

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Biologie



Hana Brzobohatá

Souvislost tvaru inhibičních zón v Etestu s mechanismem působení antibiotik

Mechanisms of antibiotic action and their relationship to the shape of the inhibition zones in
Etest

Bakalářská práce

Školitel: RNDr. Radovan Fišer, Ph. D.

Praha, 2020

Chtěla bych poděkovat svému školiteli RNDr. Radovanovi Fišerovi, Ph.D. za pomoc, cenné rady a v neposlední řadě čas, který konzultacím mé práce věnoval. Dále bych chtěla poděkovat všem členům Laboratoře fyziologie bakterií PřF UK, kteří mi pomohli s přípravou experimentů a s orientací v novém prostředí.

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci vypracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze,

.....

Hana Brzobohatá

OBSAH

1.	Úvod.....	1
2.	Antibiotika.....	2
2.1	Charakteristika antibiotik a jejich rozdělení.....	2
2.2	Baktericidní antibiotika	2
2.3	Bakteriostatická antibiotika	3
2.4	Rozdělení antibiotik podle cíle zásahu	3
2.4.1.	Syntéza DNA.....	4
2.4.2.	Syntéza buněčné stěny	4
2.4.3.	Cytoplazmatická membrána	4
2.4.4.	Syntéza RNA.....	5
2.4.5.	Proteosyntéza	5
2.4.6.	Metabolismus kyseliny listové	6
2.5	Metody testování citlivosti bakterií	7
2.5.1.	Diluční metody.....	8
2.5.2.	Difuzní metody.....	9
2.5.3.	Etest (epsilometrický test).....	9
2.5.4.	Metody testování na úrovni jednotlivých bakteriálních buněk	10
2.6	Faktory ovlivňující tvar inhibičních zón při Etestu	11
2.6.1.	Rychlost difuze.....	12
2.6.2.	Vlastnosti difuzního prostředí	14
2.6.3.	Velikost inokula	16
2.6.4.	Vlastnosti molekul antibiotika	16
2.7	Interpretace tvarů inhibičních zón u Etestu	17
2.7.1.	Rezistentní kmeny	21
2.7.2.	Rozsáhlý růst uvnitř inhibiční zóny	22

2.7.3.	Výrazně se zužující inhibiční zóny	24
2.7.4.	Dvojitá inhibiční zóna	25
2.7.5.	Mechanismus účinku antibiotika.....	26
3.	Závěr.....	28
4.	Seznam použité literatury	30

ABSTRAKT

Tato práce se zabývá metodami testování citlivosti bakteriálních kmenů vůči antibiotikům, a to zejména metodou Etestu (epsilometrický test), která je díky své jednoduchosti a přesnosti rozšířena jak ve výzkumných, tak i v klinických podmínkách. Porozumění metodám testování je nezbytné pro správné odečtení hodnoty MIC (minimální inhibiční koncentrace) a pochopení interakce bakteriálních buněk a molekul antibiotika. Cílem bylo zejména demonstrovat souvislosti mezi mechanismem účinku antibiotika s tvarem inhibiční zóny při provedení Etestu a poukázat na možné překážky, které mohou zkomplikovat interpretaci výsledků. Při literární rešerši byly sesbírány obrazové dokumentace výsledků Etestů z různých výzkumů, které byly vzájemně porovnány s tím, jak by měly inhibiční zóny vypadat podle fyzikálně-chemických zákonů o difuzi. Tvary inhibičních zón jsou ovlivněny zejména rychlostí difuze, charakterem molekul, vlastnostmi bakteriálního kmene a způsobem, jakým antibiotikum s bakterií interaguje.

Klíčová slova

antibiotika, metody testování citlivosti, Etest, difuze antibiotik, mechanismus účinku antibiotik

ABSTRACT

The aim of this work is antibiotic susceptibility testing, especially the method of Etest. Etest is a widespread technique due to its simplicity and accuracy in both research and clinical conditions. Understanding the method and its influencing factors is necessary for accurate reading of the MIC (minimum inhibitory concentration) and understanding of bacteria-antibiotic interactions. The purpose of the study was to demonstrate connections between antibiotic action mechanism and zone of inhibition shape. Also, to point out the obstacles that might complicate results interpretation. The pictures of Etest results from research papers were compared to the models of antibiotic diffusion. The zone of inhibition shape is affected by the diffusion rate, molecular characteristics of antibiotic, by the bacterial strain performances and by the specific bacteria-antibiotic interactions.

Keywords

antibiotics, antibiotic susceptibility testing methods, Etest, antibiotic diffusion, mechanism of antibiotic action

1. ÚVOD

Testování citlivosti bakteriálních kmenů je ve výzkumu a zejména klinické praxi klíčové. Vzhledem ke stoupajícímu počtu rezistentních bakteriálních kmenů je pro léčbu bakteriálních infekcí nezbytné zvolit odpovídající antibiotikum, vůči kterému je patogen citlivý. K prevenci šíření rezistencí přispívá i podání dostatečné koncentrace antibiotik. Nástrojem, který tyto informace poskytuje, jsou metody testování citlivosti bakterií. Nejvýznamnější z nich jsou popsány v této práci. Pro pochopení jejich principů a správnou interpretaci výsledků je třeba zohlednit vlastnosti antibiotika, testovaného kmenu i podmínky, za jakých testování probíhá. Je žádoucí, aby testování bylo co nejrychlejší, nejjednodušší, nejlevnější a hlavně nej přesnější. Metody jsou vyvíjeny od samého počátku používání antibiotik k boji s bakteriemi a s pokračujícím vědecko-technickým pokrokem jsou vyvíjeny stále nové. Dochází ale také ke zdokonalování technik původních, které jsou založené na základních fyzikálně-chemických principech. Nejčastěji se zakládají na principu difuze nebo na ředících řadách roztoku antibiotika (Baker *et al.*, 1991).

Na rozhraní těchto dvou skupin metod stojí metoda testování pomocí ustáleného gradientu koncentrace antibiotika, jehož nosičem je testovací proužek – Etest. Z proužku se antibiotikum difuzí šíří do agarového média, na kterém je kultivován testovaný bakteriální kmen. Jedná se o jednoduše proveditelnou kvalitativní metodu, jejíž výsledkem je při správném dodržení protokolu jasně stanovená hodnota MIC. Vzniklá oblast bez růstu buněk – inhibiční zóna – má eliptický tvar a podle stávajících podmínek různou excentricitu (Baquero *et al.*, 1992). Její tvar je závislý na difuzních zákonech, vlastnostech bakteriálního kmenu a v některých případech i na mechanismu účinku antibiotika. Pokud dochází ke vzniku nestandardního tvaru zóny, je namísto hledat příčinu ve vlastnostech bakterie nebo vlastnostech difuzní soustavy (Bonev, Hooper a Parisot, 2008).

Cílem této práce bylo zmapovat principy, které stojí za metodami testování citlivosti bakterií, a faktory, které mohou ovlivnit jejich výsledky. Zejména se pak zabývá principem Etestu a demonstrací souvislosti mechanismu účinku antibiotika a tvaru výsledné inhibiční zóny. Důvodem bylo pozorování během experimentů prováděných v Laboratoři fyziologie bakterií PřF UK, kdy některá antibiotika vyvolávala na plotnách vznik zón zvláštního tvaru. Příčina vzniku tohoto tvaru, který připomínal dvě překrývající se inhibiční zóny, nebyla jasná, což bylo prvotním impulzem k tematickému zaměření této práce.

2. ANTIBIOTIKA

2.1 Charakteristika antibiotik a jejich rozdělení

Jako antibiotika jsou označovány nízkomolekulární chemické sloučeniny, které svým účinkem inhibují růst mikroorganismů. Historicky byly za antibiotika označovány pouze látky produkované mikroorganismy, dnes je definice rozšířena i na látky jiného původu, které však také mají antimikrobiální účinky (Lancini *et al.*, 1995). Tato práce se zabývá pouze látkami, které účinkují proti bakteriím.

Lze je rozdělit do následujících skupin podle původu:

Antibiotika vznikající činností mikroorganismů (skupiny *Bacteria* a *Fungi*) jsou v přírodě mikroorganismy využívána jako způsob ochrany proti bakteriím v okolí producenta. Druhou skupinou jsou antimikrobiální látky syntetické, nebo semi-syntetické, které jsou vyráběny průmyslově nebo vznikají modifikací látek z první skupiny.

Kromě antibiotik *sensu stricto* existují i látky s antimikrobiálními účinky produkované vyššími organismy (např. antimikrobiální peptidy, které jsou součástí imunitního systému mnohobuněčných organismů) (Hanson, Lemaitre a Unckless, 2019). Ty se sice mezi antibiotika obvykle neřadí, ale vzhledem k možnostem jejich využití, které se za určitých okolností může s antibiotiky shodovat, jsou v této práci zmíněny i jejich mechanismy účinku. Látky ze všech těchto skupin lze dále rozdělit podle druhu účinku na baktericidní a bakteriostatické, nebo podle mechanismu působení (Madigan, Martinko a Parker, 2003).

2.2 Baktericidní antibiotika

Baktericidní antibiotika při použití dostatečně vysoké koncentrace svým působením s účinností vyšší než 99,9 % zabíjejí senzitivní bakteriální buňky (Nemeth, Oesch a Kuster, 2015). Jejich účinek na zasažené buňky je tedy trvalý. Zásahovým místem jsou procesy nebo komponenty, bez kterých se buňka neobejde. Mezi možné mechanismy (detailní popis viz níže) patří inhibice syntézy DNA, RNA, proteinů a buněčné stěny a narušení cytoplazmatické membrány (Kohanski, Dwyer a Collins, 2010). Mezi baktericidní jsou řazena např. β -laktamová, aminoglykosidická a quinolonová antibiotika (viz. níže) (Keren *et al.*, 2013).

Účinnost této skupiny antibiotik závisí na růstové fázi dané bakteriální kultury, a tedy na její růstové rychlosti. Letalita je nejvyšší u kultur ve fázi exponenciálního růstu, naopak na nerostoucí bakterie nemá, ve většině případů, antibiotikum vliv žádný, nebo velmi malý (např. β -laktamy). Výjimku tvoří některé fluorochinolony, které působí baktericidně i na pomalu

rostoucí a nerostoucí bakterie (Eng *et al.*, 1991). Účinnost může být také snížena přítomností perzistujících spor nebo přítomností rezistentních buněk (rezistence vzniklá spontánní mutací) (Keren *et al.*, 2013). Lze tedy říct, že výše popsaná definice neplatí, neboť smrtící účinek se může za různých podmínek lišit. Problematickým případem může být např. bakteriální infekce, kde rostou bakterie kvůli suboptimálním podmínkám pomaleji než laboratorně testovaná kultura, a antibiotika na ně budou tedy působit méně (Eng *et al.*, 1991).

Skupina baktericidních antibiotik často indukuje v buňkách produkci hydroxylových radikálů. Výsledkem jejich působení jsou poškození vzniklá během reakčních kaskád vedoucích ke smrti buňky (poškození Fe-S center v proteinech, nedostatek redukčních ekvivalentů NADH, stimulace Fentonovy reakce). Samotná přítomnost těchto radikálů je ale pouze doprovodným jevem, který může sloužit k rozlišení baktericidního a bakteriostatického účinku (Kohanski *et al.*, 2007). Primárním smrtícím mechanismem je znemožnění některého z nezbytných buněčných procesů, které vede ke složité kaskádě biochemických, strukturních a genetických poškození (Kohanski *et al.*, 2010).

2.3 Bakteriostatická antibiotika

Bakteriostatická antibiotika inhibují růst bakteriálních buněk (např. zastavením proteosyntézy), aniž by je nevratně poškodila. Bakterie se jejich působením dostávají do stavu podobného stacionární fázi. Účinek těchto antibiotik trvá pouze, dokud jsou jeho molekuly přítomny v médiu. Po jejich odstranění mohou bakterie znovu obnovit narušené pochody (Bernatová *et al.*, 2013). Při klinickém využití těchto látek je k úplnému odstranění infekce obvykle potřeba jejich spolupráce s funkčním imunitním systémem pacienta (Nemeth, Oesch, a Kuster, 2015).

Rozdělení antibiotik na baktericidní a bakteriostatická není ve skutečnosti tak jednoznačné, jak vyplývá z předchozích definic, ale závisí na konkrétních podmínkách. Smrtící účinek např. většinou nefunguje napříč všemi senzitivními bakteriálními druhy, ale u některých pouze inhibuje růst. Při kontaktu antibiotika s velkým inokulem se jeho letální aktivita taktéž snižuje (často je účinnost 90 - 99 %) (Nemeth, Oesch a Kuster, 2015).

2.4 Rozdělení antibiotik podle cíle zásahu

Látky s antimikrobiálním účinkem lze rozdělit do užších skupin podle chemické struktury a původu (např. penicilinová antibiotika, fluorchinolony atd.) nebo do širších skupin podle jejich zásahového místa. Níže následuje velmi stručný přehled zásahových míst s popisem mechanismu účinku látek, které blokují jejich funkci.

2.4.1. Syntéza DNA

Nejpočetnější skupinou antibiotik zastávající DNA syntézu jsou chinolony, které narušují strukturu bakteriální topoisomerázy II a inhibují činnost DNA gyrázy a topoisomerázy IV. Ovlivněním těchto enzymů je znemožněna regulace nadobrátek chromozomální DNA, a následkem je tedy znemožnění její syntézy. Chinolony jsou bicyklické molekuly, jejichž aktivitu je možno pomocí substituentů modifikovat na šesti různých místech (Pham, Ziora a Blaskovich, 2019). Další skupinou antibiotik, která rovněž zastavují replikaci vazbou na DNA gyrázu, jsou aminokumariny. Chinolony (např. kyselina nalixidová, ciprofloxacín) svou vazbou na A podjednotku gyrázy stabilizují komplex tohoto enzymu s navázanou DNA, kterou štěpí na dvouvláknový zlom. V takovou chvíli bakterie spustí SOS odpověď a zastaví procesy buněčného dělení, dokud nedojde k opravě DNA zlomu. Aminokumariny (např. novobiocin) oproti tomu kompetují o vazebné místo s molekulami ATP na podjednotce B gyrázy. Molekuly ATP jsou nutné pro katalýzu vazby gyrázy na vlákno DNA, a tedy pro zahájení činnosti enzymu (Trojanowski *et al.*, 2019). Aminokumariny na rozdíl od chinolonů nezpůsobují poškození DNA a nespouští SOS odpověď buňky (Schrö, Goerke a Wolz, 2013).

2.4.2. Syntéza buněčné stěny

Látky, které se používají k inhibici polymerizace bakteriální buněčné stěny, jsou zpravidla strukturní analogy D-alaninového postranního řetězce jednotek peptidoglykanu. Proteiny, které tyto monomery do peptidoglykanové sítě zařazují (PBPs – penicillin binding proteins), místo nich rozeznávají strukturu β -laktamového kruhu molekul antibiotika. Mezi PBPs patří transpeptidázy a karboxypeptidázy (Schneider a Sahl, 2010). Bakteriální buňka bez možnosti pokračovat v syntéze buněčné stěny ztrácí podstatnou část své mechanické odolnosti, dochází ke změně tvaru a velikosti buňky, zastavení dělení a při aktivaci autolyzinů (pouze u některých bakterií) i k její lýzi (Kohanski, Dwyer a Collins, 2010). Dalšími antibiotiky, která cílí na komponenty peptidoglykanové syntézy, jsou některé glykopenety (např. vankomycin), které svou vazbou blokuje transportní funkci baktoprenolu (lipid II) (Soriano a Ponte, 2009).

2.4.3. Cytoplazmatická membrána

Antimikrobiální látky lze cílit rovněž na některé komponenty cytoplazmatické membrány gram pozitivních bakterií, i na komponenty obou membrán bakterií gram negativních (Teixeira, Feio a Bastos, 2012). Nejčastějším mechanismem je rozrušení struktury membrány začleněním antimikrobiálního peptidu (AMP). AMP se může buď začlenit do vnější fosfolipidové vrstvy a způsobit tím snížení integrity membrány, nebo se inkorporovat napříč oběma membránovými listy. Molekuly AMP spolu po dosažení prahové koncentrace většinou interagují a tvoří

komplexy. Při těchto interakcích mohou na membránu působit jako detergenty nebo tvořit definované oligomery, čímž dochází k deformacím a rozpadu membrány a v některých případech k tvorbě pórů. Kromě strukturálních změn dochází k porušení membránového potenciálu buněk (Melo, Ferre a Castanho, 2009).

Přesto, že sekvence aminokyselin v AMP jsou značně diverzifikované, musí peptidové řetězce splňovat několik strukturních podmínek, aby byla možná interakce s bakteriální membránou. Obvykle se jedná o molekuly do velikosti 10 kDa, s hojným zastoupením kladně nabitých aminokyselin. Kladný náboj umožňuje interakci se záporně nabitým povrchem bakteriální buňky. Vyšší struktury AMP se mohou skládat jak z α -helixů, tak z β -listů. Výsledný polypeptid má většinou amfipatický charakter (Almeida a Pokorny, 2009).

Mechanismus tohoto typu látek s antibakteriálním účinkem je odvozen od obranného mechanismu, který se vyskytuje jako součást vrozeného imunitního systému napříč mnohobuněčnými organismy (Hanson, Lemaitre a Unckless, 2019).

2.4.4. Syntéza RNA

Přepis genetické informace z DNA do RNA – transkripce – je proces pro buňku zcela nezbytný. Enzymem, který se v bakteriální buňce podílí na jeho regulaci, a tedy ovlivňuje i regulaci genové exprese, je DNA dependentní RNA polymeráza – RNAP. Antibiotika, která brání syntéze RNA, pracují často na principu blokace jejích konformačních změn, nebo interferencí s některým z jejích regulačních faktorů (např. σ faktory). Pokud mají tyto zásahy trvalý efekt, dochází ke smrti buňky. RNAP je multipodjednotkový enzym a obsahuje tedy řadu potenciálních zásahových míst pro antibiotika (Murakami, Masuda a Darst, 2002). Významná část těchto antibiotik se váže do oblasti poblíž DNA/RNA žlábků na β -podjednotku enzymu a brání tvorbě fosfodiesterové vazby mezi nukleotidy nebo disociaci DNA/RNA komplexu. Takovou skupinou jsou např. ansamyciny. Konformační změna způsobená jejich interakcí s enzymem brání vazbě Mg^{2+} , což vede (jak bylo popsáno výše) ke znemožnění disociace DNA/RNA komplexu a zastavení transkripce (Campbell *et al.*, 2001).

2.4.5. Proteosyntéza

Ribosomální syntéza proteinů podle templátové mRNA – translace – je dalším z klíčových procesů v chodu buňky a je tedy vhodným cílem pro antibiotika. Mechanismem působení antibiotik dochází nejčastěji k jejímu zastavení ve fázi iniciace nebo elongace. V některých případech antibiotika mohou inhibovat i terminaci translace nebo recyklaci jejích komponent (např. EF-Tu, EF-G, IF2) (Wilson, 2014). Malá (30S) ribosomální podjednotka obsahuje tři

tRNA vazebná místa – A (aminoacyl), P (peptidyl), E (exit) – jejichž zablokováním je znemožněno pokračování proteosyntézy. Antibiotika cílená na tuto podjednotku zpravidla interagují s jejími rRNA součástmi (např. tetracyklin s 16 rRNA) (Brodersen *et al.*, 2000). Často také interagují s tzv. dekodujícím centrem (DC), které kontroluje správné párování kodonů mRNA s antikodony aminoacyl-tRNA (Lin *et al.*, 2018). Vazbami antibiotika může docházet např. ke změnám konformace ribosomální podjednotky, snížení flexibility polypeptidického řetězce, vychýlení oblastí ribosomu, které rozeznávají mRNA, inhibici translokace tRNA nebo zabránění tvorby 70S ribosomu interferencí s IF3 (Brodersen *et al.*, 2000).

Mechanismus účinku většiny antibiotik cílených na velkou (50S) ribosomální podjednotku zahrnuje interferenci s peptidyl-transferázovým centrem (PTC), kde dochází k tvorbě peptidické vazby mezi aminokyselinami, nebo s místem, kde nascentní peptidický řetězec ribosom opouští (nascent peptid exit tunnel - NPET) a které je zároveň důležitým regulačním centrem translace. Tímto způsobem působí např. makrolidy, skupina antibiotik, která svou vazbou zmenší průměr NPET. Jedná se tedy o mechanické zablokování peptidického řetězce, který se po vazbě některého z makrolidických antibiotik do NPET nevejde a nemůže opustit ribosom (Lin *et al.*, 2018). Ke znemožnění tvorby peptidické vazby může docházet například kompeticí molekuly antibiotika s postranními řetězci aminokyselin o vazebná místa v PTC, nebo jeho konformační změnou (Davidovich, Bashan a Yonath, 2008).

Obě podjednotky bakteriálního (70S) ribozomu obsahují větší množství dalších potenciálních cílů pro nová antibiotika. Jejich vývoj je předmětem výzkumu kvůli rezistencím, které bakterie dosud vyvinuly proti antibiotikům stávajícím (Brodersen *et al.*, 2000).

2.4.6. Metabolismus kyseliny listové

Metabolismus kyseliny listové je pro život bakteriální buňky nezbytný z důvodu jeho spřažení se syntézou thyminu. Produktem této metabolické reakční kaskády je tetrahydrofolát, který je substrátem thymidylát syntázy. Nedostatek thyminu způsobí v buňce stav tzv. thyminového hladovění, které následně vede k smrti. Nedostatek ostatních bází a jiných růstových faktorů nemá v buňce, narozdíl od thyminu, vliv baktericidní, ale pouze bakteriostatický (Cohen a Barner, 1954). Thymin hraje nezastupitelnou roli při iniciaci replikace a při jeho nedostatku se buňky dostanou do stavu nevyváženého růstu. Při něm probíhají všechny pro život buňky důležité procesy kromě replikace DNA. Zastavená replikace vede ke vzniku dvou vláknových zlomů, které se spolu s dalšími poškozeními hromadí v buňce. Celý tento proces, označovaný jako TLD (thyminless death), je propojený s chromozomálním *mazEF* systémem

programované buněčné smrti, během kterého dochází k dalším nevratným poškozením a změnám konfigurace DNA (Ahmad, Kirk, a Eisenstark, 1998). *MazEF* operon obsahuje sekvence pro syntézu labilního antitoxinu MazE a stabilního toxinu MazF. Pod vlivem TLD se sníží exprese z *mazEF* promotoru, takže v buňce chybí antitoxin a dochází k výše zmíněným poškozením, snížení transkripce a translace, a jedná se tedy o ideální zásahové místo pro antibiotika (Sat, Reches a Engelberg-Kulka, 2003). Mezi antibiotika, která na různých úrovních interferují s metabolismem kyseliny listové, patří např. sulfonamidy a trimethoprim (Engelberg-Kulka *et al.*, 2004).

2.5 Metody testování citlivosti bakterií

Znát citlivost bakteriálního kmenu vůči antibiotiku je důležité jak v klinické praxi, tak v základním výzkumu. Antibiotika se rovněž dostávají do odpadních vod (např. z nemocničních zařízení či živočišné produkce), což následně vede k šíření genů pro rezistenci mezi bakteriemi ve volném prostředí. Tento celosvětový problém získává v posledních letech stále větší pozornost a je dalším z důvodů, proč je třeba znát dobře vztah mezi bakterií a antibiotikem (Zhang, Zhang a Fang, 2009). Metody testování citlivosti mohou být užitečným zdrojem informací o tomto vztahu. Kromě zjištění, zda zkoumaná bakterie na antibiotikum reaguje, se stanovuje minimální množství antibiotika, které je možné použít pro inhibici jejího růstu. Různé metody se používají i k detekci rezistencí v bakteriálních izolátech získaných např. od pacientů či ze zkoumaného volného prostředí. Značná část testovacích metod je závislá na bakteriálním růstu a všechny pracují s čistou bakteriální kulturou (Syal *et al.*, 2017).

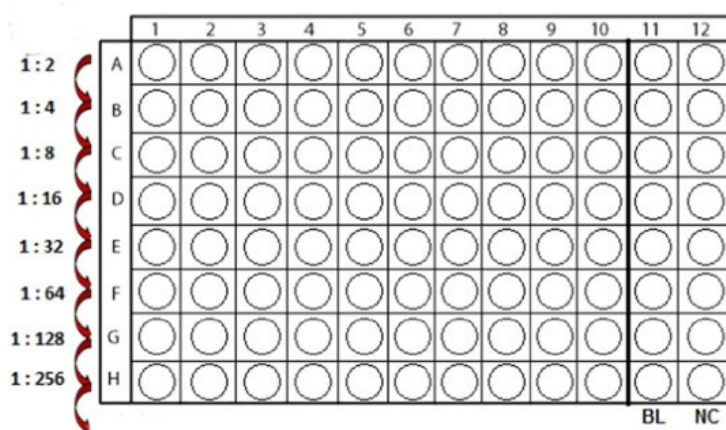
K vyjádření účinnosti působení antibiotika na vybraný bakteriální kmen se běžně používá hodnot minimální inhibiční koncentrace (MIC – minimum inhibitory concentration), která je v některých případech doplněna hodnotou minimální baktericidní koncentrace (MBC – minimum bactericidal concentration). MIC ($\mu\text{g/ml}$) je nejnižší hodnota koncentrace antibiotika, při které dochází k zastavení růstu testované bakteriální kultury (Lambert a Pearson, 2000). Bakteriální kmen je vzhledem k antibiotiku klasifikován jako citlivý v případě, že je hodnota MIC větší nebo rovna tabulkové hodnotě (tzv. „breakpoint“) (Wiegand, Hilpert a Hancock, 2008). U některých metod nastává problém při testování bakterií, které tvoří biofilm. Obvykle totiž reagují na antibiotikum jinak než v laboratoři pěstované planktonní formy a mohou mít velmi odlišnou (zpravidla vyšší) hodnotu MIC. Pro takový bakteriální kmen se tedy kromě MIC může udávat i MBIC (minimum biofilm inhibition concentration) (Macià, Rojo-Molinero a Oliver, 2014).

V následujících podkapitolách jsou popsány metody, které experimentálně stanovují MIC a MBC.

2.5.1. Diluční metody

Principem dilučních (ředicích) metod je kultivace bakteriálních kultur v několika nádobách s různou koncentrací testovaného antibiotika v médiu. Jedná se o velmi spolehlivé, ale časově náročné metody, které vyžadují precizní přípravu. Používají se např. „dvojkové“ ředící řady, kdy se základní koncentrace antibiotika v každém dalším provedení dvojnásobně sníží oproti provedení poslednímu (např: 16, 8, 4, 2, 1 µg/ml). Tato metoda má dvě varianty založené na stejném principu. Nejčastěji se používá kultivace kultury o definované koncentraci v tekutém živném médiu, např. ve zkumavkách o objemu několika ml, z nichž každá obsahuje médium o jiné koncentraci antibiotika. Po dostatečně dlouho trvající kultivaci se spektrofotometricky stanovuje koncentrace živých (tedy nově narostlých) buněk v jednotlivých nádobách a vyhodnotí se MIC podle toho, ve kterých koncentracích antibiotika došlo k nárůstu bakterií a ve kterých již ne. Náročnější a vzácněji používanou variantou je aplikace ředících řad antibiotik do médií pevných. Stejně jako v předchozím případě se očkované médium nechá při definované teplotě dostatečně dlouho inkubovat a následně se vyhodnotí, při jaké koncentraci bakterie přestávají růst (Wiegand, Hilpert a Hancock, 2008).

Pokročilejší a snazší variantou výše zmíněného postupu je metoda tzv. mikrodilučního testování, které principem odpovídá ředění v tekutém médiu, ale pracuje s výrazně nižšími objemy. Pro toto testování existují i komerčně připravené, většinou jednorázové, sady (Obr. 1) pro efektivní testování několika antibiotik současně (Jorgensen a Ferraro, 2009).



Obrázek 1 – Sada pro mikrodiluční test; A-B označuje řádky se sériovým ředěním antibiotika. 1-12 jsou sloupce pro opakování testu nebo pro více druhů antibiotik (Veiga *et al.*, 2019).

2.5.2. Difuzní metody

Principem těchto metod je spontánní prostup molekul antibiotika prostředím pevného agarového média (difuze v gelu), na které je inokulována exponenciálně rostoucí bakteriální kultura. V oblasti, kam se dostane dostatečná koncentrace molekul antibiotika (MIC), dochází k inhibici růstu a tedy vzniku tzv. inhibičních zón. Velikost těchto zón se následně používá ke stanovení citlivosti bakteriálního kmenu.

Častým provedením je metoda využívající difuzních disků. Jde o papírové disky (obvykle z porézního, např. filtračního, papíru), napuštěné roztokem antibiotika a následně vysušené. Při testu se umísťují na Petriho misku se zaočkovanou bakteriální kulturou. Z papírového disku se agarovým médiem spontánně šíří molekuly antibiotika, které radiálně kolem něj vytváří gradient koncentrací. Po inkubaci za definovaných podmínek (obvykle při 35 °C přes noc) je změřen průměr vzniklé kruhové inhibiční zóny, z něhož je podle vztahu níže (1) vypočtena hodnota MIC (Biemer, 1973). Tento vztah vychází z řešení diferenciální rovnice popisující volnou jednosměrnou difuzi (2).

$$(1) \ln(MIC) = \ln(c) - \frac{x^2}{4Dt} \quad (1)$$

$$(2) D \frac{\partial^2 c(x,t)}{\partial x^2} - \frac{\partial c(x,t)}{\partial t} = 0 \quad (2)$$

c – počáteční koncentrace antibiotika; x – průměr inhibiční zóny; D – difuzní koeficient; t – doba trvání difuze

Vztah $c(t, x)$ vyjadřuje závislost koncentrace na vzdálenosti od středu disku a na době trvání difuze. D – difuzní koeficient je na koncentraci nezávislá veličina vycházející z vlastností difundující látky a difuzního prostředí (rovnice 4 a 5 níže). Čím vyšší je počáteční koncentrace antibiotika obsažená v disku, nebo jiném bodovém zdroji molekul, tím větší průměr mají inhibiční zóny (Bonev, Hooper a Parisot, 2008).

2.5.3. Etest (epsilometrický test)

Jedná se o gradientovou difuzní metodu. Technické provedení je podobné difuznímu disku – test je umístěn na pevné agarové plotny zaočkované exponenciálně rostoucí bakteriální kulturou. Test, ve tvaru tenkého proužku („stripu“), je obvykle vyroben z inertního materiálu a jeho spodní strana nese předpřipravená množství antibiotika ve formě vysušených kapek, ze kterých se po aplikaci na agar antibiotikum šíří do prostředí a vytvoří stabilní gradient koncentrace. Standardně se jedná o gradient odpovídající dvojkové diluční řadě o 15 koncentracích na vzdálenosti 45 mm (Bolmström, 1993). Plotny s bakteriální kulturou

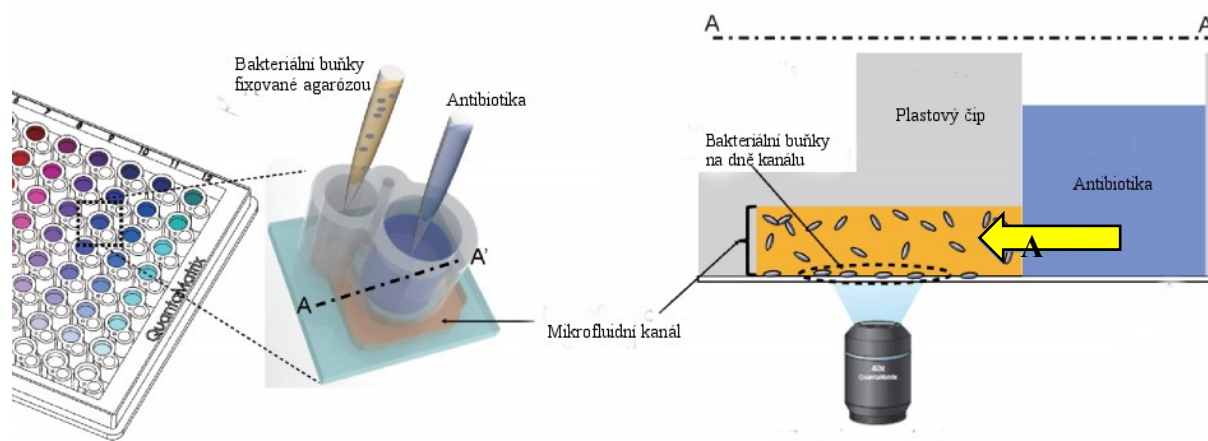
a Etestem se následně inkubují za definovaných podmínek (např. noční inkubace při 37 °C), doba inkubace však nesmí přesáhnout dobu, kdy je gradient antibiotika stabilní. Stabilita gradientu je garantována nejméně 12 hodin. Hodnota MIC ($\mu\text{g/ml}$) je odečtena přímo na stupnici testu v místě, kde jej protíná okraj vzniklé inhibiční zóny. Pro její stanovení tedy není oproti předešlé metodě potřeba dodatečných výpočtů. Vzniklá inhibiční zóna je přibližně eliptického tvaru (Ericsson a Bolmström, 1988). Faktory, které ovlivňují tvar této inhibiční zóny jsou podrobněji popsány v kapitole 2.6.

2.5.4. Metody testování na úrovni jednotlivých bakteriálních buněk

Za určitých okolností (např. urgentní klinicky odebrané vzorky) hraje u volby testovací metody bakteriálních kmenů roli kromě přesnosti i rychlost jejího provedení. Za takových podmínek není možné čekat 12-20 hodin na výsledky kultivace a je nutné případné rezistence detekovat co nejrychleji. Rychlé metody nepracují, na rozdíl od metod kultivačních, na principu detekce změn růstu bakteriální kultury (detekce měřením optické denzity nebo pouze „okometricky“), ale často na principu změn na úrovni jediné buňky. Sledovaným parametrem jsou změny, které v buňce probíhají v průběhu jejího dělení – morfologické a metabolické. Pokud jsou změny spojené s dělením detekovány v přítomnosti antibiotika, je vůči němu testovaná bakterie senzitivní. Využívané metody často detekují změny hned v raných stádiích dělení (Choi *et al.*, 2014).

Některé metody jsou založené na optickém zobrazování – např. single-cell morfologická analýza (SCMA), tedy analýza založená na detekci morfologických změn na úrovni jednotlivých buněk. Pomocí optických mikroskopů jsou snímány bakterie imobilizované (pomocí agarózy) v kanálcích mikrofluidních čipů, které rozměrově odpovídají jejich buňkám. V každém kanálku jsou zdroje živin a antibiotika, ze kterých se molekuly difuzí stabilně dostávají k bakteriím (Obr. 2) (Choi *et al.*, 2014). Tímto způsobem lze sledovat i změny metabolické aktivity, které buněčnému dělení předcházejí. Uvolněné molekuly metabolitů jsou v malých objemech uvnitř kanálu detekovány díky přidaným fluorescenčním indikátorům (např. redoxní indikátor resazurin) (Boedicker *et al.*, 2008).

Další možností detekovat u bakterií rezistence vůči antibiotikům je jejich genotypizace nebo hledání rezistencí pomocí genetických značek (Boedicker *et al.*, 2008). Analýzou genomu je ovšem možné najít pouze geny rezistence, jejichž sekvence jsou již známé u jiných bakterií (Lupien *et al.*, 2013).

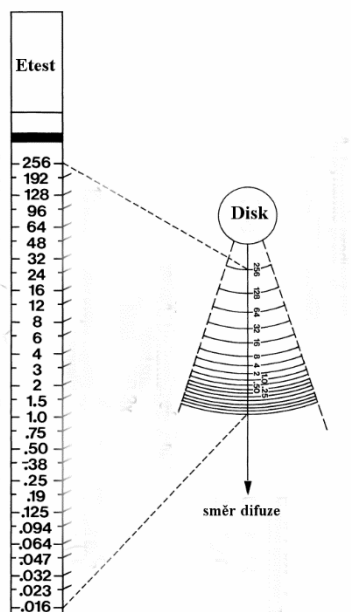


Obrázek 2 – Příklad metody analýzy bakteriální citlivosti pomocí optického snímání na úrovni jednotlivých buněk, pomocí čipu s mikrofluidními kanálky. Upraveno dle (Choi *et al.*, 2014)

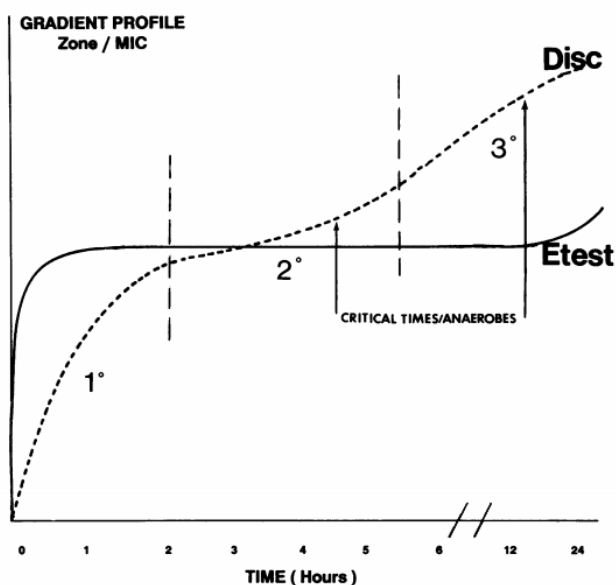
2.6 Faktory ovlivňující tvar inhibičních zón při Etestu

Při testování působení antibiotik pomocí difuzních metod dochází ke vzniku tzv. inhibičních zón – oblastí, kde je koncentrace antibiotika taková, že zde nedochází k bakteriálnímu růstu ($c \geq MIC$). Okraj inhibiční zóny je definován jako místo, kde se dostatečná koncentrace antibiotika (kritická koncentrace – c') při testování poprvé setká s populací bakteriálních buněk (kritická populace), jejichž růst kvůli vysoké hustotě již není schopné inhibovat. Doba, za jakou antibiotikum do tohoto místa doputuje, se nazývá kritický čas a závisí na růstových vlastnostech zkoumaného bakteriálního kmenu, počáteční velikosti inokula a nutriční kapacitě média. Výsledky testování jsou tedy reprodukcibilní a platné pouze, pokud je gradient antibiotika stabilní alespoň po dobu kritického času. U aerobních bakterií se kritický čas obvykle pohybuje mezi 3-6 hodinami, u anaerobů je vzhledem k rozdílnostem jejich růstových nároků mnohem variabilnější, ale u běžně testovaných kmenů kolísá mezi 5-12 hodinami. Tato doba znemožňuje jejich testování pomocí difuzních disků, neboť se u nich gradient antibiotika během času mění (velký průměr inhibiční zóny v takovém případě nutně neodráží citlivost, ale pomalý růst bakterií). Zde má výhodu Etest, kde gradient zůstává stabilní minimálně po dobu 12 hodin (Obr. 3) (Wüst a Hardegger, 1992; Bolmström, 1993).

A



B



Obrázek 3 – (A) srovnání gradientu koncentrací antibiotika u difuzního disku a Etestu, (B) stabilita ustaveného gradientu v čase (Bolmström, 1993).

Vliv kritického času na poloměr inhibiční zóny je vyjádřen vztahem (3) a lze jej demonstrovat umístěním antibiotika na agarovou plotnu s bakteriemi, které byly preinkubovány. V takovém případě budou vznikat inhibiční zóny o menším průměru a při výpočtech je tedy třeba časový rozdíl (h) odečíst od celkového času (T).

$$r^2 = 4D(T_0 - h) \ln \left(\frac{c_0}{c_1} \right) \quad (3)$$

Rovnováha mezi kritickou populací a kritickou koncentrací antibiotika je hlavním faktorem, který ovlivňuje tvar vznikající inhibiční zóny (Cooper, 1963). Faktory, které mohou touto rovnováhou hýbat a ovlivnit tím velikost a tvar inhibiční zóny, jako jsou vlastnosti antibiotika, fyzikální podmínky difuze, či specifická interakce testované bakterie s antibiotikem, jsou blíže popsány níže.

2.6.1. Rychlost difuze

Difuze je pohyb částic v prostředí způsobený stálým neuspořádaným tepelným pohybem částic (Brownovým pohybem) a tendencí částic vyrovnávat koncentraci v prostředí – tj. přecházet z místa s vyšší koncentrací do míst s koncentrací nižší. Pokud tedy difuze probíhá po dostatečně dlouhou dobu, dojde k vyrovnání koncentrace ve všech místech soustavy. Při difuzi nedochází ke spotřebě energie – jedná se tedy o děj samovolný (Bartáková a Šišková, 2005).

Mechaniku pohybu částic v plynném nebo kapalném difuzním prostředí popisuje 1. Fickův zákon (4). V prostředí, kde není uniformní koncentrace částic, platí v každém čase pro kteroukoliv z nich.

$$\left(\frac{dc}{dt}\right)_x = D \left(\frac{d^2c}{dx^2}\right)_t \quad (4)$$

Při testování antibiotik dochází k difuzi radiální, kterou popisuje upravená rovnice pro 1. Fickův zákon (5). Zdroj testované látky je v takovém nadbytku, že jej lze považovat za neomezený.

$$\left(\frac{dc}{dt}\right)_x = D \left(\frac{d^2c}{dx^2} + \frac{1}{r} \frac{dc}{dr}\right)_t \quad (5)$$

Pokud je zdroj antibiotika bodový, prakticky s velmi malým průměrem, lze jej v porovnání s průměrem (r) vznikající inhibiční zóny zanedbat. Pak platí pro výpočet průměru inhibiční zóny vztah (6) (Cooper, 1963).

$$r^2 = [\ln C_0 - \ln C' - \ln(2DT)] \quad (6)$$

Probíhá-li difuze ve stacionární soustavě, lze její rychlost vyjádřit difuzním tokem $-J_i$, který je definovaný jako látkové množství, které projde jednotkovou plochou kolmou ke směru difuze. Difuzní tok je podle 1. Fickova zákona vyjádřen vztahem (7).

$$J = \frac{n}{s \cdot t} [\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}] \quad (7)$$

Nebo také:

$$J = -D \cdot \nabla(c) = -D \cdot \frac{dc}{dx} = -D \cdot \frac{\Delta c}{\Delta x} \quad (8)$$

Zde figuruje gradient koncentrace (c) na určité vzdálenosti (x) a kde difuzní koeficient (D) popisuje schopnost látky difundovat prostředím v závislosti na teplotě, viskozitě prostředí a velikosti částic. Je definován Einsteinovou rovnicí (9)

$$D = \frac{K \cdot T}{f} \quad (9)$$

Pro kapalném prostředí platí Einstein-Stokesova rovnice (10) (Bartáková a Šišková, 2005):

$$D = \frac{K \cdot T}{f} = \frac{K \cdot T}{6 \cdot \pi \cdot \eta \cdot R} \quad (10)$$

K – Boltzmanova konstanta; T – absolutní teplota;

f – koeficient tření; η – viskozita disperzního prostředí;

R – hydrodynamický poloměr částic

Pro molekuly kompaktní struktury lze hydrodynamický poloměr úměrně vztáhnout k molekulové hmotnosti (11) (Tokita, 2016).

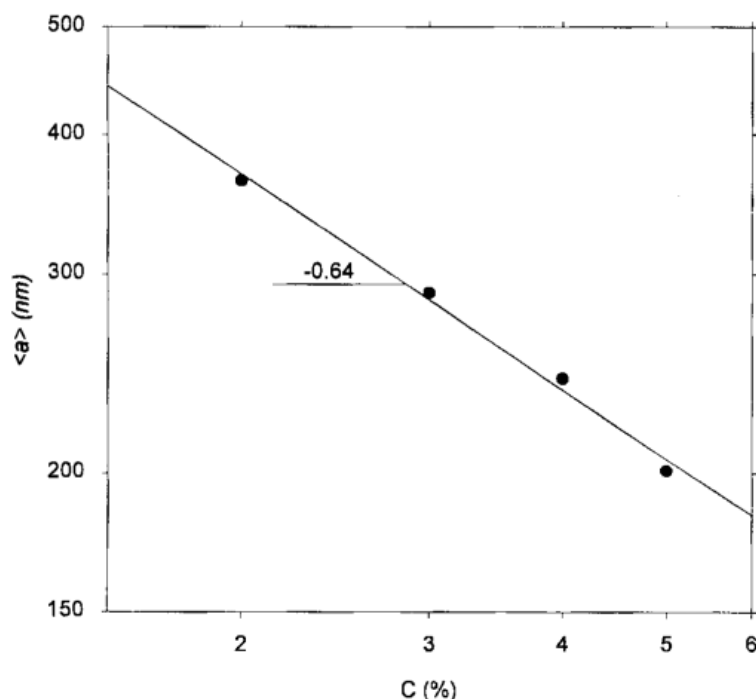
$$R \propto M_w^{\frac{1}{3}} [Da] \quad (11)$$

Test se provádí na agarovém médiu gelového charakteru. Gely řadíme ke koloidně disperzním soustavám, ve kterých dochází ve srovnání s kapalinami nebo plyny k difuzi značně pomalejší. Jedná se o porézní síť polymerizovaných molekul, které mohou být podle konkrétních molekul propojeny kovalentně, nebo díky slabým vazebným interakcím. Hustota této sítě, a tedy velikost pórů, určuje její difuzní vlastnosti – viskozitu (η) a koeficient tření (f) (10) (Bartáková a Šišková, 2005; Tokita, 2016).

2.6.2. Vlastnosti difuzního prostředí

Pro kultivaci bakterií při testování citlivosti se používá živné médium zpevněné agarovým gelem. Jedná se o polysacharid extrahovaný z mořských řas (skupina *Rhodophyta*), který je tvořen D- a L-galaktózovými jednotkami. Bylo prokázáno, že tyto jednotky tvoří 2 různé polysacharidy s různými vlastnostmi – agaróza (tvořící pružnou gelovou strukturu) a agaropektin (zvyšující pevnost gelu). Agaróza je lineární polymer bez elektrochemického náboje, tvořený β -D-galaktózou a 3,6-anhydro-L-galaktózou, které pojí glykosylická vazba. Agaropektin je tvořen stejnými jednotkami, ale některé 3,6-anhydro-L-galaktózové cykly jsou nahrazeny L-galakto-6-sulfátem nebo metoxylem či pyruvátem, které snižují pružnost gelu (Helleur *et al.*, 1985).

Z hlediska difuze jsou důležitými vlastnostmi agarového gelu zejména jeho koncentrace a složení, které determinují jeho mechanické vlastnosti. Platí, že se zvyšující se koncentrací je polysacharidová síť hustější, zužují se póry (Obr. 4) a zvyšuje se jeho mechanická odolnost. Tu dále zvyšuje i zastoupení anhydro-galaktózových jednotek (Bertasa *et al.*, 2020). Hustota a velikost pórů ovlivňují výslednou viskozitu gelu (η), která je jednou ze složek koeficientu tření (f) v Einstein-Stokesově rovnici (9) (De Genne, 1981). Při nižších hodnotách pH se polysacharidové řetězce smrští (Bertasa *et al.*, 2020).



Obrázek 4 - Velikost pórů $\langle a \rangle$ (nm) jako funkce koncentrace agarózy C (%) (Pernodet, Maaloum, a Tinland, 1997).

Doporučená tloušťka agaru pro provedení diskového difuzního testu a Etestu jsou 4 mm (Lalitha, 2004). Pokud má vrstva agaru na plotně tloušťku jinou, může dojít ke změně difuzních vlastností prostředí, a tedy i k naměření odlišné hodnoty MIC. Čím silnější je agarová vrstva, tím menší je vzniklá inhibiční zóna, a tedy vyšší naměřená hodnota MIC. Závislost naměřené MIC na tloušťce agarové vrstvy se zvyšuje s difuzním koeficientem antibiotika, který koreluje s jeho molekulární hmotností. Nejvíce se tedy projeví u antibiotik s menšími molekulami, které jsou schopné v prostředí difundovat nejrychleji. Takové molekuly rychle difundují ze zdroje do prostředí, a pokud je tloušťka agaru větší než 4 mm, dochází ke zředění nastoleného gradientu. To je důvod vzniku menších inhibičních zón (kritická koncentrace) a naměření vyšších hodnot MIC. Větší molekuly difundují pomaleji, a tedy nedochází k tak výraznému zředění gradientu (Flanagan a Steck, 2017).

Pokud dojde k dehydrataci agarových ploten (např. jejich dlouhodobou expozicí na vzduchu), sníží se odparem vody jejich hmotnost a změní se struktura gelu. Čím více je agar dehydratovaný, tím vyšší jsou hodnoty naměřené MIC a tedy menší průměr inhibiční zóny (Flanagan a Steck, 2017). Kvalita agaru a média může změnit výsledek testu i z důvodu rozdílných nutričních vlastností, které ovlivňují růst bakterií. Některá média mohou způsobit rozmazané okraje inhibičních zón, čímž může dojít k nepřesnému odečtení hodnoty MIC (Bolmström, 1993).

2.6.3. Velikost inokula

Pokud je při difuzním testu použito příliš velké inokulum ($c > 10^7$ CFU/ml), dojde ke vzniku výrazně menší inhibiční zóny, a tedy k naměření nižších hodnot MIC, než při použití inokula menšího. Tento jev se nazývá efekt inokula. Naopak některé bakteriální kmeny se pak mohou při testování příliš malých inokul ($c = 10^6$ CFU/ml) jevit jako citlivé, přestože v koncentrovanějších kulturách na antibiotikum nereagují (Brook, 1989).

Efekt inokula (EI) je nejvíce zkoumán u β -laktamových antibiotik. Hraje zde roli β -laktamáza – enzym exkretovaný rezistentními kmeny, který degraduje molekuly antibiotika v prostředí. Dochází tím ke snižování jeho koncentrace v prostředí, což umožňuje bakteriím zmenšit velikost inhibiční zóny. Z ostatních skupin antibiotik je EI znám např. u makrolidů, antimikrobiálních glykopeptidů, sulfonamidů a fluroquinolonů. *In vivo* dopad EI není zatím zcela ozřejměn. Klinicky byl prokázán pouze u některých modelových patogenů, a to u bakteriálních nákaz, které vytvářejí velké populace např. v krevním oběhu (Smith a Kirby, 2018). Pokud ale uvažujeme tak, že počet molekul antibiotika potřebný k zabití jedné bakterie se nemění, pak při každém použití příliš velkého inokula nastane situace, kdy molekuly antibiotika nebudou stačit pro větší počet bakteriálních buněk a lze tedy tento jev očekávat u všech bakterií.

2.6.4. Vlastnosti molekul antibiotika

Vzdálenost, jakou jsou molekuly antibiotika schopny v prostředí urazit (tedy průměr vzniklé inhibiční zóny $-x$), závisí na počáteční koncentraci (C^0) a vlastnostech difuzní soustavy (D a T) způsobem vyjádřeným v rovnici (6), která vychází z Fickova zákona pro volnou difuzi (5) (Cooper, 1963). Z této rovnice je odvozen vztah (13) pro výpočet MIC (Bonev, Hooper a Parisot, 2008). Tento vztah lze použít pro výpočet velikosti zóny se stanovenou hodnotou koncentrace.

$$\ln(MIC) = \ln C_0 - \frac{x^2}{4DT} \quad (12)$$

Chování molekul amfipatického (např. nisin a subtilin), nebo hydrofobního charakteru (např. tetracyklin, gentamicin), se od předepsané rovnice liší. Velikost jejich inhibičních zón se s klesající výchozí koncentrací (C_0) nesnižuje kvadraticky, jak je popsáno výše (12), ale spíše lineárně. Z této závislosti vyplývá, že difuze takových molekul probíhá oproti modelu volné difuze pomaleji. Dochází k tomu vlivem možných interakcí s prostředím, které během difuze způsobují zpomalení až zastavení (úbytek funkčních) molekul. Pro takové molekuly platí rovnice pro disipativní difuzi (13), kde jsou oproti předešlým výpočtům zahrnuty i disipativní vlastnosti soustav (V – disipativní koeficient) (Bonev, Hooper a Parisot, 2008).

$$D \frac{d^2 c(x,t)}{dx^2} + V \frac{dc(x,t)}{dx} - \frac{dc(x,t)}{dt} = 0 \quad (13)$$

Řešením této rovnice je vztah (14), který platí pro prostředí, kde během difuze dominuje absorpce molekul antibiotika. Lze z něj vyvodit, že antibiotikum se řídí zákony pro volnou difuzi, v případě, že $V^2 \leq 4D$ (Bonev, Hooper a Parisot, 2008).

$$\ln(MIC) = \ln(c) - (V \pm \sqrt{V^2 - 4D})x \quad (14)$$

Pokud difundující molekuly nesou elektrický náboj, dojde k tvorbě gradientu, který difuzi zpomaluje. Lze tomu zabránit přidáním soli, jejíž ionty difundují rychleji než antibiotikum. Jejich náboj brání tvorbě gradientu antibiotika. Koncentrace (většinou do 5 %) přidané soli (např. NaCl, nebo CaCl₂) pak přímo ovlivňuje difuzní koeficient. Přidáním solí ale zároveň hrozí, že dojde k tvorbě komplexu s molekulami antibiotika nebo k nežádoucím interakcím s bakteriemi, což je důvodem, proč se v praxi zpravidla nepoužívá (Cooper, 1963).

2.7 Interpretace tvarů inhibičních zón u Etestu

V této kapitole následuje výstup jednoduchého experimentu, při kterém jsem srovnávala výsledky Etestu osmi různých antibiotik proti bakterii *Staphylococcus aureus*. Popudem k jeho provedení bylo pozorování vzniku zvláštního tvaru inhibiční zóny během experimentů prováděných při testování daptomycinu (Obr. 11) (Seydlová *et al.*, 2019). Cílem bylo vzájemné srovnání výsledných tvarů v souvislosti s různými vlastnostmi antibiotik a následně s výsledky Etestů.

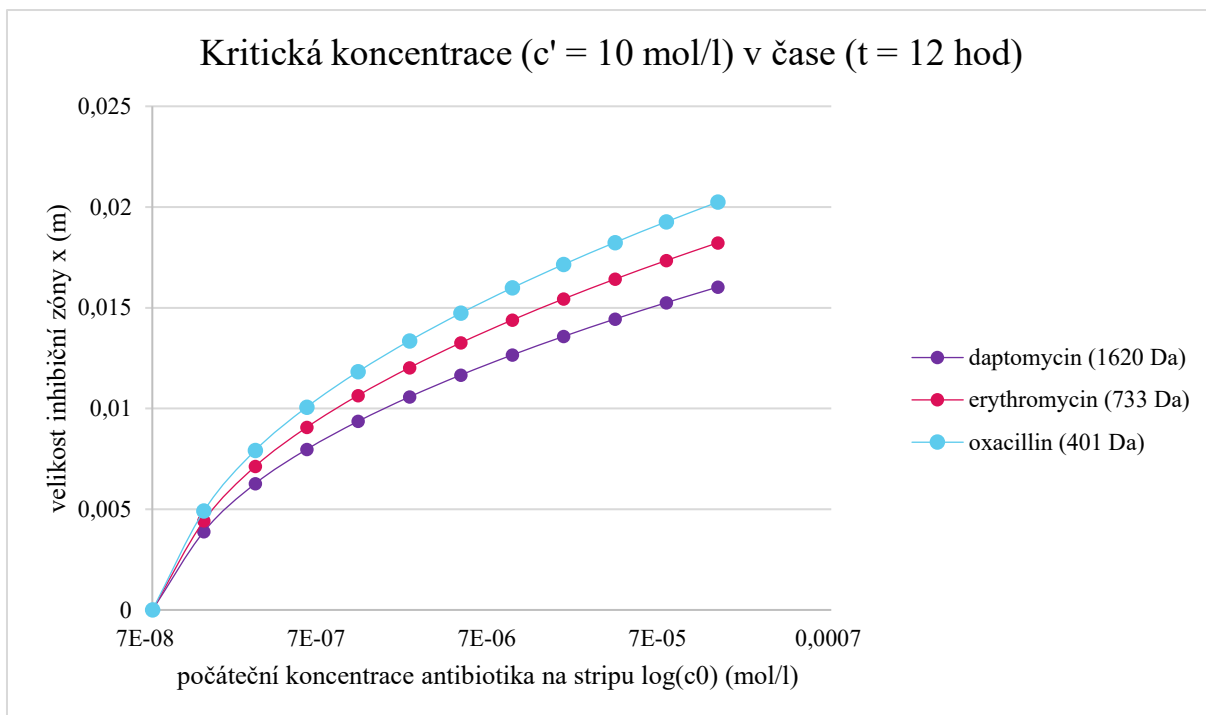
K experimentu bylo vybráno 8 antibiotik s různými zásahovými místy a vlastnostmi (erytromycin, oxacillin, streptomycin, daptomycin, kyselina fusidová, polymyxin B, rifampicin a ceftriaxon). Testovací proužky Etestu (Liofilchem) byly aplikovány na Petriho misky s Mueller-Hintonovým agarem (Mueller a Hinton, 1941) (2% agar v objemu 20 ml na misku), zaočkovaným inokulem *Staphylococcus aureus* CCM 4223 ($V_{inokulum} = 1$ ml na agarovou plotnu)

ve fázi exponenciálního růstu (10^7 CFU/ml). Test každého antibiotika byl proveden dvakrát s podobným výsledkem. Misky s testy a bakteriemi byly po aplikaci Etestu přes noc inkubovány při 37°C . Petriho misky s výsledky Etestu byly následně nafoceny a použity pro srovnání. V této práci jsou, pro ilustraci rozdílů mezi antibiotiky s výrazně odlišnými molekulárními hmotnostmi, uvedeny pouze snímky tří antibiotik, u kterých vyšla podobná hodnota MIC – oxacillin, erytromycin a daptomycin.

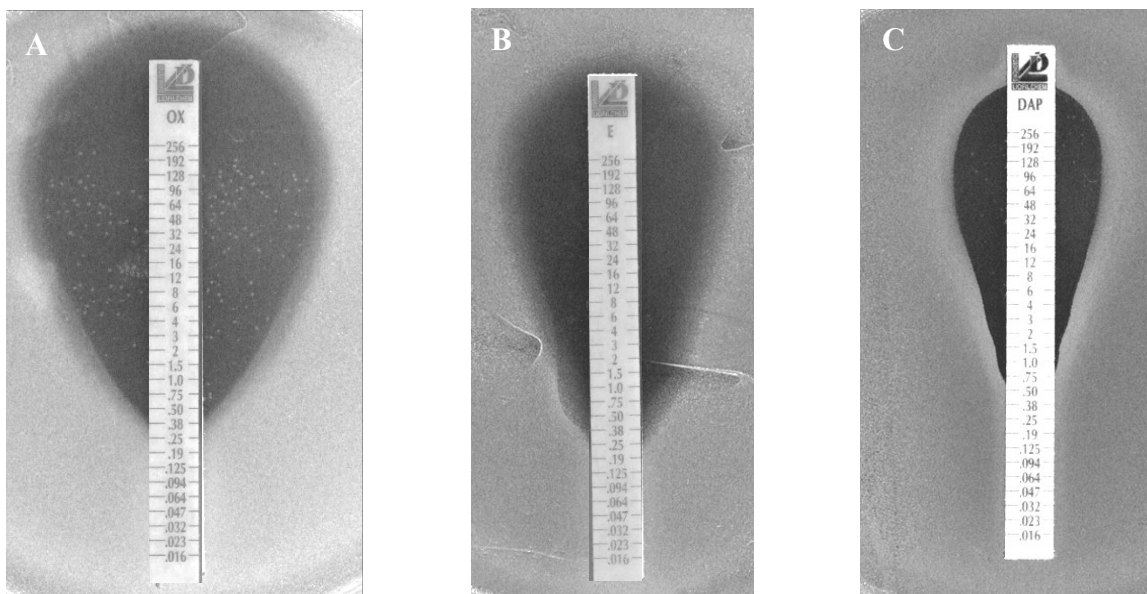
Velikost a tvar inhibiční zóny Etestu jsou vlastnosti klíčové pro přesnou determinaci citlivosti bakterie vůči zkoumanému antibiotiku. Za modelových podmínek se eliptický tvar a charakter inhibiční zóny odvíjí od fyzikálně-chemických vlastností molekul antibiotika, agarového gelu, bakterií a laboratorních podmínek. Pro srovnávání antibiotik by tak měly být použity zcela identické postupy a totožný bakteriální kmen. Pokud jsou tyto podmínky dodrženy, lze předpokládat, že vzniklý rozdíl tvaru zóny je způsoben výhradně vlastnostmi antibiotika, či jeho mechanismem účinku. V literárních pramenech se ovšem často v různých laboratořích setkáváme s rozdíly v metodice (např. v médiích) a jejich výsledky tak nejsou vzájemně zcela porovnatelné.

Nejsnáze lze podle rovnice (12) předpovědět vliv molekulární hmotnosti (M) (Graf 1). Skutečné výsledky Etestu pro antibiotika s různou M (Obr. 5) tento vliv potvrzují, ovšem velikostní rozdíl mezi antibiotiky se od teoretických hodnot liší. Pro srovnání jsou použita antibiotika, u kterých vyšla podobná hodnota MIC (cca 0,25-0,5 $\mu\text{g/ml}$). V porovnání s hodnotami v literatuře se jedná o podobné výsledky, které se liší se maximálně o 1 ředění (Hobson, 1954; Schuster *et al.*, 2015; Seydlová *et al.*, 2019)

Rozdíl mezi skutečnými rozměry inhibičních zón jednotlivých antibiotik (oproti teoretickým hodnotám) je větší (Tab. 1). Nejvíce je patrný rozdíl mezi největší zónou oxacillinu ($x = 1,85$ cm) a nejmenší zónou daptomycinu ($x = 0,89$ cm), který je u skutečných výsledků zhruba dvojnásobný. Jedná se pravděpodobně o efekt vlastností molekul antibiotika (tvar molekul či jejich interakce s médiem), které nejsou v rovnici pro difuzi zohledněny. Svou roli hraje také výše popsaná kritická koncentrace (c^*), jejíž hodnota je ovlivněna způsobem, jakým bakterie s antibiotikem interaguje a u uvedených příkladů se tedy liší. Na snímcích *Staphylococcus aureus* s daptomycinem a erytromycinem (Obr. 5B a C) je také zřetelný rozdíl v okrajích inhibičních zón (výrazně ostřejší přechod u daptomycinu), který taktéž (vzhledem k stejným podmínkám pro testování všech antibiotik) souvisí s mechanismem účinku.



Graf 1 – Matematický model (15) efektu molekulární hmotnosti antibiotika na velikost inhibiční zóny (x), která je definována jako vzdálenost, kterou molekuly antibiotika urazí z jejich zdroje na inertním stripu. Je zde znázorněna distribuce kritické koncentrace (c') podél Etestu po uplynutí 12 hodin. Počáteční koncentrace (c_0) jsou hodnoty ředící řady, která tvoří gradient antibiotika na Etestu. Hodnota c' je hypotetická a je v tomto grafu použita pro srovnání vlastností jednotlivých antibiotik.



Obrázek 5 – Srovnání velikostí inhibičních zón Etestu po noční inkubaci *Staphylococcus aureus* s oxacilinem (401 Da) (A), erytromycinem (733 Da) (B) a daptomycinem (1620 Da) (C). Hodnota MIC se u všech tří antibiotik pohybuje v intervalu 0,25-0,5 $\mu\text{g/ml}$.

Tabulka 1 – Srovnání velikostních rozdílů mezi inhibičními zónami jednotlivých antibiotik u modelové situace (x_m) a reálných hodnot (x_r). Vzdálenost je měřena v bodě nejvyšší koncentrace antibiotika.

	x_m (cm)	x_r (cm)
oxacillin	1,75	1,85
erytromycin	1,58	1,27
daptomycin	1,39	0,89

Pro tvorbu modelu (Graf 1) jsem použila rovnici (12) a z ní odvozený následující vztah (15), pro výpočet velikosti (x):

$$x = \pm \sqrt{-4 * D * t * (\ln c' - \ln c_0)} \quad (15)$$

$t = 12$ hod; $c^0 = 256; 128; 64 \dots 1 \mu\text{g/ml}$ (odpovídá zdrojovým koncentracím na Etestu) převedeno na mol/l; $c' = 10^{-7}$ mol/l – hodnota kritické koncentrace, pro kterou platí, že je v čase t ve vzdálenosti x

Pro výpočet difuzního koeficientu D byla použita rovnice (10).

$T = 310$ K; R jednotlivých antibiotik byl vypočten z jejich molekulárních hmotností podle vztahu (11)

$\eta = 0,2$ Pa*s – viskozita přibližně odpovídající 1,5% agaróze, měřeno při $t = 46$ °C (Mijangos a Dušková-Smrčková, 2008)

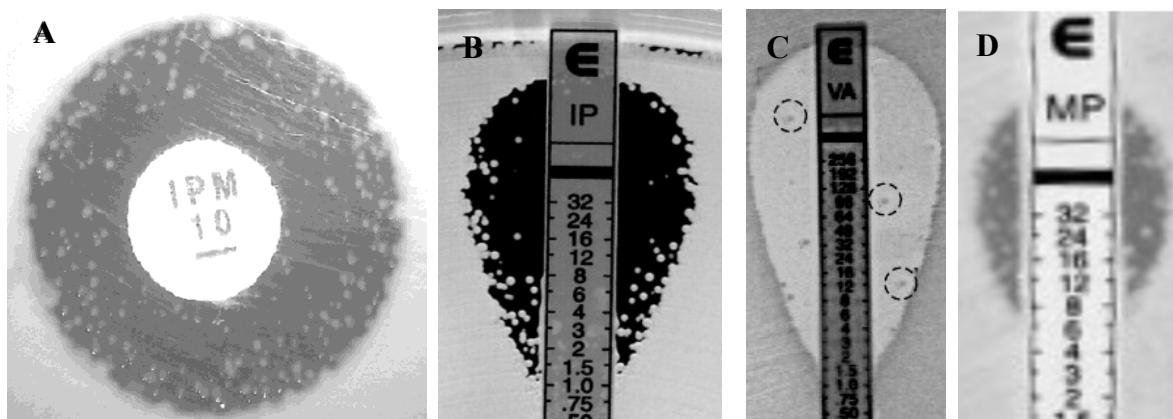
Nestandardní tvary inhibiční zóny mohou za určitých okolností znesnadnit u Etestu odečítání hodnoty MIC. Některé mohou vzniknout nesprávnou manipulací s testem (např. nesouměrná inhibiční zóna, posun zóny mimo gradientový proužek), možné další příčiny jsou nastíněny v následujících odstavcích.

2.7.1. Rezistentní kmeny

Bakterie vystavené antibiotikům, která se vyskytují v prostředí (ať už z vlastní produkce bakteriálního druhu, nebo z produkce jiných mikroorganismů), se jejich účinku brání pomocí rezistencí. Rezistence mohou vznikat spontánní chromozomální mutací nebo se do bakteriální buňky dostanou horizontálním genetickým přenosem (mobilními genetickými elementy). Díky němu se mohou geny pro rezistenci šířit i mezi buňkami různých druhů. Rezistence lze podle jejich mechanismu rozdělit do 4 kategorií – 1) modifikace cílového místa (vznik spontánních mutací), 2) enzymatická inaktivace antibiotika (štěpení β -laktamového kruhu, acetylace chloramfenikolu), 3) odstranění antibiotika pomocí tzv. *efflux* pump, 4) metabolická klíčka (alternativní PBP). Při klinickém testování antibiotik je detekce rezistentních kmenů klíčová (Madigan, Martenko a Parker 2003).

Ne všechny bakteriální kmeny se však při expozici antibiotiku chovají homogenně. Pokud se u domněle izogenního kmene vyskytne subpopulace buněk, která na antibiotikum reaguje jinak než zbytek populace, může u některých testovacích metod dojít ke komplikacím při rozhodnutí, zda se jedná o citlivý/rezistentní kmen. V některých případech je stanovení platné MIC prakticky nemožné. Heterogenita rezistence, tzv. heterorezistence, je definovaná přítomností variabilní odpovědi vůči antibiotiku v bakteriální populaci. V praxi se může jednat například o kmeny, které rostou při vyšší koncentraci antibiotika, ale při nižším ředění žádný růst nevykazují (El-Halfawy a Valvano, 2013). Heterorezistentní kmeny lze také definovat přítomností určitého množství necitlivých subpopulací v bakteriální kultuře (např. u heterorezistentních kmenů rodu *Staphylococcus* se rezistentní buňky vyskytují s pravděpodobností 10^{-13}) (Nakipoglu *et al.*, 2005). Signálem odhalujícím přítomnost heterorezistence může být např. rozpor mezi hodnotami MIC naměřenými pomocí různých testovacích metod, což je způsobené různými typy detekce citlivosti (některé metody se zaměřují např. na úbytek buněk, jiné na změny v rychlosti růstu), nebo přítomnost kolonií o malém průměru v inhibiční zóně (viz Obr. 6).

U některých kmenů *Staphylococcus aureus* je navíc známá tzv. termosenzitivní heterorezistence, kdy se bakterie chovají rozdílně v závislosti na okolní teplotě. Příkladem je rezistentní subpopulace MRSA (methicillin-resistant *S. aureus*) kmene, která při $t = 30\text{ }^{\circ}\text{C}$ vykazuje růst (MIC = 600-1000 $\mu\text{g/ml}$), zatímco při $t = 37\text{ }^{\circ}\text{C}$ svou odolnost ztrácí (MIC = 5 $\mu\text{g/ml}$) (Hartman a Tomasz, 1986).



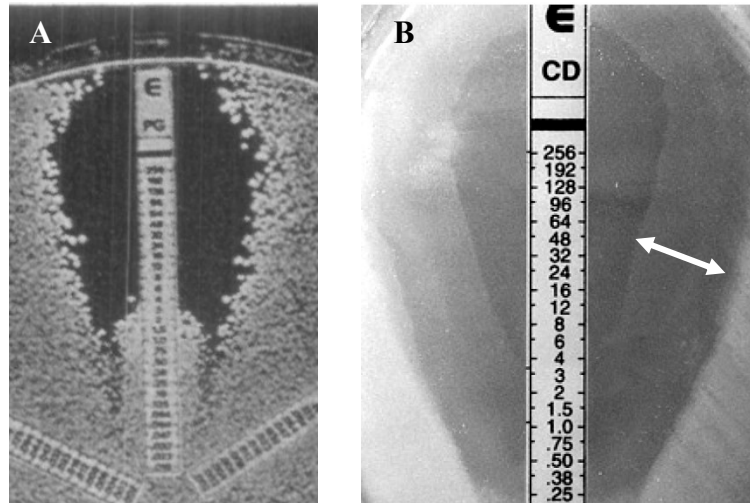
Obrázek 6 – Růst kolonií uvnitř inhibiční zóny je jedním z projevů heterorezistence bakteriálního kmenu. (A) *Acinetobacter baumannii* + imipenem (Superti *et al.*, 2009); (B) *Klebsiella pneumoniae* + imipenem (Tenover *et al.*, 2006); (C) *Enterococcus faecium* + vankomycin (vnitřní kolonie vyznačeny kroužkem) (Khan *et al.*, 2008); (D) *Acinetobacter baumannii* + meropenem (Superti *et al.*, 2009).

2.7.2. Rozsáhlý růst uvnitř inhibiční zóny

Kromě malých kolonií rezistentních mutantů se může v inhibiční zóně objevit i oblast rozsáhlejšího růstu, a to nejčastěji podél testovacího proužku nebo ve formě plynulého přechodu mezi inhibiční zónou a bakteriálním porostem (chybí zde jasně rozeznatelné hranice). Přechodová zóna má zpravidla charakter tenkého biofilmu a může být způsobená bakteriální rezistencí (viz výše) nebo specifickou schopností plazivého pohybu po pevných povrchích, tzv. swarmingu (Obr. 7). Tato schopnost, známá pouze u některých bakterií (např. *Proteus mirabilis*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa*), je spojena s tvorbou biofilmu a je charakteristická přítomností vyššího počtu laterálních bičků a propojením buněk do pohybujících se raftů. Buňky s touto schopností jsou tak schopné se po poklesu koncentrace v inhibiční zóně dostat mimo oblast růstu. (Kearns, 2010).

Při některých kombinacích antibiotik s bakteriálními kmeny dochází k nestandardní závislosti účinku antibiotika na jeho koncentraci. Dochází tak např. ke snížení baktericidní aktivity při hodnotách koncentrace vyšších než MIC. Mechanismus paradoxního efektu, jak je tento jev označován, není univerzální, ale zpravidla souvisí s bakteriálními rezistencemi. Nejčastěji jsou to rezistence proti β -laktamovým antibiotikům (Eagle a Musselman, 1948). Mechanismus zpravidla závisí na několika faktorech, a to na intenzitě indukovaní syntézy β -laktamázy, na stabilitě molekul antibiotika v přítomnosti tohoto enzymu, na vzájemné afinitě jeho molekul a enzymu a také na velikosti inokula, které bylo antibiotiku vystaveno. Princip tohoto efektu

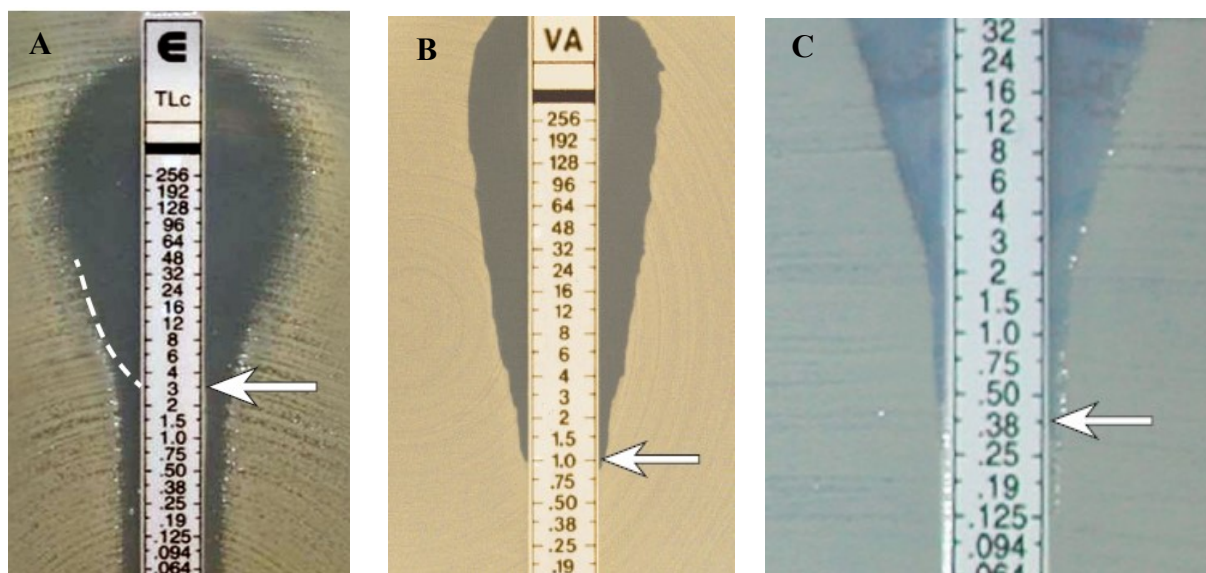
není dosud přesně popsán, ale mezi možná vysvětlení patří indukce rezistentních mechanismů pouze při vyšších koncentracích antibiotika, precipitace molekul antibiotika nebo negativní zpětná regulace antibiotika. Příkladem jsou některé kmeny *Proteus vulgaris*, které se chovají paradoxně při expozici cefalosporinům. Efekt může být potlačen přidáním kyseliny klavulonové, která inhibuje aktivitu β -laktamázy (Ikeda a Nishino, 1988).



Obrázek 7 – (A) paradoxní efekt penicilinu G na rezistentní kmen *Staphylococcus aureus* způsobil růst podél testovacího proužku v oblasti s nízkou koncentrací antibiotika (označen šipkou) (Brown a Brown, 1991); (B) přechodová zóna (rozsah vyznačen šipkou) u bakterie (*Proteus mirabilis*) se schopností swarmingu, vystavené účinku klindamycinu (Etest - antimicrobial susceptibility testing - manual, Biomeriéux, 2012).

2.7.3. Výrazně se zužující inhibiční zóny

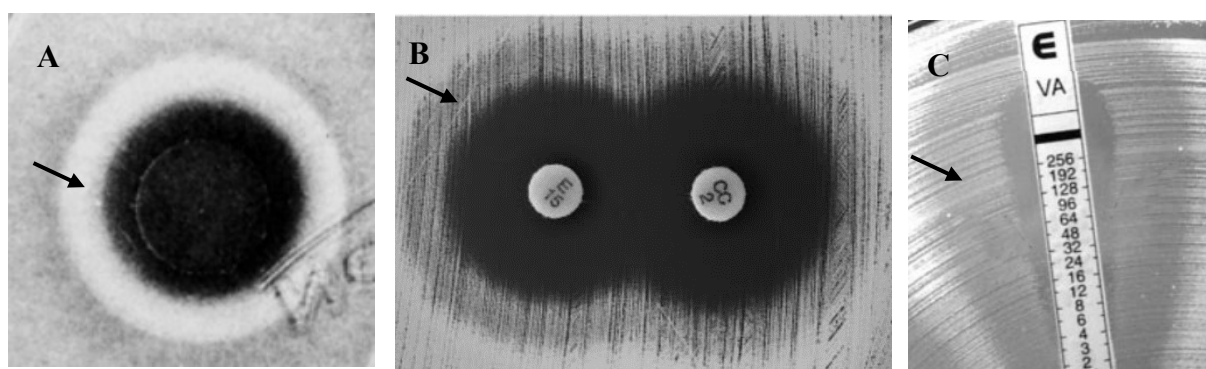
Maximální možný efekt antibiotika v některých případech nemůže nastat, pokud není použito ve spojení s jinou další látkou, která podporuje jeho účinnost. Využití takových látek je žádoucí například u bakterií produkujících β -laktamázy. Aktivita těchto enzymů může být eliminována použitím klavulonové kyseliny, sulbaktamu nebo tazobactamu (Cormican *et al.*, 1996). Po přidání takového inhibitoru při testování β -laktamového antibiotika, dochází ke kooperaci jejich mechanismů a výsledkem Etestu může být inhibiční zóna, neeliptického charakteru (viz. Obr 8). Podle manuálu použití Etestu od výrobců je v takovém případě pro správné odečtení hodnoty MIC třeba extrapolovat eliptickou křivku z vyšších hodnot koncentrací antibiotika (Etest reading guide, AB BIODISK, 2008 i Etest - antimicrobial susceptibility testing manual, Biomeriéux, 2012). Přesný mechanismus vzniku tohoto tvaru však není v literatuře blíže popsán. Při testování antibiotika o vyšší molekulové hmotnosti může být vzniklá inhibiční zóna tak úzká, že takřka ztrácí eliptický charakter. V tomto případě se ovšem nejedná o abnormalitu, která by zkreslovala hodnotu MIC, ale pouze o důsledek difuzních zákonů popsaných výše. Větší molekuly mají nižší hodnotou difuzního koeficientu (D) a po uplynutí kritického času urazí tedy v gelu menší vzdálenost než molekuly menší. Hodnota MIC je v takovém případě odečtena až v nejzazším bodě inhibiční zóny.



Obrázek 8 – (A) efekt podpůrné aktivity klavulanátu, přerušovanou čarou je vyznačena extrapolovaná elipsa, jejíž průsečík se stupnicí určuje hodnotu MIC v porovnání s efektem úzké elipsy glykopeptidického (B) a polypeptidického (C) antibiotika o vysoké molekulové hmotnosti (B); hodnoty MIC jsou vyznačeny šipkou (Etest reading guide, AB BIODISK, 2008).

2.7.4. Dvojitá inhibiční zóna

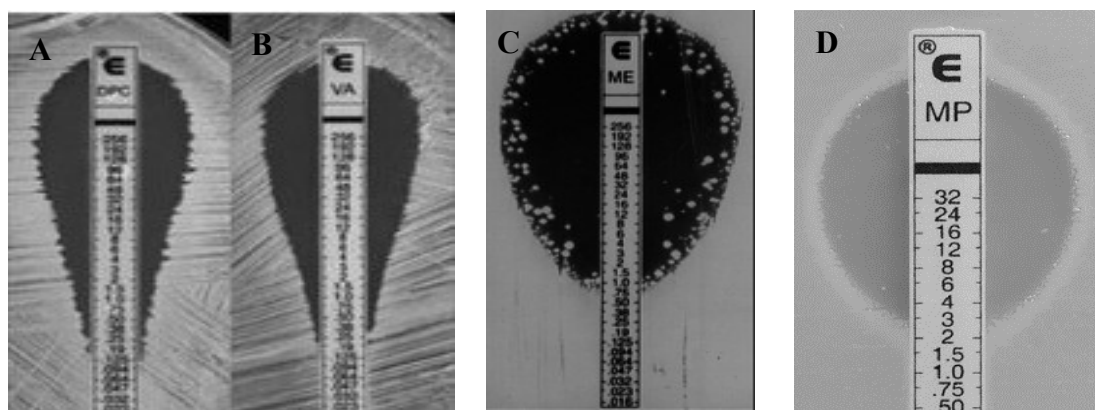
Vzhledem k odlišným chemickým strukturám fungují různé skupiny antibiotik optimálně při různých hodnotách pH. Hodnota pH substrátu se ovšem během inkubace bakterií s antibiotikem může až o několik jednotek zvýšit (v důsledku metabolismu buněk), což vede ke změně podmínek pro antibiotikum. Při testování např. makrolidních antibiotik (optimální pH pro jejich použití > 8) tak dochází ke vzniku dvojité inhibiční zóny (viz Obr. 9). Mezi vnitřní inhibiční zónou, která nevykazuje žádné známky růstu bakterií, a oblastí, která je plně porostlá bakteriální kulturou, lze jasně rozlišit periferní zónu, kde sice bakterie rostou, ale ne na 100 % povrchu. Jedná se o oblast s koncentrací antibiotika nižší než MIC, kde antibiotikum na bakterie působí pouze díky podpůrnému vlivu vyššího pH (Korkeala a Pekkanen, 1977). Dvojité inhibiční zóny jsou také jedním z možných projevů rezistence testovaného bakteriálního kmenu (Tenover *et al.*, 2004).



Obrázek 9 – Dvojitá inhibiční (periferní označená šipkami) zóna při testování citlivosti: *Micrococcus luteus* vůči streptomycinu (A) (Korkeala a Pekkanen, 1977); *Staphylococcus aureus* vůči erythromycinu (vlevo) a klindamycinu (B) (Steward *et al.*, 2005); *Staphylococcus aureus* vůči vankomycinu (C) (Tenover *et al.*, 2004).

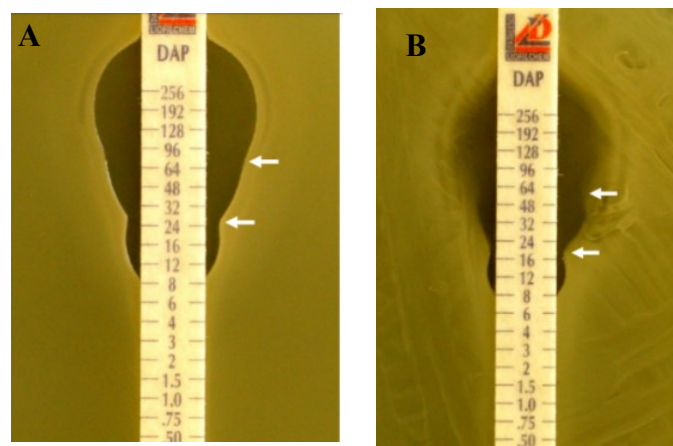
2.7.5. Mechanismus účinku antibiotika

Vzhledem k odlišnostem mechanismů jednotlivých tříd antibiotik lze očekávat rozdíly ve tvaru vznikajících inhibičních zón. Jinak budou vypadat zóny u antibiotik, která cílí na buněčnou stěnu, proteosyntetický aparát, cytoplazmatickou membránu či syntézu nukleových kyselin. Jednotlivé mechanismy rozdílnými způsoby vychylují rovnováhu mezi kritickou populací a kritickou koncentrací antibiotika, což může vést ke vzniku různých tvarů inhibičních zón (Cooper, 1963). Glykopeptidy (např. vankomycin) a polypeptidy (např. polymyxin B či kolistin) vykazují poměrně úzkou a protáhlou inhibiční zónu, jak je uvedeno i v manuálu od výrobce Etestu (Etest reading guide, AB BIODISK, 2008). Oproti tomu inhibiční zóny některých jiných antibiotik jsou výrazně konvexní (Obr. 10). V tomto případě se však pravděpodobně jedná o souvislost s molekulární hmotností jednotlivých antibiotik, a ne o důsledek rozdílných mechanismů účinku, podobně úzkou zónu totiž vykazuje např. daptomycin, který se svým mechanismem účinku od výše uvedených liší (Straus a Hancock, 2006). Odlišnosti tvarů mezi jednotlivými třídami antibiotik nejsou zatím v literatuře blíže zkoumány.



Obrázek 10 – Úzké inhibiční zóny daptomycinu (1620,671 Da), vankomycinu (1449,3 Da) proti *Staphylococcus aureus* (A,B) (Cui *et al.*, 2010) v porovnání s konvexnějšími zónami methicillinu (380,42 Da) proti *Staphylococcus aureus* (Aiba *et al.*, 2013) a meropenemu (383,464 Da) proti *Burkholderia ubonensis* (Price *et al.*, 2017).

Zvláštní případ, kdy se mechanismus účinku projeví na tvaru inhibiční zóny, může nastat v případě, že antibiotikum na bakterii působí více způsoby. Tento jev byl pozorován na reliéfu inhibiční zóny u daptomycinu (Obr. 11). Daptomycin je antibiotikum, patřící mezi lipopeptidy, jehož baktericidní účinek je způsoben tvorbou pórů ve vnější membráně grampozitivních bakterií. Vznikající póry jsou dvojího charakteru a) malé, které jsou tvořené dimery antibiotika a způsobují narušení membránového potenciálu, b) velké, tvořené oligomery o 3 a více jednotkách antibiotika, které rovněž způsobují depolarizaci, ale navíc díky většímu průměru mohou umožnit únik iontů a větších molekul ven z mezimembránového prostoru. Pro dvojitý mechanismus tak pravděpodobně mohou existovat 2 hodnoty MIC, které jsou na reliéfu inhibiční zóny patrné jako výrazná zúžení jejího průměru (Seydlová *et al.*, 2019).



Obrázek 11 – Efekt dvojího mechanismu daptomycinu proti *Bacillus subtilis* (A) a *Staphylococcus aureus* (B), okraje jednotlivých inhibičních zón jsou vyznačeny šipkami (Seydlová *et al.*, 2019).

3. ZÁVĚR

Ettest je gradientová difuzní metoda, jejímž výsledkem je eliptická inhibiční zóna, z jejíhož průsečíku s gradientovou stupnicí testovacího proužku se odečítá hodnota MIC. Výsledná elipsa se ale mezi jednotlivými antibiotiky může lišit svými parametry, zřetelností přechodu mezi zónou inhibice a růstu, a v některých případech i dalšími tvarovými abnormalitami, jako je např. dvojitá inhibiční zóna, či růst uvnitř této oblasti. Pro přesné odečtení hodnoty MIC je třeba brát všechny zmíněné faktory v potaz a co nejlépe jim porozumět.

Na výsledném tvaru inhibiční zóny se v první řadě podepisují Fickovy fyzikálně-chemické zákony o difuzi, které zahrnují nastavené laboratorní podmínky (teplota, doba trvání testu, viskozita média). Platnost těchto zákonů jsem experimentálně ověřila pomocí fluorescence molekul difundujících agarózou (výsledky v této práci nebyly prezentovány). Pokud tedy mají být výsledky Ettestu použitelné pro srovnání více různých antibiotik, je třeba zajistit totožné laboratorní podmínky. Na velikosti zóny se projevuje také rychlost růstu bakteriální kultury (Cooper, 1963).

Na schopnosti molekul pohybovat se prostředím se podílí jejich molekulární hmotnost, tvar a elektrický náboj. Molekuly hydrofobního nebo amfipatického charakteru podléhají svým chováním složitějšímu modelu disipativní difuze (z důvodu interakce s difuzním prostředím), zatímco ostatní se řídí jednoduššími zákony o difuzi volné (Bonev, Hooper a Parisot, 2008).

Vliv molekulární hmotnosti, která je součástí rovnice pro difuzi, je nezanedbatelný. Čím má molekula nižší hmotnost, tím rychleji její difuze probíhá. Výrobci Ettestu však garantují stabilitu gradientu koncentrací při dodržení doporučené doby inkubace (Bolmström, 1994) a v literatuře zatím není znám model, který by se zabýval možným zkreslením u velmi malých molekul antibiotika. Při testování je také potřeba vzít v potaz vlastnosti zkoumaného bakteriálního kmene, které mohou jeho citlivost velmi rozdílně ovlivnit. Roli zde hraje růstová rychlost, různé rezistence nebo např. schopnost swarmingu.

Tvar inhibiční zóny je výsledkem komplexního procesu interakce bakteriální buňky s molekulami antibiotika, který se při každé jejich kombinaci liší. Kromě stanovení hodnoty MIC tak může inhibiční zóna sloužit i jako zdroj informací o mechanismu účinku. V literatuře se setkáváme s tím, že existuje vliv zásahového místa na výslednou podobu inhibiční zóny (Cooper, 1963), ale výzkum, který by tyto rozdíly demonstroval, zatím chybí. Pro lepší porozumění je tedy do budoucna potřeba provést další experimenty zabývající se touto problematikou.

Potenciál problematiky, kterou jsem se v této práci zabývala, tkví v uvedeném matematickém modelu, který by při dalším rozpracování mohl umožnit predikci tvaru inhibiční zóny zkoumaného antibiotika. Mohl by pak sloužit jako nástroj k podrobnější analýze inhibičních zón Etestu. Při odečítání MIC by se dala kromě průsečíku zóny s gradientovým proužkem Etestu přikládat váha také výslednému tvaru zóny, kterou by bylo možno porovnat s tvarem, který předpovídá matematický model. Pokud by zkoumaná inhibiční zóna svým tvarem neodpovídala predikci (např. tím, že by byla výrazně užší, než se očekává), dalo by se určit, které antibiotikum se nechová podle difuzních zákonů a detekovat tak některé doprovodné jevy, které při testu nastaly.

4. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

*Ahmad, SI, Kirk, SH, a Eisenstark, A (1998). Thymine metabolism and thymineless death in prokaryotes and eukaryotes. *Annu Rev Microbiol* 52, 591–625.

Aiba, Y, Katayama, Y, Hishinuma, T, Murakami-Kuroda, H, Cui, L, a Hiramatsu, K (2013). Mutation of RNA polymerase β -subunit gene promotes heterogeneous-to-homogeneous conversion of β -lactam resistance in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 57, 4861–4871.

Almeida, PF, a Pokorny, A (2009). Mechanisms of antimicrobial, cytolytic, and cell-penetrating peptides: From kinetics to thermodynamics. *Biochemistry* 48, 8083–8093.

Baker, CN, Stocker, SA, Culver, DH, a Thornsberry, C (1991). Comparison of the Etest to agar dilution, broth microdilution, and agar diffusion susceptibility testing techniques by using a special challenge set of bacteria. *J Clin Microbiol* 29, 533–538.

Baquero, F, Cantón, R, Martínez-Beltrán, J, a Bolmström, A (1992). The Etest as an epidemiologic tool. *Diagn Microbiol Infect Dis* 15, 483–487.

Bartáková, L, a Šišková, M (2005). *Fyzikální chemie povrchů a koloidních soustav*, Praha: VŠCHT.

Bernatová, S et al. (2013). Following the mechanisms of bacteriostatic versus bactericidal action using raman spectroscopy. *Molecules* 18, 13188–13199.

Bertasa, M, Doderio, A, Alloisio, M, Vicini, S, Riedo, C, Sansonetti, A, Scalarone, D, a Castellano, M (2020). Agar gel strength: A correlation study between chemical composition and rheological properties. *Eur Polym J* 123, 109442.

Biemer, JJ (1973). Antimicrobial susceptibility testing by the Kirby-Bauer disc diffusion method. *Ann Clin Lab Sci* 3, 135–140.

Boedicker, JQ, Li, L, Kline, TR, a Ismagilov, RF (2008). Detecting bacteria and determining their susceptibility to antibiotics by stochastic confinement in nanoliter droplets using plug-based microfluidics. *Lab Chip* 8, 1265–1272.

Bolmström, A (1993). Susceptibility testing of anaerobes with Etest. *Clin Infect Dis* 16, S367–S370.

Bolmström, A (1994). Determinations of minimum bactericidal concentrations, kill curves, and

postantibiotic effects with the Etest technology. *Diagn Microbiol Infect Dis* 19, 187–195.

Bonev, B, Hooper, J, a Parisot, J (2008). Principles of assessing bacterial susceptibility to antibiotics using the agar diffusion method. *J Antimicrob Chemother* 61, 1295–1301.

Brodersen, DE, Clemons, WM, Carter, AP, Morgan-Warren, RJ, Wimberly, BT, a Ramakrishnan, V (2000). The structural basis for the action of the antibiotics tetracycline, pactamycin, and hygromycin B, on the 30S ribosomal subunit. *Cell* 103, 1143–1154.

*Brook, I (1989). Inoculum effect. *Rev infectious diseases* 11, 361–368.

Brown, FJD, a Brown, L (1991). Evaluation of the Etest, a novel method of quantifying antimicrobial activity. *J Antimicrob Chemother* 27, 185–190.

Campbell, EA, Korzheva, N, Mustaev, A, Murakami, K, Nair, S, Goldfarb, A, a Darst, SA (2001). Structural mechanism for rifampicin inhibition of bacterial RNA polymerase. *Cell* 104, 901–912.

Choi, J et al. (2014). A rapid antimicrobial susceptibility test based on single-cell morphological analysis. *Sci Transl Med* 6, 267ra174.

Cohen, SS, a Barner, HD (1954). Studies on unbalanced growth in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci* 40, 885–893.

Cooper, KE (1963). The Theory of Antibiotic Inhibition Zones. In: *Analytical Microbiology*, Elsevier, 1–86.

Cormican, MG, Marshall, SA, a Jones, RN (1996). Detection of extended-spectrum-lactamase (ESBL)-producing strains by the Etest ESBL screen. *J Clin Microbiol* 34, 1880–1884.

Cui, L, Isii, T, Fukuda, M, Ochiai, T, Neoh, HM, Da Cunha Camargo, ILB, Watanabe, Y, Shoji, M, Hishinuma, T, a Hiramatsu, K (2010). An RpoB mutation confers dual heteroresistance to daptomycin and vancomycin in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 54, 5222–5233.

Davidovich, C, Bashan, A, a Yonath, A (2008). Structural basis for cross-resistance to ribosomal PTC antibiotics. *Proc Natl Acad Sci* 105, 20665–20670.

Eagle, H, a Musselman, AD (1948). The rate of bactericidal action of penicillin in vitro as a function of its concentration, and its paradoxically reduced activity at high concentrations against certain organisms. *J Exp Med* 88, 99–131.

El-Halfawy, OM, a Valvano, MA (2013). Chemical communication of antibiotic resistance by a highly resistant subpopulation of bacterial cells. *PLoS One* 8, e68874.

Eng, RHK, Padberg, FT, Smith, SM, Tan, EN, a Cherubin, CE (1991). Bactericidal effects of antibiotics on slowly growing and nongrowing bacteria. *Antimicrob Agents Chemother* 35, 1824–1828.

Engelberg-Kulka, H, Sat, B, Reches, M, Amitai, S, a Hazan, R (2004). Bacterial programmed cell death systems as targets for antibiotics. *Trends Microbiol* 12, 66–71.

Ericsson, M, a Bolmström, A (1988). Device for Susceptibility Testing, Sweden.

Flanagan, JN, a Steck, TR (2017). The relationship between agar thickness and antimicrobial susceptibility testing. *Indian J Microbiol* 57, 503–506.

De Gennes, P-J (1981). Scaling concepts in polymer physics. *Polymer (Guildf)* 22, 565.

Hanson, MA, Lemaitre, B, a Unckless, RL (2019). Dynamic evolution of antimicrobial peptides underscores trade-offs between immunity and ecological fitness. *Front Immunol* 10, 2620.

Hartman, BJ, a Tomasz, A (1986). Expression of methicillin resistance in heterogeneous strains of *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 29, 85–92.

Helleur, RJ, Hayes, ER, Jamieson, WD, a Craigie, JS (1985). Analysis of polysaccharide pyrolysate of red algae by capillary gas chromatography-mass spectrometry. *J Anal Appl Pyrolysis* 8, 333–347.

Hobson D (1954). Activity of erythromycin against *Staphylococcus aureus*. *Br Med J.* 1, 236-239.

Ikeda, Y, a Nishino, T (1988). Paradoxical antibacterial activities of β -lactams against *Proteus vulgaris*: Mechanism of the paradoxical effect. *Antimicrob Agents Chemother* 32, 1073–1077.

*Jorgensen, JH, a Ferraro, MJ (2009). Antimicrobial susceptibility testing: A review of general principles and contemporary practices. *Clin Infect Dis* 49, 1749-1755.

*Kearns, DB (2010). A field guide to bacterial swarming motility. *Nat Rev Microbiol* 8, 634–644.

Keren, I, Wu, Y, Inocencio, J, Mulcahy, LR, a Lewis, K (2013). Killing by bactericidal antibiotics does not depend on reactive oxygen species. *Science* 339, 1213–1216.

Khan, SA, Sung, K, Layton, S, a Nawaz, MS (2008). Heteroresistance to vancomycin and novel point mutations in Tn1546 of *Enterococcus faecium* ATCC 51559. *Int J Antimicrob Agents* 31, 27–36.

*Kohanski, MA, Dwyer, DJ, a Collins, JJ (2010). How antibiotics kill bacteria: From targets to networks. *Nat Rev Microbiol* 8, 423–435.

Kohanski, MA, Dwyer, DJ, Hayete, B, Lawrence, CA, a Collins, JJ (2007). A common mechanism of cellular death induced by bactericidal antibiotics. *Cell* 130, 797–810.

Korkeala, H, a Pekkanen, TJ (1977). The testing of the antibiotic sensitivity of bacteria on an agar medium: The problem of a double zone of inhibition. *Acta Pathol Microbiol Scand Sect B Microbiol* 85B, 174–176.

Lalitha, MK (2004). Manual on antimicrobial susceptibility testing, *Ind Jour of Med Microbiology*, 3-4.

Lambert, RJW, a Pearson, J (2000). Susceptibility testing: Accurate and reproducible minimum inhibitory concentration (MIC) and non-inhibitory concentration (NIC) values. *J Appl Microbiol* 88, 784–790.

Lancini, G, Parenti, F, a Gallo, GG (1995). The Antibiotics. In: *Antibiotics*, Boston, MA: Springer US, 1–14.

*Lin, J, Zhou, D, Steitz, TA, Polikanov, YS, a Gagnon, MG (2018). Ribosome-targeting antibiotics: Modes of action, mechanisms of resistance, and implications for drug design. *Annu Rev Biochem* 87, 451–478.

Lupien, A, Billal, DS, Fani, F, Soualhine, H, Zhanel, GG, Leprohon, P, a Ouellette, M (2013). Genomic characterization of ciprofloxacin resistance in a laboratory-derived mutant and a clinical isolate of *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 57, 4911–4919.

Macià, MD, Rojo-Molinero, E, a Oliver, A (2014). Antimicrobial susceptibility testing in biofilm-growing bacteria. *Clin Microbiol Infect* 20, 981–990.

Madigan, MT, Martinko, JM, a Parker, J (2003). Antimicrobial Drugs. In: *Brock Biology of Microorganisms*, 811–816.

*Melo, MN, Ferre, R, a Castanho, MA (2009). Antimicrobial peptides: Linking partition, activity and high membrane-bound concentrations. *Nat Rev Microbiol* 7, 245–250.

- Mijangos, C, a Dušková-Smrčková, M (2008). Rheological and thermal properties of agarose aqueous solutions and hydrogels. *J Polym Sci* 46, 322–328.
- Mueller, JH s Hinton, J (1941). A protein-free medium for primary isolation of the *Gonococcus* and *Meningococcus*. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* 48, 330–333.
- Murakami, KS, Masuda, S, a Darst, SA (2002). Structural basis of transcription initiation: RNA polymerase holoenzyme at 4 Å resolution. *Science* 296, 1280–1284.
- Nakipoglu, Y, Derbentli, S, Katranci, H, a Cagatay, A (2005). Investigation of *Staphylococcus* strains with heterogeneous resistance to glycopeptides in a Turkish University Hospital. *BMC Infect Dis* 5, 1–8.
- Nemeth, J, Oesch, G, a Kuster, SP (2015). Bacteriostatic versus bactericidal antibiotics for patients with serious bacterial infections: Systematic review and meta-analysis. *J Antimicrob Chemother* 70, 382–395.
- Pernodet, N, Maaloum, M, a Tinland, B (1997). Pore size of agarose gels by atomic force microscopy. *Electrophoresis* 18, 55–58.
- Pham, TDM, Ziora, ZM, a Blaskovich, MAT (2019). Quinolone antibiotics. *Medchemcomm* 10, 1719.
- Price, EP et al. (2017). Phylogeographic, genomic, and meropenem susceptibility analysis of *Burkholderia ubonensis*. *PLoS Negl Trop Dis* 11, e0005928
- Sat, B, Reches, M, a Engelberg-Kulka, H (2003). The *Escherichia coli* mazEF suicide module mediates thymineless death. *J Bacteriol* 185, 1803–1807.
- Schneider, T, a Sahl, HG (2010). An oldie but a goodie - cell wall biosynthesis as antibiotic target pathway. *Int J Med Microbiol* 300, 161–169.
- Schrö, W, Goerke, C, a Wolz, C (2013). Opposing effects of aminocoumarins and fluoroquinolones on the SOS response and adaptability in *Staphylococcus aureus*. *J Antimicrob Chemother* 68, 529–538.
- Seydlová, G, Sokol, A, Lišková, P, Konopásek, I, a Fišer, R (2019). Daptomycin pore formation and stoichiometry depend on membrane potential of target membrane. *Antimicrob Agents Chemother* 63, e01589-18.

Schuster CF, Mechler L, Nolle N, Krismer B, Zelder ME, Götz F, Bertram R (2015). The MazEF toxin-antitoxin system alters the β -lactam susceptibility of *Staphylococcus aureus*. PLoS One. 10(5), e0126118

Smith, KP, a Kirby, JE (2018). The Inoculum Effect in the Era of Multidrug Resistance: Minor Differences in Inoculum Have Dramatic Effect on MIC Determination, Antimicrob Agents Chemother 62, e00433-18.

Soriano, F, a Ponte, C (2009). Comment on: Functional relationship between bacterial cell density and the efficacy of antibiotics. J Antimicrob Chemother 63, 1301.

Steward, CD, Raney, PM, Morrell, AK, Williams, PP, Mcdougal, LK, Jevitt, L, McGowan, JE, a Tenover, FC (2005). Testing for induction of clindamycin resistance in erythromycin-resistant isolates of *Staphylococcus aureus*. J Clin Microbiol 43, 1716–1721.

Straus, SK, a Hancock, REW (2006). Mode of action of the new antibiotic for Gram-positive pathogens daptomycin: Comparison with cationic antimicrobial peptides and lipopeptides. Biochim Biophys Acta - Biomembr 1758, 1215–1223.

Superti, SV, Martins, DDS, Caierão, J, Soares, FDS, Prochnow, T, a Zavascki, AP (2009). Indications of carbapenem resistance evolution through heteroresistance as an intermediate stage in *Acinetobacter baumannii* after carbapenem administration. Rev Inst Med Trop Sao Paulo 51, 111–113.

Syal, K, Mo, M, Yu, H, Iriya, R, Jing, W, Guodong, S, Wang, S, Grys, TE, Haydel, SE, a Tao, N (2017). Current and emerging techniques for antibiotic susceptibility tests. Theranostics 7, 1795–1805.

Teixeira, V, Feio, MJ, a Bastos, M (2012). Role of lipids in the interaction of antimicrobial peptides with membranes. Prog Lipid Res 51, 149–177.

Tenover, FC et al. (2004). Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* isolate from a patient in Pennsylvania. Antimicrob Agents Chemother 48, 275–280.

Tenover, FC, Kalsi, RK, Williams, PP, Carey, RB, Stocker, S, Lonsway, D, Rasheed, JK, Biddle, JW, McGowan, JE, a Hanna, B (2006). Carbapenem resistance in *Klebsiella pneumoniae* not detected by automated susceptibility testing. Emerg Infect Dis 12, 1209–1213.

Tokita, M (2016). Transport Phenomena in Gel. Gels 2, 17.

Trojanowski, D, Kołodziej, M, Hołówka, J, Müller, R, a Zakrzewska-Czerwińska, J (2019). Watching DNA replication inhibitors in action: exploiting time-lapse microfluidic microscopy as a tool for target-drug interaction studies in *Mycobacterium*. *Antimicrob Agents Chemother* 63, e00739-19.

Veiga, A, Toledo, M da GT, Rossa, LS, Mengarda, M, Stofella, NCF, Oliveira, LJ, Gonçalves, AG, a Murakami, FS (2019). Colorimetric microdilution assay: Validation of a standard method for determination of MIC, IC50%, and IC90% of antimicrobial compounds. *J Microbiol Methods* 162, 50–61.

Wiegand, I, Hilpert, K, a Hancock, RE (2008). Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. *Nat Protoc* 3, 163–175.

Wilson, DN (2014). Ribosome-targeting antibiotics and mechanisms of bacterial resistance. *Nat Rev Microbiol* 12, 35–48.

Wüst, J, a Hardegger, U (1992). Comparison of the E test and a reference agar dilution method for susceptibility testing of anaerobic bacteria. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 11, 1169–1173.

*Zhang, XX, Zhang, T, a Fang, HHP (2009). Antibiotic resistance genes in water environment. *Appl Microbiol Biotechnol* 82, 397–414.

*označuje sekundární citace