sod., 1997). Primarno je za odpornost odgovoren spremenjen PBP2X. Pri visoko odpornih sevih sta spremenjena še PBP2B in PBP1A. MRSA je še en primer, pri katerem se pojavlja mehanizem odpornosti proti antibiotikom s spremembo tarčnega mesta. MRSA sintetizira nov PBP, ki se imenuje PBP2a (uporablja se tudi poimenovanje PBP2') (Song in sod., 1987). Zmožnost enega PBP, da prevzame vlogo ostalih treh nespremenjenih PBP pri stafilokoku, je presenetljiva, saj naj bi bilo za normalno rast in morfogenezo bakterije potrebnih več PBP (Spratt in Cromie, 1988). PBP2a ima zelo nizko afiniteto do skoraj vseh betalaktamskih antibiotikov. Zapis za sintezo PBP2a nosi gen *mecA*, ki je del transpozona in ni prisoten pri občutljivih sevih bakterije *S. aureus* (Song in sod., 1987). Ito in sod., (1999) so s sekveniranjem specifičnega kromosomskega območja seva N315 MRSA potrdili, da zapis za gen *mecA* nosi nov genetični element, ki so ga poimenovali stafilokokna kromosomska kaseta *mec* (angl. staphylococcal cassette chromosome *mec*, SCC*mec*). Gen *mecA* se med stafilokoknimi vrstami prenaša s transdukcijo (Cohen in Sweeney, 1970).

Pri po Gramu negativnih bakterijah prehajajo antibiotiki zunanjo membrano skozi porine. Spremembe v sestavi porinov zmanjšajo prepustnost za antibiotike in tako ne povzročijo odpornosti le proti betalaktamskim antibiotikom, temveč tudi proti več različnim antibiotikom, saj po večini vstopajo v celico skozi iste porine. Spremenjeni porini in beta-laktamaze delujejo sinergistično (Nikaido, 2000).



Slika 1: Shematični prikaz beljakovin, ki posredujejo odpornost proti betalaktamskim antibiotikom. Beljakovine, ki so odgovorne za odpornost proti antibiotikom so razdeljene v tri skupine: izlivne črpalke, PBP (penicilin vezoče beljakovine) in beta-laktamaze. BlaR receptor; BlaI in MexR represorja odpornostnega operona; blaR, blaI in blaZ, mexR, mexA, mexB in oprM represorski geni; CTXM9 in CphA serin in metalo beta-laktamaze; PBP1b, PBP2x, PBP2a penicilin vezoče beljakovine; H⁺ proton; MexAB-OprM izlivna črpalka; NM – notranja membrana; PG – peptidoglikan; ZM – zunanja membrana; gm⁺/gm⁻ Gram pozitivno/negativno (Wilke in sod., 2005).

2.1.1.2 Oksacilin

Oksacilin (izoksazolilpenicilin) uvrščamo med antistafilokokne peniciline. Pri intravenoznem vnosu se bolje absorbira kot pri peroralnem. Dobro prehaja v kosti, ostala tkiva in telesne tekočine (Kadurina in sod., 2003). Ob prisotnosti probenecida prehaja tudi v likvor (Dacey in Sande, 1974). Oksacilin se aktivno izloča skozi ledvice s tubularno sekrecijo in glomerulno filtracijo (Kadurina in sod., 2003). Oksacilin se uporablja namesto meticilina pri standardnem testiranju občutljivosti za antibiotike za odkrivanje odpornih stafilokokov (CLSI, 2008). Broekema in sod. (2009) so ugotovili, da je disk difuzijski test

s cefoksitinom primernejša in boljša izbira kot disk difuzijski test z oksacilinom pri odkrivanju odpornih stafilokokov, zaradi boljše občutljivosti in lažje interpretacije rezultatov. MRSA je odporen proti oksacilinu, vendar pa obstajajo izolati, ki vsebujejo gen *mecA*, a so vseeno občutljivi za oksacilin (Ikonomidis in sod., 2008). Med oksacilinom in ostalimi betalaktamskimi antibiotiki obstaja navzkrižna odpornost (James in Gurk-Turner, 2001).

2.1.1.3 Cefoksitin

Cefoksitin je polsintetični derivat cefamicina C in ga uvrščamo v II. generacijo cefalosporinov. Študija *in vitro* je pokazala, da je cefoksitin manj učinkovit proti po Gramu pozitivnim bakterijam kot cefalotin, ima pa razširjeno delovanje proti po Gramu negativnim bakterijam, kot so *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Klebsiella pneumoniae* ter bakterijam iz rodov *Enterobacter* in *Citrobacter*. Proti bakteriji *Pseudomonas aeruginosa* pa je neučinkovit (Neu, 1974). Cefoksitin je odporen proti večini betalaktamaz, ki jih izdelujejo po Gramu negativne bakterije (Richmond in Wotton, 1976). Tally in sod. (1975) so v *in vitro* študiji ugotovili, da ima cefoksitin razširjeno delovanje proti bakteriji *Bacteroides fragilis* in drugim anaerobnim bakterijam. Cefoksitin se izloča z glomerularno filtracijo in tubularno sekrecijo. Večina antibiotika se izloči v nespremenjeni obliki z urinom. Ob sočasnem vnosu probenecida in cefoksitina, se nivo slednjega v krvi poviša, ker probenecid zavira izločanje cefoksitina s tubularno sekrecijo (Vlasses in sod., 1980). Cefoksitin je učinkovit pri zdravljenju pooperativne trebušne seapse, okužb sečil, meningitisa, ki ga povzročajo po Gramu negativne bakterije in septičnega artritisa ter trebušnih in pljučnih abscesov, ki so posledica okužbe z mešano bakterijsko floro, predvsem anaerobnimi po Gramu negativnimi bakterijami. (Nair in Cherubin, 1978). CLSI (2008) priporoča uporabo cefoksitina namesto oksacilina pri ugotavljanju MRSA z disk difuzijsko metodo. Broekema in sod. (2009) so ugotovili, da je disk difuzijski test s cefoksitinom primernejša in boljša izbira kot disk difuzijski test z oksacilinom pri odkrivanju odpornih stafilokokov, zaradi boljše občutljivosti in lažje interpretacije rezultatov.

2.1.2 Makrolidni antibiotiki

Za makrolidne antibiotike je značilen makrociklični 14-, 15- ali 16-členski laktonski obroč (Tenson in sod., 2003). Zavirajo sintezo bakterijskih beljakovin. Selektivno in povratno se vežejo na 50S ribosomsko podenoto, natančneje v domeno V 23S rRNA, pri čemer preprečijo nastanek peptidne vezi (Hansen in sod., 1999). Makrolidi, linkozamidi in streptogramin B imajo kljub različni kemijski sestavi enak način delovanja, zato jih lahko obravnavamo kot skupino (angl. Macrolide, lincosamide and streptogramine B, MLS_B). MLS_B med translokacijo povzročijo disociacijo peptidil-tRNA iz ribosoma in s tem blokirajo pot, prek katere iz ribosoma izstopa nastajajoča peptidna veriga. MLS_B torej zavirajo podaljševanje (elongacijo) polipeptidne verige (Tenson in sod., 2003).

2.1.2.1 Mehanizmi odpornosti proti makrolidnim antibiotikom

Za odpornost proti makrolidom so odgovorni trije mehanizmi: sprememba tarčnega mesta, aktivno črpanje antibiotika iz celice in encimska razgradnja antibiotika. Veliko kliničnih izolatov, ki so odporni proti MLS_B, ima encime, ki posttranskripcijsko modificirajo 23S rRNA. Ti encimi so metiltransferaze, za katere zapis nosijo geni *erm*. Metiltransferaza modificira adenin na mestu 2058 v domeni V 23S rRNA (številski sistem *E.coli*) in s tem prepreči vezavo MLS_B na ribosom (Skinner in sod., 1983; Weisblum, 1995). Makrolidi inducirajo translacijsko-atenuacijski mehanizem, ki nato aktivira sintezo metilaze (Horinouchi in Weisblum, 1980). Mehanizem opornosti s spremembo tarčnega mesta se pri stafilokokih izraža konstitutivno (navzkrižna odpornost proti vsem MLS_B – MLS_B-fenotip) ali inducibilno (odpornost le proti 14- in 15-členskim makrolidom – M-fenotip), odvisno od zaporedja regulatornega območja, ki leži navzgor od zaporedja, ki nosi zapis za metilazo. Gen, ki nosi zapis za metilazo, lahko leži na plazmidu ali kromosomu (Horinouchi in Weisblum, 1980). MLS_B-fenotip se izraža tudi pri bakteriji *S. pneumoniae* in je odgovoren za visoko stopnjo odpornosti (Hyde in sod., 2001). Drugi mehanizem odpornosti proti MLS_B je aktivno črpanje antibiotika iz celic, za kar so odgovorne beljakovinske izlivne črpalke. Pri bakteriji *S. aureus* izlivne črpalke aktivno črpajo le 14- in 15-členske makrolide in streptogramin B (MS-fenotip), še vedno pa so občutljivi za 16-

členske makrolide in linkozamide. Zapis za izlivno črpalko nosi gen *msrA*, ki leži na plazmidu (Hassan in sod., 2007). Tudi pri bakteriji *S. pneumoniae* poteka aktivno črpanje antibiotika iz celice, le da je za odpornost proti 14- in 15-členskim makrolidom (M-fenotip) odgovoren gen *mefE* (Ambrose in sod., 2005). Encimska razgradnja antibiotika je še en mehanizem odpornosti, ki se pojavlja pri makrolidih. Eritromicin esteraze (Barthélémy in sod., 1984) ali makrolid 2'-fosfotransferaze (O'Hara in sod., 1989) inaktivirajo laktonski obroč 14-členskim makrolidom. Bakterije, ki imajo te encime, so naravno odporne proti makrolidom. Ta mehanizem odpornosti (inaktivacija z eritromicin esterazo), ki so ga odkrili pri nekaterih bakterijskih vrstah iz družine *Enterobacteriaceae*, posreduje visoko stopnjo odpornosti proti eritromicinu (Arthur in sod., 1987). Prav tako se pri njih pojavlja sinergistično delovanje med eritromicin esterazo in metilazo (Arthur in Courvalin, 1986).

2.1.2.2 Eritromicin

Eritromicin je najstarejši 14-členski makrolidni antibiotik. V kislem okolju je neobstoje. Temu se izognemo na dva načina: z ovojem, ki onemogoči interakcijo antibiotika s kislino v želodcu in z modifikacijo molekule eritromicina, ki prepreči oz. zmanjša interakcijo s kislino (tvorba soli (stearat) (Kirst in Sides, 1989a), estra (etilsukcinat) ali estolata (propionat ester), pri čemer je estolat uspešnejši v boju z želodčno kislino kot ester (Croteau in sod., 1988)). Dobro prehaja v tkiva in telesne tekočine, presnavlja se v jetrih ter izloča z žolčem (Kirst in Sides, 1989b). Dostopen je v obliki za peroralno in parenteralno uporabo. Intravenozno vnešen eritromicin v obliki laktobionatne ali glukohexatne soli topne v vodi, dosega v plazmi višjo koncentracijo, kot če je vnešen peroralno (Austin in sod., 1980). Skozi kalcijeve kanale vstopa v makrofage in polimorfonuklearne levkocite, kar pa ni pokazatelj dejanske učinkovitosti proti znotrajceličnim bakterijam (Mtairag in sod., 1995). Učinkovit je proti po Gramu pozitivnim bakterijam (*Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Corynebacterium diphtheriae*) in je alternativna izbira za zdravljenje pri bolnikih alergičnih na penicilin ali okužnih s sevi, ki so na penicilin odporni. Je zdravilo izbire za okužbe z bakterijami *Chlamydomphila pneumoniae*, *Mycoplasma pneumoniae* in *Legionella pneumophila*. Proti bakteriji *H. influenzae* je slabo učinkovit, kar predstavlja oviro pri

zdravljenju okužb dihal. Deluje lahko baktericidno ali bakteriostatično, odvisno od bakterijske vrste, stopnje rasti, velikosti inokuluma in koncentracije samega antibiotika (Klein, 1997). Pri uporabi se lahko pojavi holestatska zlatenica, ki jo povzroča eritromicin propionat. Pri ostalih modificiranih oblikah eritromicina se hipersenzitivnost in hepatotoksičnost ne pojavljata (Braun, 1969).

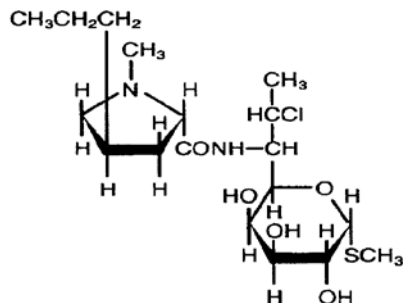
2.1.3 Linkozamidi

Linkozamidi imajo enak mehanizem delovanja kot makrolidi (Tenson in sod., 2003). Vežejo se na 50S ribosomsko podenoto in povzročijo disociacijo peptidil-tRNA iz ribosoma, kar posledično zavre sintezo bakterijskih beljakovin (Menninger in Coleman, 1993). Pri normalnih koncentracijah delujejo bakteriostatično, pri višjih, ki jih lahko dosežemo *in vivo*, pa celo baktericidno (Spížek in Řezanka, 2004). Odpornost proti linkozamidom je posledica spremembe tarčnega mesta z encimom metilazo, ki prepreči vezavo antibiotika na ribosom (Skinner in sod., 1983). Odpornost proti ostalim predstavnikom skupine MLS_B je posledica enakega mehanizma odpornosti in se pri stafilokokih pojavi, če je izražena konstitutivno (MLS_B-fenotip) (Horinouchi in Weisblum, 1980). Encimska razgradnja antibiotika je mehanizem odpornosti, ki se prav tako pojavlja v primeru odpornosti proti linkozamidom. Za inaktivacijo linkozamidov so odgovorni geni *linA/linA'*, ki nosijo zapis za transferazo in se v večini primerov pojavljajo v kombinaciji z geni *erm* ter pogosteje pri KNS kot pri bakteriji *S. aureus*, kar so v svoji raziskavi ugotovili Lina in sod. (1999).

2.1.3.1 Klindamicin

Klindamicin je polsintetični 7-kloro-7-deoksi derivat linkomicina, ki dobro prehaja v tkiva, telesne tekočine, kosti in sklepe. V likvor ne prehaja, tudi če so možganske ovojnice vnete (Kasten, 1999). Prehaja v makrofage in nevtrofilce, kjer oslabi delovanje znotrajceličnih bakterij (Easmon in Crane, 1984). Pri peroralnem vnosu se dobro absorbira. Presnavlja se v jetrih, pri čemer nastajajo produkti, ki delujejo protimikrobno. Izloča se z urinom in žolčem (Kasten, 1999). Deluje na po Gramu pozitivne bakterije, razen na enterokoke in

večino anaerobnih bakterij, ne pa tudi na po Gramu negativne aerobne bakterije. Uporablja se za zdravljenje okužb, ki jih povzročajo stafilokoki (okužbe kosti in sklepov, kože in mehkih tkiv), okužb spodnjih dihal z anaerobnimi bakterijami in v kombinaciji z antibiotikom, ki deluje na aerobne po Gramu negativne bacile (npr. aminoglikozidi) za zdravljenje mešanih okužb. Prav tako se uporablja kot alternativni antibiotik za zdravljenje okužb pri pacientih, ki so alergični na penicilin (Spížek in Řezanka, 2004). Klindamicin je učinkovit proti CA-MRSA (Popovich in Hota, 2008), proti MRSA pa ne, saj je le ta pogosto proti njemu odporen (Martínez-Aguilar in sod., 2003). Pri predpisovanju klindamicina je potrebna previdnost zaradi pojavljanja inducirane odpornosti, ki lahko nastopi tudi tekom zdravljenja (Lewis in Jorgensen, 2005). Fiebelkorn in sod. (2003) so opisali, da lahko s postavitvijo eritromicinskega in klindamicinskega diska na razdalji od 15 do 26 mm pri disk difuzijskem testiranju stafilokokov ugotovimo prisotnost inducibilne odpornosti proti klindamicinu (klindamicinska difuzijska cona se na strani, ki meji na eritromicinski disk splošči tako, da nastane cona v obliki črke D).



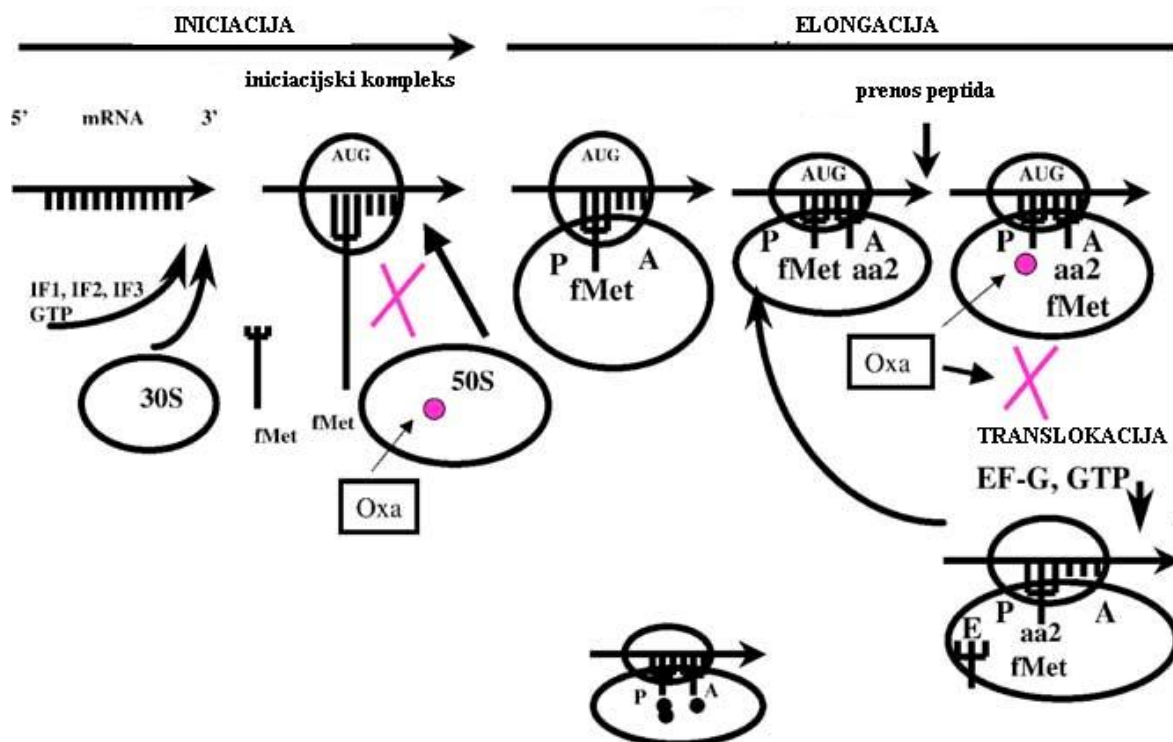
Slika 2: Kemijska struktura klindamicina
(Kasten, 1999).

Pri zdravljenju s klindamicinom lahko pride do psevdomembranoznega kolitisa, ki ga povzroča toksin bakterije *Clostridium difficile* in lahko predstavlja problem pri uporabi klindamicina (Manabe in sod., 1995).

2.1.4 Oksazolidinoni

Oksazolidinoni so sintetične večciklične spojine, ki so jih sprva sintetizirali za uničevanje rastlinskih patogenov, kasneje pa so razvili morfolinski (linezolid) in piperazinski derivat (eperezolid), ki sta primerna za zdravljenje bakterijskih okužb pri ljudeh (Brickner in sod., 1996). Imajo veliko primernih mest za vezavo substituent, ki vplivajo na strukturno odvisno aktivnost in toksičnost (Stratton, 1998b). Oksazolidinoni delujejo bakteriostatično (Slee in sod., 1987; Zurenko in sod., 1996). Sintezo beljakovin (slika 3) zavirajo po edinstvenem mehanizmu, saj za razliko od ostalih klinično uporabnih antibiotikov, ki zavirajo sintezo beljakovin, ne zavirajo podaljševanja (elongacije) (Slee in sod., 1987; Shinabarger in sod., 1997). Oksazolidinoni se vežejo na 50S ribosomsko podenoto (Burghardt in sod., 1998; Lin in sod., 1997) in zavirajo nastanek začetnega (iniciacijskega) kompleksa, ki je sestavljen iz 30S ribosomske podenote, N-formilmethionin tRNA (angl. N-Formylmethionine tRNA, fMet-tRNA), mRNA, gvanozin-trifosfata (angl. guanosine 3-phosphate, GTP) in začetnega dejavnika 1 (angl. initiation factor 1, IF1), začetnega dejavnika 2 (angl. initiation factor 2, IF2) ter začetnega dejavnika 3 (angl. initiation factor 3, IF3). Vezava oksazolidinona na 50S ribosomsko podenoto prepreči nastanek 70S ribosoma in posledično se zaustavi sinteza beljakovin (Swaney in sod., 1998).

Oksazolidinone odlikuje edinstven mehanizem delovanja, nizka pogostnost pojavljanja odpornosti in navzkrižne odpornosti z drugimi antibiotiki, učinkovitost pri zdravljenju okužb, ki jih povzročajo proti drugim antibiotikom odporni sevi ter visoka absolutna biološka uporabnost (Corti in sod., 2000).



Slika 3: Prikaz sinteze bakterijskih beljakovin in mesta delovanja oksazolidinonov. IF1-3, iniciacijski faktor 1-3, 30S – ribosomska podenota, fMet – f metionin, AUG - kodon, 50S – ribosomska podenota, P – peptidilno mesto, A – aminokislinsko mesto, EF-G – elongacijski faktor G, OXA - oksazolidinon (Bozdogan in Appelbaum, 2004).

2.1.4.1 Linezolid

Linezolid je antibiotik z bakteriostatičnim delovanjem. Pri nekaterih pnevmokoknih sevih se pojavlja tudi vrstno specifična, od koncentracije odvisna baktericidna aktivnost (Zurenko in sod., 1996). Pri peroralnem in parenteralnem vnosu se hitro in popolnoma resorbira (Slatter in sod., 2001). Dobro prehaja v tkiva, kosti, sinovialno tekočino in mišice (Gee in sod., 2001; Rana in sod., 2001). Ker prodira tudi v likvor, je uporaben za zdravljenje meningitisa (Gill in sod., 2002). Hrana ne vpliva na njegovo absorpcijo (Welshman in sod., 2001). Linezolid se reabsorbira skozi ledvice. Približno 94 % antibiotika se izloči z urinom in blatom, od tega približno 35 % v nespremenjeni obliki, približno 40 % kot metabolit PNU-142586 in približno 10 % kot metabolit PNU-142300 z urinom in približno 10 % v obliki obeh metabolitov z blatom (Slatter in sod., 2001). Linezolid ni substrat in tudi ne inhibitor citokrom P-450 sistema (Wynalda in sod., 2000).

Odpornost proti linezolidu ni razširjena zaradi: nove strukture in edinstvenega mehanizma delovanja, ki onemogoča nastanek navzkrižne odpornosti z drugimi antibiotiki, vključno s tistimi, ki se vežejo na 50S ribosomsko podenoto (Fines in Leclercq, 2000); popolnoma sintetičnega izvora, zaradi česar ne more obstajati predhodna naravna odpornost (Moellering, 1999) in zaradi prisotnosti več kopij genov, ki nosijo zapis za domeno V 23S rRNA (linezolidna tarča) (Klappenbach in sod., 2001). Odpornost proti linezolidu je posledica spremembe tarčnega mesta, natančneje enojnih nukleotidnih zamenjav v velikem številu kopij genov, ki nosijo zapis za 23S rRNA. Prvi zapis o pridobljeni odpornosti poroča, da ima laboratorijsko izzvana odpornost proti linezolidu ali eperezolidu pri bakterijah *Enterococcus faecalis* (enterokoki) in *S. aureus* enojno G→U mutacijo na mestu 2447 ali 2576 (številski sistem *E. coli*) v centralni zanki domene V 23S rRNA (Meka in Gold, 2004).

Linezolid je učinkovit proti po Gramu pozitivnim bakterijam, proti po Gramu negativnim bakterijam pa ima omejeno aktivnost (Diekema in Jones, 2001). Bakterija *S. aureus*, ki povzroča bolnišnično pridobljene okužbe, je občutljiva za linezolid, tako MRSA kot tudi za meticilinu občutljiva bakterija *S. aureus* (angl. Methicillin-susceptible *S. aureus*, MSSA) (Cercenado in sod., 2001) in vankomicin zmerno odporna bakterija *S. aureus* ter proti vankomicinu odporna bakterija *S. aureus* (angl. Vancomycin-resistant *S. aureus*, VRSA) (Bozdogan in sod., 2003). Večkratno odporni bakteriji *Enterococcus faecium* in *E. faecalis* ter proti vankomicinu odporni enterokoki (angl. Vancomycin-resistant enterococci, VRE) so občutljivi za linezolid. Učinkovit je tudi proti bakteriji *S. pneumoniae* (Cercenado in sod., 2001). Tudi po Gramu pozitivne anaerobne bakterije so občutljive za linezolid (Behra-Miellet in sod., 2003). Ker je zmerno učinkovit proti bakterijama *H. influenzae* in *Moraxella catarrhalis*, ne pokriva vseh povzročiteljev zunajbolnišničnih okužb dihal (Hamel in sod., 2000). Uporablja se tudi za zdravljenje okužb kosti in sklepov, bolnišnično pridobljene pljučnice (Rubinstein in sod., 2001), zunajbolnišnične pljučnice in sočasne bakteriemijske z zunajbolnišnično pljučnico, ki jo povzroča bakterija *S. pneumoniae* (Plouffe, 2000), meningitisa, endokarditisa, osteomielitisa ter okužb znotraj trebuha (Diekema in Jones, 2001).

2.1.5 Kinoloni

Kinoloni so sintetični analogi nalidiksične kisline. Nalidiksična kislina povzroča nenormalno kopičenje prekurzorjev enoverižne deoksiribonukleinske kisline (angl. single-stranded deoxyribonucleic acid, ssDNA) in s tem cepljenje kromosoma (Crumplin in Smith, 1976). Pri prokariontih družino DNA topoizomeraz tvorita dve skupini: DNA topoizomeraze I in DNA topoizomeraze II. Skupini označujemo glede na reakcije, ki sodelujejo pri začasni prekinitvi ssDNA ali dvoverižne DNA (angl. double-stranded DNA, dsDNA). DNA topoizomeraze so specifični encimi, ki sodelujejo pri spreminjanju topološkega stanja molekule DNA in posledično vplivajo na podvojevanje, prepisovanje in rekombinacijo bakterijske DNA (Gellert, 1981). V skupino DNA topoizomeraz II sodi DNA-giraza, ki nadzoruje količino dodatnega zvitja bakterijske DNA (Gellert in sod., 1976). DNA-giraza pretvori sproščeno krožno DNA v dodatno negativno zvito obliko, ki je odločilnega pomena za podvojevanje DNA. DNA-giraza se veže na molekulo DNA in pri tem ustvari dodaten pozitiven zavoj, ga stabilizira in razcepi obe verigi molekule DNA. Za cepitev je odgovorna podenota GyrA. Zapis zanjo nosi gen *gyrA*. Podenota GyrB s pomočjo energije, ki se sprosti ob hidrolizi adenozin-trifosfata (angl. adenzin 3-phosphate, ATP), prenese DNA odsek skozi zarezo. Zapis za podenoto B nosi gen *gyrB*. Podenota GyrA nato zlepi obe razcepljeni verigi molekule DNA in tako nastane dodaten negativen zavoj (Cozzarelli, 1980). Nalidiksična kislina in njeni sintetični analogi se tesno vežejo na podenoto GyrA in tako preprečijo tvorbo dodatnih negativnih zavojev (Gellert in sod., 1977; Sugino in sod., 1977). Posledično se zaustavi vitalna biološka procesa podvojevanje in prepisovanje molekule DNA. Sledi razgradnja molekule DNA in celična smrt (Cozzarelli, 1980). V skupino DNA topoizomeraz II uvrščamo tudi topoizomerazo IV, ki pa za razliko od DNA-giraze ne more dodatno zavijati molekule DNA. Funkcija topoizomeraze IV še ni popolnoma pojasnjena, znano pa je, da ob prisotnosti magnezijevih ionov in ATP sprošča dodatne negativne in pozitivne zavoje molekule DNA ter razpleta (dekatenacija) hčerinske verige DNA na koncu podvojitve kromosoma. Tako kot DNA-giraza je tudi topoizomeraza IV tetramer, ki je pri bakteriji *E. coli* sestavljena iz dveh parnih podenot: ParC in ParE. ParC se specifično veže z notranjo membrano, zaradi česar

pripisujejo topoizomerazi IV tudi funkcijo sidranja kromosomske DNA na celično membrano (Kato in sod., 1992).

Kljub splošnemu sprejetju, da kinoloni zavirajo DNA-girazo in topoizomerozo IV, ni popolnoma pojasnjeno, kako se kinoloni vežejo na DNA topoizomerozo tipa II oz. kako zaviranje teh encimov povzroči celično smrt. Kljub uveljavljenemu mnenju, da se kinolonska molekula veže neposredno na ssDNA, ki jo ustvari DNA-giraza med tvorbo cepitvenega kompleksa (Shen in Pernet, 1985), naj bi se fluorokinoloni učinkovito vezali le na kompleks, ki ga tvorita DNA-giraza in molekula DNA (Willmott in Maxwell, 1996). Ker interakcija med fluorokinolonom in DNA-girazo stabilizira cepitveni kompleks (Drlica in Zhao, 1997) domnevajo, da je smrtonosen učinek posledica stabilizacije kovalentne vezi med DNA-girazo in molekuljo DNA, kar naj bi vodilo v cepitev DNA verige, zamrznitev podvojevalnih vilic ali celo obojega (Chen in sod., 1996). Kinoloni nepovratno stabilizirajo tudi topoizomerozo IV – DNA kompleks, ki ob trku z aktivnimi podvojevalnimi vilicami spremeni obliko in ustavi njihovo napredovanje, vendar ne razcepi molekule DNA. Sinteza DNA se na ta način zaustavi pod pogojem, da ima topoizomerozo IV ohranjeno funkcijo rezanja molekule DNA (Hiasa in sod., 1996). Zaustavitev sinteze DNA poteka hitro, če se kinolon veže z DNA-girazo, če pa se veže s topoizomerozo IV pa do zaustavitve pride z zamikom. Do te razlike prihaja zaradi lege DNA-giraze in topoizomeroze IV na bakterijskem kromosomu. DNA-giraza leži pred podvojevalnimi vilicami, tako da do trka pride kmalu po nastanku kinolon-DNA-giraza-DNA kompleksa. Topoizomerozo IV pa leži za podvojevalnimi vilicami, zato do trka pride šele pri naslednjem ciklu podvojevanja DNA (Huang in sod., 1998).

Kinoloni delujejo baktericidno (Drlica in Zhao, 1997), dobro prehajajo v tkiva, telesne tekočine in vstopajo v fagocitne celice (Gerding in Hitt, 1989). Večina kinolonov se primarno izloča z glomerularno filtracijo in tubularno sekrecijo skozi ledvice, nekaj pa tudi skozi jetra (Stein, 1996). Zaradi širokega spektra delovanja, odlične absorpcije pri peroralnem vnosu, dobrega prehajanja v tkiva in relativno nizke pojavnosti stranskih učinkov, so fluorokinoloni široko uporabni za zdravljenje bakterijskih okužb (Zhanel in Noreddini, 2001).

Glede na protimikrobno učinkovitost delimo kinolone v 4 generacije. Kinoloni 1. generacije so učinkoviti proti aerobnim po Gramu negativnim bakterijam, ne pa tudi oz. so slabo učinkoviti proti po Gramu pozitivnim bakterijam in anaerobnim bakterijam. Drugo generacijo odlikuje dodatek fluora na mesto C-6 in cikličnega diamin piperazina na mesto C-7, kar je omogočilo učinkovitost proti po Gramu pozitivnim bakterijam in izboljšalo učinkovitost proti po Gramu negativnim bakterijam v primerjavi s kinoloni 1. generacije. Še vedno pa niso učinkoviti proti anaerobnim bakterijam. Predstavnik te generacije je norfloksacin, ki velja tudi za prvega predstavnika fluorokinolonov (dodaten fluor na mestu C-6). Kinoloni 3. generacije imajo v primerjavi s kinoloni 2. generacije izrazito povečano učinkovitost proti po Gramu pozitivnim bakterijam, še posebej proti pnevmokokom (Andriole, 2005). Ob obstoječi učinkovitosti proti po Gramu negativnim bakterijam, so učinkoviti tudi proti več znotrajceličnim bakterijam in nekateri predstavniki tudi že proti anaerobnim bakterijam (Appelbaum, 1999). Četrta generacija kinolonov pa je v primerjavi z ostalimi generacijami najbolj učinkovita proti anaerobnim bakterijam in hkrati učinkuje proti po Gramu pozitivnim in proti po Gramu negativnim bakterijam (Andriole, 2005).

5.1.5.1 Mehanizmi odpornosti proti kinolonom

Bakterije imajo več mehanizmov odpornosti proti kinolonom. Dobro poznan mehanizem odpornosti je sprememba tarčnega mesta, natančneje mutacije v genih, ki nosijo zapis za encima DNA-girazo in topoizomerazo IV. Primarna tarča kinolonov je pri po Gramu negativnih bakterijah kot sta *E. coli* in *N. gonorrhoeae* DNA-giraza, pri po Gramu pozitivnih bakterijah kot sta *S. pneumoniae* in *S. aureus* pa topoizomerata IV (Hoshino in sod., 1994; Khodursky in sod., 1995). Pri bakteriji *S. aureus* je prvotno nastala mutacija v genu *parC*, ki posreduje nizko stopnjo odpornosti. Kot druga pa mutacija v genu *gyrA*, pri čemer se lahko oblikuje dvojna mutanta *gyrA parC*, ki posreduje visoko stopnjo odpornosti. Do razlike v kinolonskih tarčah prihaja zato, ker je DNA-giraza pri po Gramu pozitivnih bakterijah manj občutljiva za kinolone kot DNA-giraza pri po Gramu negativnih bakterijah. Na izbiro tarče naj bi vplivala struktura kinolona, kar lepo prikaže primer bakterije *S. pneumoniae*, pri kateri je primarna tarča ciprofloksacina topoizomeraza IV, sparfloksacina in klinafloksacina, ki imata na mestu C-8 dodatno fluoridno skupino, pa DNA-giraza (Pan in Fisher, 1997).

Fluorokinoloni morajo prečkati citoplazemsko membrano in pri po Gramu negativnih bakterijah še celično steno, da dosežejo svoje tarče, ki ležijo v citoplazmi. Zaradi svoje majhnosti in ustreznega naboja lahko zunanjo membrano prečkajo skozi porine, citoplazemsko membrano pa z difuzijo (Hooper, 2001). Pri bakteriji *S. aureus* je za aktivno črpanje kinolonov iz celice odgovoren polipeptid NorA, ki zaradi svoje hidrofilne sestave aktivno črpa le hidrofilne kinolone (Yoshida in sod., 1990). NorA je beljakovinska izlivna črpalka, ki izkorišča energijo iz transmembranskega protonskega gradienta za aktivno črpanje kinolonov ter ostalih strukturno nesorodnih antibiotikov iz bakterijske celice (Neyfakh in sod., 1993). Več avtorjev je opisalo proti več snovem odporne (angl. multi-drug resistant, MDR) sisteme črpanja, ki so zmožni odstraniti kinolone iz bakterijske celice. Takšni sistemi so široko razširjeni in po vsej verjetnosti bistvenega pomena v bakterijski fiziologiji. Večina bakterij ima več različnih MDR sistemov črpanja, za katere zapis leži na kromosomu in ob aktivaciji gena sintetizirajo fenotipe odporne proti kinolonom (Paulsen in sod., 1996). MDR fenotip se lahko izrazi tudi ob stiku z drugimi snovmi kot so: barvila, detergenti, antiseptiki in drugi, zaradi česar lahko določene bakterije kažejo nizko stopnjo odpornosti proti kinolonom (Martinez in sod., 1998).

5.1.5.2 Ciprofloksacin

Ciprofloksacin je antibiotik širokega spektra z baktricidnim delovanjem. Učinkovit je proti bakterijam, ki povzročajo okužbe sečil (*E. coli*, *K. pneumoniae*, *E. faecalis*), kože in mehkih tkiv (*S. aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *P. aeruginosa*, *E. coli*), kosti in sklepov ter proti bakteriji *Salmonella typhi*, ki povzroča infektivno drisko in tifoidno vročico. Uporablja se za zdravljenje okužb dihal, ki jih povzročajo bakterije *H. influenzae*, *M. catarrhalis*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* in *L. pneumophila* (Emmerson in Jones, 2003). Je odlična izbira za zdravljenje okužb s po Gramu negativnimi bacili, vključno z bakterijo *P. aeruginosa* (Bauernfeind, 1997). Dobro prehaja v tkiva, telesne tekočine in fagocitne celice, zato je primeren tudi za zdravljenje težko potekajočih okužb. Dostopen je tako v peroralni kot tudi v parenteralni obliki (Emmerson in Jones, 2003). Ciprofloksacin je znan kot zmeren zaviralec encimov citokrom P-450 sistema, zato je potrebna previdnost pri

sočasemu jemanju zdravil, ki se presnavljajo po isti encimski poti, npr. teofilin in kofein (Bertino in Fish., 2000).

5.1.5.3 Moksifloksacin

Moksifloksacin je antibiotik s širokim spektrom delovanja in baktericidno učinkuje na bakterije, ki primarno povzročajo okužbe dihal (*S. pneumoniae*, *H. influenzae* in *M. catarrhalis*). Učinkovit je tudi proti netipičnim povzročiteljem okužb dihal (*C. pneumoniae*, *M. pneumoniae* in *L. pneumophila*) (Emmerson in Jones, 2003). Uporablja se lahko za zdravljenje okužb kože in mehkih tkiv, ki jih povzročata MSSA in MRSA (Woodcock in sod., 1997). Kot vsi fluorokinoloni je tudi moksifloksacin učinkovit proti po Gramu negativnim bakterijam (Woodcock in sod., 1997), proti bakteriji *P. aeruginosa* pa je manj učinkovit kot ciprofloksacin oz. neučinkovit (Bauernfeind, 1997). Učinkovit je tudi proti anaerobnim bakterijam (Noel in sod., 2005). Moksifloksacin se absorbira iz prebavil in ni podvržen predhodni sistemski biotransformaciji z encimi citokrom P-450 sistema. Dostopen je v peroralni in parenteralni obliki. Pri slednji je absolutna biološka uporabnost 90 %. Moksifloksacin dobro prehaja v tkiva, telesne tekočine in fagocitne celice, izloča pa se z urinom in žolčem ali blatom v nespremenjeni obliki in tudi metaboliziran do N-sulfonata (M1) in acilglukuronida (M2), ki sta oba farmakološko neaktivna (Stass in Kubitz, 1999).

2.1.6 Sulfonamidi in trimetoprim

Sulfonamidi so sintetični antibiotiki, ki so bili tekom razvoja podvrženi številnim modifikacijam (Woods, 1962). Med drugim so jih tudi kombinirali z drugimi antibiotiki in tako je nastala kombinacija trimetoprim-sulfametoksazol (angl. trimethoprim-sulfamethoxazole, TMP-SMX) s sinergističnim delovanjem (Darrell in sod., 1968).

2.1.6.1 Sulfonamidi – mehanizem delovanja

Sulfametoksazol je sulfonamidni antibiotik, ki zavira bakterijsko sintezo folne kisline. Je strukturni analog para-aminobenzojeve kisline (angl. para-aminobenzoic acid, PABA), s katero tekmuje za vezavo na encim dihidropteroat sintetazo (angl. dihydropteroate synthetase, DHPS). S tem, ko kompetitivno zavira DHPS, posredno onemogoča nastanek dihidrofolne kisline in njeno nadaljnjo redukcijo v tetrahidrofolno kislino (Brown, 1962). Tetrahidrofolna kislina je derivat folne kisline in nujno potrebna za rast bakterijske celice, saj je s prenašanjem spojine z enim ogljikovim atomom bistvenega pomena pri sintezi timidina, purinov in aminokislin. Selektivna toksičnost sulfonamidov temelji na dejstvu, da bakterijske celice sintetizirajo folno kislino v celoti, sesalske celice pa ne, saj jo pridobijo iz okolja (Woods, 1962).

2.1.6.2 Trimetoprim – mehanizem delovanja

Antibiotik trimetoprim je strukturni analog pteridinskega dela dihidrofolne kisline. Kompetitivno zavira encim dihidrofolat reduktazo (angl. dihydrofolate reductase, DHFR), ki s pomočjo nikotinamid adenozin dinukleotid fosfata (angl. nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, NADPH) reducira dihidrofolno kislino v tetrahidrofolno kislino. V primerjavi s sulfonamidi trimetoprim hitreje zavira rast bakterijske celice, saj deluje neposredno pri pretvorbi dihidrofolne kisline v tetrahidrofolno kislino, pri sulfonamidih pa se rast bakterijske celice zaustavi, ko se porabijo zaloge folne kisline. Trimetoprim močnejše zavira delovanje bakterijske kot sesalske dihidrofolat reduktaze (Darrell in sod., 1968). Koch in Burchall (1971) sta v svoji raziskavi ugotavljala vpliv koncentracije

timidina v komercialnih gojiščih na odziv bakterije *E. coli* na antibiotik trimetoprim in pri tem ugotovila, da ob odsotnosti produktov metabolizma spojin z enim ogljikovim atomom trimetoprim deluje bakteriostatično. Če so vsi produkti metabolizma spojin z enim ogljikovim atomom razen timidina prisotni, pa trimetoprim deluje baktericidno. Enak učinek se pojavi tudi pri uporabi sulfonamidov, kar sta v raziskavi potrdila Then in Angehrn (1973). Slednja raziskava je pokazala tudi, da lahko sulfonamidi v krvi in urinu delujejo baktericidno, saj te tekočine ne vsebujejo timidina ali pa je le-ta v sledih.

2.1.6.3 Mehanizmi odpornosti proti sulfonamidom in trimetoprimu

Sprememba tarčnega mesta je mehanizem odpornosti proti trimetoprimu, ki je posledica točkovni mutaciji (substitucija ene aminokisline) v genu *dhfr*, ki nosi zapis za encim DHFR in sinteze nove spremenjene DHFR. Zapis zanjo leži na kromosomu (Huovinen, 2001). Takšen mehanizem odpornosti proti trimetoprimu najdemo tako pri bakteriji *S. aureus* (Dale in sod., 1997) kot tudi pri bakteriji *S. pneumoniae* (Pikis in sod., 1998). Pri bakteriji *S. aureus*, ki ima s plazmidi posredovano odpornost, najdemo enak mehanizem (Dale in sod., 1997). Odkritih je že več kot 20 takšnih plazmidnih genov, med katerimi sta najbolj razširjena gena *dhfrI* in *dhfrII*, ki ju najpogosteje najdemo pri po Gramu negativnih črevesnih bakterijah (Huovinen in sod., 1995). Drugi mehanizem odpornosti proti trimetoprimu, ki so ga odkrili pri bakteriji *E. coli*, je prekomerna sinteza DHFR (Flensburg in Sköld, 1987). Bakterija *P. aeruginosa* ima beljakovinske izlivne črpalke, ki so odgovorne za odpornost proti trimetoprimu in sulfametoksazolu (Köhler in sod. 1996). Sprememba tarčnega mesta je mehanizem odpornosti tudi proti sulfonamidom. Spremembe nastanejo zaradi enojne mutacije v genu *dhps*, ki nosi zapisa za encim DHPS. Takšen mehanizem odpornosti proti sulfonamidom se pojavlja pri klinično pomembnih bakterijah *E. coli*, *S. aureus*, *Staphylococcus haemolyticus*, *Campylobacter jejuni* in *Helicobacter pylori* (Huovinen, 2001). Padayachee in Klugman (1999) sta v svoji raziskavi odkrila, da odpornost proti sulfonamidom pri bakteriji *S. pneumoniae* temelji na podvojitvi dveh aminokislin v genu *dhps*, zaradi česar se spremeni terciarna struktura encima. Hampele in sod. (1997) so sekvencirali 9 kliničnih izolatov bakterije *S. aureus* odpornih proti sulfonamidom iz različnih geografskih območij in odkrili, da vsi izolati vsebujejo mutacije v kromosomskem genu *dhps*, in posledično sintetizirajo spremenjen encim DHPS. Za

horizontalen prenos odpornosti proti sulfonamidom sta odgovorna le dva gena in sicer *sulI* in *sulIII*, ki ju najdemo pri po Gramu negativnih črevesnih bakterijah (Sköld, 2001).

2.1.6.4 Trimetoprim-sulfametoksazol

Kombinacija TMP-SMX deluje sinergistično in onemogoča bakterijsko celično rast. Sinergizem je učinkovit, ker antibiotika delujeta na različnih mestih v isti biosintetski poti. Trimetoprim zavira redukcijo dihidrofolne kisline v tetrahidrofolno kislino. Akumulacija dihidrofolne kisline, kot rezultat timidilat sintetaze in sinteze nove dihidrofolne kisline, negativno vpliva na učinkovitost trimetoprima. Ker pa sulfametoksazol zavira sintezo nove dihidrofolne kisline, je s tem na voljo manj substrata za tekmovanje s trimetoprimom in tako doseženo sinergistično delovanje (Hitchings, 1973). Kombinacija TMP-SMX deluje baktericidno, ima širši spekter delovanja in je manj dovzetna za razvoj odpornosti kot vsaka komponenta zase (Darrell in sod., 1968).

Kombinacija TMP-SMX je učinkovita proti velikemu številu po Gramu pozitivnih in po Gramu negativnih bakterij (Bushby, 1973). Uporablja se za zdravljenje kroničnega bronhitisa, akutnega vnetja srednjega ušesa ter okužb sečil. Učinkovitost proti bakterijam iz rodu *Shigella*, ki povzročajo enterokolitis in potovalno drisko kot tudi enterotoksigenim sevom bakterije *E. coli*, pa upada zaradi vedno večje odpornosti proti kombinaciji TMP-SMX (Huovinen, 2001). Trimetoprim in sulfametoksazol sta lahko v hkratni stalni kombinaciji, ker imata zelo podobni serumski biološki razpolovni dobi. Optimalno sinergistično protimikrobno delovanje trimetoprima in sulfametoksazola je *in vitro* doseženo pri razmerju 1:20. Ena tableta vsebuje 80 mg TMP in 400 mg SMX ter pomožne snovi. Kljub temu, da je razmerje v stalni kombinaciji 1:5, je zaradi farmakokinetičnih lastnosti obeh antibiotikov v serumu doseženo približno optimalno, v tkivih pa nekoliko manjše razmerje. Kombinacija TMP-SMX je dostopna v obliki tablet ali suspenzije za peroralno uporabo in kot sterilna raztopina za intravenski vnos. Oba antibiotika dobro prehajata v tkiva in telesne tekočine. Oba se presnavljata v jetrih in izločata preko ledvic z urinom (Kaplan in sod., 1973).

2.2 ZNAČILNOSTI TESTIRANIH BAKTERIJ

2.2.1 Stafilokoki

Stafilokoki so po Gramu pozitivni koki (0,5–1,5 μm), ki so urejeni v grozdu podobne skupke, lahko pa jih najdemo tudi kot posamezne celice, v parih ali celo v kratkih verižicah. So negibljivi in ne tvorijo spor. Proizvajajo encim katalazo. Uvrščamo jih med fakultativne anaerobe. Najbolje rastejo v aerobnem okolju ob prisotnosti 10 % natrijevega klorida (NaCl) in pri temperaturi 18–40 °C. Celična stena je sestavljena iz peptidoglikana in teihoične kisline (Peacock, 2005).

Stafilokoki so velika skupina bakterij, ki jih najpogosteje najdemo na koži in sluznicah sesalcev. Najbolj razširjen predstavnik stafilokokov, ki ga najdemo na človeški koži, je bakterija *Staphylococcus epidermidis* (Cogen in sod., 2008). Najbolj virulenten predstavnik je bakterija *S. aureus*, ki se najpogosteje nahaja v nosu. Približno 20 % odrasle populacije ljudi so zdravi nosilci te bakterije (Kluytmans in sod., 1997; Cole in sod, 2001).

2.2.1.1 *Staphylococcus aureus*

Bakterija *S. aureus* je pogosta povzročiteljica resnih bolnišničnih in zunajbolnišnično pridobljenih okužb. Ima veliko različnih virulentnih dejavnikov, ki ji omogočajo koloniziranje, izogibanje obrambnim mehanizmom gostitelja in širjenje okužbe. Adhezini, ki so izraženi na bakterijski celični steni ali nanjo prenešeni iz celice, omogočajo kolonizacijo gostitelja. Med njimi so najbolj proučene: beljakovina A (Spa), ki ovira gostiteljeve imunske celice, kolagen vezavna beljakovina (Cna), fibrinogen vezavna beljakovina (ClfA in ClfB) in fibronektin vezavni beljakovini (FnBPA in FnBPB) (Ferry in sod., 2005). Na zunanji strani celične stene polisaharidi tvorijo kapsulo, ki bakterijo ščiti pred fagocitozo. Iz monosaharidov, beljakovin in majhnih peptidov nastaja sluz, ki pritrdi bakterijske celice na površino in tvori biofilm. Biofilm ščiti bakterijo pred obrambnimi mehanizmi gostitelja in delovanjem antibiotikov (Peacock, 2005). Največja skupina virulentnih dejavnikov bakterije *S. aureus* so zunajcelične beljakovine, ki delujejo kot

toksini, encimi ali encimski aktivatorji. Toksini uničujejo ali regulirajo gostiteljske celične komponente in tako omogočijo nemoteno rast in razmnoževanje bakterij ter širjenje okužbe. Takšni toksini so: toksini, ki uničujejo celične membrane (hemolizini in Panton-Valentinov levkocidin), pirogeni toksini (enterotoksini SA in toksin sindroma toksičnega šoka) ter epidermolitični toksini (eksfoliatin A in B), ki delujejo kot superantigeni (Peacock, 2005).

Stafilokoagulaza je encim, ki v odsotnosti Ca^{2+} koagulira plazmo s tem, ko pretvarja fibrinogen v fibrin. Stafilokinaza pa pretvarja plazminogen v fibrinolitičen encim plazmin. Bakterija *S. aureus* sintetizira tudi bakteriolitična encima endo- β -N-acetilglukozaminidazo in lizostafin endopeptidazo, s katerima se učinkovito brani pred drugimi bakterijami ter hidrolitične encime (lipaze, ureaze, hialuronidazo in proteaze), ki razgrajujejo različne komponente gostiteljske celice (Ferry in sod., 2005; Peacock, 2005).

Virulentni dejavniki se izražajo usklajeno in v določenem zaporedju, ki je odvisno od celične gostote. Tako se adhezini izražajo v zgodnji eksponentni stopnji rasti, toksini in encimi pa konec eksponentne stopnje oz. v stacionarni stopnji rasti. Izražanje virulentnih dejavnikov uravnava regulatorna sistema Agr (angl. accessory global regulator) in Sar (angl. staphylococcal accessory regulator) (Pragman in Schlievert, 2004).

2.2.1.2 Mehanizmi odpornosti bakterije *S. aureus* proti antibiotikom

Bakterija *S. aureus* ima več mehanizmov odpornosti proti antibiotikom. Odpornost proti betalaktamskim antibiotikom je posledica sinteze zunajceličnega encima penicilinaze, ki hidrolizira betalaktamski obroč antibiotika (Pentosti in sod., 2007). Gen *blaZ*, ki nosi zapis za ta encim, se nahaja na plazmidu in se lahko s transdukcijo prenaša med bakterijami (McCallum in sod., 2010). Drugi mehanizem odpornosti proti betalaktamskim antibiotikom je sinteza dodatnega PBP (PBP2a) pri MRSA. PBP2a ima zmanjšano afiniteto za betalaktamske antibiotike, zato lahko nadaljuje s sintezo peptidoglikana. Zapis za sintezo PBP2a nosi gen *mecA*. Skupaj z regulatornima genoma *mecI* in *mecR1* sestavlja *mec* kompleks, ki je del (SSC)*mec*. (SSC)*mec* se nahaja na bakterijskem kromosomu in lahko vključuje dodatne mobilne elemente in gene, ki nosijo zapis za odpornost proti

drugim antibiotikom (Pentosi in sod., 2007). Shematični prikaz beljakovin, ki posredujejo odpornost proti betalaktamskim antibiotikom, je na sliki 1.

Odpornost proti makrolidom in linkozamidom pri bakteriji *S. aureus* posredujejo trije mehanizmi. Prvi je sprememba tarčnega mesta za antibiotik z encimom metiltransferazo. Zapis zanje nosi gen *erm*. Erm metiltransferaze metilirajo 23S rRNA in s tem preprečijo vezavo antibiotika na 50S ribosomsko podenoto. Pri tem prihaja do navzkrižne odpornosti med makrolidi, linkozamidi in streptograminom B (McCallum in sod., 2010). Znanih je že več kot 40 genov *erm*, ki nosijo zapis za metilaze in se nahajajo na plazmidih in transpozonih. Razporejeni so v 21 razredov, izmed katerih se razredi *erm(A)*, *erm(B)*, *erm(C)* in *erm(F)* pojavljajo pri patogenih bakterijah. Razreda *erm(A)* in *erm(C)* sta tipična razreda, ki se pojavljata pri stafilokokih (Leclercq, 2002). Cfr metiltransferaze prav tako metilirajo 23S rRNA in razširijo spekter odpornosti bakterije *S. aureus* proti fenikolom, oksazolidinonom, pleuromutilinom in streptograminu A. Spremembo tarčnega mesta za makrolide povzročijo tudi mutacije v *rrl* operonu molekule 23S rRNA in ribosomskih beljakovinah L4 in L22 (McCallum in sod., 2010). Drugi mehanizem odpornosti proti makrolidom je aktivno črpanje antibiotika iz celice. Pri stafilokokih so za pridobljeno odpornost proti makrolidom odgovorne izlivne črpalke iz družine ABC prenašalcev. Zapis zanje nosijo geni *msr(A)*, ki ležijo na plazmidu. Zraven genov *msr(A)* so potrebni še drugi kromosomski geni, ki skupaj tvorijo aktivno izlivno črpalko, ki črpa 14- in 15-členske makrolide in streptogamin B iz bakterijske celice. Ta mehanizem ne zagotavlja odpornosti proti linkozamidom, saj le-ti niso substrat za te izlivne črpalke. Encimska razgradnja antibiotika je tretji mehanizem odpornosti, ki pa posreduje odpornost le proti linkozamidom. Pri stafilokokih zapis za linkozamid nukleotidiltransferaze nosijo geni *lnu(A)* (prejšnje poimenovanje *linA*) in *lnu(B)* (predhodno *linB*). Ta mehanizem odpornosti se pogosteje pojavlja pri koagulaza negativnih stafilokokih (KNS) kot pri bakteriji *S. aureus* (Leclercq, 2002).

Odpornost proti linezolidu (oksazolidinoni) pri bakteriji *S. aureus* se kaže s spremembo tarčnega mesta za antibiotik. Spremembe povzročijo mutacije v 23S rRNA, natančneje enojna nukleotidna zamenjava v domeni V na 23S rRNA. Ker ima bakterija *S. aureus* 5 do 6 rRNA operonov, se odpornost proti linezolidu izrazi šele, ko mutira več rRNA genov.

Takšna odpornost naj bi se prenašala s homologno rekombinacijo (Pentosti in sod., 2007). Pri MRSA so odkrili, da metilacija 23S rRNA z encimom Cfr metiltransferazo prav tako spremeni tarčno mesto za linezolid. Cfr metiltransferaza metilira nukleotid A2503 23S rRNA. Klinični sev MRSA, v katerem so odkrili prvi *cfr* gen, so izolirali leta 2005. Gen *cfr* leži skupaj z genom *ermB* na kromosomu, natančneje na prenosljivem genetskem elementu (Long in Vester, 2012). Aktivno črpanje antibiotika iz celice je mehanizem odpornosti proti linezolidu prav tako prisoten pri bakteriji *S. aureus*. Zanj je odgovorna LmrS izlivna črpalka iz družine MFS prenašalcev (Floyd in sod., 2010).

Bakterija *S. aureus* ima proti fluorokinolonom dva mehanizma odpornosti. Prvi je sprememba tarčnega mesta, kjer mutacije v genih, ki nosijo zapis za sintezo DNA-giraze (*gyrA* in *gyrB*) in topoizomeraze IV (*parC* in *parE*), onemogočajo vezavo fluorokinolonov na te encime, ki so ključnega pomena pri podvojevanju DNA. Drugi mehanizem odpornosti je aktivno črpanje fluorokinolonov iz bakterijske celice. Zapis za izlivno črpalko nosi gen *norA*, ki leži na bakterijskem kromosomu. Izlivno črpalko NorA uvrščamo v družino MSF prenašalcev. Uvrščamo jo tudi v MDR sisteme črpanja, saj poleg fluorokinolonov iz bakterijske celice črpa tudi druge strukturno nesorodne antibiotike (McCallum in sod., 2010).

Odpornost proti sulfonamidom in trimetoprimu pri bakteriji *S. aureus* povzročajo mutacije v genih, ki nosijo zapis za encime, ki posredno sodelujejo pri sintezi jedernih kislin. Razvoj alternativne presnovne poti za sintezo folne kisline omogoča bakteriji odpornost proti kombinaciji TMP-SMX. Odpornost proti sulfonamidni komponenti je posledica mutacije ene aminokisline v genu *dhps*, ki nosi zapis za encim DHPS in leži na kromosomu. Odpornost proti trimetoprimu pa je posledica enojne aminokislinske substitucije v genu *dhfr*, ki nosi zapis za encim DHFR in prav tako leži na kromosomu (Huovinen, 2001).

Pregled mehanizmov odpornosti bakterije *S. aureus* proti antibiotikom se nahaja v preglednici 1.

Preglednica 1: Mehanizmi odpornosti bakterije *S. aureus* proti testiranim antibiotikom (Reinert, 2009; Jacobs, 2004; Ambrose in sod., 2005; Leclercq, 2002; Pentosti in sod., 2007; Billal in sod., 2011; Huovinen, 2001; Boncoeur in sod., 2012; Eliopoulus, 2004).

Skupina antibiotikov	Antibiotik	Mehanizem odpornosti (<i>S. aureus</i>)
Betalaktamski antibiotiki	Oksacilin	encimska razgradnja antibiotika (penicilinaza, cefalosporinaza)
	Cefoksitin	sprememba tarčnega mesta (sinteza PBP2a pri MRSA)
Makrolidi	Eritromicin	sprememba tarčnega mesta (metilacija 23S rRNA, mutacije v 23S rRNA in ribosomskih beljakovinah L4 in L22)
		aktivno črpanje antibiotika iz celice (gen <i>msr(A)</i>)
Linkozamidi	Klindamicin	sprememba tarčnega mesta (metilacija 23S rRNA, mutacije v 23S rRNA in ribosomskih beljakovinah L4 in L22)
		encimska razgradnja antibiotika (gena <i>lnuA</i> in <i>lnuB</i>)
Oksazolidinoni	Linezolid	sprememba tarčnega mesta (mutacije v 23S rRNA, metilacija 23S rRNA)
		aktivno črpanje antibiotika iz celice (gen <i>lmrS</i>)
Kinoloni	Ciprofloksacin	sprememba tarčnega mesta (mutacije v genih, ki nosijo zapis za sintezo encimov DNA-giraze in/ali topoizomeraze IV)
	Moksifloksacin	
		aktivno črpanje antibiotika iz celice (gen <i>norA</i>)
Sulfonamidi in Trimetoprim	TMP-SMX	sprememba tarčnega mesta (mutacije v genih, ki nosi zapis za encim DHFR (pri trimetoprimu) in encim DHPS (pri sulfametoksazolu))

PBP – penicilin vezoče beljakovine, MRSA – proti meticilinu odporna bakterija *S. aureus*, TMP-SMX – trimetoprim-sulfametoksazol; DHFR – dihidrofolat reduktaza, DHPS – dihidropteroat sintaza

2.2.2 Streptokoki

Streptokoki so po Gramu pozitivni koki, ki se urejajo v kratke verižice ali pare. So negibljivi, nesporgeni, alfa hemolitični, beta hemolitični ali nehemolitični in katalaza negativni. Uvrščamo jih med fakultativne anaerobe. Večina streptokokov raste v aerobnem okolju, nekateri pa potrebujejo za rast dodatek ogljikovega dioksida (CO₂) (Kilian, 2005).

Streptokoki so del komenzalne mikroflore sluznic zgornjih dihal ljudi in večine živali. Kolonizirajo lahko tudi površine zob, črevesje in spolovila. Večina streptokokov ne povzroča okužb, razen v primeru, da zaidejo v primarno sterilno okolje, nekateri predstavniki pa so visoko patogeni in se širijo med populacijo ter povzročajo okužbe (Kilian, 2005).

2.2.2.1 *Streptococcus pneumoniae*

Bakterija *S. pneumoniae* povzroča bronhitis, pljučnico, vnetje srednjega ušesa, sinusitis in meningitis (Jacobs, 2004). Ima številne virulentne dejavnike, ki povzročajo okužbe. Pomemben virulentni dejavnik je polisaharidna kapsula, ki bakterijo ščiti pred fagocitozo. Trenutno je znanih 93 serotipov polisaharidnih kapsul (Domenech in sod., 2011). Poznavanje serotipov polisaharidnih kapsul je omogočilo izdelavo cepiva, ki preprečuje okužbo z bakterijo *S. pneumoniae* (Jedrzejcas, 2001). Pomembno vlogo pri zaščiti pred gostiteljevimi obrambnimi mehanizmi imajo tudi cink metaloproteinaze, med katerimi je najbolj proučena IgA1 proteaza, ki odcepi Fab podenoto protitelesa A (imunoglobulina A). S Fab podenoto se prekrije hidrofilna narava kapsule in bakterija se tako lahko pritrdi na gostiteljeve epitelne celice (Weiser in sod., 2003). Pnevmonokoki sintetizirajo znotrajcelični toksin hemolizin (pnevmolizin), ki se ob avtolizi bakterijske celice sprosti v okolje. Pnevmolizin zavira fagocitozo, proliferacijo limfocitov in sintezo protiteles. Virulentni dejavniki so tudi določene druge streptokokne beljakovine, ki omogočajo kolonizacijo, širjenje okužbe in ščitijo pred gostiteljevimi obrambnimi mehanizmi. Te beljakovine so: hialuronat liaza (Hyl), neuraminidaze (NanA in NanB), avtolizin (LytA), holin vezavna beljakovina A (CbpA), pnevmokokni površinski antigen A (PsaA) in pnevmokokna

površinska beljakovina A (PspA). Vse te beljakovine so tudi potencialni kandidati za izdelavo antigensko neodvisnih cepiv (Jedrzejcas, 2001).

2.2.2.2 Mehanizmi odpornosti bakterije *S. pneumoniae* proti antibiotikom

Bakterija *S. pneumoniae* se učinkovito zaščiti pred betalaktamskimi antibiotiki s spremembo tarčnega mesta. Tak mehanizem odpornosti je posledica spremembe v genih, ki nosijo zapis za PBP2b, PBP2x in PBP1a (Reinert, 2009). Ti geni se horizontalno prenašajo tako znotraj vrste kot tudi znotraj rodu *Streptococcus*. Tako spremenjenim genom pravimo mozaični geni, saj poleg spremenjenega nukleotidnega zaporedja vsebujejo še odseke nespremenjenega nukleotidnega zaporedja za antibiotike občutljivih genov *pbp*. Zaradi sposobnosti naravne kompetence bakterije *S. pneumoniae* so tudi geni, ki posredujejo odpornost proti kinolonom in tetraciklinom mozaični geni (Berger-Bächli, 2002).

Makrolidi in linkozamidi so še ena skupina antibiotikov, proti katerim ima bakterija *S. pneumoniae* razvitih več mehanizmov odpornosti. Prvi je sprememba tarčnega mesta z metilacijo 23S rRNA. Gen *erm(B)* nosi zapis za encim metilazo, ki posredno onemogoča vezavo makrolidov, linkozamidov in streptogramina B (MLS_B fenotip) na ribosom. Ta mehanizem posreduje visoko stopnjo odpornosti proti antibiotikom (Jacobs, 2004). Pojavljajo se tudi mutacije v 23S rRNA in ribosomskih beljakovinah L4 in L22 (Reinert, 2009). Drugi mehanizem odpornosti je aktivno črpanje antibiotika iz celice. Ta mehanizem zagotavlja odpornost le proti makrolidom (M-fenotip). Zapis za beljakovinske izlivne črpalke nosita gena *mef(A)* in *mef(E)*. Gen *mef(E)* je del genetskega sestava za črpanje makrolidov (angl. macrolide efflux gene assembly, MEGA), gen *mef(A)* pa je del večjega genetskega elementa Tn1207.1, katerega del je MEGA ali tesno sorodni homologi. Oba gena sta del MEGA operona, ki vključuje gen *mel*. Izlivno črpalko Mef uvrščamo v družino MFS prenašalcev, pri katerih so gonilna sila protoni. Izlivno črpalko Mel pa uvrščamo v družino ABC prenašalcev, ki pridobivajo energijo za črpanje antibiotika iz molekul ATP. Pri bakteriji *S. pneumoniae* beljakovini Mef E in Mel delujeta kot dvojna izlivna črpalka (Ambrose in sod., 2005).

Pri bakteriji *S. pneumoniae* sta za odpornost proti oksazolidinonom odgovorna dva mehanizma. Prvi je sprememba tarčnega mesta z mutacijami v domeni V na 23S rRNA (Billal in sod., 2010), drugi pa je aktivno črpanje antibiotika iz celice z izlivno črpalko iz družine ABC prenašalcev (Feng in sod., 2009). Feng in sod. (2009) so sekvencirali genome proti linezolidu odpornih sevov bakterije *S. pneumoniae* (*in vitro* izbrane mutante) ter ugotovili, da so za aktivno črpanje antibiotika iz celice odgovorne motnje v genih, ki nosijo zapis za izlivne črpalke iz družine ABC prenašalcev oz. natančneje, motnje v genih *patA* in *patB*, ki se pri proti linezolidu odpornih mutantah povečano izražata. Zaradi mutacij v primerni tarči (23S rRNA) se v celici nakopiči prosti linezolid. Posledično se poveča izražanje genov *patA* in *patB* in črpanje linezolida iz bakterijske celice (Feng in sod., 2009).

Povečano izražanje genov *patA* in *patB* se pojavlja tudi pri celicah, ki so izpostavljene fluorokinolonom, kar dokazuje, da so ti geni povezani z MDR sistemi črpanja (Boncoeur in sod., 2012). Ta mehanizem odpornosti bakterije *S. pneumoniae* je odgovoren tako za odpornost proti linezolidu kot tudi za odpornost proti fluorokinolonom. Primarni mehanizem odpornosti proti fluorokinolonom pa je še vedno sprememba tarčnega mesta, natančneje mutacije v genih, ki nosijo zapis za encima topoizomerozo IV (primarno v genu *parC*) in DNA-girazo (primarno v genu *gyrA*). Mutacije nastanejo v točno določenih regijah, ki določajo odpornost proti kinolonom (angl. quinolone resistance-determining regions, QRDR) (Eliopoulos, 2004).

Odpornost proti kombinaciji TMP-SMX pri bakteriji *S. pneumoniae* je posledica spremembe tarčnega mesta. Mehanizem odpornosti proti trimetoprimu je enak kot pri bakteriji *S. aureus*. Odpornost proti sulfonamidni komponenti pa je posledica podvojitve dveh aminokislin v genu *folP* (gen *dhps*), ki nosi zapis za encim DHPS (Huovinen, 2001).

Pregled mehanizmov odpornosti bakterije *S. pneumoniae* proti antibiotikom je podan v preglednici 2.

Preglednica 2: Mehanizmi odpornosti bakterije *S. pneumoniae* proti testiranim antibiotikom (Reinert, 2009; Jacobs, 2004; Ambrose in sod., 2005; Leclercq, 2002; Pentosti in sod., 2007; Billal in sod., 2011; Huovinen, 2001; Boncoeur in sod., 2012; Eliopoulos, 2004).

Skupina antibiotikov	Antibiotik	Mehanizem odpornosti (<i>S. pneumoniae</i>)
Betalaktamski antibiotiki	Oksacilin	sprememba tarčnega mesta (spremembe v zgradbi PBP (2b, 2x in 1a))
	Cefoksitin	
Makrolidi	Eritromicin	sprememba tarčnega mesta (metilacija 23S rRNA, mutacije v 23S rRNA in ribosomskih beljakovinah L4 in L22)
		aktivno črpanje antibiotika iz celice (geni <i>mef(A)</i> , <i>mef(E)</i> in <i>mel</i>)
Linkozamidi	Klindamicin	sprememba tarčnega mesta (metilacija 23S rRNA)
Oksazolidinoni	Linezolid	sprememba tarčnega mesta (mutacija 23S rRNA)
		aktivno črpanje antibiotika iz celice (gena <i>patA</i> in <i>patB</i>)
Kinoloni	Ciprofloksacin	sprememba tarčnega mesta (mutacije v genih, ki nosijo zapis za encima DNA-girazo in/ali topoizomerozo IV)
	Moksifloksacin	
		aktivno črpanje antibiotika iz celice (gena <i>patA</i> in <i>patB</i>)
Sulfonamidi in Trimetoprim	TMP-SMX	sprememba tarčnega mesta (mutacije v genih, ki nosi zapis za DHFR (pri trimetoprimu) in DHPS (pri sulfametoksazolu))
PBP - penicilin vezoče beljakovine, TMP-SMX, trimetoprim-sulfametoksazol; DHFR - dihidrofolat reduktaza, DHPS - dihidropteroat sintetaza		

2.2.3 Razširjenost odpornosti proti antibiotikom pri bakterijah *S. aureus* in *S. pneumoniae* v Evropi v letu 2011

Bakteriji *S. aureus* in *S. pneumoniae* sta povzročiteljici različnih okužb in pri obeh se pojavlja odpornost proti več različnim antibiotikom, kar predstavlja resno grožnjo za zdravljenje teh okužb. Bakterija *S. aureus* kolonizira kožo in v večini primerov ne povzroča okužb. Problem predstavljajo izolati MRSA, ki je eden najpogostejši povzročitelj bolnišnično pridobljenih okužb po vsem svetu. V letnem poročilu Evropske mreže za nadzor protimikrobne odpornosti (angl. European Antimicrobial Resistance Surveillance Network – EARS-Net) iz leta 2011 je, med drugim, objavljen tudi delež proti določenim antibiotikom odpornih invazivnih izolatov bakterije *S. aureus* izoliranih iz hemokultur za posamezne evropske države in ostale države, ki so vključene v to združenje. Testiranje občutljivosti za betalaktamske antibiotike je zajelo 34099 izolatov iz 28 držav, med katerimi je bilo 5703 (16,7 %) izolatov MRSA. Delež izolatov MRSA je bil v območju med 0,03 % (Norveška) in 54,6 % (Portugalska). Slovenija je zabeležila 7,1 % izolatov MRSA pri 464 testiranih izolatih. Testiranje občutljivosti za rifampicin je zajelo 24587 izolatov iz 27 držav, med katerimi je bilo 262 (1,1 %) izolatov odpornih proti rifampicinu. Delež izolatov odpornih proti rifampicinu, ki je nižji od 1 %, so zabeležili v 18 državah (Slovenija – 0,5 % odpornih izolatov pri 443 testiranih izolatih), 1–5 % v šestih državah, 5–10 % (Romunija), 10–25 % (Bolgarija) in nad 25 % na Poljskem. Delež proti betalaktamskim antibiotikom in rifampicinu odpornih izolatov za posamezne države je prikazan v preglednici 3. Testiranje občutljivosti za vsaj en fluorokinolon je zajelo 23336 izolatov iz 26 držav, med katerimi je bilo 4854 (20,8 %) neobčutljivih za fluorokinolone. Petinosemdeset odstotkov izolatov MRSA (3637/4265) je bilo odpornih proti fluorokinolonom. Podatki za Slovenijo niso bili podani. Testiranje občutljivosti za linezolid je zajelo 22653 izolatov bakterije *S. aureus* med katerimi je bilo 14 (0,06 %) zmerno odpornih in odpornih za linezolid. Podatki za Slovenijo niso bili podani. Delež MRSA v večini evropskih držav upada (tudi v Sloveniji) ali ostaja stabilen, kar pa ne pomeni, da več ne ogroža javnega zdravja, saj v osmih evropskih državah delež bakterije MRSA ostaja nad 25 odstotki (EARS-Net, 2012).

Preglednica 3: Število testiranih in odstotek invazivnih izolatov bakterije *S. aureus* odpornih proti meticilinu in rifampicinu za posamezne države, upoštevajoč 95 % interval zaupanja (EARS-Net, 2012: 55).

Dežava	Št. izolatov testiranih na meticilin	% MRSA (95 % IZ)	Št. izolatov testiranih na rifampicin	% odpornih proti rifampicinu (95 % IZ)
Avstrija	1966	7,4 (6-9)	1850	0,3 (0-1)
Belgija	1744	17,4 (16-19)	1014	0,6 (0-1)
Bulgarija	214	22,4 (17-29)	162	14,2 (9-21)
Ciper	113	41,6 (32-51)	113	0,0 (0-3)
Češka	1555	14,5 (13-16)	782	1,8 (1-3)
Danska	1452	1,2 (1-2)	1452	0,1 (0-0)
Estonija	116	1,7 (0-6)	3	0,0 (0-71)
Francija	4716	20,1 (19-21)	4278	1,0 (1-1)
Nemčija	2388	16,1 (15-18)	1656	0,7 (0-1)
Grčija	784	39,2 (36-43)	0	0
Madžarska	1156	26,2 (24-29)	570	0,4 (0-1)
Islandija	71	2,8 (0-10)	3	0,0 (0-71)
Irska	1057	23,7 (21-26)	835	1,0 (0-2)
Italija	1261	38,2 (36-41)	970	4,3 (3-6)
Latvija	192	9,9 (6-15)	186	0,5 (0-3)
Litva	278	5,4 (3-9)	158	0,6 (0-2)
Liksemburg	127	20,5 (14-29)	90	0,0 (0-4)
Malta	130	49,2 (41-59)	130	0,8 (0-4)
Nizozemska	1801	1,4 (1-2)	1581	0,4 (0-1)
Norveška	1223	0,3 (0-1)	446	0,0 (0-1)
Poljska	860	24,3 (21-27)	135	27,4 (20-36)
Portugalska	1307	54,6 (52-57)	1092	1,7 (1-3)
Romunija	107	50,5 (41-60)	101	7,9 (3-15)
Slovaška	560	25,9 (22-30)	478	1,3 (0-3)
Slovenija	464	7,1 (5-10)	443	0,5 (0-2)
Španija	1950	22,5 (21-24)	1826	0,5 (0-1)
Švedska	3099	0,8 (1-1)	2456	0,2 (0-1)
Anglija	3408	13,6 (13-15)	1777	0,6 (0-1)

MRSA – proti meticilinu odporna bakterija *S.aureus*, IZ – interval zaupanja

Bakterija *S. pneumoniae* je najpogostejša povzročiteljica zunajbolnišnično pridobljene pljučnice po vsem svetu. Letno naj bi za posledicami pnevmokoknih okužb umrlo približno 3 milijone ljudi (EARS-Net, 2012). V letnem poročilu EARS-Net iz leta 2011 je objavljen delež proti določenim antibiotikom odpornih invazivnih izolatov bakterije *S. pneumoniae*, izoliranih iz hemokultur in likvorja za posamezne evropske države in ostale države, ki so vključene v to združenje. Testiranje občutljivosti za penicilin je zajelo 11788 izolatov iz 27 držav, med katerimi je bilo skupaj 1039 (8,8 %) izolatov zmerno odpornih in odpornih proti penicilinu. Delež proti penicilinu odpornih izolatov, ki je bil nižji od 1 % so zabeležili v Belgiji, 1–5 % v osmih državah, 5–10 % v petih državah, 10–25 % v devetih

državah (Slovenija – pri 252 testiranih izolatih je bilo 12,3 % izolatov zmerno odpornih in odpornih proti penicilinu), 25–50 % v treh državah in nad 50 % v Romuniji. Testiranje občutljivosti za makrolide je zajelo 11739 izolatov iz 27 držav, med katerimi je bilo 1713 (14,6 %) izolatov zmerno odpornih in odpornih proti makrolidom. Deleži odpornih izolatov so bili v območju od nič (Latvija) do 44,4 % (Romunija). Slovenija je pri 251 testiranih izolatih zabeležila 24,3 % izolatov zmerno odpornih in odpornih proti makrolidom. V primerjavi s podatki iz leta 2008, 2009 in 2010, ko se je delež odpornih izolatov proti makrolidom gibal okrog 16 %, je opaziti skokovit porast števila izolatov odpornih proti makrolidom. Testiranje občutljivosti za penicilin in makrolide je zajelo 11184 izolatov iz 27 držav, med katerimi je bilo 625 (5,8 %) izolatov zmerno odpornih in odpornih proti penicilinu in makrolidom hkrati. Deleži odpornih izolatov proti penicilinu in makrolidom hkrati so bili v območju od nič (Estonija, Nemčija in Latvija) do 44,4 % (Romunija). Slovenija je med 251 testiranimi izolati zabeležila 6,0 % izolatov zmerno odpornih in odpornih proti penicilinu in makrolidom hkrati. Deleži proti penicilinu in makrolidom odpornih izolatov ter obema hkrati za posamezne države so prikazani v preglednici 4. Testiranje občutljivosti za fluorokinolone je zajelo 7275 (58 % vseh izolatov *S. pneumoniae*) izolatov iz 24 držav, med katerimi je bilo 4,8 % izolatov odpornih proti fluorokinolonom. Štirideset izmed teh je bilo zmerno odpornih ali odpornih tudi za penicilin. Povprečen delež odpornosti bakterije *S. pneumoniae* proti antibiotikom, ki so v splošni rabi, v zadnjih letih v Evropi ostaja stabilen (EARS-Net, 2012).

Preglednica 4: Število invazivnih izolatov bakterije *S. pneumoniae* testiranih na občutljivost za penicilin in makrolide in deleži odpornih in zmerno odpornih izolatov skupaj proti posameznemu antibiotiku in za oba hkrati za posamezne države upoštevajoč 95 % interval zaupanja (EARS–Net, 2012: 47).

Država	Št. izolatov testiranih na PEN/MACRboje	% zmerno odpornih in odpornih skupaj proti PEN (95 % IZ)	% odpornih proti PEN (95 % IZ)	% zmerno odpornih in odpornih skupaj proti MACR (95 % IZ)	% odpornih samo proti PEN (95 % IZ)	% odpornih samo proti MACR (95 % IZ)	% zmerno odpornih in odpornih skupaj proti PEN in MACR (95 % IZ)
Avstrija	405/373/355	3,0 (2-5)	1,7 (1-4)	11,5 (8-15)	0,8 (0-2)	9,6 (7-13)	2,3 (1-4)
Belgija	1829/1829/1829	0,8 (0-1)	0,8 (0-1)	26,0 (24-28)	0,2 (0-1)	25,4 (23-27)	0,6 (0-1)
Bulgarija	33/30/30	21,2 (9-39)	21,2 (9-39)	13,3 (4-31)	10,0 (2-27)	0,0 (0-12)	13,3 (4-31)
Ciper	12/12/12	25,0 (5-57)	25,0 (5-57)	25,0 (5-57)	8,3 (0-38)	8,3 (0-38)	16,7 (2-48)
Češka	316/316/316	3,8 (2-7)	0,0 (0-1)	3,5 (2-6)	1,9 (1-4)	1,6 (1-4)	1,9 (1-4)
Danska	896/896/896	4,8 (3-6)	0,2 (0-1)	5,1 (4-7)	1,8 (1-3)	2,1 (1-3)	3,0 (2-4)
Estonija	51/45/42	2,0 (0-10)	2,0 (0-10)	2,2 (0-12)	2,4 (0-13)	2,4 (0-13)	0,0 (0-8)
Francija	1413/1413/1413	23,8 (22-26)	0,1 (0-1)	26,0 (24-28)	5,1 (4-6)	7,3 (6-9)	18,8 (17-21)
Nemčija	347/353/343	1,7 (1-4)	0,3 (0-2)	7,9 (5-11)	1,2 (0-3)	8,2 (5-12)	0,0 (0-1)
Madžarska	139/129/129	11,5 (7-18)	5,8 (3-11)	14,7 (9-22)	3,9 (1-9)	6,2 (3-12)	8,5 (4-15)
Islandija	32/32/32	9,4 (2-25)	6,3 (1-21)	21,9 (9-40)	0,0 (0-11)	12,5 (4-29)	9,4 (2-25)
Irska	324/310/310	19,4 (15-24)	6,2 (4-9)	18,4 (14-23)	5,5 (3-9)	4,8 (3-8)	13,5 (10-18)
Italija	174/266/162	6,9 (4-12)	6,3 (3-11)	27,4 (22-33)	2,5 (1-6)	24,7 (18-32)	4,3 (2-9)
Latvija	40/46/38	12,5 (4-27)	10,0 (3-24)	0,0 (0-8)	13,2 (4-28)	0,0 (0-9)	0,0 (0-9)
Litva	48/41/41	18,8 (9-33)	2,1 (0-11)	26,8 (14-43)	4,9 (1-17)	9,8 (3-23)	17,1 (7-32)
Luksembur	50/52/50	8,0 (2-19)	2,0 (0-11)	15,4 (7-28)	2,0 (0-11)	10,0 (3-22)	6,0 (1-17)
Malta	8/10/8	50,0 (25-73)	10,0 (2-71)	12,5 (0-53)	0,0 (0-71)	0,0 (0-71)	12,5 (0-53)
Nizozemska	1067/1200/978	1,1 (1-2)	0,3 (0-1)	4,5 (3-6)	0,7 (0-1)	4,2 (3-6)	0,3 (0-1)
Norveška	619/570/567	3,4 (2-5)	0,0 (0-1)	4,2 (3-6)	1,9 (1-3)	2,6 (1-4)	1,4 (1-3)
Poljska	165/135/134	18,2 (13-25)	4,2 (2-9)	26,7 (19-35)	3,7 (1-8)	11,9 (7-19)	14,9 (9-22)
Portugalska	439/417/402	10,5 (8-14)	8,4 (6-11)	14,9 (12-19)	5,5 (3-8)	9,2 (7-12)	5,2 (3-8)
Romunija	36/18/18	61,1 (43-77)	61,1 (43-77)	44,4 (22-69)	16,7 (4-41)	0,0 (0-19)	44,4 (22-69)
Slovaška	26/25/25	7,7 (1-25)	3,8 (0-20)	12,0 (3-31)	4,0 (0-20)	8,0 (1-26)	4,0 (0-20)
Slovenija	252/251/251	12,3 (9-17)	0,8 (0-3)	24,3 (19-30)	6,4 (4-10)	18,3 (14-24)	6,0 (3-10)
Španija	736/746/720	30,2 (27-34)	9,8 (8-12)	24,8 (22-28)	13,2 (11-16)	8,3 (6-11)	16,9 (14-20)
Švedska	1013/963/963	3,5 (2-5)	3,2 (2-4)	5,2 (4-7)	1,7 (1-3)	3,2 (2-5)	2,0 (1-3)
Anglija	1324/1263/1126	5,4 (4-7)	0,8 (0-1)	5,9 (5-7)	2,7 (2-4)	2,5 (2-4)	3,6 (3-5)

PEN – penicilin, MACR – makrolidi, IZ – interval zaupanja,

2.3 METODE ZA DOLOČANJE OBČUTLJIVOSTI BAKTERIJ ZA ANTIBOTIKE

Določanje občutljivosti bakterij za antibiotike je pomembno za izbiro naustreznejšega antibiotika za zdravljenje okužbe in za spremljanje gibanja odpornosti proti antibiotikom pri posameznih bakterijskih vrstah. Splošno uporabljene metode za določanje občutljivosti za antibiotike so: bujon dilucijski test, metoda difuzijskega gradienta (E test), disk difuzijski test in avtomatizirani sistemi za določanje občutljivosti za antibiotike (MicroScan WalkAway, BD Phoenix Automated Microbiology System, Vitek 1, Vitek 2, Sensititre ARIS 2X) (Jorgensen in Ferraro, 2009).

3 MATERIALI IN METODE

3.1 MATERIALI

3.1.1 Bakterijski izolati

V raziskavi smo testirali skupno 63 kliničnih izolatov in 2 referenčna seva iz zbirke ATCC (angl. American Type Culture Collection) za kontrolo pravilnega izvajanja disk difuzijskega testa. Občutljivost za cefoksitin, eritromicin, klindamicin, linezolid ciprofloksacin in trimetoprim-sulfametoksazol smo testirali pri 31 kliničnih izolatih ter 1 referenčnem sevu bakterije *S. aureus* ATTC 25923. Občutljivost za oksacilin, eritromicin, klindamicin, moksifloksacin in trimetoprim-sulfametoksazol smo testirali pri 32 kliničnih izolatih ter 1 referenčnem sevu bakterije *S. pneumoniae* ATTC 49619. Klinični izolati bakterij *S. aureus* in *S. pneumoniae* so bili v letu 2009 osamljeni iz kužnin bolnikov hospitaliziranih na Univerzitetni kliniki za pljučne bolezni in alergijo Golnik.

Bakterijski izolati so bili osamljeni iz različnih kužnin: krvi, punktatov, kužnin iz dihal, brisov nosu, kože, ran in katetrov. V raziskavi smo od posameznega bolnika uporabili le en izolat.

V okviru rednega dela v Laboratoriju za respiratorno mikrobiologijo na Univerzitetni kliniki za pljučne bolezni in alergijo Golnik so s pomočjo klasičnih mikrobioloških metod identificirali vse izolate ter jih shranili pri temperaturi -70 °C.

3.1.2 Gojišča, raztopine in reagenti

- hranilni agar (HA) (Becton-Dickinson, ZDA)
- krvni agar (KA) (Becton-Dickinson, ZDA)
- Mueller-Hinton agar (MHA) (Becton-Dickinson, ZDA)

- MHA z dodatkom 5 % defibrinirane ovčje krvi (Becton-Dickinson, ZDA)
- 0,85-odstotna fiziološka raztopina NaCl (bioMérieux, Francija)
- standardizirani diski z antibiotiki (Becton-Dickinson, ZDA) – njihove količine in bakterije pri katerih smo testirali občutljivost nanje, so prikazani v preglednici 5

Preglednica 5: Koncentracije standardiziranih diskov z antibiotiki testiranih pri izolatih bakterij *S. aureus* in *S. pneumoniae* (CLSI, 2008).

Antibiotik	Količina antibiotika v disku	Testiranje občutljivosti bakterije <i>S. aureus</i>	Testiranje občutljivosti bakterije <i>S. pneumoniae</i>
Oksacilin	1 µg	NE	DA
Cefoksitin	30 µg	DA	NE
Eritromicin	15 µg	DA	DA
Klindamicin	2 µg	DA	DA
Linezolid	30 µg	DA	NE
Ciprofloksacin	5 µg	DA	NE
Moksifloksacin	5 µg	DA	DA
TMP-SMX	1,25/23,75 µg	DA	DA
TMP-SMX – trimetoprim-sulfametoksazol			

3.1.3 Laboratorijski pribor in oprema

- steriliziran laboratorijski pribor in potrošni material: plastična stojala, cepilne zanke, epruvete, petrijeve plošče in bombažni brisi
- zaščitna oprema: laboratorijska halja, rokavice
- oprema in aparature: hladilnik (4 °C – 8 °C) (LTH, Slovenija), zamrzovalnik (-14 °C) (LTH, Slovenija), zamrzovalna omara (-70 °C) (Sanyo, Japonska), ventilacijski sušilec (35 °C) (LTH, Slovenija), zaščitna mikrobiološka komora (Iskra PIO, Slovenija), merilec optične gostote (denzitometer) (bioMérieux, Francija), inokulator (Becton-Dickinson, ZDA), inkubator (35 °C) (Kambič, Slovenija), inkubator (35 °C, 5 % CO₂) (Kambič, Slovenija), kljunasto merilo, namizna svetilka

3.2 METODE

3.2.1 Disk difuzijski test

Za določanje občutljivosti kliničnih izolatov bakterij *S. aureus* in *S. pneumoniae* za izbrane antibiotike smo uporabili disk difuzijski test, ki smo ga izvedli v skladu z navodili CLSI, hkrati pa smo metodo modificirali tako, da smo preverili vpliv določenih gostot bakterijskih suspenzij in časov inkubacije na rezultate testiranja za antibiotike.

3.2.1.1 Priprava bakterijskih izolatov in bakterijske inokulacijske suspenzije

Delo je potekalo v zaščitni mikrobiološki komori, pri čemer smo uporabljali zaščitne rokavice in aseptično tehniko dela, da smo preprečili morebitno kontaminacijo vzorcev ter možnost okužbe med delom.

Bakterijske izolate smo odmrznili in izolate bakterije *S. aureus* nacepili na osnovno gojišče hranilni agar (HA), izolate bakterije *S. pneumoniae* pa na osnovno gojišče krvni agar (KA). Petrijeve plošče z nacepljenimi izolati smo obrnjene na glavo (kondenzat ne kaplja na gojišče) inkubirali 24 ur v aerobnih pogojih pri temperaturi 35 °C. Izolate bakterije *S. pneumoniae* smo inkubirali pri enakih pogoji, vendar v atmosferi z dodanih 5 % CO₂. Po 24-urni inkubaciji smo izolate ponovno precepili na enaka gojišča in inkubirali pri enakih pogojih.

Po 24-urni inkubaciji smo s sterilnim bombažnim brisom prenesli kolonije čiste kulture bakterije *S. aureus* z gojišča v 3 ml 0,85 % fiziološke raztopine (kolonije čiste kulture bakterije *S. pneumoniae* v 1,5 ml 0,85 % fiziološke raztopine) in s pomočjo merilca optične gostote umerili gostoto bakterijske suspenzije na 0,5 McF.

Na tem mestu smo standardizirano metodo prvič modificirali, in sicer tako, da smo vsem izolatom umerili gostoto bakterijske suspenzije še na 1,0 McF, 2,0 McF in 4,0 McF.

Nato smo v manj kot 15 minutah z bombažnim brisom ob pomoči inokulatorja, ki omogoči enakomeren nanos suspenzije, nacepili suspenzije različnih gostot bakterije *S. aureus* na MHA, suspenzije različnih gostot bakterije *S. pneumoniae* pa na MHA z dodatkom 5 % defibrinirane ovčje krvi. Petrijeve plošče smo pred polaganjem standardiziranih diskov z antibiotiki pustili priprte, vendar ne več kot 15 minut.

3.2.1.2 Polaganje standardiziranih diskov z antibiotiki in inkubacija

Standardizirane diske z antibiotiki smo 1 uro pred uporabo iz hladilnika prenesli na sobno temperaturo, da smo minimizirali nastanek kondenzata na diskih. Nato smo jih s pomočjo avtomatskega polagalca (dispenzer) nanesli na nacepljena gojišča. Antibiograme nacepljene z izolati bakterije *S. pneumoniae* smo v manj kot 15 minutah od nanosa diskov obrnjene na glavo prenesli v inkubator in jih po standardnih navodilih CLSI inkubirali 24 ur pri temperaturi 35 °C in atmosferi z dodanih 5 % CO₂. Antibiograme nacepljene z izolati bakterije *S. aureus* smo po standardnih navodilih CLSI inkubirali 16 - 18 ur v aerobnih pogojih pri temperaturi 35 °C.

Na tem mestu smo standardizirano metodo drugič modificirali tako, da smo spremenili čas inkubacije pred odčitavanjem rezultatov. Antibiograme nacepljene z izolati bakterije *S. aureus* smo odčitavali po 5-, 6- in 7-urni inkubaciji. Antibiograme nacepljene z izolati bakterije *S. pneumoniae* pa smo odčitavali po 6- in 7-urni inkubaciji.

3.2.1.3 Odčitavanje in interpretacija rezultatov

Pri izvedbi standardiziranega disk difuzijskega testa so po 16 - 24-urni inkubaciji okrog diskov z antibiotiki vidne zaviralne cone, kar pomeni, da je antibiotik difundiral v gojišče in v določeni razdalji okrog diskov onemogočil razmnoževanje občutljivih bakterij.

Premjer zaviralne cone smo do milimetra natančno izmerili s pomočjo umerjenega kljunastega merila in na podlagi kriterijev, ki jih določa CLSI (2008), interpretirali testiran bakterijski izolat kot občutljiv (angl. sensitive, S), zmerno odporen (angl. intermediate, I) ali odporen (angl. resistant, R) proti testiranemu antibiotiku. Zaviralne cone pri izolatih

bakterije *S. aureus* smo merili tako, da smo petrijevo ploščo držali nad temno površino in jo presevali s svetlobo namizne svetilke ter s kljunastim merilom izmerili premer zaviralne cone. Pri izolatih bakterije *S. pneumoniae* smo zaradi v gojišču prisotne krvi zaviralne cone izmerili s kljunastim merilom na zgornji površini odkrite petrijeve plošče presevane s svetlobo namizne svetilke. Pri slednjih smo bili pozorni, da smo izmerili zaviralno cono in ne cono hemolize. Rezultate smo odčitali po 5-, 6-, 7-, in 18-urni inkubaciji za vse izolate bakterije *S. aureus* in po 6-, 7- ter 24-urni inkubaciji za vse izolate bakterije *S. pneumoniae*, iz katerih smo pripravili določeno gostoto bakterijske suspenzije in pripravili antibiogram. Posebaj pazljivi smo bili pri merjenju in interpretaciji rezultatov testiranja občutljivosti izolatov za kombinacijo TMP-SMX, saj kljub temu da ima gojišče MHA zelo nizko vsebnost timidina (antagonist TMP-SMX), le-ta lahko omogoči rahlo rast, zato smo zanemarili dovoljeno 20 ali manj odstotno rast ter izmerili najbolj očitno cono.

4 REZULTATI

4.1 IDENTIFIKACIJA BAKTERIJ IN PREGLED REZULTATOV TESTIRANJA OBČUTLJIVOSTI ZA IZBRANE ANTIBIOTIKE

V raziskavo smo vključili 31 kliničnih izolatov bakterije *S. aureus* in 32 kliničnih izolatov bakterije *S. pneumoniae*, ki so jih leta 2009 v okviru rednega dela s klasičnimi mikrobiološkimi metodami identificirali v Laboratoriju za respiratorno mikrobiologijo na Univerzitetni kliniki za pljučne bolezni in alergijo Golnik. Pregled rezultatov (premeri zaviralnih con) testiranja občutljivosti kliničnih izolatov bakterij *S. aureus* in *S. pneumoniae* s standardizirano in modificirano disk difuzijsko metodo ter pripadajoče oznake sevov se nahajajo v Prilogi A in Prilogi B.

4.2 REZULTATI TESTIRANJA OBČUTLJIVOSTI REFERENČNIH SEVOV ZA IZBRANE ANTIBIOTIKE

Rezultati standardiziranega disk difuzijskega testa občutljivosti referenčnih sevov bakterij *S. aureus* ATTC 25923 in *S. pneumoniae* ATTC 49619 za izbrane antibiotike in razpon zaviralnih con, ki po navodilih CLSI prikazujejo natančnost meritev disk difuzijskega testa so predstavljeni v preglednici 6.

Preglednica 6: Rezultati standardiziranega disk difuzijskega testa občutljivosti sevov bakterij *S. aureus* ATTC 25923 in *S. pneumoniae* ATTC 49619 za izbrane antibiotike in razpon zaviralnih con.

Referenčni sev <i>S. aureus</i> ATTC 25923			Referenčni sev <i>S. pneumoniae</i> ATTC 49619		
Antibiotik	Izmerjen premer zaviralne cone (mm)	Razpon zaviralnih con (mm) (CLSI, 2008)	Antibiotik	Izmerjen premer zaviralne cone (mm)	Razpon zaviralnih con (mm) (CLSI, 2008)
Cefoksitin	26	23-29	Oksacilin	11	≤ 12
Eritromicin	25	22-30	Eritromicin	28	25-30
Klindamicin	25	24-30	Klindamicin	25	19-25
Linezolid	29	25-32	Moksifloksacin	30	25-31
Ciprofloksacin	27	22-30	TMP-SMX	24	20-28
TMP-SMX	27	24-32	/	/	/

TMP-SMX – trimetoprim-sulfametoksazol

V preglednici 7 so predstavljeni rezultati standardiziranega in modificiranega disk difuzijskega testa občutljivosti referenčnega seva bakterije *S. pneumoniae* ATTC 49619 za izbrane antibiotike. Po 24-urni inkubaciji pri vseh različicah gostote bakterijskih suspenzij, meritve ustrezajo določenemu razponu zaviralnih con, ki so podane v CLSI (2008). Prav tako meritve ustrezajo določenemu razponu zaviralnih con po 18-urni inkubaciji in vseh različicah gostote bakterijskih suspenzij pri standardiziranem in modificiranem disk difuzijskem testu občutljivosti referenčnega seva bakterije *S. aureus* ATTC 25923, kar je razvidno iz preglednice 8. Namen tega testiranja je pozitivna kontrola oz. ugotavljanje ustreznosti izvedbe disk difuzijskega testa.

Preglednica 7: Rezultati (premeri zaviralnih con v mm) standardiziranega in modificiranega disk difuzijskega testa občutljivosti (gostota bakterijske suspenzije 0,5 McF, 1,0 McF, 2,0 McF in 4,0 McF ter po 6-, 7- in 24-urni inkubaciji) referenčnega seva bakterije *S.pneumoniae* ATTC 49619 za izbrane antibiotike.

ATTC 49619	Oksacilin			Eritromicin			Klindamicin			Moksifloksacin			TMP-SMX		
	6h	7 h	24h	6h	7h	24h	6h	7h	24h	6h	7h	24h	6h	7h	24h
0,5 McF	12	11	11	26	28	28	25	25	25	23	25	30	20	22	24
1,0 McF	11	14	11	26	28	28	25	25	25	24	24	30	20	21	24
2,0 McF	14	14	11	26	26	28	25	23	25	25	23	30	24	20	24
4,0 McF	11	14	11	28	28	28	24	23	25	26	22	30	23	20	24

TMP-SMX –trimetoprim-sulfametoksazol, zelena – rezultati standardiziranega disk difuzijskega testa, rumena – rezultati modificiranega disk difuzijskega testa

Preglednica 8: Rezultati (premeri zaviralnih con v mm) standardiziranega in modificiranega disk difuzijskega testa občutljivost (gostota bakterijske suspenzije 0,5 McF, 1,0 McF, 2,0 McF in 4,0 McF ter po 5-, 6-, 7- in 18-urni inkubaciji) referenčnega seva bakterije *S.aureus* ATTC 25923 za izbrane antibiotike.

ATTC 25923	Cefoksitin				Eritromicin				Klindamicin				Linezolid				Ciprofloksacin				TMP-SMX			
	5h	6h	7h	18h	5h	6h	7h	18h	5h	6h	7h	18h	5h	6h	7h	18h	5h	6h	7h	18h	5h	6h	7h	18h
0,5 McF	18	20	20	26	x	20	23	25	20	22	22	25	x	21	23	29	x	18	19	27	x	21	22	27
1,0 McF	19	19	21	26	21	21	23	25	21	21	21	25	22	23	24	29	18	18	19	27	20	22	22	27
2,0 McF	22	21	22	25	21	23	23	25	22	21	22	25	22	24	24	29	18	19	19	27	22	23	23	27
4,0 McF	22	22	22	25	21	22	23	25	22	22	22	25	23	24	23	29	19	19	21	27	23	23	23	27

TMP-SMX –trimetoprim-sulfametoksazol, zelena – rezultati standardiziranega disk difuzijskega testa, rumena – rezultati modificiranega disk difuzijskega testa

4.3 REZULTATI TESTIRANJA OBČUTLJIVOSTI KLINIČNIH IZOLATOV BAKTERIJE *S. aureus* ZA IZBRANE ANTIBIOTIKE

V preglednici 9 so predstavljeni rezultati modificiranega disk difuzijskega testa občutljivost kliničnih izolatov bakterije *S. aureus* za izbrane antibiotike. (različne gostote bakterijskih suspenzij in različni časi inkubacije). Tako je iz preglednice 9 razvidno, da je bilo pri gostoti bakterijske suspenzije 0,5 McF in 5-urni inkubaciji 9 (29,1 %) izolatov odpornih proti cefoksitinu, pri 21 (67,7 %) izolatih rasti še nismo zaznali. Nismo zaznali odpornih sevov proti eritromicinu, klindamicinu, linezolidu, ciprofloksacinu in TMP-SMX. Pri 21 (67,7 %) izolatih še nismo zaznali rasti ob diskih eritromicina, klindamicina in ciprofloksacina. Ob diskih TMP-SMX in linezolida nismo zaznali rasti pri 19 izolatih (61,3 %).

Po 6-urni inkubaciji je bilo 17 (54,8 %) izolatov odpornih proti cefoksitinu, pri 10 (32,3 %) izolatih rasti še nismo zaznali. Proti eritromicinu, klindamicinu, linezolidu in TMP-SMX nismo zaznali odpornih izolatov. Pri 9–12 (29,1–38,7 %) izolatih rasti še nismo zaznali. Proti ciprofloksacinu je bil 1 (3,2 %) izolat odporen.

Po 7-urni inkubaciji je bilo 21 (67,7 %) izolatov odpornih proti cefoksitinu, pri 3 (9,7 %) izolatih rasti še nismo zaznali. Proti eritromicinu sta bila odporna 2 (6,4 %) izolata, proti klindamicinu in ciprofloksacinu po 1 (3,1 %). Proti linezolidu in TMP-SMX nismo zaznali odpornih sevov. Rasti še nismo zaznali pri 1–4 izolatih (3,2–12,9 %).

V preglednici 9 so prikazani tudi rezultati standardiziranega disk difuzijskega testa občutljivosti 31 bakterijskih izolatov *S. aureus* za izbrane antibiotike (gostota bakterijske suspenzije 0,5 McF in 18-urna inkubacija). Izmed 31 izolatov so bili 3 (9,7 %) odporni proti cefoksitinu, 3 (9,7 %) odporni proti eritromicinu, 1 (3,3 %) odporen proti klindamicinu in 4 (12,9 %) odporni proti ciprofloksacinu. Vseh 31 (100 %) izolatov je bilo občutljivih za linezolid in TMP-SMX.

Preglednica 9: Število in deleži bakterije *S. aureus* občutljivih, zmerno odpornih in odpornih proti izbranim antibiotikom. Rezultati modificiranega disk difuzijskega testa z gostoto bakterijske suspenzije 0,5 McF po 5-, 6- in 7-urni inkubaciji ter standardiziranega disk difuzijskega testa z gostoto bakterijske suspenzije 0,5 McF po 18-urni inkubaciji.

Čas inkubacije	Antibiotik	Število testiranih izolatov	Število (%) S	Število (%) I	Število (%) R	Število (%) N
5 h						
	Cefoksitin	31	1 (3,2)	0 (0)	9 (29,1)	21 (67,7)
	Eritromicin	31	1 (3,2)	9 (29,1)	0 (0)	21 (67,7)
	Klindamicin	31	3 (9,7)	7 (22,6)	0(0)	21 (67,7)
	Linezolid	31	12 (38,7)	0 (0)	0 (0)	19 (61,3)
	Ciprofloksacin	31	0 (0)	10 (32,3)	0 (0)	21 (67,7)
	TMP-SMX	31	12 (38,7)	0 (0)	0 (0)	19 (61,3)
6 h						
	Cefoksitin	31	4 (12,9)	0 (0)	17 (54,8)	10 (32,3)
	Eritromicin	31	7 (22,6)	12 (38,7)	0 (0)	12 (38,7)
	Klindamicin	31	17 (54,8)	3 (9,7)	0 (0)	11 (35,5)
	Linezolid	31	22 (70,9)	0 (0)	0 (0)	9 (29,1)
	Ciprofloksacin	31	3 (9,7)	16 (51,6)	1 (3,2)	11 (35,5)
	TMP-SMX	31	21 (67,7)	0 (0)	0 (0)	10 (32,3)
7 h						
	Cefoksitin	31	7 (22,6)	0 (0)	21 (67,7)	3 (9,7)
	Eritromicin	31	16 (51,6)	9 (29,1)	2 (6,4)	4 (12,9)
	Klindamicin	31	26 (83,9)	1 (3,2)	1 (3,2)	3 (9,7)
	Linezolid	31	30 (96,8)	0 (0)	0 (0)	1 (3,2)
	Ciprofloksacin	31	12 (38,7)	14 (45,2)	1 (3,2)	4 (14,9)
	TMP-SMX	31	29 (93,6)	0 (0)	0 (0)	2 (6,4)
18 h						
	Cefoksitin	31	28 (90,3)	0 (0)	3 (9,7)	0 (0)
	Eritromicin	31	28 (90,3)	0 (0)	3 (9,7)	0 (0)
	Klindamicin	31	30 (96,7)	0 (0)	1 (3,3)	0 (0)
	Linezolid	31	31 (100)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
	Ciprofloksacin	31	25 (80,6)	2 (6,5)	4 (12,9)	0 (0)
	TMP-SMX	31	31 (100)	0 (0)	0 (0)	0 (0)

TMP-SMX – trimetoprim-sulfametoksazol, S – občutljiv, I – zmerno odporen, R – odporen, N – ni zaznane rasti, zelena - rezultati standardiziranega disk difuzijskega testa

Iz preglednice 10 je razvidno, da je bilo pri gostoti bakterijske suspenzije 1,0 McF in 5-urni inkubaciji 12 (38,7 %) izolatov odpornih proti cefoksitinu, pri 18 (58,1 %) izolatih rasti še nismo zaznali. Proti eritromicinu je bil 1 (3,2 %) izolat odporen, pri 17 (54,8%) izolatih prav tako še nismo zaznali rasti. Proti klindamicinu, linezolidu, ciprofloksacinu in TMP-SMX nismo zaznali odpornih izolatov. Rasti nismo zaznali pri 17–20 izolatih (54,8–64,5%).

Po 6-urni inkubaciji je bilo 19 (61,3 %) izolatov odpornih proti cefoksitinu, pri 5 (12,1 %) izolatih rasti še nismo zaznali. Proti eritromicinu in ciprofloksacinu sta bila odporna po 2 (6,4%) izolata, proti klindamicinu pa 1 (3,2%). Proti linezolidu in TMP-SMX nismo zaznali odpornih izolatov. Rasti nismo zaznali pri 4–6 izolatih (12,9–19,4%).

Po 7-urni inkubaciji je bilo proti cefoksitinu 20 (64,5 %) izolatov odpornih, pri 1 (3,2 %) izolatu rasti še nismo zaznali. Proti eritromicinu sta bila odporna 2 izolata (6,4 %), proti klindamicinu 1 (3,2 %), proti ciprofloksacinu 3 (9,7 %). Odpornih izolatov nismo zaznali proti linezolidu in TMP-SMX. Rasti nismo zaznali pri 1–2 izolatih (3,2–6,4%).

Po 18-urni inkubaciji in gostoti bakterijske suspenzije 1,0 McF smo dobili enake rezultate testiranja občutljivosti 31 bakterijskih izolatov *S. aureus* za izbrane antibiotike kot pri standardiziranem disk difuzijskem testu.

Preglednica 10: Število in deleži bakterije *S. aureus* občutljivih, zmerno odpornih in odpornih proti izbranim antibiotikom. Rezultati modificiranega disk difuzijskega testa z gostoto bakterijske suspenzije 1,0 McF po 5-, 6-, 7- in 18-urni inkubaciji.

Čas inkubacije	Antibiotik	Število testiranih izolatov	Število (%) S	Število (%) I	Število (%) R	Število (%) N
5 h						
	Cefoksitin	31	1 (3,2)	0 (0)	1 (38,7)	18 (58,1)
	Eritromicin	31	2 (6,5)	11 (35,5)	1 (3,2)	17 (54,8)
	Klindamicin	31	12 (38,7)	2 (6,5)	0 (0)	17 (54,8)
	Linezolid	31	14 (45,2)	0 (0)	0 (0)	17 (54,8)
	Ciprofloksacin	31	1 (3,2)	10 (32,3)	0 (0)	20 (64,5)
	TMP-SMX	31	14 (45,2)	0 (0)	0 (0)	17 (54,8)
6 h						
	Cefoksitin	31	7 (22,6)	0 (0)	19 (61,3)	5 (12,1)
	Eritromicin	31	11 (35,5)	14 (45,2)	2 (6,4)	4 (12,9)
	Klindamicin	31	22 (71)	4 (12,9)	1 (3,2)	4 (12,9)
	Linezolid	31	27 (87,1)	0 (0)	0 (0)	4 (12,9)
	Ciprofloksacin	31	4 (12,9)	19 (61,3)	2 (6,4)	6 (19,4)
	TMP-SMX	31	27 (87,1)	0 (0)	0 (0)	4 (12,9)
7 h						
	Cefoksitin	31	10 (32,3)	0 (0)	20 (64,5)	1 (3,2)
	Eritromicin	31	21 (76,7)	7 (22,7)	2 (6,4)	1 (3,2)
	Klindamicin	31	28 (90,4)	1 (3,2)	1 (3,2)	1 (3,2)
	Linezolid	31	30 (96,8)	0 (0)	0 (0)	1 (3,2)
	Ciprofloksacin	31	12 (38,7)	14 (45,2)	3 (9,7)	2 (6,4)
	TMP-SMX	31	30 (96,8)	0 (0)	0 (0)	1 (3,2)
18 h						
	Cefoksitin	31	28 (90,3)	0 (0)	3 (9,7)	0 (0)
	Eritromicin	31	28 (90,3)	0 (0)	3 (9,7)	0 (0)
	Klindamicin	31	30 (96,7)	0 (0)	1 (3,3)	0 (0)
	Linezolid	31	31 (100)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
	Ciprofloksacin	31	25 (80,6)	2 (6,5)	4 (12,9)	0 (0)
	TMP-SMX	31	31 (100)	0 (0)	0 (0)	0 (0)

TMP-SMX – trimetoprim-sulfametoksazol, S – občutljiv, I – zmerno odporen, R – odporen, N – ni zaznane rasti

Iz preglednice 11 je razvidno, da je bilo pri gostoti bakterijske suspenzije 2,0 McF in 5-urni inkubaciji 20 (64,5 %) izolatov odpornih proti cefoksitinu, pri 10 (32,2 %) izolatih rasti še nismo zaznali. Proti eritromicinu sta bila odporna 2 izolata (6,4 %), proti klindamicinu 1 (3,2 %), proti ciprofloksacinu 2 (6,4 %). Nismo zaznali odpornih sevov proti linezolidu in TMP-SMX. Rasti nismo zaznali pri 9–11 izolatih (29,1–35,5%).

Po 6-urni inkubaciji je bilo 26 (83,9 %) izolatov odpornih proti cefoksitinu. Proti eritromicinu sta bila odporna 2 izolata (6,4 %), proti klindamicinu 1 (3,2 %), proti

ciprofloksacinu 4 (12,9 %). Za linezolid in TMP-SMX je bilo vseh 31 (100 %) izolatov občutljivih.

Po 7-urni inkubaciji je bilo 18 (58,1 %) izolatov odpornih proti cefoksitinu. Proti eritromicinu sta bila odporna 2 izolata (6,4 %), proti klindamicinu 1 (3,2 %) ter proti ciprofloksacinu 4 (12,9 %). Za linezolid in TMP-SMX je bilo vseh 31 (100 %) izolatov občutljivih.

Po 18-urni inkubaciji in gostoti bakterijske suspenzije 2,0 McF smo dobili enake rezultate testiranja občutljivosti 31 bakterijskih izolatov *S. aureus* za izbrane antibiotike kot pri standardiziranem disk difuzijskem testu.

Preglednica 11: Število in deleži bakterije *S. aureus* občutljivih, zmerno odpornih in odpornih proti izbranim antibiotikom. Rezultati modificiranega disk difuzijskega testa z gostoto bakterijske suspenzije 2,0 McF po 5-, 6-, 7- in 18-urni inkubaciji.

Čas inkubacije	Antibiotik	Število testiranih izolatov	Število (%) S	Število (%) I	Število (%) R	Število (%) N
5 h						
	Cefoksitin	31	1 (3,2)	0 (0)	20 (64,5)	10 (32,3)
	Eritromicin	31	3 (9,7)	17 (54,8)	2 (6,4)	9 (29,1)
	Klindamicin	31	15 (48,4)	4 (12,9)	1 (3,2)	11 (35,5)
	Linezolid	31	21 (67,7)	0 (0)	0 (0)	10 (32,3)
	Ciprofloksacin	31	1(3,2)	17 (54,9)	2 (6,4)	11 (35,5)
	TMP-SMX	31	21 (67,7)	0 (0)	0 (0)	10 (32,3)
6 h						
	Cefoksitin	31	5 (16,1)	0 (0)	26 (83,9)	0 (0)
	Eritromicin	31	12 (38,7)	17 (54,9)	2 (6,4)	0 (0)
	Klindamicin	31	27 (87,1)	3 (9,7)	1 (3,2)	0 (0)
	Linezolid	31	31 (100)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
	Ciprofloksacin	31	5 (16,1)	22 (71)	4 (12,9)	0 (0)
	TMP-SMX	31	31 (100)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
7 h						
	Cefoksitin	31	13 (41,9)	0 (0)	18 (58,1)	0 (0)
	Eritromicin	31	20 (64,5)	9 (29,1)	2 (6,4)	0 (0)
	Klindamicin	31	30 (96,8)	0 (0)	1 (3,2)	0 (0)
	Linezolid	31	31 (100)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
	Ciprofloksacin	31	17 (54,9)	10 (32,3)	4 (12,9)	0 (0)
	TMP-SMX	31	31 (100)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
18 h						
	Cefoksitin	31	28 (90,3)	0 (0)	3 (9,7)	0 (0)
	Eritromicin	31	28 (90,3)	0 (0)	3 (9,7)	0 (0)
	Klindamicin	31	30 (96,7)	0 (0)	1 (3,3)	0 (0)
	Linezolid	31	31 (100)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
	Ciprofloksacin	31	25 (80,6)	2 (6,5)	4 (12,9)	0 (0)
	TMP-SMX	31	31 (100)	0 (0)	0 (0)	0 (0)

TMP-SMX – trimetoprim-sulfametoksazol, S – občutljiv, I – zmerno odporen, R – odporen, N – ni zaznane rasti

Iz preglednice 12 je razvidno, da je pri gostoti bakterijske suspenzije 4,0 McF in 5-urni inkubaciji bilo 29 (93,6 %) izolatov odpornih proti cefoksitinu, pri 2 (6,4 %) izolatih rasti še nismo zaznali. Proti eritromicinu sta bila odporna 2 izolata (6,4 %), proti klindamicinu 1 (3,2 %), proti ciprofloksacinu 3 (9,7 %). Proti linezolidu in TMP-SMX nismo zaznali odpornih sevov. Rasti nismo zaznali pri 2–4 izolatih (6,4–12,9%).

Po 6-urni inkubaciji je bilo 28 (90,3 %) izolatov odpornih proti cefoksitinu. Proti eritromicinu sta bila odporna 2 (6,4 %) izolata. Proti klindamicinu je bil odporen 1 izolat

(3,2 %), proti ciprofloksacinu 4 (12,9 %). Za linezolid in TMP-SMX je bilo vseh 31 (100 %) izolatov občutljivih.

Po 7-urni inkubaciji je bilo 15 (48,4 %) izolatov odpornih proti cefoksitinu. Proti eritromicinu so bili odporni 3 izolati (9,7 %), proti klindamicinu 1 (3,2 %), proti ciprofloksacinu 4 (12,9 %). Za linezolid in TMP-SMX je bilo vseh 31 (100 %) izolatov občutljivih.

Po 18-urni inkubaciji in gostoti bakterijske suspenzije 4,0 McF smo dobili enake rezultate testiranja občutljivosti 31 bakterijskih izolatov *S. aureus* za izbrane antibiotike kot pri standardiziranem disk difuzijskem testu.

Preglednica 12: Število in deleži bakterije *S. aureus* občutljivih, zmerno odpornih in odpornih proti izbranim antibiotikom. Rezultati modificiranega disk difuzijskega testa z gostoto bakterijske suspenzije 4,0 McF po 5-, 6-, 7- in 18-urni inkubaciji.

Čas inkubacije	Antibiotik	Število testiranih izolatov	Število (%) S	Število (%) I	Število (%) R	Število (%) N
5 h						
	Cefoksitin	31	0 (0)	0 (0)	29 (93,6)	2 (6,4)
	Eritromicin	31	7 (22,6)	20 (64,5)	2 (6,4)	2 (6,4)
	Klindamicin	31	18 (58,1)	9 (29)	1 (3,2)	3 (9,7)
	Linezolid	31	28 (90,3)	0 (0)	0 (0)	3 (9,7)
	Ciprofloksacin	31	1 (3,2)	23 (74,2)	3 (9,7)	4 (12,9)
	TMP-SMX	31	28 (90,3)	0 (0)	0 (0)	3 (9,7)
6 h						
	Cefoksitin	31	3 (9,7)	0 (0)	28 (90,3)	0 (0)
	Eritromicin	31	21 (76,8)	8 (25,8)	2 (6,4)	0 (0)
	Klindamicin	31	30 (96,8)	0 (0)	1 (3,2)	0 (0)
	Linezolid	31	31 (100)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
	Ciprofloksacin	31	4 (12,9)	23 (74,2)	4 (12,9)	0 (0)
	TMP-SMX	31	31 (100)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
7 h						
	Cefoksitin	31	16 (51,6)	0 (0)	15 (48,4)	0 (0)
	Eritromicin	31	27 (87,1)	1 (3,2)	3 (9,7)	0 (0)
	Klindamicin	31	30 (96,8)	0 (0)	1 (3,2)	0 (0)
	Linezolid	31	31 (100)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
	Ciprofloksacin	31	22 (71)	5 (16,1)	4 (12,9)	0 (0)
	TMP-SMX	31	31 (100)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
18 h						
	Cefoksitin	31	28 (90,3)	0 (0)	3 (9,7)	0 (0)
	Eritromicin	31	28 (90,3)	0 (0)	3 (9,7)	0 (0)
	Klindamicin	31	30 (96,7)	0 (0)	1 (3,3)	0 (0)
	Linezolid	31	31 (100)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
	Ciprofloksacin	31	25 (80,6)	2 (6,5)	4 (12,9)	0 (0)
	TMP-SMX	31	31 (100)	0 (0)	0 (0)	0 (0)

TMP-SMX – trimetoprim-sulfametoksazol, S – občutljiv, I – zmerno odporen, R – odporen, N – ni zaznane rasti

4.4 REZULTATI TESTIRANJA OBČUTLJIVOSTI KLINIČNIH IZOLATOV BAKTERIJE *S. pneumoniae* ZA IZBRANE ANTIBIOTIKE

V preglednici 13 so predstavljeni rezultati standardiziranega in modificiranega disk difuzijskega testa občutljivosti (različne gostote bakterijske suspenzije in različni časi inkubacije) kliničnih izolatov bakterije *S. pneumoniae* za izbrane antibiotike.

Iz preglednice 13 je razvidno, da pri gostoti bakterijske suspenzije 0,5 McF in 6-urni inkubaciji nismo zaznali odpornih izolatov proti oksacilinu, pri 24 (75 %) izolatih rasti še

nismo zaznali. Proti eritromicinu je bil odporen 1 izolat (3,1 %), proti TMP-SMX pa 2 (6,3 %). Proti klindamicinu in moksifloksacinu nismo zaznali odpornih sevov. Rasti nismo zaznali pri 24 izolatih (75 %) pri vseh antibiotikih.

Po 7-urni inkubaciji je bilo 5 (15,6 %) izolatov odpornih proti oksacilinu, pri 14 (43,8 %) izolatih rasti še nismo zaznali. Proti eritromicinu je bilo odpornih 6 izolatov (18,7 %), proti klindamicinu 5 (15,6 %), proti TMP-SMX 5 (15,6 %). Proti moksifloksacinu nismo zaznali odpornih izolatov. Rasti nismo zaznali pri 14–15 izolatih (43,8–46,9 %) pri vseh antibiotikih.

Iz preglednice 13 je prav tako razvidno, da je bilo pri testiranju občutljivosti 32 bakterijskih izolatov *S. pneumoniae* za izbrane antibiotike s standardiziranim disk difuzijskim testom (bakterijska suspenzija 0,5 McF in 24-urna inkubacija) 9 (28,1 %) izolatov odpornih proti oksacilinu. Proti eritromicinu je bilo odpornih 7 (21,9 %) izolatov. Proti klindamicinu je bilo odpornih 5 (15,6 %) izolatov. Za moksifloksacin je bilo vseh 31 (100 %) izolatov občutljivih. Proti TMP-SMX je bilo odpornih 7 (21,9 %) izolatov.

Preglednica 13: Število in deleži bakterije *S. pneumoniae* občutljivih, zmerno odpornih in odpornih proti izbranim antibiotikom. Rezultati modificiranega disk difuzijskega test z gostoto bakterijske suspenzije 0,5 McF po 6- in 7-urni inkubaciji ter standardiziranega disk difuzijskega test z gostoto bakterijske suspenzije 0,5 McF po 24-urni inkubaciji.

Čas inkubacije	Antibiotik	Število testiranih izolatov	Število (%) S	Število (%) I	Število (%) R	Število (%) N
6 h						
	Oksacilin	32	8 (25)	0 (0)	0 (0)	24 (75)
	Eritromicin	32	7 (21,9)	0 (0)	1 (3,1)	24 (75)
	Klindamicin	32	8 (25)	0 (0)	0 (0)	24 (75)
	Moksifloksacin	32	8 (25)	0 (0)	0 (0)	24 (75)
	TMP-SMX	32	5 (15,6)	1 (3,1)	2 (6,3)	24 (75)
7 h						
	Oksacilin	32	13 (40,6)	0 (0)	5 (15,6)	14 (43,8)
	Eritromicin	32	12 (37,5)	0 (0)	6 (18,7)	14 (43,8)
	Klindamicin	32	13 (40,6)	0 (0)	5 (15,6)	14 (43,8)
	Moksifloksacin	32	18 (56,3)	0 (0)	0 (0)	14 (43,8)
	TMP-SMX	32	11 (34,4)	1 (3,1)	5 (15,6)	15 (46,9)
24 h						
	Oksacilin	32	23 (71,9)	0 (0)	9 (28,1)	0 (0)
	Eritromicin	32	25 (78,1)	0 (0)	7 (21,9)	0 (0)
	Klindamicin	32	27 (84,4)	0 (0)	5 (15,6)	0 (0)
	Moksifloksacin	32	32 (100)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
	TMP-SMX	32	24 (75)	1 (3,1)	7 (21,9)	0 (0)

TMP-SMX, trimetoprim-sulfametoksazol, S – občutljiv, I – zmerno odporen, R – odporen, N – ni zaznane rasti, zelena rezultati standardiziranega disk difuzijskega testa

Iz preglednice 14 je razvidno, da je bil pri gostoti bakterijske suspenzije 1,0 McF in 6-urni inkubaciji 1 (3,1 %) izolat odporen proti oksacilinu, pri 21 (65,6 %) izolatih rasti še nismo zaznali. Proti eritromicinu je bil odporen 1 izolat (3,1 %), proti TMP-SMX 3 (9,4 %). Proti klindamicinu in moksifloksacinu nismo zaznali odpornih izolatov. Rasti nismo zaznali pri 21 izolatih (65,6 %) pri vseh antibiotikih.

Po 7-urni inkubaciji je bilo 6 (18,7 %) izolatov odpornih proti oksacilinu, pri 11 (34,4 %) izolatih rasti še nismo zaznali. Proti eritromicinu je bilo odpornih 6 izolatov (18,7 %), proti klindamicinu 5 (15,6 %), proti TMP-SMX 6 (18,7 %). Proti moksifloksacinu nismo zaznali odpornih izolatov. Pri 11 (34,4 %) izolatih še nismo zaznali rasti pri vseh antibiotikih.

Po 24-urni inkubaciji in gostoti bakterijske suspenzije 1,0 McF smo dobili enake rezultate testiranja občutljivosti 32 bakterijskih izolatov *S. pneumoniae* za izbrane antibiotike kot pri standardiziranem disk difuzijskem testu.

Preglednica 14: Število in deleži bakterije *S. pneumoniae* občutljivih, zmerno odpornih in odpornih proti izbranim antibiotikom. Rezultati modificiranega disk difuzijskega test z gostoto bakterijske suspenzije 1,0 McF po 6-, 7- in 24-urni inkubaciji.

Čas inkubacije	Antibiotik	Število testiranih izolatov	Število (%) S	Število (%) I	Število (%) R	Število (%) N
6 h						
	Oksacilin	32	10 (31,3)	0 (0)	1 (3,1)	21 (65,6)
	Eritromicin	32	10 (31,3)	0 (0)	1 (3,1)	21 (65,6)
	Klindamicin	32	11 (34,4)	0 (0)	0 (0)	21 (65,6)
	Moksifloksacin	32	11 (34,4)	0 (0)	0 (0)	21 (65,6)
	TMP-SMX	32	8 (25)	0 (0)	3 (9,4)	21 (65,6)
7 h						
	Oksacilin	32	15 (46,9)	0 (0)	6 (18,7)	11 (34,4)
	Eritromicin	32	15 (46,9)	0 (0)	6 (18,7)	11 (34,4)
	Klindamicin	32	16 (50)	0 (0)	5 (15,6)	11 (34,4)
	Moksifloksacin	32	21 (65,6)	0 (0)	0 (0)	11 (34,4)
	TMP-SMX	32	14 (43,8)	1 (3,1)	6 (18,7)	11 (34,4)
24 h						
	Oksacilin	32	23 (71,9)	0 (0)	9 (28,1)	0 (0)
	Eritromicin	32	25 (78,1)	0 (0)	7 (21,9)	0 (0)
	Klindamicin	32	27 (84,4)	0 (0)	5 (15,6)	0 (0)
	Moksifloksacin	32	32 (100)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
	TMP-SMX	32	24 (75)	1 (3,1)	7 (21,9)	0 (0)

TMP-SMX, trimetoprim-sulfametoksazol, S – občutljiv, I – zmerno odporen, R – odporen, N – ni zaznane rasti

Iz preglednice 15 je razvidno, da so pri gostoti bakterijske suspenzije 2,0 McF in 6-urni inkubaciji 4 (12,5 %) izolati odporni proti oksacilinu, pri 16 (50 %) izolatih rasti še nismo zaznali. Proti eritromicinu je bilo odpornih 5 izolatov (15,6 %), proti klindamicinu 4 (12,5 %) in proti TMP-SMX 5 (15,6%). Proti moksifloksacinu nismo zaznali odpornih sevov. Pri 16 (50 %) izolatih tudi še nismo zaznali rasti pri vseh antibiotikih.

Po 7-urni inkubaciji je bilo 6 (18,7 %) izolatov odpornih proti oksacilinu, pri 8 (25 %) izolatih rasti še nismo zaznali. Proti eritromicinu je bilo odpornih 6 izolatov (18,7 %), proti klindamicinu 5 (15,6 %), proti TMP-SMX 6 (18,7 %). Proti moksifloksacinu nismo zaznali odpornih izolatov. Pri 8 izolatih (25 %) tudi še nismo zaznali rasti pri vseh antibiotikih.

Po 24-urni inkubaciji in gostoti bakterijske suspenzije 2,0 McF smo dobili enake rezultate testiranja občutljivosti 32 bakterijskih izolatov *S. pneumoniae* za izbrane antibiotike kot pri standardiziranem disk difuzijskem testu.

Preglednica 15: Število in deleži bakterije *S. pneumoniae* občutljivih, zmerno odpornih in odpornih proti izbranim antibiotikom. Rezultati modificiranega disk difuzijskega test z gostoto bakterijske suspenzije 2,0 McF po 6-, 7- in 24-urni inkubaciji.

Čas inkubacije	Antibiotik	Število testiranih izolatov	Število (%) S	Število (%) I	Število (%) R	Število (%) N
6 h						
	Oksacilin	32	12 (37,5)	0 (0)	4 (12,5)	16 (50)
	Eritromicin	32	11 (34,4)	0 (0)	5 (15,6)	16 (50)
	Klindamicin	32	12 (37,5)	0 (0)	4 (12,5)	16 (50)
	Moksifloksacin	32	16 (50)	0 (0)	0 (0)	16 (50)
	TMP-SMX	32	10 (31,3)	1 (3,1)	5 (15,6)	16 (50)
7 h						
	Oksacilin	32	18 (56,3)	0 (0)	6 (18,7)	8 (25)
	Eritromicin	32	18 (56,3)	0 (0)	6 (18,7)	8 (25)
	Klindamicin	32	19 (59,4)	0 (0)	5 (15,6)	8 (25)
	Moksifloksacin	32	24 (75)	0 (0)	0 (0)	8 (25)
	TMP-SMX	32	17 (53,2)	1 (3,1)	6 (18,7)	8 (25)
24 h						
	Oksacilin	32	23 (71,9)	0 (0)	9 (28,1)	0 (0)
	Eritromicin	32	25 (78,1)	0 (0)	7 (21,9)	0 (0)
	Klindamicin	32	27 (84,4)	0 (0)	5 (15,6)	0 (0)
	Moksifloksacin	32	32 (100)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
	TMP-SMX	32	24 (75)	1 (3,1)	7 (21,9)	0 (0)

TMP-SMX, trimetoprim-sulfametoksazol, S – občutljiv, I – zmerno odporen, R – odporen, N – ni zaznane rasti

Iz preglednice 16 je razvidno, da je bilo pri gostoti bakterijske suspenzije 4,0 McF in 6-urni inkubaciji 5 (15,6 %) izolatov odpornih proti oksacilinu, pri 15 (46,9 %) izolatih rasti še nismo zaznali. Proti eritromicinu je bilo odpornih 6 izolatov (18,7 %), proti klindamicinu 5 (15,6 %) in proti TMP-SMX 5 (15,6 %). Proti moksifloksacinu nismo zaznali odpornih izolatov. Pri 15 izolatih (46,9 %) tudi še nismo zaznali rasti pri vseh antibiotikih.

Po 7-urni inkubaciji je bilo 6 (18,7 %) izolatov odpornih proti oksacilinu, pri 7 (21,9 %) izolatih rasti še nismo zaznali. Proti eritromicinu je bilo odpornih 6 izolatov (18,7 %), proti klindamicinu 5 (15,6 %) in proti TMP-SMX 6 (18,7 %). Proti moksifloksacinu nismo zaznali odpornih izolatov. Pri 7 (21,9 %) izolatih tudi še nismo zaznali rasti.

Po 24-urni inkubaciji in gostoti bakterijske suspenzije 4,0 McF smo dobili enake rezultate testiranja občutljivosti 32 bakterijskih izolatov *S. pneumoniae* za izbrane antibiotike kot pri standardiziranem disk difuzijskem testu.

Preglednica 16: Število in deleži bakterije *S. pneumoniae* občutljivih, zmerno odpornih in odpornih proti izbranim antibiotikom. Rezultati modificiranega disk difuzijskega test z gostoto bakterijske suspenzije 4,0 McF po 6-, 7- in 24-urni inkubaciji.

Čas inkubacije	Antibiotik	Število testiranih izolatov	Število (%) S	Število (%) I	Število (%) R	Število (%) N
6 h						
	Oksacilin	32	12 (37,5)	0 (0)	5 (15,6)	15 (46,9)
	Eritromicin	32	11 (34,4)	0 (0)	6 (18,7)	15 (46,9)
	Klindamicin	32	12 (37,5)	0 (0)	5 (15,6)	15 (46,9)
	Moksifloksacin	32	17 (53,1)	0 (0)	0 (0)	15 (46,9)
	TMP-SMX	32	11 (34,4)	1 (3,1)	5 (15,6)	15 (46,9)
7 h						
	Oksacilin	32	19 (59,4)	0 (0)	6 (18,7)	7 (21,9)
	Eritromicin	32	19 (59,4)	0 (0)	6 (18,7)	7 (21,9)
	Klindamicin	32	20 (62,5)	0 (0)	5 (15,6)	7 (21,9)
	Moksifloksacin	32	25 (78,1)	0 (0)	0 (0)	7 (21,9)
	TMP-SMX	32	18 (56,3)	1 (3,1)	6 (18,7)	7 (21,9)
24 h						
	Oksacilin	32	23 (71,9)	0 (0)	9 (28,1)	0 (0)
	Eritromicin	32	25 (78,1)	0 (0)	7 (21,9)	0 (0)
	Klindamicin	32	27 (84,4)	0 (0)	5 (15,6)	0 (0)
	Moksifloksacin	32	32 (100)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
	TMP-SMX	32	24 (75)	1 (3,1)	7 (21,9)	0 (0)

TMP-SMX, trimetoprim-sulfametoksazol, S – občutljiv, I – zmerno odporen, R – odporen, N – ni zaznane rasti

4.5 PRIMERJAVA REZULTATOV MODIFICIRANEGA DISK DIFUZIJSKEGA TESTA OBČUTLJIVOSTI KLINIČNIH IZOLATOV BAKTERIJE *S. aureus* S STANDARDIZIRANIM TESTOM

Občutljivost kliničnih izolatov bakterije *S. aureus* smo testirali s standardiziranim disk difuzijskim testom (gostota bakterijskih suspenzij 0,5 McF po 18 – urni inkubaciji) in z modificiranim disk difuzijskim testom, pri katerem smo spreminjali gostote bakterijskih suspenzij (0,5 McF, 1,0 McF, 2,0 McF in 4,0 McF) ter čas inkubacije (5 h, 6 h in 7 h). Dobljene rezultate smo primerjali med seboj.

Primerjava rezultatov standardiziranega disk difuzijskega testa in modificiranega disk difuzijskega testa z gostoto bakterijske suspenzije 0,5 McF po 5-urni inkubaciji (preglednica 17) je pokazala najnižje ujemanje občutljivosti za eritromicin (3,2 %) in najvišje ujemanje za linezolid (38,7 %) ter TMP-SMX (38,7 %). Po 6-urni inkubaciji je bilo najnižje ujemanje rezultatov občutljivosti za cefoksitin (22,6 %) in eritromicin (22,6

%) ter najvišje za linezolid (70,9 %). Po 7-urni inkubaciji je bilo najnižje ujemanje rezultatov občutljivosti za cefoksitin (32,3 %) in najvišje za linezolid (96,8 %).

Preglednica 17: Ujemanje rezultatov modificiranega disk difuzijskega testa občutljivosti bakterije *S. aureus* (gostota bakterijske suspenzije 0,5 McF po 5-, 6- in 7-urni inkubaciji) s standardiziranim testom.

Čas inkubacije	Antibiotik	Število izolatov (% od vseh)				Število ujemajočih rezultatov (%)
		Testirano z obema testoma	S (pri obeh testih)	I (pri obeh testih)	R (pri obeh testih)	
5 h						
	Cefoksitin	31 (100)	1 (3,2)	0 (0)	3 (9,7)	4 (12,9)
	Eritromicin	31 (100)	1 (3,2)	0 (0)	0 (0)	1 (3,2)
	Klindamicin	31 (100)	3 (9,7)	0 (0)	0 (0)	3 (9,7)
	Linezolid	31 (100)	12 (38,7)	0 (0)	0 (0)	12 (38,7)
	Ciprofloksacin	31 (100)	0 (0)	2 (6,5)	0 (0)	2 (6,5)
	TMP-SMX	31 (100)	12 (38,7)	0 (0)	0 (0)	12 (38,7)
6 h						
	Cefoksitin	31 (100)	4 (12,9)	0 (0)	3 (9,7)	7 (22,6)
	Eritromicin	31 (100)	7 (22,6)	0 (0)	0 (0)	7 (22,6)
	Klindamicin	31 (100)	17 (54,8)	0 (0)	0 (0)	17 (54,8)
	Linezolid	31 (100)	22 (70,9)	0 (0)	0 (0)	22 (70,9)
	Ciprofloksacin	31 (100)	3 (9,7)	2 (6,5)	1 (3,2)	3 (9,7)
	TMP-SMX	31 (100)	21 (67,1)	0 (0)	0 (0)	21 (67,1)
7 h						
	Cefoksitin	31 (100)	7 (22,6)	0 (0)	3 (9,7)	10 (32,3)
	Eritromicin	31 (100)	16 (51,6)	0 (0)	2 (6,5)	17 (54,8)
	Klindamicin	31 (100)	26 (83,9)	0 (0)	1 (3,2)	27 (87,1)
	Linezolid	31 (100)	30 (96,8)	0 (0)	0 (0)	30 (96,8)
	Ciprofloksacin	31 (100)	12 (38,7)	2 (6,5)	1 (3,2)	15 (48,4)
	TMP-SMX	31 (100)	29 (93,3)	0 (0)	0 (0)	29 (93,3)
TMP-SMX, trimetoprim-sulfametoksazol, S – občutljiv, I – zmerno odporen, R – odporen						

Primerjava rezultatov standardiziranega disk difuzijskega testa in modificiranega disk difuzijskega testa z gostoto bakterijske suspenzije 1,0 McF po 5-urni inkubaciji (preglednica 18) je pokazala najnižje ujemanje občutljivosti za eritromicin (9,7 %) in ciprofloksacin (9,7 %) ter najvišje ujemanje za linezolid (45,2 %) in TMP-SMX (45,2 %). Po 6-urni inkubaciji je bilo najnižje ujemanje rezultatov občutljivosti za cefoksitin (32,3 %) in najvišje za linezolid (87,1 %) ter TMP-SMX (87,1 %). Po 7-urni inkubaciji je bilo najnižje ujemanje rezultatov občutljivosti za cefoksitin (41,9 %) in najvišje za linezolid (96,8 %) ter TMP-SMX (96,8 %).

Preglednica 18: Ujemanje rezultatov modificiranega disk difuzijskega testa občutljivosti bakterije *S. aureus* (gostota bakterijske suspenzije 1,0 McF po 5-, 6- in 7-urni inkubaciji) s standardiziranim testom.

Čas inkubacije	Antibiotik	Število izolatov (% od vseh)				Število ujemajočih rezultatov (%)
		Testirano z obema testoma	S (pri obeh testih)	I (pri obeh testih)	R (pri obeh testih)	
5 h						
	Cefoksitin	31 (100)	1 (3,2)	0 (0)	3 (9,7)	4 (12,9)
	Eritromicin	31 (100)	2 (6,5)	0 (0)	1 (3,2)	3 (9,7)
	Klindamicin	31 (100)	12 (38,7)	0 (0)	0 (0)	12 (38,7)
	Linezolid	31 (100)	14 (45,2)	0 (0)	0 (0)	14 (45,2)
	Ciprofloksacin	31 (100)	1 (3,2)	2 (6,5)	0 (0)	3 (9,7)
	TMP-SMX	31 (100)	14 (45,2)	0 (0)	0 (0)	14 (45,2)
6 h						
	Cefoksitin	31 (100)	7 (22,6)	0 (0)	3 (9,7)	10 (32,3)
	Eritromicin	31 (100)	11 (35,5)	0 (0)	2 (6,5)	13 (41,9)
	Klindamicin	31 (100)	22 (71)	0 (0)	1 (3,3)	23 (74,2)
	Linezolid	31 (100)	27 (87,1)	0 (0)	0 (0)	27 (87,1)
	Ciprofloksacin	31 (100)	4 (12,9)	2 (6,5)	2 (6,5)	8 (25,8)
	TMP-SMX	31 (100)	27 (87,1)	0 (0)	0 (0)	27 (87,1)
7 h						
	Cefoksitin	31 (100)	10 (32,3)	0 (0)	3 (9,7)	13 (41,9)
	Eritromicin	31 (100)	21 (76,7)	0 (0)	2 (6,5)	23 (74,2)
	Klindamicin	31 (100)	28 (90,4)	0 (0)	1 (3,3)	29 (93,5)
	Linezolid	31 (100)	30 (96,8)	0 (0)	0 (0)	30 (96,8)
	Ciprofloksacin	31 (100)	12 (38,7)	2 (6,5)	2 (6,5)	14 (45,2)
	TMP-SMX	31 (100)	30 (96,8)	0 (0)	0 (0)	30 (96,8)
TMP-SMX, trimetoprim-sulfametoksazol, S – občutljiv, I – zmerno odporen, R - odporen						

Primerjava rezultatov standardiziranega disk difuzijskega testa in modificiranega disk difuzijskega testa z gostoto bakterijske suspenzije 2,0 McF po 5-urni inkubaciji (preglednica 19) je pokazala najnižje ujemanje občutljivosti za cefoksitin (12,9 %) in najvišje za linezolid (67,7 %) ter TMP-SMX (67,7 %). Po 6-urni inkubaciji je bilo najnižje ujemanje rezultatov občutljivosti za cefoksitin (25,8 %) in 100 % ujemanje za linezolid in TMP-SMX. Po 7-urni inkubaciji je bilo najnižje ujemanje rezultatov občutljivosti za cefoksitin (51,6 %) in 100 % ujemanje za linezolid in TMP-SMX.

Preglednica 19: Ujemanje rezultatov modificiranega disk difuzijskega testa občutljivosti bakterije *S. aureus* (gostota bakterijske suspenzije 2,0 McF po 5-, 6- in 7-urni inkubaciji) s standardiziranim testom.

Čas inkubacije	Antibiotik	Število izolatov (% od vseh)				Število ujemajočih rezultatov (%)
		Testirano z obema testoma	S (pri obeh testih)	I (pri obeh testih)	R (pri obeh testih)	
5 h						
	Cefoksitin	31 (100)	1 (3,2)	0 (0)	3 (9,7)	4 (12,9)
	Eritromicin	31 (100)	3 (9,7)	0 (0)	3 (9,7)	6 (19,4)
	Klindamicin	31 (100)	15 (48,4)	0 (0)	1 (3,3)	16 (51,6)
	Linezolid	31 (100)	21 (67,7)	0 (0)	0 (0)	21 (67,7)
	Ciprofloksacin	31 (100)	1 (3,2)	2 (6,5)	2 (6,5)	5 (16,1)
	TMP-SMX	31 (100)	21 (67,7)	0 (0)	0 (0)	21 (67,7)
6 h						
	Cefoksitin	31 (100)	5 (16,1)	0 (0)	3 (9,7)	8 (25,8)
	Eritromicin	31 (100)	12 (38,7)	0 (0)	2 (6,4)	14 (45,2)
	Klindamicin	31 (100)	27 (87,1)	0 (0)	1 (3,2)	28 (90,3)
	Linezolid	31 (100)	31 (100)	0 (0)	0 (0)	31 (100)
	Ciprofloksacin	31 (100)	5 (16,1)	2 (6,5)	4 (12,9)	11 (35,5)
	TMP-SMX	31 (100)	31 (100)	0 (0)	0 (0)	31 (100)
7 h						
	Cefoksitin	31 (100)	13 (41,9)	0 (0)	3 (9,7)	16 (51,6)
	Eritromicin	31 (100)	20 (64,5)	0 (0)	2 (6,4)	22 (71)
	Klindamicin	31 (100)	30 (96,8)	0 (0)	1 (3,2)	31 (100)
	Linezolid	31 (100)	31 (100)	0 (0)	0 (0)	31 (100)
	Ciprofloksacin	31 (100)	17 (54,9)	2 (6,5)	4 (12,9)	21 (67,7)
	TMP-SMX	31 (100)	31 (100)	0 (0)	0 (0)	31 (100)
TMP-SMX – trimetoprim-sulfametoksazol, S – občutljiv, I – zmerno odporen, R - odporen						

Primerjava rezultatov standardiziranega disk difuzijskega testa in modificiranega disk difuzijskega testa z gostoto bakterijske suspenzije 4,0 McF po 5-urni inkubaciji (preglednica 20) je pokazala najnižje ujemanje občutljivosti za cefoksitin (9,7 %) in najvišje za linezolid (90,3 %) ter TMP-SMX (90,3 %). Po 6-urni inkubaciji je bilo najnižje ujemanje rezultatov občutljivosti za cefoksitin (19,4 %) in 100 % za linezolid ter TMP-SMX. Po 7-urni inkubaciji je bilo najnižje ujemanje rezultatov občutljivosti za cefoksitin (61,3 %) in 100 % za linezolid ter TMP-SMX.

Preglednica 20: Ujemanje rezultatov modificiranega disk difuzijskega testa občutljivosti bakterije *S. aureus* (gostota bakterijske suspenzije 4,0 McF po 5-, 6- in 7-urni inkubaciji) s standardiziranim testom.

Čas inkubacije	Antibiotik	Število izolatov (% od vseh)				Število ujemajočih rezultatov (%)
		Testirano z obema testoma	S (pri obeh testih)	I (pri obeh testih)	R (pri obeh testih)	
5 h						
	Cefoksitin	31 (100)	0(0)	0 (0)	3 (9,7)	3 (9,7)
	Eritromicin	31 (100)	7 (22,6)	0 (0)	2 (6,4)	9 (29)
	Klindamicin	31 (100)	18 (58,1)	0 (0)	1 (3,2)	19 (61,3)
	Linezolid	31 (100)	28 (90,3)	0 (0)	0 (0)	28 (90,3)
	Ciprofloksacin	31 (100)	1 (3,2)	2 (6,5)	3 (9,7)	6 (19,4)
	TMP-SMX	31 (100)	28 (90,3)	0 (0)	0 (0)	28 (90,3)
6 h						
	Cefoksitin	31 (100)	3 (9,7)	0 (0)	3 (9,7)	6 (19,4)
	Eritromicin	31 (100)	21 (76,8)	0 (0)	2 (6,4)	23 (74,2)
	Klindamicin	31 (100)	30 (96,8)	0 (0)	1 (3,2)	31 (100)
	Linezolid	31 (100)	31 (100)	0 (0)	0 (0)	31 (100)
	Ciprofloksacin	31 (100)	4 (12,9)	2 (6,5)	4 (12,9)	10 (32,3)
	TMP-SMX	31 (100)	31 (100)	0 (0)	0 (0)	31 (100)
7 h						
	Cefoksitin	31 (100)	16 (51,6)	0 (0)	3 (9,7)	19 (61,3)
	Eritromicin	31 (100)	27 (87,1)	0 (0)	3 (9,7)	30 (96,8)
	Klindamicin	31 (100)	30 (96,8)	0 (0)	1 (3,2)	31 (100)
	Linezolid	31 (100)	31 (100)	0 (0)	0 (0)	31 (100)
	Ciprofloksacin	31 (100)	22 (71)	2 (6,5)	4 (12,9)	28 (90,3)
	TMP-SMX	31 (100)	31 (100)	0 (0)	0 (0)	31 (100)
TMP-SMX – trimetoprim-sulfametoksazol, S – občutljiv, I – zmerno odporen, R - odporen						

4.6 PRIMERJAVA REZULTATOV MODIFICIRANEGA DISK DIFUZIJSKEGA TESTA OBČUTLJIVOSTI KLINIČNIH IZOLATOV BAKTERIJE *S. pneumoniae* S STANDARDIZIRANIM TESTOM

Občutljivost kliničnih izolatov bakterije *S. pneumoniae* smo testirali s standardiziranim disk difuzijskim testom (gostota bakterijskih suspenzij 0,5 McF po 24-urni inkubaciji) in z modificiranim disk difuzijskim testom, pri katerem smo spreminjali gostote bakterijskih suspenzij (0,5 McF, 1,0 McF, 2,0 McF in 4,0 McF) ter čas inkubacije (6 h in 7 h). Dobljene rezultate smo primerjali med sabo.

Primerjava rezultatov standardiziranega disk difuzijskega testa in modificiranega disk difuzijskega testa z gostoto bakterijske suspenzije 0,5 McF po 6-urni inkubaciji (preglednica 21) je pokazala 25 % ujemanje pri vseh antibiotikih. Po 7-urni inkubaciji je

bilo najnižje ujemanje rezultatov občutljivosti za TMP-SMX (53,1 %) in 56,3 % za oksacilin, eritromicin, klindamicin in moksifloksacin.

Preglednica 21: Ujemanje rezultatov modificiranega disk difuzijskega testa občutljivosti bakterije *S. pneumoniae* (gostota bakterijske suspenzije 0,5 McF po 6- in 7-urni inkubaciji) s standardiziranim testom.

Čas inkubacije	Antibiotik	Število izolatov (% od vseh)				Število ujemajočih rezultatov (%)
		Testirano z obema testoma	S (pri obeh testih)	I (pri obeh testih)	R (pri obeh testih)	
6 h						
	Oksacilin	32 (100)	8 (25)	0 (0)	0 (0)	8 (25)
	Eritromicin	32 (100)	7 (21,9)	0 (0)	1 (3,1)	8 (25)
	Klindamicin	32 (100)	8 (25)	0 (0)	0 (0)	8 (25)
	Moksifloksacin	32 (100)	8 (25)	0 (0)	0 (0)	8 (25)
	TMP-SMX	32 (100)	5 (15,6)	1 (3,1)	2 (6,3)	8 (25)
7 h						
	Oksacilin	32 (100)	13 (40,6)	0 (0)	5 (15,6)	18 (56,3)
	Eritromicin	32 (100)	12 (37,5)	0 (0)	6 (18,7)	18 (56,3)
	Klindamicin	32 (100)	13 (40,6)	0 (0)	5 (15,6)	18 (56,3)
	Moksifloksacin	32 (100)	18 (56,3)	0 (0)	0 (0)	18 (56,3)
	TMP-SMX	32 (100)	11 (34,4)	1 (3,1)	5 (15,6)	17 (53,1)
TMP-SMX – trimetoprim-sulfametoksazol, S – občutljiv, I – zmerno odporen, R - odporen						

Primerjava rezultatov standardiziranega disk difuzijskega testa in modificiranega disk difuzijskega testa z gostoto bakterijske suspenzije 1,0 McF po 6-urni inkubaciji (preglednica 22) je pokazala 34,4 % za vse testirane antibiotike. Po 7-urni inkubaciji je bilo ujemanje rezultatov občutljivosti 65,6 % za vse testirane antibiotike.

Preglednica 22: Ujemanje rezultatov modificiranega disk difuzijskega testa občutljivosti bakterije *S. pneumoniae* (gostota bakterijske suspenzije 1,0 McF po 6- in 7-urni inkubaciji) s standardiziranim testom.

Čas inkubacije	Antibiotik	Število izolatov (% od vseh)				Število ujemajočih rezultatov (%)
		Testirano z obema testoma	S (pri obeh testih)	I (pri obeh testih)	R (pri obeh testih)	
6 h						
	Oksacilin	32 (100)	10 (31,3)	0 (0)	1 (3,1)	11 (34,4)
	Eritromicin	32 (100)	10 (31,3)	0 (0)	1 (3,1)	11 (34,4)
	Klindamicin	32 (100)	11 (34,4)	0 (0)	0 (0)	11 (34,4)
	Moksifloksacin	32 (100)	11 (34,4)	0 (0)	0 (0)	11 (34,4)
	TMP-SMX	32 (100)	8 (25)	0 (0)	3 (9,4)	11 (34,4)
7 h						
	Oksacilin	32 (100)	15 (46,9)	0 (0)	6 (18,7)	21 (65,6)
	Eritromicin	32 (100)	15 (46,9)	0 (0)	6 (18,7)	21 (65,6)
	Klindamicin	32 (100)	16 (50)	0 (0)	5 (15,6)	21 (65,6)
	Moksifloksacin	32 (100)	21 (65,6)	0 (0)	0 (0)	21 (65,6)
	TMP-SMX	32 (100)	14 (43,8)	1 (3,1)	6 (18,7)	21 (65,6)
TMP-SMX – trimetoprim-sulfametoksazol, S – občutljiv, I – zmerno odporen, R - odporen						

Primerjava rezultatov standardiziranega disk difuzijskega testa in modificiranega disk difuzijskega testa z gostoto bakterijske suspenzije 2,0 McF po 6-urni inkubaciji (preglednica 23) je pokazala enako ujemanje (50 %) za vse testirane antibiotike. Po 7-urni inkubaciji je bilo ujemanje rezultatov občutljivosti 75 % za vse testirane antibiotike.

Čas inkubacije	Antibiotik	Število izolatov (% od vseh)				Število ujemajočih rezultatov (%)
		Testirano z obema testoma	S (pri obeh testih)	I (pri obeh testih)	R (pri obeh testih)	
6 h						
	Oksacilin	32 (100)	12 (37,5)	0 (0)	4 (12,5)	16 (50)
	Eritromicin	32 (100)	11 (34,4)	0 (0)	5 (15,6)	16 (50)
	Klindamicin	32 (100)	12 (37,5)	0 (0)	4 (12,5)	16 (50)
	Moksifloksacin	32 (100)	16 (50)	0 (0)	0 (0)	16 (50)
	TMP-SMX	32 (100)	10 (31,3)	1 (3,1)	5 (15,6)	16 (50)
7 h						
	Oksacilin	32 (100)	18 (56,3)	0 (0)	6 (18,7)	24 (75)
	Eritromicin	32 (100)	18 (56,3)	0 (0)	6 (18,7)	24 (75)
	Klindamicin	32 (100)	19 (59,4)	0 (0)	5 (15,6)	24 (75)
	Moksifloksacin	32 (100)	24 (75)	0 (0)	0 (0)	24 (75)
	TMP-SMX	32 (100)	17 (53,2)	1 (3,1)	6 (18,7)	24 (75)

TMP-SMX – trimetoprim-sulfametoksazol, S – občutljiv, I – zmerno odporen, R - odporen

Preglednica 24: Ujemanje rezultatov modificiranega disk difuzijskega testa občutljivosti bakterije *S. pneumoniae* (gostota bakterijske suspenzije 4,0 McF po 6- in 7-urni inkubaciji) s standardiziranim testom.

Čas inkubacije	Antibiotik	Število izolatov (% od vseh)				Število ujemajočih rezultatov (%)
		Testirano z obema testoma	S (pri obeh testih)	I (pri obeh testih)	R (pri obeh testih)	
6 h						
	Oksacilin	32 (100)	12 (37,5)	0 (0)	5 (15,6)	17 (53,1)
	Eritromicin	32 (100)	11 (34,4)	0 (0)	6 (18,7)	17 (53,1)
	Klindamicin	32 (100)	12 (37,5)	0 (0)	5 (15,6)	17 (53,1)
	Moksifloksacin	32 (100)	17 (53,1)	0 (0)	0 (0)	17 (53,1)
	TMP-SMX	32 (100)	11 (34,4)	1 (3,1)	5 (15,6)	17 (53,1)
7 h						
	Oksacilin	32 (100)	19 (59,4)	0 (0)	6 (18,7)	25 (78,1)
	Eritromicin	32 (100)	19 (59,4)	0 (0)	6 (18,7)	25 (78,1)
	Klindamicin	32 (100)	20 (62,5)	0 (0)	5 (15,6)	25 (78,1)
	Moksifloksacin	32 (100)	25 (78,1)	0 (0)	0 (0)	25 (78,1)
	TMP-SMX	32 (100)	18 (56,3)	1 (3,1)	6 (18,7)	25 (78,1)

TMP-SMX – trimetoprim-sulfametoksazol, S – občutljiv, I – zmerno odporen, R - odporen

5 RAZPRAVA

5.1 RAZPRAVA

Bakterija *S. aureus* povzroča okužbe kože, mehkega tkiva, kosti, sklepov, pljuč, ČŽS in kolonizira proteze ter katetre. Danes zaradi visoke pojavnosti, obolenosti in odpornosti proti antibiotikom predstavlja zdravljenje teh okužb vedno večji problem (Bomberberg in Boyd, 2005).

Bakterija *S. pneumoniae* je najpogostejša povzročiteljica zunajbolnišnično pridobljenih okužb dihal, ki se večinoma zdravijo izkustveno ter vodilna povzročiteljica obolenosti in umrljivosti po vsem svetu (Appelbaum, 2000).

Laboratorijski podatki testiranja občutljivosti bakterij za antibiotike so običajno prvo opozorilo, da se delež odpornih bakterijskih sevov zvišuje, zato je izredno pomembno redno testiranje izolatov ter spremljanje novega pojavljanja in širjenja odpornih sevov (Tenover, 2010).

V naši raziskavi smo ugotovili, da se delež ujemanja rezultatov testiranja občutljivosti kliničnih izolatov bakterije *S. aureus* med standardiziranim disk difuzijskim testom in modificiranim disk difuzijskim testom z višanjem gostote bakterijske suspenzije za izbrane antibiotike ter daljšanjem časa inkubacije viša (preglednice 17, 18, 19, 20). Najvišji delež ujemanja rezultatov pri testiranju občutljivosti med standardiziranim in modificiranim disk difuzijskim testom z gostoto bakterijske suspenzije 0,5 McF je bil po 7-urni inkubaciji za klindamicin 87,1 %, linezolid 96,8 % in TMP-SMX 93,3 %. Pri teh pogojih je bila bakterijska rast dovolj močna, da smo lahko določili rob zaviralne cone in rezultati občutljivosti za linezolid in TMP-SMX so primerljivi s standardizirano disk difuzijsko metodo. Podobne rezultate so dobili tudi Coyle in sod. (1984), ki so izvedli hitro testiranje občutljivosti bakterij iz krvnih kultur za antibiotike, pri čemer so vzorec iz pozitivnih krvnih kultur brez predhodnega določanja gostote bakterijske suspenzije neposredno inokulirali in rezultate disk difuzijskega testa odčitali po 4- in 6-urni inkubaciji. Rezultate so primerjali s standardiziranim disk difuzijskim testom, ki so ga izvedli po navodilih

Nacionalnega komiteja za klinične laboratorijske standarde (angl. National Committee for Clinical Laboratory Standards – NCCLS), zdaj CLSI. Njihova študija je tako kot naša pokazala, da se je z daljšanjem inkubacijskega časa večalo ujemanje rezultatov občutljivosti med obema metodama. Po 6-urni inkubaciji je bilo v njihovi študiji ujemanje rezultatov občutljivosti med obema metodama za klindamicin 97,2 % in eritromicin 88,7 %. V naši študiji smo podobne rezultate (klindamicin 100 %, eritromicin 74,2 %) dobili po enakem času inkubacije in pri gostoti bakterijske suspenzije 4.0 McF. Klugova (1975) študija je prav tako pokazala, da se lahko po 4-urni inkubaciji pri 8–60 % izolatov zazna rast in da je po 6- in 8- urni inkubaciji 89–98 % ujemanje rezultatov občutljivosti s standardizirano metodo.

Kljub temu da so rezultati občutljivosti pri krajših časih inkubacije primerljivi s standardizirano metodo, hitro testiranje občutljivosti bakterijskih izolatov za antibiotike v praksi ni zaživel. Vzrok temu je dinamika dela v laboratoriju, saj v večini primerov, razen, če so plošče inokulirane v začetku delovnega časa, ni možno pridobiti rezultatov v zadovoljivem času, da bi bili uporabni še v istem dnevu. Lahko pa se modificirana metoda uporabi kot dopolnilo k standardni metodi (Turnidge in Bell, 2005).

Pri gostoti bakterijske suspenzije 1,0 McF je bil najvišji delež ujemanja rezultatov občutljivosti po 7-urni inkubaciji za klindamicin 93,5 %, linezolid 96,8 % in TMP-SMX 96,8 %. Višja gostota bakterijske suspenzije je omogočila močnejšo bakterijsko rast in tako višji delež ujemanja rezultatov občutljivosti za klindamicin in TMP-SMX ter s tem večjo primerljivost s standardizirano disk difuzijsko metodo. Za linezolid je delež ujemanja rezultatov občutljivosti ostal nespremenjen, kar pomeni, da povišanje bakterijske suspenzije na 1 McF ni vplivalo na povečanje ujemanja rezultatov. Acar in Goldstein (1996) navajata, da so potrebni dodatni pogoji za dobro ujemanje s standardizirano metodo, in sicer petrijevke predhodno segrete na 37 ° C, gostota bakterijske suspenzije 1,0 McF, kar se ujema z našimi rezultati in dodatek 5 % defibrinirane ovčje krvi v MHA za vse po Gramu pozitivne koke.

Pri gostoti bakterijske suspenzije 2,0 McF je bil visok delež ujemanja rezultatov dosežen že po 6-urni inkubaciji za klindamicin (90,3 %) in linezolid (100 %) ter TMP-SMX (100

%). Iz teh rezultatov lahko razberemo, da je bila dovolj močna bakterijska rast dosežena že pri krajšem času inkubacije (6 h), vendar pri višji gostoti bakterijske suspenzije (2,0 McF). Za linezolid in TMP-SMX je ujemanje rezultatov občutljivosti 100 %, kar pomeni, da sta metodi primerljivi. Po 7-urni inkubaciji je bilo ujemanje rezultatov občutljivosti 100 % za klindamicin, linezolid in TMP-SMX. Pri teh pogojih je bila bakterijska rast dovolj močna, da smo lahko z gotovostjo določili rob zaviralne cone. Rezultati občutljivosti za te antibiotike so pod omenjenimi pogoji primerljivi z rezultati standardizirane disk difuzijske metode.

Pri gostoti bakterijske suspenzije 4,0 McF je bil visok delež ujemanja rezultatov občutljivosti dosežen že po 5-urni inkubaciji za linezolid (90,3 %) in TMP-SMX (90,3 %). Ujemanje rezultatov govori v prid primerljivosti z rezultati standardiziranega disk difuzijskega testa. Po 6-urni inkubaciji je bilo ujemanje rezultatov 100 % za klindamicin, linezolid ter TMP-SMX. Po 7-urni inkubaciji je bilo visoko ujemanje rezultatov doseženo za eritromicin 96,8 % in ciprofloksacin 90,3 % ter 100 % ujemanje za klindamicin, linezolid, TMP-SMX. Po 6- in 7-urni inkubaciji in gostoti bakterijske suspenzije 4,0 McF je bila bakterijska rast dovolj močna, da smo lahko z gotovostjo določili rob zaviralne cone za klindamicin, linezolid in TMP-SMX. Ker so se rezultati občutljivosti 100 % ujemali, lahko trdimo, da sta metodi primerljivi. Po 7-urni inkubaciji so se bakterije primerno namnožile tudi pri testiranju občutljivosti za eritromicin in ciprofloksacin, da smo lahko določili rob zaviralne cone. Rezultati so pokazali, da so rezultati ujemanja za eritromicin in ciprofloksacin primerljivi s standardizirano disk difuzijsko metodo. Višja gostota bakterijske populacije omogoči, da se kritična meja bakterijske populacije dosež prej kot pri nižji gostoti bakterijske populacije v enakem času (Turnidge in Bell, 2005). To smo pokazali tudi v naši študiji.

Pri testiranju občutljivosti za cefoksitin se je delež ujemanja prav tako z daljšanjem časa inkubacije in višjo gostoto bakterijske suspenzije višal, vendar niti po 7-urni inkubaciji in gostoti bakterijske suspenzije 4,0 McF ni presegel 61,3 % ujemanja z rezultatom standardiziranega disk difuzijskega testa, zato menimo, da za cefoksitin rezultati niso primerljivi. Razlog takšnemu neujemanju rezultatov občutljivosti za cefoksitin bi lahko bila šibka rast, zaradi česar ni moč z gotovostjo določiti roba zaviralne cone.

Z obema metodama smo testirali tudi referenčni sev bakterije *S. aureus* ATTC 25923, pri katerem smo ugotovili, da meritve ustrezajo določenemu razponu zaviralnih con, ki so podane v CLSI (2008), zato lahko rečemo, da smo pravilno izvedli test.

V naši raziskavi smo prav tako ugotovili, da se delež ujemanja rezultatov testiranja občutljivosti kliničnih izolatov bakterije *S. pneumoniae* med standardiziranim disk difuzijskim testom in modificiranim disk difuzijskim testom z višanjem gostote bakterijske suspenzije za izbrane antibiotike z daljšanjem časa inkubacije viša (preglednice 21, 22, 23, 24). Najvišji delež ujemanja rezultatov pri testiranju občutljivosti med standardiziranim in modificiranim disk difuzijskim testom z gostoto bakterijske suspenzije 0,5 McF po 7-urni inkubaciji je za vse testirane antibiotike enak (56,3 %), razen za TMP-SMX (53,1 %). Pri gostoti bakterijske suspenzije 1,0 McF je bil pri 7-urni inkubaciji delež ujemanja za vse izbrane antibiotike enak (65,6 %). Pri gostoti bakterijske suspenzije 2,0 McF je bil pri 7-urni inkubaciji delež ujemanja za vse izbrane antibiotike enak (75 %). Pri gostoti bakterijske suspenzije 4,0 McF je bil pri 7-urni inkubaciji prav tako delež ujemanja za vse izbrane antibiotike enak (78,1 %).

Deleži ujemanja rezultatov testiranja občutljivosti kliničnih izolatov bakterije *S. pneumoniae* med standardiziranim in modificiranim disk difuzijskim testom za izbrane antibiotike se z višanjem gostote bakterijske suspenzije in daljšanjem časa inkubacije višajo, vendar niti pri 7-urni inkubaciji in gostoti bakterijske suspenzije 4,0 McF ne presežejo 78,1 % ujemanja, zato menimo, da so rezultati obeh testov le pogojno primerljivi. Takšni rezultati so bili pričakovani, saj je bakterija *S. pneumoniae* zahtevnejša za gojenje. Za pridobitev zanesljivejših rezultatov testiranja občutljivosti za antibiotike potrebuje obogateno gojišče, atmosfero z dodanih 5 % CO₂ in daljši čas inkubacije (18–24 ur), za razliko od hitro rastočih bakterij pri katerih lahko rezultate odčitamo že po 16-urni inkubaciji (Jorgensen in Ferraro, 2000). Zaradi počasnejše rasti bakterija potrebuje več časa, da doseže dovolj močno rast. Prav zaradi tega pa ni mogoče z gotovostjo določiti roba zaviralne cone. Za pravilno interpretacijo rezultatov potrebujemo enakomerno rast, ki omogoča nastanek pravih robov zaviralnih con, kar pa je bilo v našem primeru doseženo le pogojno pri najdaljšem času inkubacije (7 h) in najvišji gostoti bakterijske suspenzije (4,0 McF).

Z obema metodama smo testirali tudi referenčni sev bakterije *S. pneumoniae* ATTC 49619, pri katerem smo ugotovili, da meritve ustrezajo določenemu razponu zaviralnih con, ki so podane v CLSI (2008). Ustreznost meritev nam pove, da smo pravilno izvedli test.

5.2 SKLEPI

- Deleži ujemanja rezultatov testiranja občutljivosti kliničnih izolatov bakterij *S. aureus* in *S. pneumoniae* med standardiziranim disk difuzijskim testom in modificiranim disk difuzijskim testom (gostote bakterijskih suspenzij 0,5 McF, 1,0 McF, 2,0 McF, 4,0 McF in časi inkubacije 5 h, 6 h, 7 h) za izbrane antibiotike se z višanjem gostote bakterijske suspenzije in daljšanjem časa inkubacije višajo.
- Menimo, da je testiranje občutljivosti za bakterijo *S. aureus* z modificiranim disk difuzijskim testom (gostota bakterijske suspenzije 4,0 McF, čas inkubacije 7 h) primerljivo s standardnim disk difuzijskim testom za vse izbrane antibiotike, razen za cefoxitin, saj se rezultati ujemajo s standardizirano metodo od 90 % do 100 %.
- Deleži ujemanja rezultatov testiranja občutljivosti 32 kliničnih izolatov bakterije *S. pneumoniae* med standardiziranim in modificiranim disk difuzijskim testom so pri gostotah bakterijskih suspenzij 4,0 McF ter 7-urni inkubaciji za vse testirane antibiotike od 75 % do 80 %, zato je modificirana metoda le pogojno primerljiva.
- Vse druge modificirane metode (nižje gostote od 4,0 McF, krajši časi inkubacije od 7 h) testiranja občutljivosti za antibiotike za bakterijo *S. pneumoniae* niso primerljive s standardizirano metodo in so zato neustrezne za rutinsko uporabo.

6 POVZETEK

Bakterija *S. aureus* je pogosta povzročiteljica resnih bolnišničnih in zunajbolnišnično pridobljenih okužb. Ima veliko različnih virulentnih dejavnikov, ki ji omogočajo koloniziranje, izogibanje obrambnim mehanizmom gostitelja in širjenje okužbe. Prav tako ima več mehanizmov odpornosti proti antibiotikom, ki zraven visoke pojavnosti in obolevnosti otežujejo zdravljenje teh okužb. Bakterija *S. pneumoniae* (pnevmokok) je povzročiteljica različnih invazivnih in neinvazivnih okužb. Povzroča bronhitis, pljučnico, vnetje srednjega ušesa, sinusitis in meningitis. Številni virulentni dejavniki omogočajo nastanek in širjenje okužb. Mehanizmi odpornosti proti antibiotikom pa otežujejo zdravljenje. Kljub novim razpoložljivim antibiotikom in cepivom za zdravljenje in preprečevanje pnevmokoknih okužb je bakterija *S. pneumoniae* še vedno vodilna povzročiteljica obolevnosti in umrljivosti po vsem svetu. V veliko pomoč pri zdravljenju bakterijskih okužb z antibiotiki so rezultati testiranja občutljivosti bakterij za antibiotike. Običajno so laboratorijski podatki testiranja občutljivosti bakterij za antibiotike prvo opozorilo, da se delež odpornih bakterijskih sevov zvišuje, zato je izredno pomembno redno testiranje izolatov ter spremljanje novega pojavljanja in širjenja odpornih sevov.

Namen dela je bil ugotoviti ali so rezultati testiranja občutljivosti bakterij *S. aureus* in *S. pneumoniae* za antibiotike s standardiziranim disk difuzijskim testom po navodilih CLSI primerljivi z rezultati disk difuzijskega testa, ki smo ga modificirali tako, da smo spremenili gostoto bakterijskih suspenzij in čas inkubacije. S standardiziranim disk difuzijskim testom smo testirali občutljivost 32 kliničnih izolatov bakterije *S. pneumoniae* za antibiotike oksacilin, eritromocin, klindamicin, moksifloksacin in TMP-SMX ter občutljivost 31 kliničnih izolatov bakterije *S. aureus* za antibiotike cefoksitin, eritromicin, klindamicin, linezolid, ciprofloksacin in TMP-SMX ter dobljene rezultate primerjali z rezultati modificiranega disk difuzijskega testa. Želeli smo ugotoviti kakšen vpliv imajo različne gostote bakterijskih suspenzij in različni časi inkubacije na rezultate testiranja občutljivosti za antibiotike pri bakterijah *S. pneumoniae* in *S. aureus*. Pričakovali smo, da bodo pri višji gostoti bakterijske suspenzije in krajšem času inkubacije rezultati primerljivi z rezultati standardiziranega disk difuzijskega testa. Rezultate obeh testov smo primerjali in ugotavljali delež ujemanja med njima. Deleži ujemanja rezultatov testiranja občutljivosti

kliničnih izolatov bakterije *S. aureus* in *S. pneumoniae* med standardiziranim disk difuzijskim testom in modificiranim disk difuzijskim testom za izbrane antibiotike so se z višanjem bakterijske suspenzije ter daljšanjem časa inkubacije višali. Pri testiranju občutljivosti kliničnih izolatov bakterije *S. aureus* smo 100 % ujemanje zabeležili za klindamicin, linezolid in TMP-SMX pri gostoti bakterijske suspenzije 2,0 McF in 7-urni inkubaciji ter gostoti bakterijske suspenzije 4,0 McF pri 6- in 7-urni inkubaciji. Za slednje antibiotike smo več kot 90 % ujemanje zabeležili že pri nižjih gostotah bakterijskih suspenzij in krajših časih inkubacije. Za eritromicin in ciprofloksacin smo zabeležili več kot 90 % ujemanje pri gostoti bakterijske suspenzije 4,0 McF in 7-urni inkubaciji. Najvišji delež ujemanja za cefoksitin (61,3 %) smo zabeležili pri gostoti bakterijske suspenzije 4,0 McF in 7-urni inkubaciji. Pri testiranju občutljivosti kliničnih izolatov bakterije *S. pneumoniae* smo zabeležili najvišje deleže ujemanja, ki so bili za vse testirane antibiotike od 75 % do 80 %, pri gostotah bakterijskih suspenzij 2,0 McF in 4,0 McF ter 7-urni inkubaciji. Menimo, da so pri testiranju občutljivosti kliničnih izolatov bakterije *S. aureus* za klindamicin, linezolid in TMP-SMX rezultati modificiranega disk difuzijskega testa (gostota bakterijske suspenzije 2,0 McF in 4,0 McF, čas inkubacije 6 h in 7 h) primerljivi s standardiziranim disk difuzijskim testom, saj je bilo ujemanje med njima 100 %. Menimo, da so rezultati primerljivi tudi za tiste antibiotike, razen za cefoksitin, ki pri določenih parametrih presegajo 90 % ujemanje. Pri testiranju občutljivosti kliničnih izolatov bakterije *S. pneumoniae* so bili najvišji deleži ujemanja za vse testirane antibiotike od 75 % do 80 %, pri gostotah bakterijskih suspenzij 2,0 McF, 4,0 McF in 7-urni inkubaciji. Zaradi nižjega deleža ujemanja menimo, da so rezultati med obema testoma le pogojno primerljivi.

V raziskavo bi bilo smiselno vključiti več proti antibiotikom odpornih kliničnih izolatov, saj bi bili takšni rezultati modificiranega disk difuzijskega testa bolj koristni za primerjavo s standardiziranim disk difuzijskim testom in primernejši za podporo pri rutinski uporabi.

7 VIRI

- Acar J.F., Goldstein F.W. 1996. Disk susceptibility test. V: Antibiotics in laboratory medicine. 4th ed. Lorian V (ed.). Baltimore, Williams and Wilkins: 1-51
- Ambrose K.D., Nisbet R., Stephens D.S. 2005. Macrolide efflux in *Streptococcus pneumoniae* is mediated by a dual efflux pump (*mel* and *mef*) and is erythromycin inducible. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49, 10: 4203-4209
- Andriole V.T. 2005. The quinolones: past, present, and future. *Clinical Infectious Disease*, 41: 113-119
- Appelbaum P.C. 1999. Quinolone activity against anaerobes. *Drugs*, 58, Suppl. 2: 60-64
- Appelbaum P.C. 2000. Microbiological and pharmacodynamic considerations in the treatment of infection due to antimicrobial-resistant *Streptococcus pneumoniae*. *Clinical Infectious Diseases*, 31, Suppl. 2: S29-S34
- Arthur M., Andremont A., Courvalin P. 1987. Distribution of erythromycin esterase and rRNA methylase genes in members of the family *Enterobacteriaceae* highly resistant to erythromycin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 31, 3: 404-409
- Arthur M., Courvalin P. 1986. Contribution of two different mechanisms to erythromycin resistance in *Escherichia coli*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 30,5: 694-700
- Austin K.L., Mather L.E., Philpot C.R., McDonald P.J. 1980. Intersubject and dose-related variability after intravenous administration of erythromycin. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 10: 273-279
- Barthélémy P., Autissier D., Gerbaud G., Courvalin P. 1984. Enzymic hydrolysis of erythromycin by a strain of *Escherichia coli*. *Journal of Antibiotics*, 37, 12: 1692-1696
- Bauernfeind A. 1997. Comparison of the antimicrobial activities of the quinolones Bay 12-8039, gatifloxacin (AM 1155), trovafloxacin, clinafloxacin, levofloxacin in ciprofloxacin. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 40: 639-651
- Bayles K.W. 2000. The bactericidal action of penicillin: New clues to an unsolved mystery. *Trends in Microbiology*, 8, 6: 274-278
- Behra-Miellet J., Calvet L., Dubreuil L. 2003. Activity of linezolid against anaerobic bacteria. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 22: 28-34
- Berger-Bächi B. 2002. Resistance mechanisms of Gram-positive bacteria. *International Journal of Medical Microbiology*, 292: 27-35
- Bertino J., Fish D. 2000. The safety profile of the fluoroquinolones. *Clinical Therapeutics*, 22, 7: 798-817
- Billal D.S., Feng J., Leprohon P., Légaré D., Quéllette M. 2011. Whole genome analysis of linezolid resistance in *Streptococcus pneumoniae* reveals resistance and compensatory mutations. *BMC Genomics*, 12: 512, doi:10.1186/1471-2164-12-512:10 str.
- Bomberberg D.M., Boyd S.E. 2005. Management of *Staphylococcus aureus* infections. *American Family Physician*, 72, 12: 2474-2481
- Boncoeur E., Durmort C., Bernay B., Ebel C., Di Guilmi A.M., Croizé J., Vernet T., Jault J.M. 2012. PatA and ParB from a functional heterodimeric ABC multidrug efflux transporter responsible for the resistance of *Streptococcus pneumoniae* to fluoroquinolones. *Biochemistry*, 51: 7755-7765

- Bozdogan B., Esel D., Whitener C., Browne F.A., Appelbaum P.C. 2003. Antibacterial susceptibility of a vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* strain isolated at the Hershey Medical Center. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 52: 864-868
- Braun P. 1969. Hepatotoxicity of erythromycin. *Journal of Infection Diseases*, 119, 3: 300-306
- Brickner S.J., Hutchinson D.K., Barbachyn M.R., Manninen P.R., Ulanowicz D.A., Garmon S.A., Grega K.C., Handges S.K., Toops D.S., Ford C.W., Zurenko G.E. 1996. Synthesis and antibacterial activity of U-100592 and U-100766, two oxazolidinone antibacterial agents for the potential treatment of multidrug-resistant Gram-positive bacterial infection. *Journal of Medicinal Chemistry*, 39, 3: 673-679
- Broekema N.M., Van T.T., Monson T.A., Marshall S.A., Warshauer D.M. 2009. Comparison of cefoxitin and oxacillin disk diffusion methods for detection of *mecA*-mediated resistance of *Staphylococcus aureus* in a large-scale study. *Clinical Microbiology*, 47, 1:217-219
- Brown A.G., Butterworth D., Cole M., Hanscomb G., Hood J.D., Reading C. 1976. Naturally occurring β -lactamase inhibitors with antibacterial activity. *Journal of Antibiotics*, 29, 6: 668-669
- Brown G.M. 1962. The biosynthesis of folic acid. Inhibition by sulfonamides. *Journal of Biological Chemistry*, 237, 2: 536-540
- Burghardt H., Schimz K.L., Müller M. 1998. On the target of a novel class of antibiotics, oxazolidinones, active against multidrug-resistant Gram-positive bacteria. *FEBS Letters*, 425: 40-44
- Bush K. 1989. Characterization of β -lactamases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 33, 3: 259-263
- Bushby S.R.M. 1973. Trimethoprim-sulfamethoxazole: *in vitro* microbiological aspects. *Journal of Infectious Diseases*, 128: 442-462
- Cercenado E., García-Garrote F., Bouza E. 2001. *In vitro* activity of linezolid against multiply resistant Gram-positive clinical isolates. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 47: 77-81
- Chambers H. F., Deck D. H. 2009. Beta-lactam & other cell wall- & membrane-active antibiotics. V: Basic and clinical pharmacology. 11th ed. Katzung B.G., Masters S.B., Trevor A.J. (eds.). New York, The McGraw-Hill Companies: 773-795
- Chen C. R., Malik M., Synder M., Drlica K. 1996. DNA gyrase and topoisomerase IV on the bacterial chromosome: Quinolone-induced DNA cleavage. *Journal of Molecular Biology*, 258, 4: 627-637
- CLSI – Clinical and Laboratory Standards Institute. 2008. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Eighteenth Informational Supplement. M100-S18. Winkler M.A. (ed.). Wayne (PA), Clinical and Laboratory Standards Institute: 181 str.
- Cogen A.L., Nizet V., Gallo R.L. 2008. Skin microbiota: a source of disease or defence? *British Journal of Dermatology*, 158, 3: 442-455
- Cohen S., Sweeney H.M. 1970. Transduction of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus* dependent on an unusual specificity of the recipient strain. *Journal of Bacteriology*, 104, 3: 1158-1167
- Cole A.M., Tahk S., Oren A., Yoshioka D., Kim Y.H., Park A., Ganz T. 2001. Determinants of *Staphylococcus aureus* nasal carriage. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 8, 6: 1064-1069

- Corti G., Cinelli R., Paradisi F. 2000. Clinical and microbiologic efficacy and safety profile of linezolid, a new oxazolidinone antibiotic. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 16: 527-530
- Coyle M.B., McGonagle L.A., Plorde J.J., Clausen C.R., Schoenknecht C.R. 1984. Rapid antimicrobial susceptibility testing of isolates from blood cultures by direct inoculation and early reading of disk diffusion tests. *Journal of Clinical Microbiology*, 20, 3: 473-477
- Cozzarelli N.R. 1980. DNA gyrase and the supercoiling of DNA. *Science*, 207, 29: 953-960
- Croteau D., Bergeron M.G., LeBel M. 1988. Pharmacokinetic advantages of erythromycin estolate over ethylsuccinate as determined by high-pressure liquid chromatography. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 32, 4: 561-565
- Crumplin G.C., Smith J.T. 1976. Nalidixic acid and bacterial chromosome replication. *Nature*, 260: 643-645
- Dacey R.G., Sande M.A. 1974. Effect of probenecid on cerebrospinal fluid concentrations of penicillin and cephalosporin derivatives. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 6, 4: 437-441
- Dale G.E., Broger C., Arcy A.D., Hartman P.G., DeHoogt R., Jolidon S., Kompis I., Labhardt H.L., Locher H., Page M.G.P., Stüber D., Then R.L., Wipf B., Oefner C. 1997. A single amino acid substitution in *Staphylococcus aureus* dihydrofolate reductase determines trimethoprim resistance. *Journal of Molecular Biology*, 266: 23-30
- Darrell J.H., Garrod L.P., Waterworth P.M. 1968. Trimethoprim: laboratory and clinical studies. *Journal of Clinical Pathology*, 21: 202-209
- Deresinski S. 2005. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: An evolutionary, epidemiologic and therapy odyssey. *Clinical Infectious Diseases*, 40: 562-573
- Diekema D.J., Jones R.N. 2001. Oxazolidinone antibiotics. *Lancet*, 358: 1975-1982
- Domenech A., Ardanuy C., Calatayud L., Santos S., Tubau F., Grau I., Verdager R., Dorca J., Pallares R., Martin R., Liñares J. 2011. Serotypes and genotypes of *Streptococcus pneumoniae* causing pneumonia and acute exacerbations in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 66: 487-493
- Drlica K., Zhao X. 1997. DNA gyrase, topoisomerase IV, and the 4-quinolones. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 61, 3: 377-392
- EARS-Net - European Antimicrobial Resistance Surveillance Network. 2012. EARS-Net annual report 2011. Stockholm, ECDC – European Centre for Disease Prevention and Control: 47-58
- Easmon C.S.F., Crane J.P. 1984. Cellular uptake of clindamycin and lincomycin. *British Journal of Experimental Pathology*, 65: 725-730
- Eliopoulos G.M. 2004. Quinolone resistance mechanisms in pneumococci. *Clinical Infectious Diseases*, 38, Suppl. 4: S350-S356
- Emmerson A.M. in Jones A.M. 2003. The quinolones: Decades of development and use. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 51, Suppl. S1: 13-20
- Feng J., Lupien A., Gingras H., Wassersheid J., Dewar K., Légaré D., Ouellette M. 2009. Genome sequencing of linezolid-resistant *Streptococcus pneumoniae* mutants reveals novel mechanisms of resistance. *Genome Research*, 19: 1214-1223

- Ferry T., Perpoint T., Vandenasch F., Etienne J. 2005. Virulence determinants in *Staphylococcus aureus* and their involvement in clinical syndromes. *Current Infectious Disease Reports*, 7: 420-428
- Fiebelkorn K.R., Crawford S.A., McElmeel M.L., Jorgensen J.H. 2003. Practical disk diffusion method for detection of inducible clindamycin resistance in *Staphylococcus aureus* and coagulase negative staphylococci. *Journal of Clinical Microbiology*, 41, 10: 4740-4744
- Fines M., Leclercq R. 2000. Activity of linezolid against Gram-positive cocci possessing genes conferring resistance to protein synthesis inhibitors. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 45: 797-802
- Flensburg J., Sköld O. 1987. Massive overproduction of dihydrofolate reductase in bacteria as a response to the use of trimethoprim. *European Journal of Biochemistry*, 126: 473-476
- Floyd J.L., Smith K.P., Kumar S.H., Floyd L.T., Varela M.F. 2010. LmrS is a multidrug efflux pump of the major facilitator superfamily from *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 54, 12: 5406-5412
- Gee T., Ellis R., Marshall G., Andrews J., Ashby J., Wise R. 2001. Pharmacokinetics and tissue penetration of linezolid following multiple oral doses. *Antimicrobial agents and Chemotherapy*, 45, 6: 1843-1846
- Gellert M. 1981. DNA topoisomerases. *Annual Review of Biochemistry*, 50: 879-906
- Gellert M., Mizuuchi K., O'Dea M.H., Itoh T., Tomizawa J. J. 1977. Nalidixic acid resistance: A second genetic character involved in DNA gyrase activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 74: 4772-4776
- Gellert M., Mizuuchi K., O'Dea M.H., Nash H.A. 1976. DNA Gyrase: An enzyme that introduces superhelical turns into DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 73: 3872-3876
- Georgopapadakou N.H. 1993. Penicillin-binding proteins and bacterial resistance to beta-lactams. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 37, 10: 2045-2053
- Gerding D.N., Hitt J.A. 1989. Tissue penetration of the new quinolones in humans. *Reviews of Infectious Diseases*, 11, Suppl. 5: S1046-S1057
- Gill C.J., Murphy M.A., Hamer D.H. 2002. Treatment of *Staphylococcus epidermidis* ventriculo-peritoneal shunt infection with linezolid. *Journal of Infection*, 45, 2: 129-132
- Hakenbeck R., Balmelle N., Weber B., Gardès C., Keck W., de Saizieu A. 2001. Mosaic genes and mosaic chromosomes: Intra- and interspecies genomic variation of *Streptococcus pneumoniae*. *Infection and Immunity*, 69, 4: 2477-2486
- Hamel J.C., Stapert D., Moerman J.K., Ford C.W. 2000. Linezolid, critical characteristics. *Infection*, 28: 60-64
- Hampele I.C., D'Arcy A., Dale G.E., Kostrewa D., Nielson J., Oefner C., Page M.G.P., Schönfeld H.J., Stüber D., Then R.L. 1997. Structure and function of the dihydropteroate synthase from *Staphylococcus aureus*. *Journal of Molecular Biology*, 268: 21-30
- Hansen L.H., Mauvais P., Douthwaite S. 1999. The macrolide-ketolide antibiotic binding site is formed by structures in domain II and V of 23S ribosomal RNA. *Molecular Microbiology*, 31, 2: 623-631

- Hassan K.A., Skurray R.A., Brown M.H. 2007. Active export proteins mediating drug resistance in staphylococci. *Journal of Molecular and Microbiology and Biotechnology*, 12: 180-196
- Hayde T.B., Gay K., Stephens D.S., Vugia D.J., Pass M., Johnson S., Barrett N.L., Schaffner W., Cieslak P.R., Maupin P.S., Zell E.R., Jorgensen J.H., Facklam R.R., Whitney C.G. 2001. Macrolide resistance among invasive *Streptococcus pneumoniae* isolates. *Journal of American Medical Association*, 286, 15: 1857-1862
- Hiasa H., Yousef D. O., Marians K.J. 1996. DNA strand cleavage is required for replication fork arrest by a frozen topoisomerase- quinolone-DNA ternary complex. *Journal of Biological Chemistry*, 27, 24: 26424-26429
- Hitchings G.H. 1973. Mechanism of action of trimethoprim-sulfamethoxazole: I. *Journal of Infectious Diseases*, 128: 433-436
- Hooper D.C. 2001. Emerging mechanisms of fluoroquinolone resistance. *Emerging Infectious Diseases*, 7, 2: 337-341
- Horinouchi S. Weisblum B. 1980. Posttranscriptional modification of mRNA conformation: Mechanism that regulates erythromycin-induced resistance. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 77, 12: 7079-7083
- Hoshino K., Kitamura A., Morrissey I., Sato K., Kato J. I., Ikeda H. 1994. Comparison of inhibition of *Escherichia coli* topoisomerase IV by quinolones with DNA gyrase inhibition. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 38, 11: 2623-2627
- Huang W. M., Libbey J. L., Van der Hoeven P., Yu S. X. 1998. Bipolar localization of *Bacillus subtilis* topoisomerase IV , an enzyme required for chromosome segregation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95: 4652-4657
- Huovinen P. 2001. Resistance to trimethoprim-sulfamethoxazole. *Clinical Infectious Diseases*, 32: 1608-1614
- Huovinen P., Sundström L., Swedberg G., Sköld O. 1995. Trimethoprim and sulfonamide resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 39, 2: 279-289
- Ikonomidis A., Michail G., Vasdeki A., Labrou M., Karavasilis V., Stathopoulos C., Maniatis A.N., Pournaras S. 2008. *In vitro* and *in vivo* evaluations of oxacillin efficiency against *mecA*-positive oxacillin-susceptible *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 52, 11: 3905-3908
- Ito T., Katayama Y., Hiramatsu K. 1999. Cloning and nucleotide sequence determination of the entire *mec* DNA of pre-methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* N315. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 43, 6: 1449-1458
- Jacobs M.R. 1999. Drug-resistant *Streptococcus pneumoniae*: rational antibiotic choices. *American Journal of Medicine*, 106: 19-25
- Jacobs M.R. 2004. *Streptococcus pneumoniae*: Epidemiology and patterns of resistance. *American Journal of Medicine*, 117, 3A: 3-15
- James C.W., Gurk-Turner C. 2001. Cross-reactivity of beta-lactam antibiotics. *Baylor University Medical Center Proceedings*, 14: 106-107
- Jedrzejewski M.J. 2001. Pneumococcal virulence factors: Structure and function. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 65, 2: 187-207

- Johnston L.S., Neuhaus F.C. 1975. Initial membrane reaction in the biosynthesis of peptidoglikan. Spin-labeled intermediates as receptors for vancomycin and ristocetin. *Biochemistry*, 14, 12: 2754-2760
- Jorgensen J.H., Ferraro M.J. 2000. Antimicrobial susceptibility testing: Special needs for fastidious organisms and difficult-to-detect resistance mechanisms. *Clinical Infectious Diseases*, 30: 799-808
- Jorgensen J.H., Ferraro M.J. 2009. Antimicrobial susceptibility testing: A review of general principles of contemporary practices. *Clinical Infectious Diseases*, 49: 1749-1755
- Kadurina M., Bocheva G., Tonev S. 2003. Penicillin and semisynthetic penicillins in dermatology. *Clinics in Dermatology*, 21: 12-23
- Kaplan S.A., Weinfeld R.E., Abruzzo C.W., McFaden K., Lewis Jack M., Weissman L. 1973. Pharmacokinetic profile of trimethoprim-sulfamethoxazole in man. *Journal of Infectious Diseases*, 128: 547-555
- Kasten J.M. 1999. Clindamycin, metronidazole and chloramphenicol. *Mayo Clinic Proceedings*, 74, 8: 825-833
- Kato J., Suzuki H., Ikeda H. 1992. Purification and characterization of DNA topoisomerase IV in *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry*, 267, 36: 25676-25684
- Khodursky A.B., Zechiedrich E.L., Cozzarelli N. R. 1995. Topoisomerase IV is a target of quinolones in *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92: 11801-11805
- Kilian M. 2005. *Streptococcus* and *Lactobacillus*. V: Topley and Wilson's microbiology and microbial infections: Bacteriology. Vol. 2. 10th ed. Borriello S.P., Murray P.R., Funke G. (eds.). London, Hodder Arnold: 833-881
- Kirst H.A., Sides G.D. 1989a. New directions for macrolide antibiotics: Structural modifications and *in vitro* activity. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 33, 9: 1413-1418
- Kirst H.A., Sides G.D. 1989b. New directions for macrolide antibiotics: Pharmacokinetics and clinical efficacy. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 33, 9: 1419-1422
- Klappenbach J.A., Saxman P.R., Cole J.R., Schmidt T.M. 2001. rrnbd: the ribosomal RNA operon copy number database. *Nucleic Acid Research*, 29, 1: 181-184
- Klein J. 1997. History of macrolide use in pediatrics. *Pediatric Infectious Disease Journal*, 16, 4: 427-431
- Kluge M. R. 1975. Accuracy of Kirby-Bauer susceptibility tests read at 4, 8, and 12 hours of incubation: comparison with readings at 18 to 20 hours. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 8, 4: 139-145
- Kluytmans J., van Belkum A., Verbrugh H. 1997. Nasal carriage of *Staphylococcus aureus*: Epidemiology, underlying mechanisms and associated risks. *Clinical Microbiology Reviews*, 10, 3: 505-520
- Koch A.E., Burchall J.J. 1971. Reversal of the antimicrobial activity of trimethoprim by thymidine in commercially prepared media. *Applied Microbiology*, 22, 5: 812-817
- Köhler T., Kok M., Michea-Hamzehpour M., Plesiat P., Gotoh N., Nishino T., Curty L.K., Pechere J.C. 1996. Multidrug efflux in intrinsic resistance to trimethoprim and sulfamethoxazole in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 40, 10: 2288-2290
- Lawson D.H., Paice B.J. 1982. Adverse reactions to trimethoprim-sulfamethoxazole. *Reviews of Infectious Diseases*, 4, 2: 429-433

- Leclercq R. 2002. Mechanisms of resistance to macrolides and lincosamides: Nature of the resistance elements and their clinical implications. *Clinical Infectious Diseases*, 34: 482-492
- Lewis J.S., Jorgensen J.H. 2005. Inducible clindamycin resistance in staphylococci: Should clinicians and microbiologists be concerned? *Antimicrobial Resistance*, 40: 280-285
- Lin A.H., Murray R.W., Vidmar T.J., Marotti K.R. 1997. The oxazolidinone eperezolid binds to the 50S ribosomal subunit and competes with binding of chloramphenicol and lincomycin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 41, 10: 2127-2131
- Lina G., Quaglia A., Reverdy M.E., Leclercq R., Vandenesch F., Etienne J. 1999. Distribution of genes encoding resistance to macrolides, lincosamides and straptogramines among staphylococci. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 43, 5: 1062-1066
- Llarrull L. I., Testero S.A., Fisher J.F., Mobashery S. 2010. The future of the β -lactams. *Current Opinion in Microbiology*, 13: 551-557
- Long K.S., Vester B. 2012. Resistance to linezolid caused by modifications at its binding site on the ribosome. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 56, 2: 603-612
- Madigan M.T., Martinko J.M., Parker J. 2003. Brock biology of microorganisms. 10th ed. Upper Saddle River, New Jersey, Prentice-Hall International: 965-993
- Manabe Y.C., Vinetz J.M., Moore R.D., Merz C., Charache P., Bartlett J.G. 1995. *Clostridium difficile* Colitis: An effective clinical approach to diagnosis. *Annals of Internal Medicine*, 123: 835-840
- Martinez J.L., Alono A., Gomez-Gomez J.M., Baquero F. 1998. Quinolone resistance by mutations in chromosomal gyrase genes. Just the tip of the iceberg? *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 42: 683-688
- Martínez-Aguilar G., Hammerman W.A., Mason E.O., Kaplan S.L. 2003. Clindamycin treatment of invasive infection caused by community-acquired, methicillin-resistant and methicillin susceptible *Staphylococcus aureus* in children. *Pediatric Infectious Disease Journal*, 22, 7: 593-598
- McCallum N., Berger-Bächi B., Senn M.M. 2010. Regulation of antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus*. *International Journal of Medical Microbiology*, 300: 118-129
- Meka V.G., Gold H.S. 2004. Antimicrobial resistance to linezolid. *Clinical Infectious Diseases*, 39: 1010-1015
- Menninger J.R., Coleman R.A. 1993. Lincosamide antibiotics stimulate dissociation of peptidyl-tRNA from ribosome. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 37, 9: 2027-2029
- Miller L.A., Ratnam K., Payne D.Y. 2001. Beta-lactamase-inhibitor combinations in the 21st century: Current agents and new developments. *Current Opinion in Pharmacology*, 1: 451-458
- Moellering R.C. 1999. A novel antimicrobial agent joins battle against resistant bacteria. *Annals of Internal Medicine*, 130, 2: 155-157
- Mtairag E. M., Abdelghaffar H., Douhet C., Labro M. T. 1995. Role of extracellular calcium in in vitro uptake and intraphagocytic location of macrolides. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 39, 8: 1676-1682

- Nair S. R., Cherubin C. E. 1978. Use of cefoxitin, new cephalosporine-like antibiotic, in the treatment of aerobic and anaerobic infection. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 14, 6: 886-875
- Neu H.C. 1974. Cefoxitin, a semisynthetic cephamycin antibiotic: Antibacterial spectrum and resistance to hydrolysis by Gram-negative beta-lactamases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 6, 2: 170-176
- Neyfakh A. A., Borsch C. M., Kaatz G. W. 1993. Fluoroquinolone resistance protein NorA of *Streptococcus aureus* is a multidrug efflux transporter. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 37, 1: 128-129
- Nikaido H. 2000. Crossing the envelope: How cephalosporins reach their targets. *Clinical Microbiology and Infection*, 6, Suppl. 3: 22-26
- Noel A.R., Bowker K.E., MacGrowan A.P. 2005. Pharmacodynamics of moxifloxacin against anaerobes studied in an *in vitro* pharmacokinetics model. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49, 10: 4234-4239
- O'Hara K., Kanda T., Ohmiya K., Ebisu T., Kono M. 1989. Purification and characterization of macrolide 2'-phosphotransferase from a strain of *Escherichia coli* that is highly resistant to erythromycin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 33, 8:1354-1357
- Padayachee T., Klugman K.P. 1999. Novel expansions of the gene encoding dihydropteroate synthase in trimethoprim-sulfamethoxazole resistant *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 43, 9: 2225-2230
- Pan X.S., Fisher L.M. 1997. Targeting of DNA gyrase in *Streptococcus pneumoniae* by sparfloxacin: Selective targeting of gyrase and topoisomerase IV by quinolones. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 41: 471-474
- Pantosti A., Sanchini A., Monaco M. 2007. Mechanisms of antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus*. *Future Microbiology*, 2, 3: 323-334
- Paulsen I.T., Brown M.H., Skurray R.A. 1996. Proton -dependent multidrug efflux systems. *Microbiological Reviews*, 60, 4: 575-608
- Peacock S.J. 2005. *Staphylococcus*. V: Topley and Wilson's microbiology and microbial infections: Bacteriology. Vol. 2. 10th ed. Borriollo S.P., Murray P.R., Funkle G. (eds.). London, Hodder Arnold: 771-832
- Pikis A., Donkersloot J.A., Rodriguez W.J., Keith J.M. 1998. A conservative amino acid mutation in the chromosome-encoded dihydrofolate reductase confers trimethoprim resistance. *Journal of Infectious Disease*, 178: 700-706
- Pitout J.D.D., Sanders C.C., Sanders W.E. 1997. Antimicrobial resistance with focus on β -lactam resistance in Gram-negative bacilli. *American Journal of Medicine*, 103: 51-59
- Plouffe J.F. 2000. Emerging therapies for serious Gram-positive bacterial infections: a focus on linezolid. *Clinical Infectious Diseases*, 31, Suppl. 4: S144-S149
- Popovich K.J., Hota B. 2008. Treatment and prevention of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* skin and soft tissue infections. *Dermatologic Therapy*, 21: 167-179
- Pragman A.A., Schlievert P.M. 2004. Virulence regulation in *Staphylococcus aureus*: The need for *in vivo* analysis of virulence factor regulation. *Immunology and Medical Microbiology*, 42: 147-154

- Rana B., Butcher I., Grigoris P., Murnaghan C., Seaton R.A., Tobin C.M. 2001. Linezolid penetration into osteo-articular tissues. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 50, 747-750
- Reichmann P., König A., Liñares A., Alcaide F., Tenover F.C., McDougal L., Swidsinski S., Hakenbeck R. 1997. A global gene pool for high-level cephalosporin resistance in commensal *Streptococcus* species and *Streptococcus pneumoniae*. *Journal of Infectious Diseases*, 176: 1001-1012
- Reinert R.R. 2009. The antimicrobial resistance profile of *Streptococcus pneumoniae*. *Clinical Microbiology and Infection*, 15, Suppl. 3: 7-11
- Richmond M.H., Wotton S. 1976. Comparative study of seven cephalosporins: Susceptability to beta-lactamases and ability to penetrate the surface layers of *Escherichia coli*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 10, 2: 219-222
- Rubinstein E., Cammarata S.K., Oliphant T.H., Wunderink R.G. 2001. Linezolid (PNU 100766) versus vancomycin in the treatment of hospitalized patients with nosocomial pneumonia: a randomized double-blind, multicenter study. *Clinical Infectious Diseases*, 32: 402-412
- Ryan K.J., Drew W.L. 2010. Antibacterial agents and resistance. V: Sherris medical microbiology. 5th ed. Kenneth J.R., Ray C.G. (eds.). New York, The McGraw-Hill Companies: 403-429
- Scheffers D.J., Pinho M.G. 2005. Bacterial cell wall synthesis: new insight from localization studies. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 69, 4: 585-607
- Shen L., Pernet A.G. 1985. Mechanism of inhibition of DNA gyrase by analogues of nalidixic acid: The target of the drug is DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 82: 307-311
- Shinabarger D.L., Marotti K.R., Murray R.W., Lin A.H., Melchior E.P., Swaney S.M., Dunyak D.S., Demyan W.F., Buysse J.M. 1997. Mechanism of action of oxazolidinones: Effects of linezolid and eperezolid on translation reactions. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 41, 10: 2132-2136
- Skinner R., Cundliffe E., Schmidt F.J. 1983. Site of action of a ribosomal RNA methylase responsible for resistance to erythromycin and other antibiotics. *Journal of Biological Chemistry*, 258, 20: 12702-12706
- Sköld O. 2001. Resistance to trimethoprim and sulfonamides. *Veterinary Research*, 32: 261-273
- Slatter J.G., Feenstra S.K., Welshman I.R., Bruss J.B., Sams J.P., Johnson M.G., Sanders P.E., Hauer M.J., Fagerness P.E., Stryd R.P., Peng G.W., Shobe E.M. 2001. Pharmacokinetics, metabolism and excretion of linezolid following an oral dose of [¹⁴C]linezolid to healthy human subjects. *Drug Metabolism and Disposition*, 29, 8: 1136-1145
- Slee A.M., Wuonola M.A., McRipley R.J., Zajac I., Zawada M.J., Bartholomew P.T., Gregory W.A., Forbes M. 1987. Oxazolidinones, a new class of synthetic antibacterial agents: *In vitro* and *in vivo* activities of DuP 105 and DuP 721. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 31, 11: 1791-1797
- Song M.D., Wachi M., Doi M., Ishino F., Matsushashi M. 1987. Evolution of an inducible penicillin-target protein in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by gene fusion. *Federation of European Biochemical Societies Letters*, 221, 1: 167-171
- Spížek J., Řezanka T. 2004. Linkomycin, clindamycin and their application. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 64: 455-464

- Spratt B.G., 1994. Resistance to antibiotics mediated by target alterations. *Science*, 246, 5157: 388-393
- Spratt B.G., Cromie K.D. 1988. Penicillin-binding proteins of Gram-negative bacteria. *Reviews of Infectious Diseases*, 10, 4: 699-711
- Stass H., Kubitz D. 1999. Pharmacokinetics and elimination of mixifloxacin after oral and intravenous administration in man. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 43, Suppl. B: 83-90
- Stein G.E. 1996. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of newer fluoroquinolones. *Clinical Infectious Diseases*, 23, Suppl. 1: S19-S24
- Stratton C.W. 1998a. The safety profile of fluoroquinolones. *Antimicrobics and Infectious Diseases Newsletter*, 17, 8: 57-64
- Stratton C.W. 1998b. Oxazolidinones: A new class of antimicrobial agents. *Antimicrobics and Infectious Diseases Newsletter*, 16, 9: 69-71
- Sugino A., Peebles C. L., Kreuzer K. N., Cozzarelli N. R. 1977. Mechanism of action of nalidixic acid: Purification of *Escherichia coli* *nalA* gene product and its relationship to DNA gyrase and a novel nicking-closing enzyme. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 74: 4767-4771
- Swaney S.M., Aoki H., Ganoza M.C., Shinabarger D.L. 1998. The oxazolidinone linezolid inhibits initiation of protein synthesis in bacteria. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 42, 12: 3251-3255
- Tally F.P., Jacobus N.V., Bartlett J.G., Gorbach S.L. 1975. Susceptibility of anaerobes to cefoxitin and other cephalosporins. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 7, 2: 128-132
- Tenover C.F. 2010. Potential impact of rapid diagnostic tests on improving antimicrobial use. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1213: 70-80
- Tenson T., Lovmar M., Ehrenburg M. 2003. The mechanism of action of macrolides, lincosamides and streptogramin B reveals the nascent peptide exit path in the ribosome. *Journal of Molecular Biology*, 303: 1005-1014
- Then R., Angehrn P. 1973. Sulphonamide-induced 'thymineless death' in *Escherichia coli*. *Journal of General Microbiology*, 76: 255-263
- Tipper D.J., Strominger J.L. 1965. Mechanism of action of penicillins: A proposal based on their structural similarity to acyl-D-alanyl-D-alanine. *Microbiology*, 54: 1133-1141
- Turnidge J.D., Bell J.M. 2005. Antimicrobial susceptibility on solid media. V: Antibiotics in laboratory medicine. 5th ed. Lorian V. (ed.). Philadelphia, Lippincott Williams and Wilkins: 8-61
- Tzouveleakis L.S., Zissis N.P., Gazouli M., Tzelepi E., Legakis N.J. 1997. *In vitro* comparative assessment of β -lactamase inhibitors and their penicillin combinations against selected enterobacteria. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 8: 193-197
- Vlasses P.H., Holbrook A.M., Schrogie J.J., Douglas Rogers J., Ferguson R.K., Abrams W.B. 1980. Effect of orally administered probenecid on the pharmacokinetics of cefoxitin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 17, 5: 847-855
- Walshman I.R., Sisson T.A., Jungbluth G.L., Stalker D.J., Hopkins N.K. 2001. Linezolid absolute bioavailability and the effect of food on oral bioavailability. *Biopharmaceutics and Drug Disposition*, 22: 91-97

- Wang E., Walsh C. 1978. Suicide substrates for the alanine racemase of *Escherichia coli*. *Biochemistry*, 17, 7: 1313-1321
- Weisblum B. 1995. Erythromycin resistance by ribosome modification. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 39, 3: 577-585
- Weiser J.N., Bae D., Fasching C., Scamurra R.W., Ratner A.J., Janoff E.N. 2003. Antibody-enhanced pneumococcal adherence requires IgA1 protease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100, 7: 4215-4220
- Willmott C. J. R., Maxwell A. 1996. A single point mutation in the DNA gyrase A protein greatly reduces binding of fluoroquinolones to the DNA gyrase complex. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 37: 126- 127
- Wise R., Andrews J.M., Bedford K.A. 1978. *In vitro* study of clavulanic acid in combination with penicillin, amoxycillin, and carbenicillin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 13, 3: 389-393
- Woodcock J.M., Andrews J.M., Boswell F.J., Brenwald N.P., Wise R. 1997. *In vitro* activity of BAY 12-8039, a new fluoroquinolone. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 41, 1: 101-106
- Woods D.D. 1962. The biochemical mode of action of the sulphonamide drugs. *Journal of General Microbiology*, 29: 687-702
- Wynalda M.A., Hauer M.J., Wienkers L.C. 2000. Oxidation of the novel oxazolidinone antibiotic linezolid in human liver microsomes. *Drug Metabolism and Disposition*, 28, 9: 1014-1017
- Yoshida H., Bogaki M., Nakamura S., Ubukata K., Konno M. 1990. Nukleotide sequence and characterization of the *Streptococcus aureus* *norA* gene, which confers resistance to quinolones. *Journal of Bacteriology*, 172, 12: 6942-6949
- Zalezny A.M., Ferraro M.J., Glennen A., Hindler J.F., Mann L.M., Munro S., Murray P.R., Reller L.B., Tenover F.C., Jorgensen J.H. 2005. Selection of strains for quality assesment of the disc induction method for detection of inducible clindamycin resistance in staphylococci: A CLSI collaborative study. *Journal of Clinical Microbiology*, 43, 6: 2613-2615
- Zhanel G.G., Noreddini A.M. 2001. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of the new fluoroquinolones: Focus on respiratory infections. *Current Opinion in Pharmacology*, 1: 459-463
- Zurenko G.E., Yagi B.H., Schaadt R.D., Allison J.W., Kilburn J.O., Glickman S.E., Hutchinson D.K., Barbachyn M.R., Brickner S.J. 1996. *In vitro* activities of U-100592 and U-100766, novel oxazolidinone antibacterial agents. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 40, 4: 839-845

ZAHVALA

Zahvaljujem se mentorici prof. dr. Nini Gunde-Cimerman za usmerjanje in napotke pri izdelavi diplomskega dela.

Zahvaljujem se tudi somentorici doc. dr. Viktoriji Tomič za strokovno vodenje, pomoč in koristne nasvete pri laboratorijskem delu in izdelavi diplomskega dela.

Zahvaljujem se tudi prof. dr. Katji Seme za temeljit pregled diplomskega dela in koristne pripombe.

Prav tako se zahvaljujem osebju Laboratorija za respiratorno mikrobiologijo na Univerzitetni kliniki za pljučne bolezni in alergijo Golnik za njihovo pomoč in prijazne besede. Še posebej ga. Judit Stokič za pomoč in vodenje pri laboratorijskem delu.

Posebna zahvala je namenjena moji družini in Maji, ki verjemejo vame in mi stojijo ob strani ter prijateljem s katerimi sem delila nepozabna študentska leta.

PRILOGE

Priloga A: Prikaz rezultatov (premeri zaviralnih con v mm) testiranja občutljivosti 31 kliničnih izolatov bakterije *S. aureus* s standardiziranim in modificiranim disk difuzijskim testom

0,5 McF																								
Oznaka seva	Cefoksitin				Klindamicin				Eritromicin				TMP-SMX				Linezolid				Ciprofloksacin			
	18h	5h	6h	7h	18h	5h	6h	7h	18h	5h	6h	7h	18h	5h	6h	7h	18h	5h	6h	7h	18h	5h	6h	7h
6682	28	17	22	22	26	20	22	23	28	20	22	24	28	21	22	23	30	21	24	24	28	19	20	22
7095	26	18	20	21	26	20	22	22	23	20	23	23	24	21	21	23	26	21	23	23	27	18	20	20
7010	28	x	x	x	27	17	22	21	8	x	x	0	31	18	22	22	29	x	x	23	29	19	20	21
6962	26	17	21	20	24	19	23	21	24	20	22	20	24	20	22	20	25	21	24	22	27	17	20	21
6703	29	x	x	22	24	x	x	x	24	x	x	x	23	x	x	x	27	21	25	24	0	x	x	x
7058	27	20	20	22	24	20	23	22	25	19	23	23	24	20	22	23	25	21	24	23	27	19	19	20
6702	26	19	21	20	22	21	23	22	23	21	22	23	20	22	24	22	23	22	25	23	28	19	19	19
6684	29	19	24	22	28	20	23	24	26	20	23	24	30	23	22	23	32	21	24	25	28	20	20	22
7109	26	x	21	20	27	x	x	21	26	x	x	22	27	x	x	22	29	x	x	24	27	x	x	19
7097	28	x	21	21	28	x	23	21	27	x	22	22	29	x	21	22	28	x	21	23	28	x	18	18
7124	15	15	15	15	23	22	22	22	23	20	20	20	24	21	21	21	23	22	23	23	25	18	20	20
7127	29	x	19	19	29	x	20	20	28	x	21	21	29	x	21	20	30	x	22	22	11	x	0	10
7212	33	x	x	19	9	x	x	9	0	x	x	0	31	x	x	22	30	x	x	22	23	x	x	17
7213	25	x	x	x	23	x	x	x	23	x	x	x	24	20	21	22	23	21	22	22	0	x	x	x
7362	29	x	19	19	30	x	19	22	26	x	20	21	29	x	21	20	29	x	22	23	17	x	18	18
6679	24	22	22	22	26	26	26	25	23	24	24	24	23	24	24	24	25	26	26	26	0	x	x	x
6284	12	11	11	11	24	x	24	26	23	20	20	23	24	20	21	23	25	22	22	23	20	17	19	19
6644	11	x	9	9	28	x	20	21	28	x	20	22	27	x	21	22	28	x	23	23	32	x	19	20
6960	31	19	20	21	29	20	21	22	28	20	21	23	25	20	22	23	27	22	23	24	31	17	19	20
8035	29	x	20	23	27	x	22	22	29	x	22	23	30	x	20	23	31	x	24	24	30	x	20	20
8040	29	x	19	21	28	x	21	23	28	x	21	22	31	x	20	23	31	x	23	25	32	x	19	21
8054	30	x	x	21	28	x	x	23	28	x	x	23	30	x	x	23	30	x	x	25	31	x	x	20
8069	29	x	x	21	28	x	x	23	30	x	x	24	31	x	x	25	30	x	x	25	32	x	x	21
8155	29	x	22	22	31	x	x	23	11	x	x	x	32	x	x	24	31	x	26	26	27	x	20	22
8160	31	x	20	20	29	x	24	22	30	x	23	23	32	x	23	24	31	x	25	26	28	x	21	21
8204	29	x	19	21	29	x	22	23	30	x	23	23	31	x	22	24	31	x	24	26	33	x	21	21
8215	31	x	x	x	30	x	x	x	31	x	x	x	32	x	x	x	32	x	x	x	27	x	x	x
7707	30	x	21	21	30	x	22	22	29	x	23	23	32	x	23	23	31	x	25	26	31	x	21	21
7711	30	x	x	21	29	x	x	24	29	x	x	24	31	x	x	24	31	x	x	25	31	x	x	22
7718	28	x	x	21	28	x	x	22	28	x	x	23	31	x	x	23	31	x	x	26	30	x	x	22
7748	29	x	x	21	30	x	x	21	30	x	x	22	31	x	x	22	31	x	x	24	25	x	x	20
25923	26	18	20	20	25	20	22	22	25	x	20	23	27	x	21	22	29	x	21	23	27	x	18	19
McF – McFarland (enota), TPM-SMX – trimetoprim-sulfametoksazol, zelena – občutljivi, rumena – zmerno odporni, rdeča – odporni, x - ni zaznane rasti, ATTC 25923 – referenčni sev bakterije <i>S. aureus</i>																								

se nadaljuje

nadaljevanje Priloge A: Prikaz rezultatov (premeri zaviralnih con v mm) testiranja občutljivosti 31 kliničnih izolatov bakterije *S. aureus* s standardiziranim in modificiranim disk difuzijskim testom

1,0 McF																												
Oznaka seva	Cefoksitin				Klindamicin				Eritromicin				TMP-SMX				Linezolid				Ciprofloksacin							
	18h	5h	6h	7h	18h	5h	6h	7h	18h	5h	6h	7h	18h	5h	6h	7h	18h	5h	6h	7h	18h	5h	6h	7h	18h	5h	6h	7h
6682	28	20	22	23	26	21	23	23	28	21	24	24	28	22	23	23	30	23	24	25	28	17	21	21				
7095	26	20	20	20	26	21	22	22	23	22	23	23	24	21	23	22	26	22	24	24	27	18	20	20				
7010	28	22	22	22	27	21	22	22	8	9	9	8	31	20	22	21	29	22	24	23	29	18	21	21				
6962	26	20	21	20	24	21	23	23	24	20	20	22	24	21	22	22	25	22	23	24	27	18	20	22				
6703	29	x	22	22	24	20	23	23	24	21	23	23	23	21	24	22	27	22	24	23	0	x	x	0				
7058	27	20	21	22	24	21	23	23	25	21	23	23	24	22	23	21	25	22	23	23	27	19	20	20				
6702	26	20	22	22	22	21	23	23	23	21	23	23	20	23	22	21	23	23	24	23	28	18	20	20				
6684	29	20	22	22	28	22	23	23	26	22	23	23	30	23	22	23	32	21	23	25	28	17	20	22				
7109	26	19	20	20	27	x	21	21	26	x	22	22	27	x	22	22	29	x	23	24	27	x	18	20				
7097	28	x	21	21	28	x	22	22	27	x	22	22	29	x	22	22	28	x	23	23	28	x	19	19				
7124	15	x	16	17	23	x	22	22	23	x	23	23	24	x	21	21	23	x	22	23	25	x	18	19				
7127	29	x	20	21	29	x	20	21	28	x	21	22	29	x	21	22	30	x	23	23	11	x	0	11				
7212	33	x	20	21	9	x	13	13	0	x	0	0	31	x	22	21	30	x	23	23	23	x	20	18				
7213	25	17	19	19	23	20	20	20	23	20	19	20	24	21	21	20	23	22	22	22	0	x	0	0				
7362	29	x	19	21	30	x	20	21	26	x	20	21	29	x	21	22	29	x	22	23	17	x	18	19				
6679	24	21	22	22	26	24	23	23	23	24	24	24	23	20	21	22	25	25	25	25	0	x	x	x				
6284	12	x	x	11	24	23	24	24	23	24	24	24	24	21	21	24	25	25	26	27	20	20	20	20				
6644	11	x	10	9	28	x	21	21	28	x	21	23	27	x	22	22	28	x	24	25	32	x	19	20				
6960	31	20	20	21	29	21	22	22	28	20	21	23	25	20	22	21	27	22	23	25	31	17	19	20				
8035	29	x	19	22	27	x	21	23	29	x	22	24	30	x	22	25	31	x	25	25	30	x	20	19				
8040	29	x	20	21	28	x	21	23	28	x	22	23	31	x	23	22	31	x	24	25	32	x	20	21				
8054	30	x	20	22	28	x	22	23	28	x	22	24	30	x	22	23	30	x	25	25	31	x	20	21				
8069	29	x	20	21	28	x	22	23	30	x	22	23	31	x	23	24	30	x	25	24	32	x	19	21				
8155	29	21	22	22	31	21	22	22	11	14	15	15	32	22	22	23	31	23	24	25	27	22	22	22				
8160	31	19	21	21	29	21	23	23	30	21	23	24	32	22	23	24	31	24	25	25	28	19	21	21				
8204	29	x	19	20	29	x	20	22	30	x	20	24	31	x	22	24	31	x	25	26	33	x	19	20				
8215	31	x	x	x	30	x	x	x	31	x	x	x	32	x	x	x	32	x	x	x	27	x	x	x				
7707	30	x	x	20	30	x	x	23	29	x	x	24	32	x	x	24	31	x	x	25	31	x	x	21				
7711	30	x	x	19	29	x	x	23	29	x	x	24	31	x	x	24	31	x	x	26	31	x	x	21				
7718	28	x	x	20	28	x	x	22	28	x	x	23	31	x	x	23	31	x	x	25	30	x	x	21				
7748	29	x	19	20	30	x	22	23	30	x	23	23	31	x	23	23	31	x	25	25	25	x	19	18				
25923	26	19	19	21	25	21	21	21	25	21	21	23	27	20	22	22	29	22	23	24	27	18	18	19				
	McF – McFarland (enota), TPM-SMX – trimetoprim-sulfametoksazol, zelena – občutljivi, rumena – zmerno odporni, rdeča – odporni, x - ni zaznane rasti, ATTC 25923 – referenčni sev bakterije <i>S. aureus</i>																											

se nadaljuje

nadaljevanje Priloge A: Prikaz rezultatov (premeri zaviralnih conv mm) testiranja občutljivosti 31 kliničnih izolatov bakterije *S. aureus* s standardiziranim in modificiranim disk difuzijskim testom

2,0 McF																								
Oznaka seva	Cefoksitin				Klindamicin				Eritromicin				TMP-SMX				Linezolid				Ciprofloksacin			
	18h	5h	6h	7h	18h	5h	6h	7h	18h	5h	6h	7h	18h	5h	6h	7h	18h	5h	6h	7h	18h	5h	6h	7h
6682	28	22	22	22	26	22	23	23	28	23	23	24	28	23	22	25	30	24	25	25	28	20	22	21
7095	26	19	20	22	26	21	22	22	23	22	22	23	24	21	23	23	26	22	25	25	27	19	19	20
7010	28	x	22	22	27	22	22	23	8	11	11	11	31	20	23	20	29	24	25	26	29	17	21	22
6962	26	19	20	22	24	21	23	22	24	21	21	22	24	19	23	22	25	22	26	23	27	18	20	21
6703	29	20	20	23	24	x	23	23	24	22	23	23	23	21	24	22	27	24	25	25	0	0	0	0
7058	27	20	21	24	24	21	23	23	25	22	23	23	24	21	24	23	25	24	25	26	27	19	19	21
6702	26	19	21	22	22	21	23	23	23	22	22	23	20	22	24	23	23	24	26	26	28	19	19	20
6684	29	20	20	22	28	21	23	24	26	22	22	23	30	23	22	24	32	24	25	25	28	20	20	21
7109	26	20	21	21	27	21	22	22	26	22	22	22	27	22	23	22	29	23	24	23	27	17	18	20
7097	28	18	21	21	28	21	22	22	27	21	22	22	29	22	23	22	28	23	24	23	28	17	20	20
7124	15	14	16	16	23	18	19	21	23	19	20	23	24	21	21	22	23	21	24	23	25	16	16	19
7127	29	19	19	21	29	21	21	21	28	21	22	21	29	21	21	21	30	23	23	23	11	0	10	10
7212	33	20	21	21	9	9	13	12	0	0	0	0	31	20	22	23	30	24	24	24	23	19	19	19
7213	25	17	20	20	23	20	21	22	23	20	21	23	24	21	22	21	23	23	23	24	0	x	0	0
7362	29	18	20	20	30	20	21	21	26	21	21	23	29	21	21	23	29	23	22	24	17	18	19	19
6679	24	20	22	22	26	23	24	24	23	24	23	25	23	x	22	23	25	x	23	24	0	x	0	0
6284	12	11	11	13	24	23	23	23	23	23	23	24	24	20	21	22	25	22	24	23	20	18	19	20
6644	11	9	10	11	28	18	21	23	28	21	21	23	27	21	22	23	28	22	24	25	32	18	19	21
6960	31	20	19	20	29	21	21	23	28	19	22	22	25	20	22	22	27	22	23	24	31	18	19	22
8035	29	x	21	22	27	x	21	21	29	x	22	22	30	x	23	23	31	x	24	23	30	x	19	19
8040	29	18	18	18	28	19	20	21	28	22	22	22	31	22	22	22	31	22	24	23	32	18	19	21
8054	30	x	20	22	28	x	23	23	28	x	23	23	30	x	23	23	30	x	23	25	31	x	19	21
8069	29	x	20	20	28	x	23	23	30	x	23	23	31	x	24	24	30	x	23	25	32	x	19	21
8155	29	21	22	22	31	x	24	24	11	14	14	14	32	20	22	22	31	26	26	26	27	21	21	22
8160	31	18	20	20	29	21	23	23	30	21	24	24	32	21	23	23	31	24	25	25	28	18	21	21
8204	29	x	20	20	29	x	22	22	30	x	23	23	31	x	23	23	31	x	25	25	33	x	20	21
8215	31	x	20	20	30	x	23	23	31	x	21	21	32	x	23	23	32	x	24	24	27	x	19	19
7707	30	x	22	22	30	x	24	24	29	x	22	23	32	x	23	23	31	x	25	25	31	x	21	21
7711	30	x	20	20	29	x	22	22	29	x	23	23	31	x	24	24	31	x	26	26	31	x	19	21
7718	28	x	20	20	28	x	20	21	28	x	23	23	31	x	22	22	31	x	24	24	30	x	19	21
7748	29	x	20	20	30	x	23	23	30	x	25	25	31	x	23	24	31	x	25	25	25	x	19	21
25923	26	19	21	22	25	22	21	22	25	21	23	23	27	22	23	23	29	22	24	24	27	18	19	19
	McF – McFarland (enota), TPM-SMX – trimetoprim-sulfametoksazol, zelena – občutljivi, rumena – zmerno odporni, rdeča – odporni, x - ni zaznane rasti, ATTC 25923 – referenčni sev bakterije <i>S. aureus</i>																							

se nadaljuje

Priloga B: Prikaz rezultatov (premeri zaviralnih con v mm) testiranja občutljivosti 32 kliničnih izolatov bakterije *S. pneumoniae* s standardiziranim in modificiranim disk difuzijskim testom

0,5 McF																
Oznaka seva	Eritromicin			Klindamicin			TMP-SMX			Moksifloksacin			Oksacilin			
	24h	6h	7h	24h	6h	7h	24h	6h	7h	24h	6h	7h	24h	6h	7h	
6914	39	x	x	34	x	x	25	x	x	38	x	x	22	x	x	
7034	30	x	x	28	x	x	0	x	x	36	x	x	0	x	x	
7055	30	30	29	26	26	25	20	21	21	25	24	24	27	22	24	
5274	32	x	26	28	x	23	24	x	x	28	x	22	24	x	20	
6763	32	27	27	30	26	26	0	0	0	29	26	25	25	21	21	
6769	32	26	26	28	25	24	22	18	20	29	23	25	24	21	20	
6799	34	x	x	32	x	x	26	x	x	30	x	x	25	x	x	
6699	36	x	x	33	x	x	0	x	x	32	x	x	0	x	x	
7185	38	x	x	35	x	x	20	x	x	33	x	x	10	x	x	
8921	0	x	0	0	x	0	21	x	22	28	x	24	0	x	0	
118	39	x	x	36	x	x	25	x	x	34	x	x	37	x	x	
5294	15	x	x	32	x	x	23	x	x	35	x	x	28	x	x	
6480	33	x	x	33	x	x	24	x	x	33	x	x	30	x	x	
7792	35	x	x	32	x	x	26	x	x	29	x	x	31	x	x	
8816	33	x	26	31	x	24	27	x	20	29	x	23	28	x	22	
8612	29	26	28	26	25	27	0	0	0	28	23	26	24	20	21	
8050	34	x	29	30	x	25	25	x	22	30	x	25	26	x	22	
8044	33	x	28	31	x	25	22	x	20	28	x	24	28	x	21	
8790	30	27	27	27	24	26	23	19	21	26	23	24	24	21	23	
7855	31	x	26	30	x	24	29	x	21	27	x	24	25	x	22	
7952	33	x	x	31	x	x	27	x	x	29	x	x	27	x	x	
7963	34	x	x	31	x	x	26	x	x	32	x	x	31	x	x	
9996	35	x	x	32	x	x	27	x	x	32	x	x	29	x	x	
7649	0	x	0	0	x	0	0	x	0	31	x	26	0	x	0	
7643	0	x	0	0	x	0	0	x	0	34	x	26	0	x	0	
7443	0	x	0	0	x	0	0	x	0	33	x	26	0	x	0	
7733	34	x	x	30	x	x	27	x	x	32	x	x	26	x	x	
3599	34	x	x	33	x	x	24	x	x	30	x	x	28	x	x	
3565	0	x	0	0	x	0	18	x	18	27	x	24	0	x	0	
3497	0	0	0	27	24	24	24	20	21	30	24	24	24	20	20	
3438	29	25	27	25	25	25	23	21	22	28	23	25	22	21	21	
6305	32	26	29	30	26	26	23	21	21	29	24	25	31	24	24	
49619	28	26	28	25	25	25	24	20	22	30	23	25	11	12	11	

McF - McFarland (enota), TMP-SMX – trimetoprim-sulfametoksazol, zelena – občutljivi, rumena – zmerno odporni, rdeča – odporni, x - ni zaznane rasti, ATTC 49619 – referenčni sev bakterije *S. pneumoniae*

se nadaljuje

nadaljevanje Priloge B: Prikaz rezultatov (premeri zaviralnih con v mm) testiranja občutljivosti 32 kliničnih izolatov bakterije *S. pneumoniae* s standardiziranim in modificiranim disk difuzijskim testom

1,0 McF																
Oznaka seva	Eritromicin			Klindamicin			TMP-SMX			Moksifloksacin			Oksacilin			
	24h	6h	7h	24h	6h	7h	24h	6h	7h	24h	6h	7h	24h	6h	7h	
6914	39	x	x	34	x	x	25	x	x	38	x	x	22	x	x	
7034	30	22	19	28	24	24	0	0	0	36	25	25	0	0	0	
7055	30	30	29	26	27	28	20	21	20	25	23	24	27	23	24	
5274	32	x	26	28	x	24	24	x	20	28	x	25	24	x	22	
6763	32	26	28	30	25	25	0	0	0	29	25	25	25	21	21	
6769	32	26	27	28	25	24	22	19	20	29	23	25	24	21	21	
6799	34	x	x	32	x	x	26	x	x	30	x	x	25	x	x	
6699	36	x	x	33	x	x	0	x	x	32	x	x	0	x	x	
7185	38	x	x	35	x	x	20	x	x	33	x	x	10	x	x	
8921	0	x	0	0	x	0	21	x	21	28	x	24	0	x	0	
118	39	x	x	36	x	x	25	x	x	34	x	x	37	x	x	
5294	15	x	x	32	x	x	23	x	x	35	x	x	28	x	x	
6480	33	x	x	33	x	x	24	x	x	33	x	x	30	x	x	
7792	35	x	x	32	x	x	26	x	x	29	x	x	31	x	x	
8816	33	x	26	31	x	23	27	x	20	29	x	24	28	x	22	
8612	29	26	27	26	24	23	0	0	0	28	25	25	24	20	22	
8050	34	26	28	30	25	26	25	19	21	30	23	26	26	20	22	
8044	33	x	27	31	x	24	22	x	21	28	x	25	28	x	21	
8790	30	26	27	27	25	26	23	21	22	26	23	24	24	23	23	
7855	31	26	26	30	24	26	29	19	22	27	21	24	25	20	23	
7952	33	x	x	31	x	x	27	x	x	29	x	x	27	x	x	
7963	34	x	x	31	x	x	26	x	x	32	x	x	31	x	x	
9996	35	x	x	32	x	x	27	x	x	32	x	x	29	x	x	
7649	0	x	0	0	x	0	0	x	0	31	x	25	0	x	0	
7643	0	x	0	0	x	0	0	x	0	34	x	24	0	x	0	
7443	0	x	0	0	x	0	0	x	0	33	x	26	0	x	0	
7733	34	x	27	30	x	26	27	x	23	32	x	23	26	x	21	
3599	34	x	26	33	x	24	24	x	21	30	x	24	28	x	21	
3565	0	x	0	0	x	0	18	x	18	27	x	23	0	x	0	
3497	0	0	0	27	25	26	24	20	20	30	24	26	24	20	21	
3438	29	28	26	25	25	25	23	21	20	28	23	25	22	21	21	
6305	32	26	27	30	25	25	23	20	20	29	23	25	31	23	23	
49619	28	26	28	25	25	25	24	20	21	30	24	24	11	11	14	

McF - McFarland (enota), TMP-SMX – trimetoprim-sulfametoksazol, zelena – občutljivi, rumena – zmerno odporni, rdeča – odporni, x - ni zaznane rasti, ATTC 49619 – referenčni sev bakterije *S. pneumoniae*

se nadaljuje

nadaljevanje priloge B: Prikaz rezultatov (premeri zaviralnih con v mm) testiranja občutljivosti 32 kliničnih izolatov bakterije *S. neumoniae* s standardiziranim in modificiranim disk difuzijskim testom

2,0 McF																
Oznaka seva	Eritromicin			Klindamicin			TMP-SMX			Moksifloksacin			Oksacilin			
	24h	6h	7h	24h	6h	7h	24h	6h	7h	24h	6h	7h	24h	6h	7h	
6914	39	x	x	34	x	x	25	x	x	38	x	x	22	x	x	
7034	30	x	21	28	x	23	0	x	0	36	x	25	0	x	8	
7055	30	29	27	26	25	26	20	19	19	25	25	24	27	22	25	
5274	32	26	27	28	24	24	24	21	23	28	23	24	24	20	22	
6763	32	27	29	30	25	26	0	0	0	29	23	26	25	20	22	
6769	32	26	27	28	24	25	22	19	21	29	23	25	24	20	22	
6799	34	x	27	32	x	25	26	x	20	30	x	24	25	x	21	
6699	36	x	x	33	x	x	0	x	x	32	x	x	0	x	x	
7185	38	x	x	35	x	x	20	x	x	33	x	x	10	x	x	
8921	0	x	0	0	x	0	21	x	23	28	x	24	0	x	0	
118	39	x	x	36	x	x	25	x	x	34	x	x	37	x	x	
5294	15	x	x	32	x	x	23	x	x	35	x	x	28	x	x	
6480	33	x	x	33	x	x	24	x	x	33	x	x	30	x	x	
7792	35	x	x	32	x	x	26	x	x	29	x	x	31	x	x	
8816	33	x	26	31	x	24	27	x	20	29	x	22	28	x	23	
8612	29	27	27	26	24	24	0	0	0	28	24	24	24	20	22	
8050	34	27	28	30	25	25	25	20	21	30	22	24	26	21	23	
8044	33	x	28	31	x	25	22	x	20	28	x	23	28	x	22	
8790	30	26	28	27	23	24	23	20	22	26	25	25	24	23	24	
7855	31	26	27	30	25	25	29	20	23	27	25	23	25	20	22	
7952	33	x	27	31	x	26	27	x	22	29	x	24	27	x	23	
7963	34	x	27	31	x	25	26	x	21	32	x	24	31	x	22	
9996	35	x	x	32	x	x	27	x	x	32	x	x	29	x	x	
7649	0	0	0	0	0	0	0	0	0	31	25	28	0	0	0	
7643	0	0	0	0	0	0	0	0	0	34	25	26	0	0	0	
7443	0	0	0	0	0	0	0	0	0	33	24	26	0	0	0	
7733	34	26	26	30	24	25	27	22	24	32	24	26	26	21	22	
3599	34	x	27	33	x	24	24	x	23	30	x	24	28	x	21	
3565	0	0	0	0	0	0	18	18	18	27	25	25	0	0	0	
3497	0	0	0	27	25	25	24	20	22	30	24	25	24	20	20	
3438	29	27	26	25	23	24	23	20	21	28	24	24	22	20	20	
6305	32	27	27	30	25	24	23	20	20	29	24	24	31	22	23	
49619	28	26	26	25	25	23	24	24	20	30	25	23	11	14	14	

McF - McFarland (enota), TMP-SMX – trimetoprim-sulfametoksazol, zelena – občutljivi, rumena – zmerno odporni, rdeča – odporni, x - ni zaznane rasti, ATTC 49619 – referenčni sev bakterije *S. pneumoniae*

se nadaljuje

nadaljevanje priloge B: Prikaz rezultatov (premeri zaviralnih con v mm) testiranja občutljivosti 32 kliničnih izolatov bakterije *S. pneumoniae* s standardiziranim in modificiranim disk difuzijskim testom

4,0 McF																
Oznaka seva	Eritromicin			Klindamicin			TMP.SMX			Moksifloksacin			Oksacilin			
	24h	6h	7h	24h	6h	7h	24h	6h	7h	24h	6h	7h	24h	6h	7h	
6914	39	x	x	34	x	x	25	x	x	38	x	x	22	x	x	
7034	30	x	27	28	x	24	0	x	0	36	x	22	0	x	0	
7055	30	x	26	26	x	25	20	x	19	25	x	22	27	x	21	
5274	32	26	27	28	23	25	24	21	24	28	23	25	24	20	23	
6763	32	26	27	30	23	25	0	0	0	29	23	26	25	20	22	
6769	32	28	27	28	25	25	22	20	20	29	23	24	24	20	21	
6799	34	x	28	32	x	26	26	x	20	30	x	22	25	x	21	
6699	36	x	x	33	x	x	0	x	x	32	x	x	0	x	x	
7185	38	x	x	35	x	x	20	x	x	33	x	x	10	x	x	
8921	0	0	0	0	0	0	21	20	20	28	23	24	0	0	0	
118	39	x	x	36	x	x	25	x	x	34	x	x	37	x	x	
5294	15	x	x	32	x	x	23	x	x	35	x	x	28	x	x	
6480	33	x	x	33	x	x	24	x	x	33	x	x	30	x	x	
7792	35	x	28	32	x	23	26	x	20	29	x	23	31	x	22	
8816	33	x	28	31	x	24	27	x	23	29	x	20	28	x	24	
8612	29	26	27	26	23	24	0	0	0	28	24	24	24	21	22	
8050	34	x	27	30	x	25	25	x	25	30	x	23	26	x	23	
8044	33	x	29	31	x	26	22	x	20	28	x	23	28	x	22	
8790	30	26	27	27	23	25	23	22	22	26	23	25	24	22	25	
7855	31	25	26	30	22	24	29	20	23	27	21	23	25	20	21	
7952	33	x	27	31	x	26	27	x	22	29	x	25	27	x	22	
7963	34	26	28	31	24	27	26	22	24	32	24	25	31	21	23	
9996	35	x	x	32	x	x	27	x	x	32	x	x	29	x	x	
7649	0	0	0	0	0	0	0	0	0	31	26	26	0	0	0	
7643	0	0	0	0	0	0	0	0	0	34	26	25	0	0	0	
7443	0	0	0	0	0	0	0	0	0	33	25	26	0	0	0	
7733	34	27	27	30	24	26	27	22	22	32	23	25	26	21	22	
3599	34	25	28	33	23	25	24	20	22	30	23	24	28	20	22	
3565	0	0	0	0	0	0	18	18	18	27	25	25	0	0	0	
3497	0	0	0	27	23	25	24	21	22	30	24	25	24	20	20	
3438	29	27	26	25	24	24	23	20	21	28	23	25	22	20	21	
6305	32	27	28	30	25	24	23	20	20	29	24	25	31	23	23	
49619	28	28	28	25	24	23	24	23	20	30	26	22	11	11	14	

McF - McFarland (enota), TMP-SMX – trimetoprim-sulfametoksazol, zelena – občutljivi, rumena – zmerno odporni, rdeča – odporni, x ni zaznane rasti, ATTC 49619 – referenčni sev bakterije *S. pneumoniae*