

Univerzita Karlova v Praze
Farmaceutická fakulta v Hradci Králové
Katedra biologických a lékařských věd

Vyhodnocení aktivity potenciálně antimikrobních látek
pomocí mikrodiluční bujónové metody

Rigorózní práce

Vedoucí práce: Mgr. Marcela Vejsová, Ph.D.

Hradec Králové, 2012

Mgr. Anita Székelyová

Charles University in Prague
Faculty of Pharmacy in Hradec Králové
Department of Biological and Medical Sciences

Evaluation of the activity of potential antimicrobial
substances through the use of microdilution broth method

Rigorous thesis

Supervisor: Mgr. Marcela Vejsová, Ph.D.

Hradec Králové, 2012

Mgr. Anita Székelyová

„Prohlašuji, že tato rigorózní práce je mým původním autorským dílem a veškeré myšlenky, data a jejich zdroje, z nichž jsem pro zpracování čerpala, řádně cituji. Taktéž nebyla tato práce využita k získání jiného nebo stejného titulu.“

19.3.2012

Mgr. Anita Székelyová

Ráda bych poděkovala vedoucí rigorózní práce Mgr. Marcele Vejsové, Ph.D. za vstřícnost a cenné připomínky a dále paní Idě Dufkové za pomoc při technickém provedení laboratorní práce. Děkuji také svým blízkým za morální podporu.

Obsah

1	Abstrakt.....	8
2	Abstract.....	9
3	Seznam zkratek.....	10
4	Zadání – cíl práce	12
5	Úvod	13
6	Teoretická část.....	14
6.1	Popis testovaných bakteriálních kmenů	14
6.1.1	<i>Staphylococcus aureus</i>	14
6.1.2	Methicilin-rezistentní <i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA).....	15
6.1.3	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	18
6.1.4	<i>Enterococcus</i> sp.	19
6.1.5	<i>Escherichia coli</i>	19
6.1.6	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	22
6.1.7	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	23
6.2	Popis testovaných houbových kmenů	24
6.2.1	<i>Candida albicans</i>	24
6.2.2	<i>Candida tropicalis</i>	26
6.2.3	<i>Candida krusei</i>	26
6.2.4	<i>Candida glabrata</i>	27
6.2.5	<i>Trichosporon asahii</i>	27
6.2.6	<i>Aspergillus fumigatus</i>	28
6.2.7	<i>Absidia corymbifera</i>	29
6.2.8	<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	30
6.3	Testování antimikrobiální aktivity in vitro.....	31
6.3.1	Faktory ovlivňující testování antimikrobních látek	32
6.3.2	Agarová difuzní metoda	33
6.3.3	Agarová diluční metoda	36
6.3.4	Makrodiluční a mikrodiluční bujónová metoda.....	36
6.3.5	Testování kombinace antibiotik	37
6.3.6	Specifika testování antifungální aktivity	37
6.4	Přehled nejvýznamnějších antibakteriálních látek.....	42

6.4.1	β -laktámová antibiotika	42
6.4.2	Antibiotika inhibující bakteriální proteosyntézu	45
6.4.3	Antibiotika inhibující syntézu kyseliny tetrahydrolistové.....	48
6.4.4	Antibiotika inhibující syntézu nukleových kyselin.....	49
6.5	Přehled nejvýznamnějších antimykotik	50
7	Experimentální část	54
7.1	Materiál	54
7.1.1	Pomůcky a přístroje.....	54
7.1.2	Chemikálie	54
7.1.3	Růstová média.....	54
7.2	Testované kmeny bakterií	55
7.3	Testované kmeny kvasinek a hub	56
7.4	Testované látky.....	56
7.5	Postup pro testování antibakteriálního působení	57
7.5.1	Příprava suspenzí testovaných kmenů.....	57
7.5.2	Příprava ředící řady testované látky	57
7.5.3	Příprava mikrotitrační destičky.....	58
7.5.4	Inkubace.....	58
7.5.5	Vyhodnocení	59
7.6	Postup pro testování antimykotického působení	59
7.6.1	Příprava suspenzí testovaných kmenů.....	59
7.6.2	Příprava růstového média	59
7.6.3	Příprava ředící řady testované látky	59
7.6.4	Příprava mikrotitrační destičky.....	60
7.6.5	Inkubace.....	60
7.6.6	Vyhodnocení	60
7.7	Výsledky.....	61
7.7.1	Deriváty 2-(5-karboxypentyl)isochinolinium-bromidu a 1-(5-karboxypentyl)pyridinium-bromidu	61
7.7.2	Deriváty 6-[(3-methylfenyl)amino]pyrazin-2-karboxylové kyseliny	65
7.7.3	Deriváty 2-hydroxythiobenzamidu; 2 <i>H</i> -1,3-benzoxazin-2,4(3 <i>H</i>)-dithionu a další příbuzné struktury	71
7.7.4	Deriváty 2-(2-fenylvinyl)chinolinu	79

7.7.5	8-hydroxychinolin-2-karbaldehyd-N-fenylthiosemikarbazon a deriváty 7-hydroxychinolin-8-karbaldehyd-thiosemikarbazonu	82
7.7.6	2,2'-dithiodianilin a deriváty 1,3-benzothiazol-2-aminu	85
7.7.7	Deriváty 4-methyl-3-fenyl-4,5-dihydroisoxazolu	88
8	Diskuze	92
9	Závěr	100
10	Seznam obrázků a tabulek.....	101
11	Literatura.....	103

1 Abstrakt

Mgr. Anita Székelyová

Vyhodnocení aktivity potenciálně antimikrobních látek pomocí mikrodiluční bujónové metody

Rigorózní práce

Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Cílem této práce bylo stanovení antimikrobiální aktivity souboru 63 látek připravených na Katedře anorganické a organické chemie a Katedře farmaceutické chemie a kontroly léčiv Farmaceutické fakulty Univerzity Karlovy.

Látky byly testovány mikrodiluční bujónovou metodou na 8 kmenech bakterií a současně na 8 kmenech patogenních hub. Testované kmeny zahrnovaly Gram-pozitivní i Gram-negativní bakterie včetně rezistentních původců nozokomiálních infekcí a také kvasinky i vláknité houby. Podle společných strukturálních znaků byly testované látky rozděleny do 7 skupin.

Nejvyšší antibakteriální účinnost prokázaly deriváty 2-(5-karboxypentyl)isochinolinium-bromidu a 1-(5-karboxypentyl)pyridinium-bromidu, a to zejména na Gram-pozitivní bakterie. Měly také středně silný účinek na kvasinky. Nejvyšší antimykotickou aktivitu projevily deriváty 2-hydroxythiobenzamidu vůči *Absidia corymbifera* a látka WK-4 ze skupiny derivátů 2-[2-fenylvinyl]chinolinu, která dosáhla nízkých hodnot MIC téměř u všech testovaných kmenů, zejména u kvasinek. Její antistafylokoková účinnost byla také silná.

Pro získání jednoznačných výsledků je potřeba dalších testů na širším spektru příbuzných látek.

2 Abstract

Mgr. Anita Székelyová

Evaluation of the activity of potential antimicrobial substances through the use of microdilution broth method

Rigorous thesis

Charles university in Prague, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

The aim of this thesis was to assess the antimicrobial activity of 63 substances prepared at the Department of Organic and Inorganic Chemistry and the Department of Pharmaceutical Chemistry and Drug Control, Pharmaceutical Faculty of the Charles University in Hradec Králové.

The substances were tested through the microdilution broth method at eight strains of bacteria and pathogenic fungi at the same time. The tested strains consisted of Gram-positive and Gram-negative bacteria including highly resistant nosocomial pathogens, as well as yeasts and filamentous fungi. The tested substances were divided into seven groups according to their structural characteristics.

The highest antibacterial activity was shown by the derivatives of 2-(5-carboxypentyl)isoquinolinium-bromide and 1-(5-carboxypentyl)pyridinium-bromide, especially against Gram-positive bacteria. They also had intermediate activity against yeasts. The highest antimycotic activity was observed with the derivatives of 2-hydroxythiobenzamide against *Absidia corymbifera* and with the substance WK-4 from the group of derivatives of 2-[2-phenylvinyl]quinoline, which showed very low MIC values at almost all tested strains.

More tests need to be carried out on a wider spectrum of related substances to acquire more definite results.

3 Seznam zkratek

5-FC	5-fluorocytosin
ATB	antibiotikum
AMB	amfotericin B
AC	<i>Absidia corymbifera</i>
AF	<i>Aspergillus fumigatus</i>
CA-MRSA	Community-acquired MRSA
CA	<i>Candida albicans</i>
CFU	colony forming unit
CG	<i>Candida glabrata</i>
CK	<i>Candida krusei</i>
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
CNS	centrální nervová soustava
Co-NS	Coagulase-negative staphylococci
CT	<i>Candida tropicalis</i>
CTX-M	cefotaximáza
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DMSO	dimethylsulfoxid
EAEC	enteroagregativní <i>E. coli</i>
EC	<i>Escherichia coli</i>
EF	<i>Enterococcus sp.</i>
EHEC	enterohemoragická <i>E. coli</i>
EIEC	enteroinvazivní <i>E. coli</i>
EPEC	enteropatogenní <i>E. coli</i>
ESBLs	extended spectrum β -lactamases
EUCAST	European Commitee for Antimicrobial Susceptibility Testing
ETEC	enterotoxická <i>E. coli</i>
G+	Gram-pozitivní
G-	Gram-negativní
GIT	gastrointestinální trakt
GXM	glukuronoxylomannan
hVISA	heterogenní VISA

HUS	hemolyticko-uremický syndrom
KP	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
KP-E	<i>Klebsiella pneumoniae</i> ESBL pozitivní
KPCs	<i>Klebsiella pneumoniae</i> carbapenemases
MIC	minimální inhibiční koncentrace
MEC	minimální efektivní koncentrace
MH-bujón	Mueller-Hintonův bujón
MRSA	methicilin-rezistentní <i>Staphylococcus aureus</i>
MOPS	3-(N-morfolino)propansulfonová kyselina
NCCLS	National Commitee for Clinical Laboratory Standards Institute
PA	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
PBP	penicilin-binding protein
RNA	ribonukleová kyselina
rRNA	ribozomální RNA
SA	<i>Staphylococcus aureus</i>
SCC	staphylococcal chromosomal cassette
SE	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
SSSS	staphylococcal scalded skin syndrome
TA	<i>Trichosporon asahii</i>
TM	<i>Trichophyton mentagrophytes</i>
UPEC	uropatogenní <i>E. coli</i>
VISA	Vancomycin intermediate-resistant <i>Staphylococcus aureus</i>
VRE	Vancomycin-resistant <i>Enterococcus</i>
VRSA	Vancomycin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i>

4 Zadání – cíl práce

- Rešerše literatury
- Zvládnutí základních technik v mikrobiologické laboratoři
- Vypracování postupu vyhodnocení antimikrobiální aktivity *in vitro* pomocí mikrodiluční bujónové metody
- Vlastní experimenty
- Zpracování výsledků
- Vyhodnocení výsledků, jejich interpretace a diskuze s využitím teoretických a praktických znalostí dané problematiky

5 Úvod

Antimikrobiální rezistence je závažným celosvětovým problémem posledních desetiletí, který stále nabývá na důležitosti. Důvodem je neustále se zvyšující spotřeba antimikrobních látek jak v humánní a veterinární medicíně, tak v zemědělství. Důležitým faktorem je nadužívání a neracionální preskripce antibiotik, časté poddávkování a také non-compliance pacientů (předčasné ukončení léčby, nedodržování dávkovacího intervalu, apod.)

Antimikrobiální rezistence je dle Světové zdravotnické organizace globálním problémem, protože nárůst mezinárodního obchodu a cestování zvyšuje riziko přenosu rezistentních kmenů do téměř všech krajín země. Infekce způsobené rezistentními mikroorganismy nereagují na běžnou léčbu, mají výrazně delší průběh a zvýšenou úmrtnost. Pacienti jsou také mnohem déle nositeli infekce, čímž přispívají k rozšíření rezistentních mikrobů. To vše má závažné sociální a ekonomické důsledky, jako je např. zvýšení nákladů na léčbu, prodloužení doby hospitalizace, prodloužení pracovní neschopnosti, atd. Zároveň hrozí, že mnoho infekčních nemocí se stane nekontrolovatelnými a výsledky početných výtěrů moderní medicíny, jako např. transplantace orgánů, léčba onkologických onemocnění atd., budou ohroženy nozokomiálními infekcemi, a tudíž ohrozí přínos novodobé medicíny vůči společnosti. Největší dopad mají stále častější případy multirezistentních původců tuberkulózy a malárie, ale také nozokomiální infekce hospitalizovaných pacientů kmeny MRSA (methicilin-rezistentní *Staphylococcus aureus*) a vankomycin-rezistentními enterokoky. Rezistence se také zvyšuje v řadách infekcí, způsobených bakteriemi rodu *Shigella* a *Neisseria gonorrhoeae*. Významný nárůst dostupnosti antiretrovirální terapie HIV infekcí v posledních letech také vedl k znepokojujícímu vzestupu rezistence vůči inhibitorům reverzní transkriptázy a inhibitorům proteázy (www.who.int). Pacienti trpící AIDS, společně s dalšími imunokompromitovanými pacienty, jsou navíc ohroženi oportunními fungálními infekcemi, v jejichž řadách vzrůstající rezistence vůči antimykotikům také výrazně snižuje úspěšnost léčby.

Z výše uvedeného vyplývá nezbytnost neustálého zkoumání nových, antimikrobně působících látek, které by mohly snížit hrozivý dopad antimikrobiální rezistence na společnost.

6 Teoretická část

6.1 Popis testovaných bakteriálních kmenů

6.1.1 Staphylococcus aureus

Stafylokoky jsou Gram-pozitivní, nepohyblivé sférické koky o průměru přibližně 1 µm. V kulturách z kultivačních půd tvoří většinou hrozny, v klinickém materiálu se vyskytují především jednotlivě, ve dvojicích a v nepravidelných shlucích. *Staphylococcus aureus* patří mezi koaguláza-pozitivní stafylokoky. Koagulázový test se využívá k rozlišení *S. aureus* od většiny stafylokoků, které jsou koaguláza-negativní. Test se provádí s králičí plazmou, která se inokuluje stafylokovou kolonií. Při pozitivitě se ve vzorku po půl hodinové inkubaci při 37°C vytvoří koagulum, jelikož koaguláza vede ke konverzi fibrinogenu na fibrin. Jedná se o biochemicky velmi aktivní druh, který je dobře adaptovaný na kolonizaci kůže a sliznic. Produkuje různé exotoxiny, enzymy narušující tkáň a usnadňující šíření infekce do okolí (např. lipázu a hyaluronidázu) a protein A, který se váže na Fc fragment IgG a zčásti též IgM a IgA, kompetuje o Fc oblast imunoglobulinové molekuly s Fc receptory na povrchu fagocytů a tudíž inhibuje indukci fagocytózy a indukci kaskády komplementu. Tento druh také produkuje TSST-1, superantigen, který interakcí s vazebnými molekulami makrofágů a lymfocytů vede k nadprodukcí cytokinů, tyto pak mohou vyvolat tzv. syndrom toxického šoku. TSST-1 působí proliferačně na T-lymfocyty, je pyrogenní a poškozuje endoteliální buňky. Dalším produktem jsou exfoliatiny, které vedou ke tvorbě intradermálních trhlin vyplňovaných tkáňovou tekutinou, postupně se mění v puchýře a současně k exfoliaci povrchových vrstev pokožky (tzv. SSSS, Staphylococcal scalded skin syndrome, Syndrom opařené kůže, vyskytující se především u novorozenců a kojenců) (Bednář 1996). Enterotoxiny produkované *S. aureus* se vyskytují v pěti antigenních typech A, B, C, D, E a způsobují alimentární otravy. Enterotoxiny C a D kontaminují většinou mléčné produkty, enterotoxin B způsobuje stafylokokovou pseudomembranózní kolitidu. Tyto toxiny jsou termostabilní, odolávají varu až 30 min a jsou rezistentní vůči proteolytickým enzymům žaludku a jejunu, tudíž se nedají zničit tepelnou úpravou potravin ani ochrannými mechanismy trávicí soustavy. Působí jako superantigeny (tzn. antigeny, které nevyžadují pro svou interakci s imunitním systémem

zpracování antigen-prezentujícími buňkami) indukující nespecifickou aktivaci T-buněk a masivní uvolnění cytokinů. Charakteristickými histologickými změnami v žaludku a v jejunu jsou infiltrace epitelia a lamina propria neutrofilů a ztráta kartáčového lemu jejunu. Otrava stafylokovými enterotoxiny je charakteristická také emezí, která je pravděpodobně způsobovaná uvolněním zánětlivých mediátorů ze žírných buněk (Murray, Rosenthal et al. 2009).

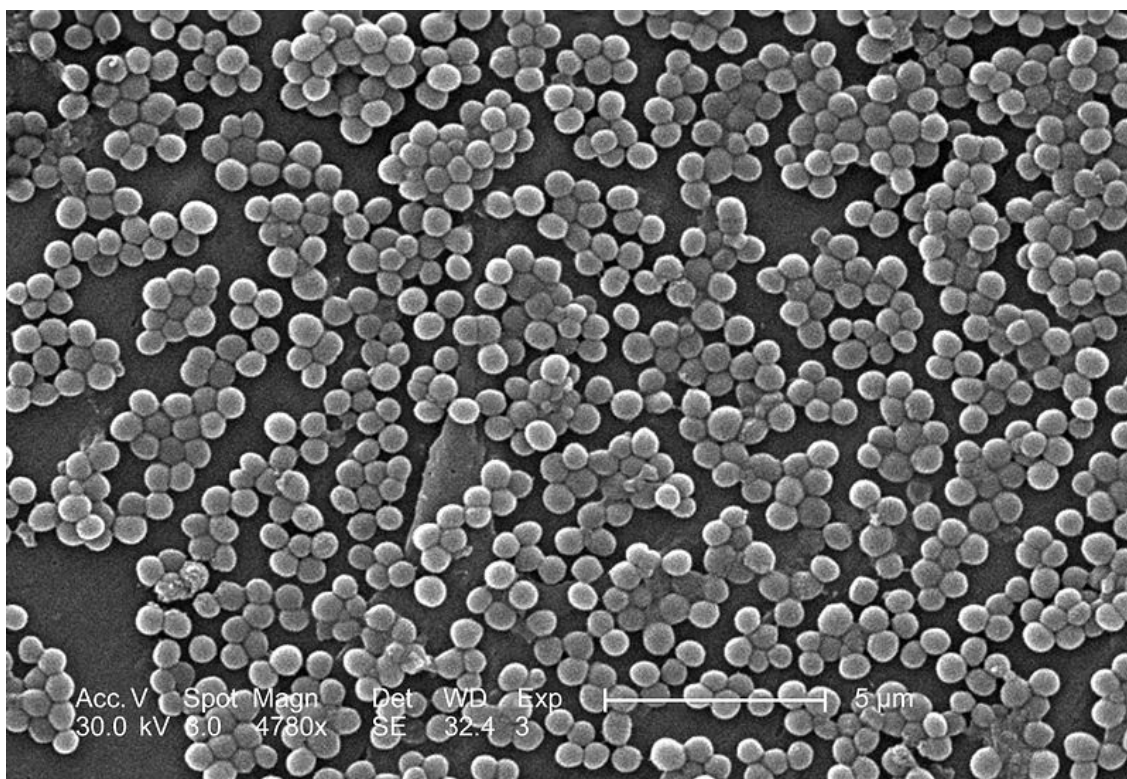
S. aureus je nejčastějším původcem kožních onemocnění, jako je furunkl, karbunkl, impetigo, případně mastitida nebo infekce ran. Lidský organismus je vůči stafylokové infekci značně odolný, k propuknutí závažnější infekce (pneumonie, osteomyelitidy, endokarditidy, meningitidy, hlubokých abscesů, atd.) dochází většinou u imunokompromitovaných pacientů. Invazivitu *S. aureus* značně podporují jím tvořené enzymy a toxiny, ve většině případů se tvoří abscesová ložiska. Stafylokové infekce často recidivují nebo přechází do chronicity. Časté je také zanesení infekce krevním řečištěm do jiných míst v organismu a vzniku sekundární infekce, která může být mnohokrát závažnější než infekce primární.

Většina kmenů je v současné době rezistentní k penicilinovým antibiotikům. Za tuto rezistenci odpovídají plazmidy kódující genetickou informaci pro tvorbu beta-laktamázy (penicilinázy) štěpící kruh beta-laktámových antibiotik. Proto se k terapii používají semi-syntetické penicilináza-rezistentní peniciliny (oxacilin, methicilin, kloxacilin), preparáty kombinované s inhibítorem beta-laktamázy kyselinou klavulánovou nebo sulbaktamem a cefalosporiny I. generace (cefalotin) (Bednář 1996).

6.1.2 Methicilin-rezistentní *Staphylococcus aureus* (MRSA)

Necelý rok po zavedení methicilinu do klinické praxe se na počátku šedesátých let minulého století objevily kmeny *S. aureus* rezistentní k tomuto antibiotiku. Během následujících dvou desetiletí se stal hlavním celosvětovým nozokomiálním patogenem s výrazným ekonomickým dopadem na systém zdravotnictví. V 80tých letech se objevily první případy veřejné MRSA-infekce mimo nemocnice, jednalo se však o osoby závislé na nitrožilně aplikovaných drogách anebo chronicky nemocné v častém kontaktu se zdravotníky. V posledním desetiletí se ve zvýšené míře začaly objevovat případy MRSA infekce i v řadách zdravých lidí bez rizikových faktorů. Jedná se

většinou o kožní infekce u dětí, způsobené kmeny MRSA odlišnými od kmenů způsobujících infekce nozokomiální (Maltezou and Giamarellou 2006).



Obrázek 1: MRSA zachycený skenovacím elektronovým mikroskopem

Převzato z: <http://en.wikipedia.org/wiki/File:MRSA7820.jpg>

Rezistence k methicilinu je určena genem kódujícím aberantní penicilin-binding protein PBP2a, který vykazuje až tisíckrát nižší afinitu k penicilinům a syntéza buněčné stěny zůstává tudíž neovlivněna. Největší hrozbou nemocničních kmenů MRSA je jejich multirezistence. Ke gentamicinu jsou rezistentní téměř všechny kmeny MRSA, ke gentamicinu, erytromycinu a klindamycinu současně je rezistentních více než 96% kmenů, ke gentamicinu, erytromycinu, klindamycinu, kotrimoxazolu, ciprofloxacinu, tetracyklinu a amikacinu současně více než 80 % kmenů. Všechny kmeny MRSA si ale dlouho uchovávaly citlivost ke glykopeptidovému antibiotiku vankomycinu. V poslední době se bohužel rozšiřují kmeny se sníženou citlivostí, tzv. VISA (Vancomycin intermediate-resistant *S. aureus*) a objevily se i vysoce rezistentní kmeny VRSA (Vancomycin-resistant *S. aureus*). V takových případech dochází k absolutnímu selhání antibiotické terapie (Schindler 2010).

Jako VISA jsou v současné době definovány izoláty s minimální inhibiční koncentrací (MIC) vankomycinu 4 až 8 µg/ml. Úplná rezistence je definována MIC \geq 16 µg/ml (Howden, Davies et al. 2010). První takový klinický izolát VRSA byl ohlášený v Michiganu v roce 2002. Heterogenní VISA (hVISA) se zdá být stádiem předcházejícím vývoji VISA. Jsou to kmeny *S. aureus* obsahující subpopulace dceřinných buněk se sníženou citlivostí k vankomycinu. Ten vyvíjí selektivní tlak preferující vývin hVISA klonů a při průběžné expozici může dojít až k vývinu uniformních VISA klonů. Kmeny VISA vykazují také sníženou citlivost vůči teikoplaninu (Liu and Chambers 2003).

Izoláty VISA a hVISA jsou charakteristické tlustější buněčnou stěnou, zvýšenou syntézou buněčné stěny, redukovanou autolýzou a změnami v teichoových kyselinách stěny. Buněčná stěna změněna takovým způsobem pak brání difuzi vankomycinu na své aktivní místo v cytoplasmatické membráně (Howden, Davies et al. 2010). U VRSA je rezistence zprostředkována genem *vanA* získaným z vankomycin-rezistentních enterokoků (VRE), který vede ke změnám v syntéze prekurzorů peptidoglykanů, přičemž je nutná předchozí infekce VRE. Jako alternativu vankomycinu lze použít linezolid a daptomycin. Linezolid je oxazolidinové antibiotikum, které inhibuje proteosyntézu bakterie vazbou na 50S podjednotku bakteriálního ribozómu díky interakci s 23S rRNA. Izoláty *S. aureus* vykazující rezistenci k linezolidu byly selektované *in vitro*, ale jsou stále velice vzácné v klinických podmínkách. Tato rezistence je často spojovaná s mutacemi v 23S rRNA, nebo se získaným genem kódujícím 23S rRNA methyltransferázu. Daptomycin je lipopeptidové antibiotikum, které narušuje propustnost a membránový potenciál bakteriální membrány, což vede k buněčné smrti bakteriální buňky. Ovšem i u daptomycinu jsou popsány případy snížené citlivosti, způsobené pravděpodobně hlavně subterapeutickými dávkami antibiotika dosaženými v místě infekce. Mechanismus snížení citlivosti je spojován se změnami ve struktuře a funkci buněčné membrány a se změnami v povrchovém náboji (Nannini, Murray et al. 2010).

V současné době je také závažným problémem šíření komunitních kmenů MRSA (Community-acquired MRSA, CA-MRSA). Způsobují infekce kůže a podkoží, hlavně abscesy, ale i primární sepsy a nekrotizující pneumonie. Od nemocničních kmenů MRSA se liší: a) odlišným umístěním genu *mecA*, b) produkcí Panton-Valentine leukocidinu a vysokou virulencí, c) sníženou multirezistencí - jsou citlivé ke kotrimoxazolu a tetracyklinu. Rizikové skupiny jsou děti do 2 let, sociálně slabší

skupiny, sportovci (z důvodu častého porušení integrity kůže), vojáci, vězňové, homosexuálové, narkomani (Schindler 2010).

6.1.3 *Staphylococcus epidermidis*

S. epidermidis patří mezi koaguláza-negativní stafylokoky a u člověka je běžným obyvatelům kůže obličej a těla, a také sliznice nosohltanu. V poslední době se ukázal být neuvěřitelně všestranným mikroorganizmem balancujícím na pomezí komenzalizmu a patogenicity. Na rozdíl od *S. aureus*, *S. epidermidis* neprodukuje mnoho agresivních virulentních faktorů, tudíž infekce způsobené u zdravých jedinců jsou většinou mírné, nebo mají chronický průběh. Avšak u imunokompromitovaných pacientů může způsobovat až život ohrožující infekce, mimo jiné sepse a meningitidy (Schoenfelder, Lange et al. 2010).

Vzestup infekcí způsobených tímto druhem je možné připsat na vrub častějšímu použití invazivních vyšetření, dlouho trvajících a složitých chirurgických zákroků a častému použití léčebných metod spojených s imunosupresí. Důležitým predisponujícím faktorem pro vznik infekce je přítomnost cizího tělesa, jelikož *S. epidermidis* velmi dobře adheruje k polymerům katétrů, cévních náhrad, umělých chlopní a kloubů, atrioventrikulárních spojů, atd. Na povrchu buněk vytváří polysacharidovou slizovou vrstvu, která zabraňuje průniku antibiotik a protilátek a zároveň zlepšuje adheenci, buňky tudíž tvoří na površích tzv. biofilm (Bednář 1996).

Rezistence vůči methicilinu je u *S. aureus* i u koaguláza negativních stafylokoků (Coagulase-negative staphylococci, Co-NS) zprostředkována komplexem genů *mecA*, který je umístěný na speciálním genovém vektoru nazývaném SCC (staphylococcal chromosomal cassette). SCC*mec* přenáší mobilní geny, které se mohou integrovat do chromozómu stafylokoků. Výskyt rezistence vůči methicilinu je mezi Co-NS a nozokomiálními kmeny *S. epidermidis* mnohonásobně vyšší, než u SA. Poslední poznatky naznačují, že je možný horizontální přenos genů kódujících rezistenci mezi jednotlivými kmeny stafylokoků, tudíž Co-NS představují rezervoár a genetické pozadí pro vývin nových SCC*mec* elementů, které se potažmo mohou inkorporovat do *Staphylococcus aureus* (Schoenfelder, Lange et al. 2010).

6.1.4 Enterococcus sp.

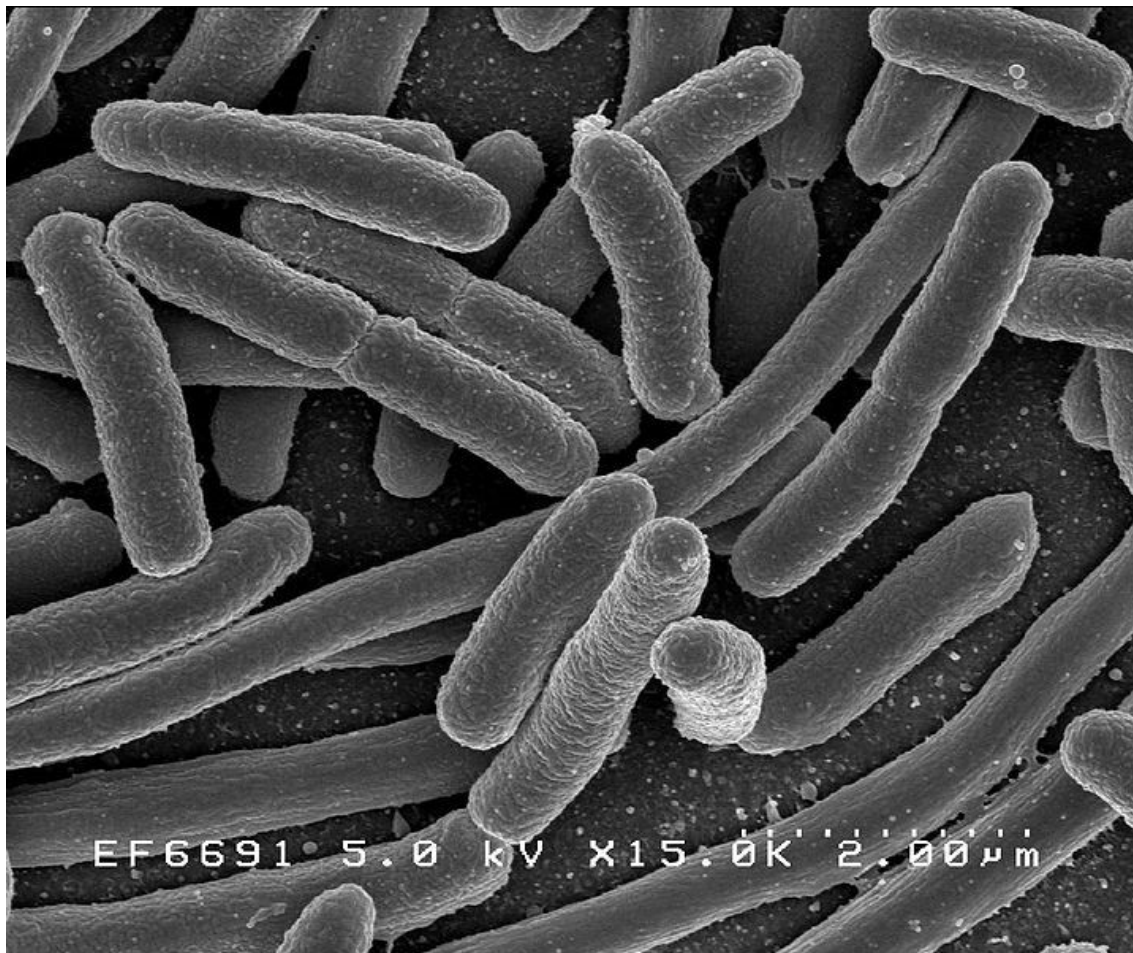
Enterokoky jsou Gram-pozitivní koky uspořádané do dvojic nebo krátkých řetízků. Neprodukují žádné silné virulentní faktory nebo toxiny a za běžných okolností jsou normální součástí mikroflóry tlustého střeva. Vyskytovat se můžou i v tenkém střevě, urogenitálním traktu, a výjimečně i v horních cestách dýchacích (např. u pacientů léčených širokospektrými antibiotiky). Jde však o závažné podmíněné patogeny, způsobující endokarditidy, těžké infekce močových a žlučových cest, ženských pohlavních orgánů a peritonea po chirurgických zákrocích (Bednář 1996). Největší význam má ovšem fakt, že jsou výrazně rezistentní k běžně používaným antibiotikům (např. oxacilin, cefalosporiny), anebo mají získané geny kódující rezistenci k vankomycinu. Terapie většinou pozůstává z kombinace aminoglykosidu a antibiotika působícího na buněčnou stěnu (např. ampicilin, vankomycin). V současnosti je však asi 25% enterokoků rezistentních vůči aminoglykosidům, *E. faecium* je plně rezistentní k ampicilinu a většina izolátů je rezistentní také vůči vankomycinu. V těchto případech lze použít novější antibiotika, např. linezolid, chinupristin, dalfopristin a některé fluorochinolony. Bohužel vzrůstá i odolnost enterokoků vůči linezolidu, chinupristin a dalfopristin neúčinkují na *E. faecium* a fluorochinolony mají slabou aktivitu vůči vankomycin-rezistentním enterokokům (Murray, Rosenthal et al. 2009). Za rezistenci vůči vankomycinu zodpovídá gen *vanA* kódující abnormální D-alanin-D-alanin ligázu, která katalyzuje náhradu koncového D-alanin-D-alaninu prekurzorů peptidoglykanů buněčné stěny za D-alanin-D-laktát, čímž tyto ztrácejí schopnost vázat glykopeptidická antibiotika (Leclercq and Courvalin 1997). Tento gen je velice nebezpečný hlavně díky tomu, že může být inkorporován pomocí plazmidů i do jiných bakteriálních kmenů. Nejvíce znepokojivý je jeho výskyt u MRSA, který je ale prozatím velmi zřídka (French 2010).

6.1.5 Escherichia coli

Jsou to Gram-negativní, fakultativně anaerobní tyčky. Ačkoliv jde o přirozeného obyvatele tlustého střeva člověka a savců, způsobuje největší podíl bakteriálních infekcí u člověka. Vyvolává intestinální a také četné extraintestinální infekce, z nichž jsou nejčastější močové infekce a cholecystitida, apendicitida, peritonitida, pooperační

infekce ran a sepsy. Používá se také jako indikátor fekální kontaminace vody a potravin. Na základě výskytu antigenů O, K a H se rozlišují různé sérotypy (Kayser, Bienz et al. 2005).

E. coli způsobuje 70-80 % akutních a 40-50% chronických infekcí močových cest. Většinou dochází k vzestupu tohoto patogenu z *ostium urethrae*. Rozvoji infekce napomáhají také obstrukční anomálie, neurogení močový měchýř anebo vezikouretrální reflux. Za fyziologických podmínek způsobuje infekce tzv. uropatogenní *E. coli* (UPEC). Tyto kmeny adherují pomocí P fimbrií na sliznici močových cest a také produkují hemolysin A, který rozkládá erythrocyty a další typy buněk, což vede k uvolnění prozánětlivých cytokinů (Kayser, Bienz et al. 2005).



Obrázek 2: *E. coli* zachycena skenovacím elektronovým mikroskopem

Převzato z: http://en.wikipedia.org/wiki/File:EscherichiaColi_NIAID.jpg

Kmeny *E. coli* způsobující gastroenteritidy lze rozdělit do pěti hlavních podskupin: **ETEC** – enterotoxická *E. coli* se vyskytuje hlavně v rozvojových zemích, je to častý původce cestovatelských průjmů. Produkuje termolabilní a termostabilní enterotoxiny. K infekci dochází prostřednictvím kontaminované vody a potravy. Způsobuje vodnaté průjmy a křeče v abdominální oblasti, k histologickým nebo zánětlivým změnám mukózy střev nedochází.

EPEC – enteropatogenní *E. coli* vyvolává vodnaté průjmy novorozenců a zůstává vážným problémem v zemích třetího světa, jelikož v důsledku vážné dehydratace může vést i ke smrti. Enterotoxiny neprodukuje, dochází ale k ultrastrukturálním změnám epiteliálních buněk tenkého střeva v důsledku úzké vazby bakterií na enterocyty.

EIEC – enteroinvazivní *E. coli* má mechanismus patogenicity podobný rodu *Shigella*, tzn. proniká do buněk střevní sliznice, kde se pomnožuje. Průjem je ze začátku vodnatý, v těžších případech i s příměsí hlenu a krve. Destrukce epiteliálních buněk ve spojení se zánětlivou infiltrací může vést až k ulceraci tlustého střeva.

EHEC – enterohemoragická *E. coli* způsobuje nejčastěji infekce dětí a vyskytuje se i v rozvinutých zemích. Nejvýznamnějšími zdroji infekce jsou infikované hovězí maso a nepasterizované mléko, džusy, syrová zelenina a ovoce. EHEC adherují podobně jako EPEC k epiteliálním buňkám, ale převážně v tlustém střevě. Produkuje také toxiny, které jsou podobné toxinu šigel (shiga-like toxin). Onemocnění se může manifestovat jako mírný průjem, ale i jako závažná hemoragická kolitida. U některých nemocných se může vyvinout hemolyticko-uremický syndrom (HUS), který je charakterizován akutním renálním selháním, trombocytopenií a mikroangiopatickou hemolytickou anemií. Toto onemocnění je často smrtelné.

EAEC – enteroagregativní *E. coli* je původcem vodnatých, někdy až hemoragických průjmů u dětí. Tyto bakterie agregují pomocí fimbrií a adherují k povrchu střev, čímž stimulují tvorbu hlenu a dochází k tvorbě biofilmu, který chrání bakterie před antibiotiky a makrofágy. Produkuje navíc i dva druhy toxinů (Bednář 1996; Murray, Rosenthal et al. 2009).

Jelikož je *E. coli* mikroorganismus s velice mobilním genetickým materiálem, není překvapivé, že v posledních desetiletích dochází k vzrůstu antimikrobiální rezistence u kmenů *E. coli* i mimo nemocniční prostředí. Ze začátku byla popsána rezistence ke konkrétním látkám, jako jsou např. ampicilin, trimetoprim nebo tetracykliny (Gupta, Scholes et al. 1999). Nedávno se však spektrum rezistence rozšířilo výskytem rezistence

k velkým skupinám látek. Zodpovídají za to hlavně tzv. ESBLs (extended spectrum β -lactamases, širokospektré β -laktamázy), které jsou kódovány a přenášeny pomocí plazmidů a vedou k rezistenci k téměř všem β -laktámovým antibiotikům včetně cefalosporinů druhé a třetí generace (Rodriguez-Bano and Paterson 2006). Producenti ESBLs jsou navíc často odolní také vůči aminoglykosidům a fluorochinolonům (Rogers, Sidjabat et al. 2010). Ačkoliv až donedávna za většinu závažných nozokomiálních infekcí způsobených koliformními bakteriemi zodpovídal rod *Klebsiella*, v 90. letech se situace změnila rozšířením *E.coli* produkujících cefotaximázy (CTX-M) po celém světě. Tyto enzymy se vyskytují ve více než 50 typech a ve srovnání s jinými ESBLs jsou více aktivní vůči cefotaximu než vůči ostatním cefalosporinům třetí generace. CTX-M produkující *E.coli* jsou vysoce přenosné jak v nemocnicích, tak ve společnosti (Woodford, Ward et al. 2004). V současnosti se tyto infekce projevují hlavně v urogenitálním traktu, převážně u starších katetrizovaných pacientů. Lékem poslední volby pro tyto multirezistentní koliformní bakterie jsou karbapenemy, avšak postupně se rozvíjí rezistence i vůči těmto látkám (French 2010).

6.1.6 *Klebsiella pneumoniae*

Jsou to nepohyblivé Gram-negativní tyčky chráněné polysacharidovým pouzdrém. Dle klíčového faktoru virulence, pouzdrného polysacharidového antigenu, se rozlišují na 77 sérotypů. Jde o oportunní patogeny, způsobující hlavně bronchopneumonie a infekce močových cest. U novorozenců může vyvolávat sepse a hnisavé meningitidy (Bednář 1996).

Celosvětový problém představují nozokomiální kmeny produkující již výše zmiňované ESBLs. Ty se vyskytují v mnohých typech, které se liší substitucemi aminokyselin v aktivním místě enzymu a mají proto rozdílnou afinitu k cefotaximu, ceftazidimu a aztreonamu, nejsou však schopné hydrolyzovat karbapenemy (Chen, Chopra et al. 2009). Ještě závažnějším nebezpečím je proto v posledních letech stále častější výskyt kmenů produkujících karbapenemázy (KPCs, *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases). Tyto enzymy jsou kódovány přenosnými plazmidy a jsou schopné hydrolyzovat všechny peniciliny, cefalosporiny a karbapenemy. KPCs již byly identifikovány i u *Escherichia coli*, *Enterobacter* spp., *Salmonella enterica* a *Pseudomonas aeruginosa*. Infekce těmito kmeny jsou velmi obtížně léčitelné, mezi

používané postupy patří terapie aminoglykosidy, kombinací polymyxinů anebo tygecyklinem (nové antibiotikum ze skupiny glycylycyklinů - jsou to semisyntetické deriváty tetracyklinů) (Hirsch and Tam 2010).

6.1.7 *Pseudomonas aeruginosa*

P. aeruginosa je dalším častým původcem nemocničních nákaz. Běžně se vyskytuje také v odpadních vodách i v půdě. Jde o Gram-negativní aerobní tyčky bez pouzdra, často však mívají slizovou obalovou vrstvu. Na základních kultivačních půdách tvoří kovově lesklé kolonie, na krevním agaru vyvolává zónu úplné hemolýzy. Produkuje pigmenty, a to modrozelený pyocyanin a žlutozelený fluorescein. Tvoří také proteolytické enzymy, čímž poškozuje kapiláry a vyvolává hemoragie až nekrózy. U zdravých lidí může dojít ke kolonizaci, ale nedochází k rozvoji onemocnění. U imunokompromitovaných pacientů způsobuje nejčastěji infekce respiračních a močových cest, infekce těžkých popálenin a ulcerizace poraněných očí (Bednář 1996).

Závažnější infekce, jako jsou bakterémie a pneumonie, jsou obtížně léčitelné a vykazují vysokou úmrtnost, jelikož je omezené množství látek s antipseudomonádovou aktivitou. Tři hlavní používané skupiny s různým mechanismem účinku jsou: aminoglykosidy (např. tobramycin a amikacin), β -laktámy (např. piperacilin, tikarcilin, cefalosporiny 3. a 4. generace - ceftazidim a cefepim), karbapenemy (imipenem, meropenem) anebo fluorochinolony (ciprofloxacin, levofloxacin). Rezistence vůči antimikrobiálním látkám se však neustále zvyšuje. Hlavními mechanismy jsou: snížení permeability vnější buněčné membrány, čímž se zabrání prostupu antimikrobiálního agens do buňky; tvorba mechanických efluxních pump, které odstraňují antibiotika mimo buňku; a produkce deaktivujících enzymů. Dále může docházet k přenosu rezistence vznikem mutací v chromozomálních genech, a také nabytím plazmidů nesoucích geny kódující rezistenci (Moore and Flaws 2011). V případě multirezistentních kmenů, u kterých je použití beta-laktámů, aminoglykosidů a chinolonů bezvýsledné, jsou poslední šancí poměrně vysoce toxické polymyxiny (např. kolistin). Velmi znepokojující je i nedostatek nových látek s významnější antipseudomonádovou aktivitou. Vývoj se mimo jiné zaměřuje na vývoj inhibitorů efluxních pump (Livermore 2002).

6.2 Popis testovaných houbových kmenů

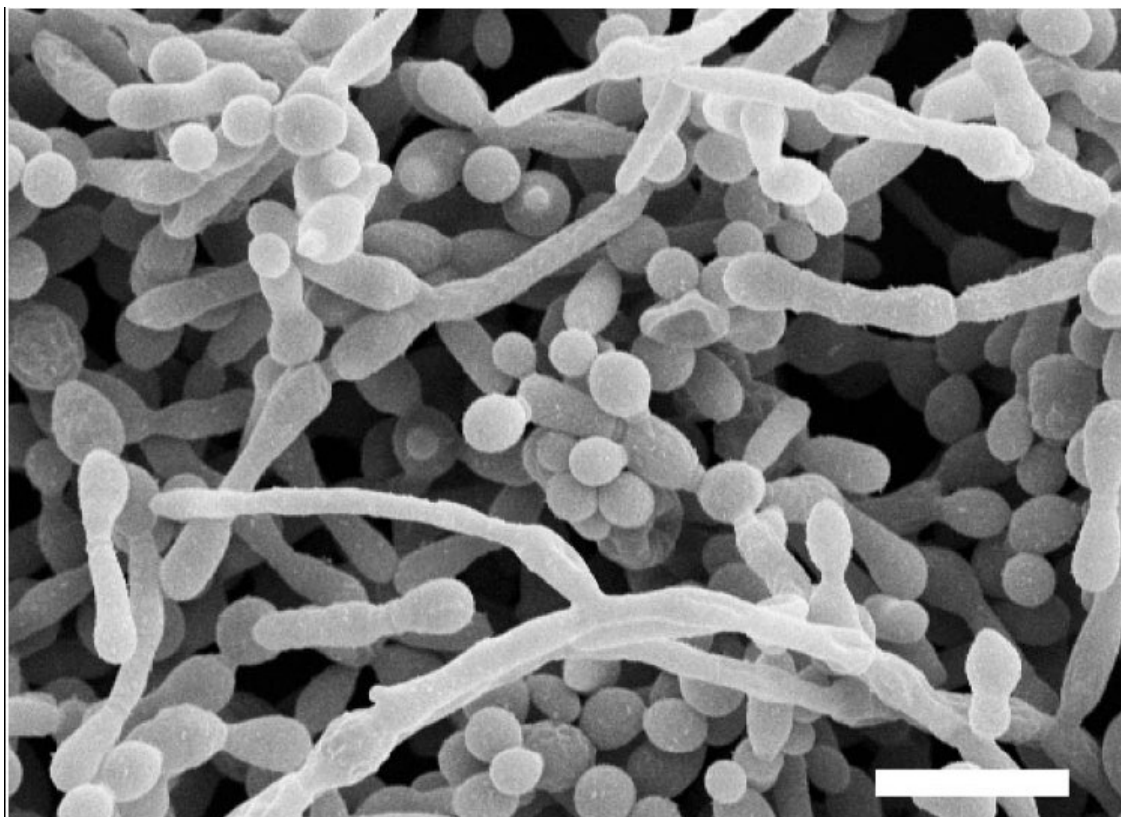
6.2.1 *Candida albicans*

Rod *Candida* je nejdůležitějším představitelem patogenů způsobujících oportunní mykózy. *Candida albicans* zodpovídá za 90% slizničních infekcí a 50 až 70 % infekcí krevního oběhu (Murray, Rosenthal et al. 2009), nicméně patogenní význam non-*albicans* kmenů pořád vzrůstá.

Morfologicky tvoří oválné blastospor/blastokonidie s pučícími novými buňkami; tyto se pak mohou protáhnout do délky a dát tak vznik pseudomyceliu, čili pseudohyfám, které se mohou dále řetězit. V jejich paždí vyrůstají blastospor. Na tvorbě pseudomycelia ve tkáni a v bílkovinném prostředí jsou založeny diagnostické testy (Schindler 2010). Charakteristickou vlastností je schopnost tvorby zárodečných klíčků, vláček, které vyrůstají z blastokonidií a dávající vznik pravým vícebuněčným hyfám rozděleným septy. Kultury rodu *Candida* tvoří jemné, krémovité, bílé, vyklenuté kolonie. *C. albicans* a některé další druhy mohou prodělat tzv. fenotypový switching, kdy se daný kandidový kmen může zvrátně přeměňovat mezi různými morfotypy, např. od typických bílých jemných kolonií složených hlavně z kvasinkovitých buněk až po chomáčkovité kolonie tvořené hlavně hyfami a pseudohyfami. Všechny buňky v populaci jsou schopny současné přeměny na základě signálů z prostředí. Tato vlastnost *Candida albicans* vysvětluje její schopnost přežít v četných různých prostředích organismu lidského hostitele (Murray, Rosenthal et al. 2009).

Rod *Candida* je běžnou součástí lidské mikroflóry, osídluje hlavně gastrointestinální trakt, a to od dutiny ústní po rektum. Vyskytují se také ve vagíně a uretře, na kůži a pod nehty. U imunokompromitovaných pacientů však mohou způsobit závažné infekce téměř jakéhokoliv orgánového systému, od slizničních a kožních kandidóz až po diseminaci do jater, sleziny, ledvin, srdce a mozku, a to v závislosti na lokálním nebo celkovém postižení obranyschopnosti. Slizniční infekce jsou lokalizovány nejčastěji v nosohltanu, ale mohou se rozšířit až do jícnu a posléze do celé trávicí soustavy. U žen je také velice časté postižení vaginální sliznice, a to hlavně u uživatelky perorální antikoncepce, po antibiotické terapii, během těhotenství, u pacientek trpících diabetes mellitus a s celkově oslabenou imunitou (Murray, Rosenthal et al. 2009).

Důvodem vysoké virulence rodu *Candida* je vysoká adaptabilita na různé podmínky v místech výskytu, produkce proteináz a fosfolipáz a tvorba biofilmů, které zvyšují přilnavost k povrchům a tudíž schopnost způsobit infekci. Buňky jsou v rámci biofilmu organizovány do strukturovaných společenstev zakotvených v extracelulární matrix (Ramage, Saville et al. 2005). Nejčastěji tvoří biofilmy *C. albicans*, ale jejich výskyt byl již prokázán i u jiných non-*albicans* druhů (Silva, Henriques et al. 2009).



Obrázek 3: Biofilm *C. albicans* zachycený skenovacím elektronovým mikroskopem
Proužek odpovídá 10 μm .

Převzato z: RAMAGE, G., SAVILLE, S. P., et al. (2005). *Candida* biofilms: an update. *Eukaryot Cell* 4(4): 633-8.

Terapie slizničních a kožních infekcí pozůstává z různých topických forem azolových antimykotik, perorálně se dá použít flukonazol nebo itraconazol. U systémových infekcí se po zhodnocení typu infekce, druhu původce a celkovém stavu nemocného podává flukonazol, vorikonazol, v případě neúčinnosti amfotericin B nebo echinokandiny (anidulafungin, kaspofungin, mikafungin). Rezistence ale bohužel není neobvyklým jevem ani u houbových kmenů. Vysoký stupeň rezistence vůči azolům u

některých druhů *Candida* je způsobena expresí proteinových pump v plazmatické membráně, které pumpují lék mimo buňku a tím pádem intracelulární koncentrace antimykotika není dostatečná pro inhibici cílového enzymu lanosterol-14 α -demethylázy. Rezistence vůči polyenům je nízká, avšak u některých kmenů *C. albicans* dochází k mutaci a tvorbě enzymu, který snižuje koncentraci ergosterolu v plazmatické membráně, tudíž dochází ke snížení vazby polyenů a potažmo k rezistenci. Významná je primární i sekundární odolnost *C. albicans* vůči 5-fluorocytosinu (5-FC) díky mutaci v enzymu, který přeměňuje 5-FC na 5-fluorouridin monofosfát. Z toho důvodu je 5-FC primárně používán v kombinaci s jinými antimykotiky, např. amfotericinem B (AMB). Tvorba biofilmu také významně přispívá k míře rezistence vůči antifungálním látkám (Niimi, Firth et al. 2010).

6.2.2 *Candida tropicalis*

C. tropicalis patří mezi nejvýznamnější patogenní non-*albicans* kmeny s celosvětově vzrůstajícím rozšířením. Například v Indii je nejčastějším původcem nozokomiální kandidémie (Chakrabarti, Mohan et al. 2002). Spolu s *C. krusei* je nejvýznamnějším původcem fungální invazivní infekce u pacientů, kteří podstoupili transplantaci kostní dřeně nebo kmenových buněk a u pacientů s hematologickými malignitami (Miceli, Diaz et al. 2011).

C. tropicalis má také schopnost tvořit biofilmy (Silva, Henriques et al. 2009). Může vyvolávat všechny klinické formy kandidémie, tzn. orální, vaginální, kožní, unguální, gastrointestinální a také systémovou podobu (Lopez-Martinez 2010). Bohužel ale v posledním desetiletí významně vzrůstá rezistence *C. tropicalis* k flukonazolu, zřejmě mechanismem up-regulace efluxních transportérů (Kothavade, Kura et al. 2010).

6.2.3 *Candida krusei*

Na rozdíl od jiných druhů rodu *Candida*, *C. krusei* se dá běžně izolovat z mnohých potravin a nápojů, ale jen výjimečně ze vzorků zdravých lidí. Infekcí mohou častěji trpět pacienti, kteří užívají flukonazol v rámci profylaktické léčby, např. po transplantaci kostní dřeně (Wingard, Merz et al. 1991). *C. krusei* je přirozeně rezistentní vůči flukonazolu díky nízké afinitě její 14 α -demethylázy k tomuto léčivu a navíc může

nabýt rezistenci k ostatním azolům sníženou kumulací léčiva v buňce prostřednictvím efluxních pump (Morschhauser 2010).

6.2.4 *Candida glabrata*

Na rozdíl od *C. albicans*, *C. glabrata* není polymorfní a vyskytuje se pouze ve formě blastokonidií, netvoří pseudohyfy (Silva, Negri et al. 2011). Jde o běžný kontaminant kůže a moči. Má variabilní citlivost vůči flukonazolu a itrakonazolu, ale mnohé infekce se dají úspěšně léčit vysokými dávkami flukonazolu (Kufe, Pollock et al. 2003). Jde o častého původce kandidémií u pacientů užívajících flukonazol nebo amfotericin B v rámci profylaxe nebo terapie (Nguyen, Peacock et al. 1996).

6.2.5 *Trichosporon asahii*

V posledních letech jsou infekce způsobené rodem *Trichosporon* na vzestupu. Tento rod je charakterizovaný tvorbou hyf, pseudohyf a blastokonidií. Všechny různé klinické manifestace bývaly připisovány *T. beigeli*. Došlo však k revizím taxonomické nomenklatury na základě morfologie a biochemických a molekulárně-biologických charakteristik, které zjistily, že *T. beigeli* pozůstává ze 17 druhů a 5 variet. *T. asahii* a *T. mucoides* jsou nejčastěji izolované z hloubkových infekcí, *T. cutaneum* a *T. asteroides* způsobují hlavně povrchové infekce. Většina invazivních trichosporonóz, za jejichž původce byl považován *T. beigeli*, jsou tudíž nyní připisovány *T. asahii*. V buněčné stěně exprimují tyto houbové organizmy glukuronoxylomannan (GXM), který je antigeně i biochemicky velice podobný GXM *Cryptococcus neoformans*. Bylo prokázáno, že GXM antigeny zeslabují fagocytární imunitní odpověď (Walsh, Groll et al. 2004).

Ke vstupu infekce nejčastěji dochází gastrointestinálním traktem nebo cévními katétry. Trichosporonóza může vyústit v život ohrožující fungémie podobné těm způsobeným rodem *Candida*, hlavně u imunokompromitovaných pacientů (Walsh, Groll et al. 2004). Mortalita je u *T. asahii* infekcí relativně vysoká a účinnost současných antimykotik poměrně limitovaná. Nebezpečná je hlavně morfologická záměna za rod *Candida*, který se většinou léčí amfotericinem B, rod *Trichosporon* je však k němu mnohem méně citlivý. *In vitro* se taky jeví málo citlivý k echinokandinům (Serena, Pastor et al. 2005). Nejúčinnější se v současnosti zdají být triazolová antimykotika

(vorikonazol a částečně i itrakonazol) nebo kombinovaná terapie. Ve studii provedené Li et al. jeví synergistický efekt kaspofungin a amfotericin B, tato kombinace by se dala použít u refrakterní diseminované trichosporonózy. Nejslibnější kombinací se ovšem jevil itrakonazol s kaspofunginem. U obou výše jmenovaných kombinací docházelo k synergické interakci simultánním zásahem na buněčnou stěnu i membránu (Li, Qiao et al. 2010)

6.2.6 *Aspergillus fumigatus*

Rod *Aspergillus* zahrnuje asi 150 druhů vláknitých hub. Rozvětvené hyfy jsou děleny septa a tvoří mycelium. Vegetativní (bazální) mycelium čerpá živiny a vzdušné mycelium nese reprodukční orgány – konidiofory, tvořící řetízkovitě uspořádané konidie. Jde o kosmopolitní saprofytické houby velkého významu (Bednář 1996).

Aspergillus fumigatus je nejčastějším původcem humánní nákazy, k přenosu konidií dochází vzdušnou cestou. U jedinců s plicním onemocněním, jako je asthma bronchiale nebo cystická fibróza může vyvolat alergickou bronchopulmonální aspergilózu. U lidí se zaléčenou tuberkulózou mohou vznikat po opakované expozici konidiami v plicních kavitách ohraničené neinvazivní aspergilomy. Invazivní aspergilóza je nejzávažnějším stavem způsobovaným *A. fumigatus* a vyskytuje se hlavně u imunokompromitovaných pacientů. U zdravých lidí dochází po inhalaci konidií k jejich částečnému odstranění z bronchiol nebo alveol mukociliární clearance a částečně k fagocytóze alveolárními makrofágy. Konidie, které přežijí obě tyto obranné linie, jsou následně zničeny infiltrujícími neutrofily. Dysfunkce těchto obranných mechanismů vede k významnému vzrůstu rizika rozvoje invazivní aspergilózy. *A. fumigatus* je velice termotolerantní druh a při 37 °C roste velmi dobře, což přispívá k jeho patogenitě. Po uchycení konidií v dýchacích cestách dochází ke změnám epitelí. Konidie mohou dokonce začít klíčit a napadat okolní plicní tkáň skrze bazální membránu epiteliálních buněk. Z plic může infekce krevním řečištěm diseminovat i do jiných orgánů včetně CNS a hyfy také často prorůstají do cév (Dagenais and Keller 2009).

K léčbě lze použít amfotericin B, azoly itrakonazol, vorikonazol a posakonazol a echinokandin kaspofungin. K léčbě invazivní aspergilózy je vorikonazol doporučovaným lékem prvním volby, druhou volbou je kaspofungin a lipidová formulace amfotericinu B. Jelikož azoly jsou dostupné v perorální formě, jsou používány k léčbě chronických infekcí, často i dlouhodobě. Rezistence se vyskytuje

bohužel i u tohoto patogenu, nejčastěji vůči itraconazolu, ale zvyšuje se počet hlášení případů rezistence i vůči novějšímu vorikonazolu a posakonazolu. Mechanismem azolové rezistence je pravděpodobně alterace cílového proteinu sterol-14 α -demethylázy, vedoucí k inhibici vazby léku na cílovou strukturu (Howard and Arendrup 2011). U azolů je také riziko zkřížené rezistence, jak dokazuje případ, kdy zhruba 70 % itraconazol-rezistentních izolátů bylo zkříženě rezistentních také vůči posakonazolu a vorikonazolu (Howard, Cerar et al. 2009).

6.2.7 *Absidia corymbifera*

Rod *Absidia* patřící do řádu *Mucorales* a třídy *Zygomycetes* prošel v roce 2007 rozsáhlou revizí na základě fylogenetických, fyziologických a morfologických charakteristik. *Absidia corymbifera* byla podle ní přejmenována na *Mycocladius corymbifer* a zařazena do nové čeledi *Mycocladaceae* a rodu *Mycocladius* spolu s *M. blakesleeana* a *M. hyalospora* (Hoffmann, Discher et al. 2007). Později došlo k dalším změnám v nomenklatuře a byl navržen název *Lichtheimiaceae*, resp. *Lichtheimia* pro tuto čeleď a rod. Jde o vláknité houby vyskytující se v půdě, které mohou způsobovat závažné infekce imunokompromitovaných pacientů, diabetických pacientů s ketoacidózou nebo pacientů s poraněním, které přišlo do kontaktu s kontaminovanou půdou (Garcia-Hermoso, Hoinard et al. 2009).

Zygomykóza způsobena *A. corymbifera* se může projevit v téměř jakémoliv tkáni, tato infekce má tudíž velmi pestrou klinickou manifestaci. Nejzávažnější infekce centrální nervové soustavy (CNS) se projevují ve třech klinických formách: nejčastěji jako rhinocerebrální zygomykóza, vzácněji pak jako diseminovaná zygomykóza rozšířená až do CNS anebo jako izolovaná cerebrální zygomykóza. Léčba je velice obtížná, pozůstává z kombinace chirurgického zákroku a lipozomálního amfotericinu B (Skiada, Vrana et al. 2009). Dalším slibným lékem dosahujícím dobré výsledky je posakonazol, a to jak u rhinocerebrálních (Greenberg, Mullane et al. 2006), tak u kožních infekcí (Almaslamani, Taj-Aldeen et al. 2009).

6.2.8 Trichophyton mentagrophytes

T. mentagrophytes patří mezi dermatofyty, vláknité keratofilní a keratolytické houby schopné napadat kůži, vlasy nebo nehty. U infekcí kůže těmito houbami je většinou napadeno pouze *stratum corneum*, průnik do hlubších vrstev kůže je velice zřídka. U vlasů a nehtů jsou také napadány pouze keratinizované vrstvy. Mikroskopicky struktura *T. mentagrophytes* je charakteristická produkcí jednotlivých doutníkovitých makrokonidií a také hroznů sférických mikrokonidií (Murray, Rosenthal et al. 2009).

Klinicky nejčastějším projevem infekce způsobené *T. mentagrophytes* je *tinea pedis*, proto bývá varieta napadající lidskou kůži nazývána také *T. interdigitale*. Infikovaná kůže často vytváří vezikuly, při napadení nehtů dochází k infekci pouze povrchu nehtu. *Tinea pedis* může přejít i v chronickou formu, kdy léze nehtového povrchu slouží jako rezervoár a dochází k opakujícím se epizodickým projevům na kůži plosky a prstů nohou a vzácně i na tříslech nebo jiných částech těla (Zaias and Rebell 2003).

T. mentagrophytes zodpovídá celosvětově za zhruba 20 % případů onychomykóz (60 % je způsobeno *Trichophyton rubrum* a 10 % *Epidermophyton floccosum*). Rizikovými faktory těchto infekcí jsou např. vlhkost, opakované trauma nehtů, genetická predispozice, ale také ve významné míře diabetes, zhoršená periferní cirkulace, HIV infekce a jiné formy imunosuprese. *T. mentagrophytes* je nejčastějším původcem povrchové bílé formy onychomykózy, kdy má povrch nehtu charakteristický bělavý křídovitý vzhled, někdy i s bělavými ostrůvky. Je také druhým nejčastějším původcem celkové dystrofické onychomykózy po *T. rubrum*, kdy dochází k zhrubnutí a postupně až k totální destrukci nehtu (Welsh, Vera-Cabrera et al. 2010).

6.3 Testování antimikrobiální aktivity *in vitro*

Výsledky *in vitro* testování antimikrobiální aktivity mají nenahraditelnou hodnotu při výběru vhodného chemoterapeutika pro léčbu infekce daným mikroorganizmem. Patří k základním vyšetřením mikrobiologických laboratoří a jsou nezbytné pro stanovení racionální terapie. Tato oblast se vyvíjí velmi dynamicky ve snaze dosáhnout co nejvyšší stupeň standardizace, spolehlivost a reprodukovatelnost. Význam testování účinnosti antimikrobiálních látek je obrovský nejen pro klinickou praxi, ale také pro výzkumnou činnost při vývoji nových antimikrobních látek a sledování vývoje rezistence.

K dispozici jsou pro tyto účely různé metody kvalitativní a kvantitativní, lišící se stupněm standardizace, technickou a materiální náročností, spolehlivostí a reprodukovatelností výsledků. Metody kvalitativní rozdělují testované kmeny mikroba na citlivé, intermediální a rezistentní, zatímco kvantitativní metody vyjadřují konkrétní hodnotu míry citlivosti či rezistence daného kmene k antimikrobní látce, nejčastěji vyjádřené jako minimální inhibiční koncentrace (MIC) látky. Jde o nejnižší koncentraci, která okem viditelně zastavuje růst testovaného mikroba (Jílek, Buchta et al. 2002).

Ovšem při výběru vhodného antibiotika pro léčbu pacienta se musí zohlednit i řada dalších faktorů, jako např. farmakokinetika testované látky, její toxicita, klinické projevy nemoci a celkový stav pacienta. Některé mikroby mohou vlivem okolností setrávat v organismu, i když by měly být k použité antimikrobní látce citlivé a naopak, může dojít k vyléčení, i když se daný mikrob testoval jako rezistentní. Příkladem může být neúčinnost aminoglykosidů v anaerobním prostředí abscesu, jelikož je pro jejich průnik do buňky mikroba nezbytný kyslík. Taktéž ale mohou být eliminovány rezistentní bakterie způsobující močové infekce, kvůli mnohonásobně vyšším koncentracím antibiotika dosaženým v moči (Murray, Rosenthal et al. 2009).

6.3.1 Faktory ovlivňující testování antimikrobních látek

Standardizace používaných postupů po zavedení do klinické praxe je nutná pro dosažení srovnatelnosti výsledků mezi jednotlivými laboratořemi. Směrodatné jsou standardy vypracovávány americkým Institutem pro klinické a laboratorní standardy (Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI), např. dokument M2-A9 pro diskový test, M7-A7 pro dluční testy u aerobních bakterií a M11-A7 pro agarovou dluční a mikrodiluční metodu u anaerobních bakterií.

Z tohoto hlediska je problematičtější testování antifungálních látek, které bylo standardizované až v 90. letech, kdežto pro většinu antibiotik u většiny patogenů jsou k dispozici standardní protokoly včetně interpretačních kritérií výsledků (Jílek, Buchta et al. 2002).

Faktory ovlivňující výsledky testování antimikrobiální účinnosti lze rozdělit do čtyř skupin (Jílek, Buchta et al. 2002):

1. METODIKA

- výběr testu, parametr hodnotící antimikrobní aktivitu, způsob odečtu
- u mikrobistaticky působících látek, čili většiny antimykotik nelze odečítat MIC definovanou jako 100% inhibice kmene, jelikož způsobují jen částečnou inhibici růstu mikroba. Tento problém se řeší zavedením relativního inhibičního parametru růstu (IC_{50} , IC_{80}), který udává procento (50 nebo 80%) inhibice růstu mikroba v přítomnosti dané koncentrace látky ve srovnání s růstem v kontrole bez dané látky

2. PODMÍNKY TESTOVÁNÍ

- složení testovací půdy a její pH, teplota, délka inkubace, stupeň aerace, pufr, rozpouštědlo

3. MIKROB

- velikost inokula (čím větší, tím větší MIC), stádium růstové fáze daného mikroba (k zásahu antimikrobní látky jsou citlivější buňky v exponenciální fázi růstu)

4. TESTOVANÁ LÁTKA

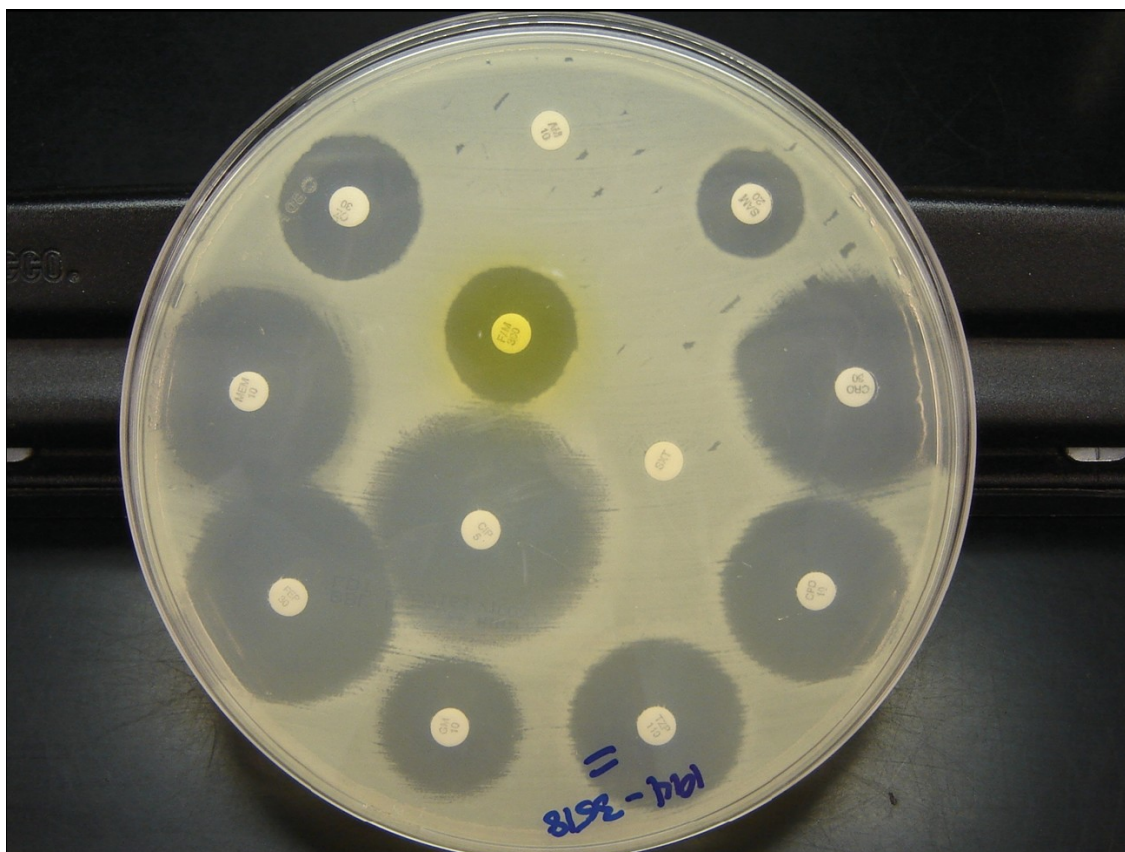
- stabilita, rozpustnost - „eagle efekt“, protonizace molekuly, lékové formy (např. liposomy)
- „eagle efekt“ je paradoxní jev, kdy v jamkách s nižší koncentrací antimykotika pozorujeme nižší nárůst než v jamkách s vyšší koncentrací látky, jelikož došlo k jejímu částečnému vysrážení.

6.3.2 Agarová difuzní metoda

6.3.2.1 Diskový test

Jde o jednoduchý, praktický a velmi dobře standardizovaný postup. Ve většině případů se bakterie testují na Mueller-Hintonově agaru, u náročnějších bakteriálních druhů se musí složení půdy, příp. i kultivační atmosféra vhodně upravit. Na vysušenou půdu o průměru 100 mm se aplikuje bakteriální inokulum obsahující $1-2 \times 10^8$ CFU/ml (CFU = colony forming unit, jednotka tvořící kolonie). Po oschnutí inokulovaných půd se na ně pokládají testovací disky z filtračního papíru impregnované určitým množstvím antibiotika, které následně difunduje do okolní agarové půdy a vytváří koncentrační gradient, který brání růstu mikroba dle míry jeho citlivosti. Obvykle se testuje 6-8 rovnoměrně rozmístěných disků. Petriho misky jsou pak inkubovány při 37 °C po dobu 16-24 hodin. Poté se provede odečet výsledků změřením průměru inhibiční zóny udávaného v mm, který je tím větší, čím je testovaný kmen citlivější. Tyto hodnoty jsou interpretovány v souladu s kritérii publikovanými CLSI. Výsledky jsou kvalitativní, čili určují se kategorie „citlivý“, „intermediátní“ a „rezistentní“. Některé komerčně dostupné odečítací systémy inhibičních zón jsou však schopny pro některé mikroby a antibiotika vypočítat přibližnou MIC. Nicméně výsledky diskového testu mívají dobrou korelaci s *in vivo* odezvou na léčbu danou látkou v běžném dávkování (Jílek, Buchta et al. 2002; Jorgensen and Ferraro 2009).

Výhodami této metody jsou jednoduchost provedení, nenáročnost na technické vybavení, obdržení kategorických výsledků s jednoduchou klinickou interpretací a flexibilita při výběru testovacích disků. Je také ze všech testovacích metod nejméně finančně náročná. Mezi nevýhody ale patří nemožnost mechanizace nebo automatizace. Přesné testování některých chloustivých a pomalu rostoucích bakteriálních kmenů není pomocí této metody možné, ale metoda byla úspěšně standardizovaná pro testování streptokoků, *Neisseria meningitidis* a *Haemophilus influenzae* za použití specializovaného růstového média, inkubačních podmínek a specifických podmínek pro interpretaci průměru inhibičních zón (Jorgensen and Ferraro 2009).



Obrázek 4: Diskový difuzní test kmenu *E. coli* získaného kultivací ze vzorku moče
Převzato z: JORGENSEN, J. H. AND FERRARO, M. J. (2009). Antimicrobial susceptibility testing: a review of general principles and contemporary practices. Clin Infect Dis 49(11): 1749-55.

6.3.2.2 Gradientová difuzní metoda – E-test

Tato metoda je kvantitativní a využívá ustanoveného koncentračního gradientu antimikrobní látky v agarovém médiu pro odečet MIC. Postup vychází z diskového testu, ale místo papírového disku je na agar přikládán tenký kalibrovaný plastový proužek zesponu impregnovaný koncentračním gradientem antibiotika a shora označený koncentrační stupnicí. Tento vytváří v agaru kontinuální gradient antimikrobiální látky podél a kolmo od proužku. Na povrch Petriho misky o průměru 150 mm inokulované stejným způsobem jako u diskové metody se může radiálně rozložit maximálně 5 až 6 proužků. Po inkubaci přes noc se odečítají výsledky z proužků na vrchu misky.

Inhibiční zóna má elipsoidní tvar a v místě, kde se její dolní hrana dotýká proužku, lze na stupnici odečíst MIC.



Obrázek 5: Kmen *Staphylococcus aureus* testovaný gradientovou difuzní metodou vankomycinem (VA), daptomycinem (DM) a linezolidem (LZ) na Mueller-Hintonově agaru.

Převzato z: JORGENSEN, J. H. AND FERRARO, M. J. (2009). Antimicrobial susceptibility testing: a review of general principles and contemporary practices. Clin Infect Dis 49(11): 1749-55.

Tato metoda je velice flexibilní a jednoduše proveditelná, ale poměrně finančně náročná, pokud je nutno otestovat větší množství látek, kvůli poměrně vysoké ceně komerčně vyráběných E-test proužků. Její použití je proto nejvhodnější pro případy, kdy je potřeba zjistit MIC pro jednu nebo dvě látky anebo když jde o choulostivý mikroorganismus a je nutné použít obohacené médium nebo speciální inkubační podmínky (např. stanovení MIC penicilinu nebo ceftriaxonu u pneumokoků). Výsledky E-testu velmi dobře korelují také s výsledky bujonové nebo agarové diluční metody. V některých případech může ale docházet k posunům vůči nižším nebo vyšším

hodnotám MIC u určitých kombinací mikroba a antimikrobní látky. Toto může vést k chybné interpretaci MIC, pokud jsou standardní interpretační kritéria pro MIC získané bujónovou diluční metodou aplikované na E-test (Jorgensen and Ferraro 2009).

Agarová diluční metoda

Tato metoda se provádí naočkováním 30 až 40 kmenů najednou pomocí jehlového razidla na povrch Petriho misek naplněných standardním objemem agarové půdy s různou koncentrací antibiotika. Po inkubaci se odečítá růst kmenů ve formě uzavřené kolonie. MIC představuje miska obsahující nejnižší množství antibiotika, na níž již není pozorovaný růst. Jedná se o velice přesnou metodu, která snadněji stanovuje inhibici růstu, nicméně v laboratorní praxi nenachází širší uplatnění z důvodu materiálové a časové náročnosti (Jílek, Buchta et al. 2002).

6.3.3 Makrodiluční a mikrodiluční bujónová metoda

Mezi nejstarší metody testování antimikrobiální citlivosti patří makrodiluční bujónová metoda, která se provádí ve zkumavkách. Tyto se naplní připravenou dvojkovou ředící řadou antibiotika ve vhodném médiu (v bakteriologii nejčastěji Mueller- Hintonův bujón o pH 7,2- 7,4) a následně se inokulují standardizovanou suspenzí bakterií $1-5 \times 10^5$ CFU/ml. Po inkubaci přes noc se hodnotí zákal vzniklý nárůstem bakterií. Nejnižší koncentrace antibiotika, která zabránila růstu mikrobu, se stanoví jako MIC. Tato metoda produkuje výsledky s přesností plus mínus jedno místo v ředící řadě. K chybám může dojít při manuální přípravě ředící řady antibiotika a při vizuálním odečtu. Výhodou této metody je získání kvantitativního výsledku, čili MIC, a případně možnost studia kinetiky antibakteriálního působení hodnocením změn optické denzity nebo zákalu. Lze jí také využít pro přesnější testování kombinace antibiotik. Nevýhodou je velká pracnost, relativně vysoké zatížení chybou a vysoká spotřeba materiálu.

K rozšíření a popularizaci bujónové diluční metody došlo zavedením polystyrénových mikrotitračních destiček, obsahujících 96 jamek o objemu 0,1 ml, tudíž je možné na jediné destičce otestovat až 12 antibiotik v 8 koncentracích. Rozplněné destičky lze zamrazit a skladovat až 4 týdny. Po inokulaci bakteriemi o 5×10^5 CFU/ml

a inkubaci přes noc při 37 °C se odečet výsledků provádí na šabloně z průhledného materiálu. První jamka, ve které není viditelný nárůst, udává MIC. Výhody této metody jsou vysoká standardnost provedení a možnost automatizace rozplňování antibiotika, inokulace i odečtu. Lze ji použít pro testování rozsáhlejších souborů kmenů nebo vyššího počtu antibiotik při relativně nižších nákladech na antimikrobní látky a kultivační půdy. Nevýhodou je, že při chybě v přípravě testovacích půd a ředění antibiotika dochází k znehodnocení celého souboru (Jílek, Buchta et al. 2002; Jorgensen and Ferraro 2009).

6.3.4 Testování kombinace antibiotik

Při léčbě systémových nozokomiálních infekcí se dnes často využívá silnějšího léčebného účinku preparátů podaných v kombinaci, většinou se jedná o kombinace baktericidních antibiotik. Výsledný efekt může být synergický, kdy dochází k snížení MIC ve srovnání s použitím každé látky zvlášť, antagonistický, kdy se sníží účinek jedné nebo obou látek, případně aditivní nebo indiferentní, kdy účinek kombinace se rovná součtu účinku obou složek, příp. odpovídá účinku silnější složky. K orientačnímu testování se využívá agarový difuzní test, k stanovení kvantitativních výsledků pak diluční bujónová metoda (Jílek, Buchta et al. 2002).

6.3.5 Specifika testování antifungální aktivity

Na rozdíl od testování antibiotik, testování citlivosti vůči antimykotikům vzrostlo na významu až celosvětovým rozšířením AIDS, kdy došlo k častějšímu výskytu závažných mykotických infekcí a mimo jiné následkem časté terapie subterapeutickými dávkami antimykotik k zvýšenému výskytu rezistentních fungálních kmenů. Snaha o standardizaci jednotlivých používaných metod se naplno rozvinula až během 90. let minulého století. Výzkum se soustředil na význam jednotlivých faktorů a podmínek testování, např. Rambali et al. otestovali vliv deseti proměnných na citlivost kmenů rodu *Candida* a vláknitých hub vůči itraconazolu. Výsledky v nejvyšší míře ovlivňovaly čas inkubace, inkubační teplota, koncentrace glukózy a velikost inokula (Rambali, Fernandez et al. 2001). Tento výzkum zdůraznil, že snaha o jednotný standardizovaný postup musí být vždy kompromisem, jelikož každý kmen reagoval odlišně na jednotlivé kombinace proměnných (Johnson 2008). V současnosti

nejpoužívanější, spolehlivé a standardizované metody vychází z již známých metod testování antibakteriální citlivosti s několika specifickými úpravami.

6.3.5.1 Bujónové diluční metody

K testování kvasinek a vláknitých hub jsou momentálně k dispozici dvě standardní mezinárodní metodiky. První byla vytvořena CLSI (původně NCCLS, National Committee for Clinical Laboratory Standards Institute), ale původní metoda se ukázala jako nepraktická pro testování velkého počtu vzorků a časem byla přizpůsobena pro použití mikrotitračních destiček. Současně je v platnosti dokument M27-A3 pro kvasinky a jde o široce přijímaný standard. Druhá byla vypracovaná Podvýborem pro testování antifungální citlivosti EUCAST (European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing). Jde taky o mikrodiluční metodu a od M27 se liší velikostí inokula, médiem a hlavně způsobem vyhodnocení, které se u M27 děje vizuálně a u EUCAST spektrofotometricky po 24 hodinách pro vyšší objektivitu dosažených výsledků. Obě metody mají vysokou inter- a intralaboratorní reprodukovatelnost, ale analýzy ukázaly, že breakpointy CLSI nejsou vhodné pro posouzení výsledků získaných EUCAST metodou a naopak. Testování citlivosti vláknitých hub byla dlouho věnována menší pozornost, současně se jí zabývá dokument CLSI M38-A a standard EUCAST (Lass-Florl, Perkhofer et al. 2010). Velice komplikované je např. stanovení *in vitro* aktivity echinokandinů vůči *Aspergillus* spp., jelikož MIC často přesahuje bezpečně dosažitelné plazmatické koncentrace. Proto se využívá hodnota minimální efektivní koncentrace (MEC), definovaná jako nejnižší koncentrace léku, při které se mikroskopicky dají pozorovat krátké, tlusté, rozvětvené hyfy. MEC se jeví jako přesnější ukazatel citlivosti než MIC a je proto doporučován jako endpoint pro stanovení *in vitro* aktivity kaspofunginu vůči *Aspergillus* spp. (Arikan, Lozano-Chiu et al. 2001).

Tabulka 1: Rozdíly mezi podmínkami CLSI a EUCAST pro testování antifungální citlivosti kvasinek

Převzato z: LASS-FLORL, C., PERKHOFER, S., ET AL. (2010). In vitro susceptibility testing in fungi: a global perspective on a variety of methods. Mycoses 53(1): 1-11.

Vlastnost	CLSI M 27 – A3	EUCAST–E.DEF.7.1
Použitelnost	Kvasinky	Kvasinky
Inokulum	0,5-2,5 x 10 ³ CFU.ml ⁻¹	0,5-2,5 x 10 ⁵ CFU.ml ⁻¹
Standardizace inokula	0,5 x McFarland	0,5 x McFarland
Médium	RPMI 1640 0,2% glukosa	RPMI 2% glukosa
Pufř	MOPS	MOPS
Mikrotitrační destička	Jamky tvaru U	Jamky s plochým dnem
Provedení	Mikrodiluce	Mikrodiluce
Teplota	35 °C	35-37 °C
Doba inkubace	24-48 h	24 h
Vyhodnocení	Vizuální	Spektrofotometrické
Endpoint / inhibice	100% - amfotericin B, 50 % - azoly, echinokandiny	50% - 5-FC, azoly, echinokandiny 90% - amfotericin B

Tabulka 2: Rozdíly mezi podmínkami CLSI a EUCAST pro testování antifungální citlivosti plísní

Převzato z: LASS-FLORL, C., PERKHOFER, S., ET AL. (2010). In vitro susceptibility testing in fungi: a global perspective on a variety of methods. Mycoses 53(1): 1-11.

Vlastnost	CLSI M 38 – A2	EUCAST–E.DEF.9.1
Použitelnost	Vláknité houby	Vláknité houby
Inokulum	0,4-5 x 10 ⁴ CFU.ml ⁻¹	2-5 x 10 ⁵ CFU.ml ⁻¹
Standardizace inokula	Spektrofotometricky	Hemocytometricky
Médium	RPMI 1640	RPMI 2% glukosa
Pufř	MOPS	MOPS
Mikrotitrační destička	Jamky tvaru U	Jamky s plochým dnem
Provedení	Mikrodiluce	Mikrodiluce
Teplota	35 °C	35°C
Doba inkubace	48 h	48 h
Vyhodnocení	Vizuální	Vizuální
Endpoint	Žádný nárůst	Žádný nárůst

6.3.5.2 Diskový test

Jde o jednoduchou a ekonomickou metodu vhodnou pro testování antimykotik rozpustných ve vodě (např. flucytosin, flukonazol a vorikonazol). Standard CLSI M44-A upřesňuje použití pro *Candida* spp. Kritickým se u této metody jeví být složení růstového média, CLSI doporučuje Mueller-Hintonův agar obohacený 2% glukózou a 0.5 µg/ml methylenové modři. Disková difuzní metoda je vhodná také pro určení aktivity echinokandinů u kvasinek, jelikož se tvoří lehce vyhodnotitelné ostré zóny inhibice (Ramirez, Serrano et al. 2006). Tato metoda se při použití vhodných podmínek jeví být velice spolehlivou i u vláknitých hub (Espinel-Ingroff, Arthington-Skaggs et al. 2007; Messer, Diekema et al. 2007)

6.3.5.3 E-test

E-test od výrobce AB BIODISK, Solna, Švédsko je velice spolehlivou a dobře reprodukovatelnou metodou pro testování citlivostí kvasinek a vláknitých hub, která velice dobře koreluje se standardy CLSI (Szekely, Johnson et al. 1999). Velice výhodné je použití E-testu pro testování citlivosti k amfotericinu B, který produkuje výsledky při širší koncentrační škále a tudíž lze lépe rozlišit citlivé a rezistentní kmeny než při mikrodiluční metodě, kde je rozpětí MIC příliš úzké. Jednou z výhrad k E-testu je, že pokud se zjistí rezistence u neočekávaného kmene, měla by být potvrzena další metodou (Johnson 2008).

6.4 Přehled nejvýznamnějších antibakteriálních látek

Cílem antibakteriálních látek je omezit růst (bakteriostatická antibiotika), nebo úplně zničit (baktericidní antibiotika) původce infekce. Antibiotiky (ATB) nazýváme produkty metabolismu mikroorganismů, uměle syntetizované antibakteriální látky se označují správně jako chemoterapeutika. Ideální antibiotikum by mělo působit selektivně na metabolické dráhy bakterií bez ovlivnění lidských buněk, tento model je však většinou těžko dosažitelný. Pro průnik antibiotik do hostitelské buňky a tudíž pro dosažení účinku je klíčový fakt, zda se jedná o Gram-pozitivní nebo Gram-negativní organismus. U Gram-pozitivních buněk nese povrch negativní náboj, proto jím snadněji pronikají ionizované molekuly s kladným nábojem, např. streptomycin. Buněčná stěna Gram-negativních organismů je mnohem komplexnější, proto jsou mnohá antibiotika méně aktivní vůči G- než G+ bakteriím (Lüllmann, Mohr et al. 2004; Rang, Dale et al. 2007).

6.4.1 β -laktámová antibiotika

Působí na hlavní strukturální složku buněčných stěn většiny bakterií, peptidoglykan. V procesu syntézy peptidoglykanu hrají významnou roli penicilin-binding proteins (PBPs), patřící mezi serinové proteázy. β -laktámová antibiotika se specificky vážou na PBPs ve stěně bakteriální buňky, což vede k destrukci buněčné stěny, aktivaci autolytických enzymů a smrti buňky.

Peniciliny

Základní strukturou penicilinových ATB je kyselina 6-aminopenicilanová. Téměř neovlivňují metabolismus nemnožících se a nerostoucích bakterií, na proliferující bakterie však působí baktericidně. G- bakterie jsou z důvodu přítomnosti fosfolipidové membrány zabraňující difuzi v buněčné stěně velmi odolné vůči penicilinům. Jedná se o vysoce efektivní antibiotika s velmi nízkou toxicitou, proto jsou lékem volby u mnoha infekcí (Lüllmann, Mohr et al. 2004).

Cefalosporiny

Základem je kyselina 7-aminocefalosporanová, jsou proto odolnější vůči β -laktamázám. Mechanismus účinku je stejný jako u penicilinů, mají však širší antibakteriální spektrum (zejména vylepšenou aktivitu vůči G- bakteriím oproti

penicilinům), lepší farmakokinetické parametry (např. poločas) a jsou rezistentní vůči mnohým β -laktamázám (Murray, Rosenthal et al. 2009).

Karbapenemy

Strukturou jsou podobné penicilinům, pouze atom síry v thiazolovém kruhu je nahrazen atomem uhlíku. Jsou to velice důležitá širokospektrá baktericidní antibiotika.

Monobaktamy

Z jádra molekuly penicilinů a cefalosporinů obsahují již pouze β -laktamový kruh. Spektrum účinku je úzké, působí pouze na aerobní G- bakterie, anaerobní a G+ bakterie jsou rezistentní. Výhodou úzkého spektra účinku je, že tolik neovlivňují běžnou mikroflóru pacienta.

Tabulka 3: Antibakteriální spektrum β -laktamových antibiotik

Převzato z: MURRAY, P. R., ROSENTHAL, K. S., et al. Medical Microbiology. 6th edition, Philadelphia, Mosby Elsevier.(2009) 978-0-323-05470-6.

Antibiotikum	Spektrum účinku
Přirozené peniciliny: benzylpenicilin (penicilin G) fenoxymethylpenicilin (penicilin V)	Aktivní vůči všem β -hemolytickým streptokokům a většině dalších druhů; limitovaná účinnost vůči stafylokokům; aktivní vůči meningokokům a většině G+ anaerobů; slabá aktivita vůči aerobním a anaerobním G- tyčkám
Penicilináza-rezistentní peniciliny: methicilin, oxacilin, kloxacilin, dikloxacilin	Podobné penicilinu G a V, kromě rozšířené aktivity vůči stafylokokům
Širokospektré peniciliny: Aminopeniciliny (ampicilin, amoxicilin), Karboxypeniciliny (karbenicilin, tikarcilin) Ureidopeniciliny (piperacilin)	Aktivita vůči G+ kokům ekvivalentní přirozeným penicilinům, aktivní vůči některým G- tyčkám (piperacilin je nejaktivnější)

<p>Peniciliny s inhibítozem β-laktamázy: ampicilin-sulbaktam, amoxicilin-klavulanát, tikarcilin-klavulanát, piperacilin-tazobaktam</p>	<p>Aktivita podobná přirozeným penicilinům plus vylepšená aktivita vůči stafylokokům produkujícím β-laktamázu a některým G- tyčkám; ne všechny β-laktamázy jsou inhibovány; nejaktivnější je piperacilin-tazobaktam</p>
<p>Cefalosporiny s úzkým spektrem (1. generace): cefalexin, cefalotin, cefazolin, cefapirin</p>	<p>Aktivita vůči G+ bakteriím je ekvivalentní oxacilinu; aktivní vůči některým G-bakteriím (např. <i>Escherichia coli</i>, <i>Klebsiella</i>, <i>Proteus mirabilis</i>)</p>
<p>Cefalosporiny s rozšířeným spektrem (2. generace): cefaklor, cefuroxim, cefoxitin</p>	<p>Aktivita vůči G+ bakteriím je ekvivalentní oxacilinu; vylepšená aktivita vůči G-bakteriím včetně rodů <i>Enterobacter</i>, <i>Citrobacter</i> a <i>Proteus</i>; cefoxitin je navíc odolnější vůči β-laktamázám</p>
<p>Cefalosporiny se širokým spektrem (3. generace): cefixim, cefotaxim, ceftriaxon, ceftazidim</p>	<p>Aktivita vůči G+ bakteriím je ekvivalentní oxacilinu; vylepšená aktivita vůči G-bakteriím včetně Enterobacteriaceae a <i>Pseudomonas aeruginosa</i></p>
<p>Cefalosporiny s nejširším spektrem (4. generace): cefepim, ceftiprom</p>	<p>Aktivita vůči G+ bakteriím je ekvivalentní oxacilinu; okrajově vylepšená aktivita vůči G-bakteriím oproti 3. generaci; zvýšená odolnost vůči β-laktamázám</p>
<p>Karbapenemy: imipenem, meropenem</p>	<p>Širokospektrá ATB aktivní vůči většině aerobních a anaerobních G+ a G- bakterií s výjimkou oxacilin-rezistentních stafylokoků, <i>Enterococcus faecium</i>, a některých G- tyček (<i>Burkholderia</i> a <i>Pseudomonas</i>)</p>
<p>Monobaktamy: aztreonam</p>	<p>Aktivní vůči vybraným aerobním G- tyčkám (<i>Pseudomonas</i>, <i>Neisseria meningitidis</i>, <i>Haemophilus influenzae</i>), ale inaktivní vůči anaerobům nebo G+ kokům</p>

6.4.2 Antibiotika inhibující bakteriální proteosyntézu

Makrolidy

Základní struktura je tvořena vícečetným laktonovým kruhem, na němž jsou navázány dva deoxy-cukry zodpovídající za inhibici proteosyntézy (Lüllmann, Mohr et al. 2004). Vážou se na 50S podjednotku ribozomu a zabraňují elongaci vznikajícího polypeptidu. Na stejnou podjednotku se váže i chloramfenikol a klindamycin, proto mohou tyto látky spolu kompetovat, pokud jsou podávány společně (Rang, Dale et al. 2007). Jsou to bezpečná, širokospektrá bakteriostatická antibiotika, která představují efektivní alternativu pro pacienty alergické na β -laktámy. Rezistence je výsledkem alterace vazebného místa na bakteriálním ribozomu a je kódována plazmidy. Makrolidy působí hlavně na G⁺ organizmy, spektrum je srovnatelné s penicilinem G. Jsou účinné také při infekcích respiračního traktu vyvolaných intracelulárními mikroby (*Legionella pneumoniae*, *Mycoplasma pneumoniae* a *Chlamydia psittaci*), považují se proto za léky volby při pneumoniích nezpůsobených nozokomiální infekcí. Klaritromycin a azitromycin jsou účinné i proti infekcím vyvolaným *Mycobacterium avium* (Lüllmann, Mohr et al. 2004).

Linkosamidy

Hlavní představitel této skupiny klindamycin podobně jako chloramfenikol a makrolidy blokuje prodlužování polypeptidového řetězce vazbou na 50S podjednotku ribozomu. Je aktivní vůči stafylokokům a anaerobním G⁻ tyčkám, ale nepůsobí na aerobní G⁻ bakterie. Má chemickou strukturu, která se u jiných antibiotik nevyskytuje, rezistence je přesto zkřížená s makrolidy (Murray, Rosenthal et al. 2009).

Tetracykliny

Strukturálně jde o deriváty oktahydrotetracenu, působí bakteriostaticky a mají široké spektrum účinku. Vážou se na 30S podjednotku ribozomu a blokují vazbu tRNA na komplex 30S ribozom-mRNA. Lehce vytvářejí antibioticky neúčinné komplexy s dvojmocnými kationty. Proto se také kumulují ve tkáních s vysokým obsahem vápníku, např. v kostech. Působí na všechny bakterie citlivé na peniciliny a navíc i na široké spektrum G⁻ bakterií. Rezistence je však poměrně častá a je kompletní paralelní, tzn. rezistence vůči jedné látce znamená rezistenci vůči celé skupině (Lüllmann, Mohr et al. 2004).

Aminoglykosidy

Mají baktericidní efekt a většinou jsou tvořeny glykosidicky spojenými trisacharidy. Mechanismus účinku je daný chybou čtení genetické informace při proteosyntéze, při nízkých koncentracích se to však projeví pouze na rostoucích bakteriích. U vyšších koncentrací nastupuje baktericidní efekt, vyvolaný syntézou falešných bílkovin, které se zabudovávají např. do plazmatické membrány a způsobují ireverzibilní funkční poruchy (Lüllmann, Mohr et al. 2004). Penetrace přes buněčnou membránu bakterie je závislá na oxygen-dependentním aktivním transportu, proto působí na anaerobní organizmy jen minimálně (Rang, Dale et al. 2007). Vankomycin má také příliš velkou molekulu, aby pronikl přes póry vnější fosfolipidové membrány G- bakterií, proto je vůči nim neaktivní (Murray, Rosenthal et al. 2009). Aminoglykosidy jsou určeny pouze k systémovému nebo lokálnímu použití, díky svojí vysoce polární polykationické struktuře totiž nejsou absorbovány z GIT. Mají relativně vyšší nežádoucí účinky, nejzávažnější je ototoxicita a neurotoxicita.

Chloramfenikol

Má široké antibakteriální spektrum podobné tetracyklinům. Působí bakteriostaticky mechanismem vazby na 50S podjednotku ribozomu a blokáci elongace polypeptidu. Kvůli inhibici proteosyntézy v buňkách lidské kostní dřeně má závažné nežádoucí účinky na krvetvorbu (Murray, Rosenthal et al. 2009). Z toho důvodu je použití velmi omezené, pouze topicky nebo jako rezervní léčivo při septických infekcích salmonelami, meningitídách nebo při sepsi vyvolané G- bakteriemi (Lüllmann, Mohr et al. 2004).

Oxazolidiny

Jde o novou skupinu úzkospektrých antibiotik, v současnosti se používá linezolid. Působí unikátním mechanismem po vazbě na 50S podjednotce ribozomu, kde blokuje iniciaci proteosyntézy, proto nevzniká zkřížená rezistence s dalšími látkami inhibujícími proteosyntézu (Murray, Rosenthal et al. 2009). Linezolid je obzvláště účinný vůči G+ kokům, je to tedy rezervní antibiotikum pro léčbu infekcí způsobených multirezistentními stafylokoky, enterokoky a pneumokoky (Lüllmann, Mohr et al. 2004).

Streptograminy

Strukturálně se jedná o cyklické peptidy. Podávají se v kombinaci látek skupiny A a B, které působí synergicky na inhibici proteosyntézy. Současně se používá chinupristin-dalfopristin. Dalfopristin se váže na 50S podjednotku ribozomu a způsobí změnu

v konformaci, která usnadní vazbu chinupristinu. Dalfopristin brání elongaci polypeptidového řetězce a chinupristin způsobuje předčasné uvolnění řetězce z ribozomu. Tato kombinace je aktivní vůči stafylokokům, streptokokům a *Enterococcus faecium*. Tato antibiotika jsou rezervována pro léčbu infekcí vankomycin-rezistentním *E. faecium* (Murray, Rosenthal et al. 2009).

Tabulka 4: Antibakteriální spektrum inhibitorů proteosyntézy

Převzato z: MURRAY, P. R., ROSENTHAL, K. S., et al. *Medical Microbiology. 6th edition, Philadelphia, Mosby Elsevier. (2009) 978-0-323-05470-6.*

Antibiotikum	Spektrum účinku
Makrolidy: erytromycin, azitromycin, klaritromycin	Širokospektrá ATB proti G+ a některým G-bakteriím, <i>Neisseria</i> , <i>Legionella</i> , <i>Mycoplasma</i> , <i>Chlamydia</i> , <i>Treponema</i> , <i>Rickettsia</i> ; klaritromycin a azitromycin jsou aktivní vůči některým mykobakteriím
Linkosamidy: klindamycin	Široké spektrum vůči G+ kokům a anaerobům
Tetracykliny: tetracyklin, doxyciklin, minocyclin	Širokospektrá ATB proti G+ a některým G-bakteriím (<i>Neisseria</i> , některé Enterobacteriaceae), mykoplazmatům, chlamydiím a rickettsiím
Aminoglykosidy: streptomycin, kanamycin, gentamicin, tobramycin, amikacin	Primárně používané na léčbu infekcí G- tyčkami; <u>kanamycin</u> má omezenou aktivitu; <u>tobramycin</u> má o něco vyšší aktivitu vůči <i>Pseudomonas</i> než gentamicin; <u>amikacin</u> má nejvyšší aktivitu; <u>streptomycin</u> a <u>gentamicin</u> je v kombinaci s ATB působícím na bakteriální stěnu používaný k léčbě enterokokových infekcí; <u>streptomycin</u> je aktivní vůči mykobakteriím a některým G- tyčkám

Oxazolidiny: linezolid	Aktivní vůči stafylokokům (včetně MRSA a VISA kmenů), <i>Enterococcus</i> , <i>Streptococcus</i> , G+ tyčkářům, <i>Clostridium</i> a anaerobním kokům; inaktivní vůči G- bakteriím
Streptograminy: chinupristin-dalfopristin	Primárně aktivní vůči G+ bakteriím, dobrá aktivita vůči streptokokům a stafylokokům citlivým i rezistentním k methicilinu; <i>Enterococcus faecium</i> citlivý i rezistentní k vankomycinu (neaktivní vůči <i>E. faecalis</i>); <i>Haemophilus</i> , <i>Moraxella</i> a anaeroby (včetně <i>Bacteroides fragilis</i>); inaktivní vůči Enterobacteriaceae nebo jiným G- tyčkářům

6.4.3 Antibiotika inhibující syntézu kyseliny tetrahydrolistové

Sulfonamidy

Bakteriostatický efekt je daný strukturální podobností sulfonamidů s kyselinou *p*-aminobenzoovou, díky které obsazují její vazebná místa a brzdí syntézu kyseliny dihydrolistové, nutné pro množení bakterií. Nedostatkem kyseliny tetrahydrolistové, která vzniká redukcí kyseliny dihydrolistové, se totiž snižuje syntéza purinů a tymidinů nutných pro syntézu DNA a RNA. Lidské ani zvířecí buňky kyselinu listovou nesyntetizují, proto nedochází k jejich poškození. Nejvýznamnějším dodnes používaným zástupcem této skupiny látek je sulfametoxazol v kombinaci s inhibitorem bakteriální reduktázy kyseliny dihydrolistové trimetoprimem (= kotrimoxazol) (Lüllmann, Mohr et al. 2004).

Sulfonamidy mají široké spektrum účinku zahrnující G+ a G- bakterie, např. *Nocardia*, *Chlamydia* a některé protozoa. Kotrimoxazol je lékem volby u akutních a chronických močových infekcí, zároveň se používá při infekcích způsobených *Pneumocystis carinii* (Murray, Rosenthal et al. 2009).

6.4.4 Antibiotika inhibující syntézu nukleových kyselin

Chinolony

Jsou to široce používaná syntetická chemoterapeutika, působící inhibicí bakteriální DNA topoizomerázy typu II (gyrázy) nebo typu IV, které jsou nezbytné pro replikaci, rekombinaci a opravu DNA. U G⁺ bakterií dochází hlavně k inhibici topoizomerázy II, kdežto u G⁻ bakterií k inhibici topoizomerázy IV. Chinolony vytváří s vícemocnými kovy komplexy.

Tabulka 5: Antibakteriální spektrum chinolonů

Převzato z: MURRAY, P. R., ROSENTHAL, K. S., et al. Medical Microbiology. 6th edition, Philadelphia, Mosby Elsevier. (2009) 978-0-323-05470-6.

Antibiotikum	Spektrum účinku
Úzkospektré chinolony (kys. nalidixová)	Aktivní vůči některým G ⁻ tyčkám; bez využitelné G ⁺ aktivity
Širokospektré chinolony (ciprofloxacin, levofloxacin, ofloxacin)	Široké spektrum vůči G ⁺ i G ⁻ bakteriím
Chinolony s rozšířeným spektrem (moxifloxacin, trovafloxacin)	Širokospektrá ATB se zesílenou aktivitou vůči G ⁺ bakteriím (zejména streptokokům a enterokokům); aktivita vůči G ⁻ tyčkám je srovnatelná s ciprofloxacinem

Metronidazol

Baktericidní účinek na anaerobní bakterie je daný kumulací v citlivých bakteriích, kde dochází k redukci nitroskupiny na hydroxylaminovou skupinu. Tato skupina pak vytváří komplex s DNA anebo přerušuje její vlákna (Lüllmann, Mohr et al. 2004).

Metronidazol je efektivní v léčbě amebiázy, giardiázy, vaginitidy způsobené *Trichomonas vaginalis* a závažných anaerobních bakteriálních infekcí (včetně infekcí způsobených *Bacteroides fragilis*). Vůči aerobům nebo fakultativním aerobům nemá významný efekt (Murray, Rosenthal et al. 2009).

Rifampicin

Jde o makrocyclické antibiotikum působící vazbou na DNA-dependentní RNA-polymerázu prokaryotických buněk, kterou následně inhibuje. Dochází tak k inhibici syntézy RNA, na proliferující bakterie působí tudíž baktericidně. Spektrum zahrnuje *Mycobacterium tuberculosis* a G+ koky, včetně stafylokoků a streptokoků. Kvůli rychle se rozvíjející rezistenci se většinou používá v kombinaci, oproti bakteriím se u *Mycobacterium tuberculosis* rozvíjí rezistence pomaleji až v průběhu mnoha týdnů i při monoterapii (Lüllmann, Mohr et al. 2004; Murray, Rosenthal et al. 2009).

6.5 Přehled nejvýznamnějších antimykotik

Pro terapii relativně benigních postižení kůže a sliznic je k dispozici široké spektrum topických antimykotických látek, které jsou velmi dobře snášeny. V posledních letech došlo i k výraznému rozvoji v oblasti mnohem rizikovější systémové terapie, která je nezbytná při mykotické sepsi nebo zasažení vnitřních orgánů. K zlepšení terapeutických výsledků došlo hlavně vývojem nových, méně toxických látek a vývojem nových formulací látek stávajících, které mají srovnatelný účinek při mnohem nižší toxicitě (např. lipidové formulace amfotericinu B).

Tabulka 6: Nejpoužívanější topické a systémové antifungální látky

Převzato z: MURRAY, P. R., ROSENTHAL, K. S., et al. Medical Microbiology. 6th edition, Philadelphia, Mosby Elsevier. (2009) 978-0-323-05470-6.

Antifungální látka	Způsob podání	Mechanismus účinku	Poznámky
<i>Allylaminy</i>			
Naftifin Terbinafin	Topicky p.o., topicky	Inhibice skvalen-epoxidázy	Terbinafin má vlemi široké spektrum a působí synergicky s dalšími antimykotiky

Antimetaboly			
Flucytosin	p.o.	Inhibice syntézy DNA a RNA	Používá se v kombinaci s amfotericinem B a flukonazolem; problémem je toxicita a sekundární rezistence
Imidazoly			
Ketokonazol, klotrimazol, ekonazol, mikonazol, oxikonazol, aj.	p.o., topicky	Inhibice lanosterol-14 α -demethylázy, která katalyzuje přeměnu lanosterolu na ergosterol	Ketokonazol má mírně rozšířené spektrum a problémy s toxicitou
Triazoly			
Flukonazol	p.o., i.v.	Stejný jako imidazoly, ale více specifická vazba na cílové místo	Limitované spektrum (kvasinky); dobrá penetrace do CNS; dobrá <i>in vivo</i> aktivita; primární rezistence u <i>Candida krusei</i> a sekundární rezistence u <i>Candida glabrata</i>
Itrakonazol	p.o., i.v.	Stejný jako imidazoly, ale více specifická vazba na cílové místo	Široké spektrum aktivity; kolísavá absorpce (potřebné kyselé pH žaludku); problémem jsou lékové interakce

Vorikonazol	p.o., i.v.	Stejný jako imidazoly, ale více specifická vazba na cílové místo	Široké spektrum včetně kvasinek a plísňí; aktivní vůči <i>Candida krusei</i> ; četné lékové interakce
Posakonazol	p.o.	Stejný jako imidazoly, ale více specifická vazba na cílové místo	Široké spektrum včetně Zygomycetes
Ravukonazol	p.o., i.v.	Stejný jako imidazoly, ale více specifická vazba na cílové místo	Široké spektrum včetně kvasinek a plísňí
<i>Polyeny</i>			
Amfotericin B	i.v., topicky	Vazba na ergosterol, přímé oxidativní poškození membrány	Zavedená látka; široké spektrum; vyšší toxicita
Lipidové formulace (amfotericin B v lipidovém komplexu nebo koloidní disperzi, lipozomální amfotericin B)	i.v.	Stejný jako amfotericin B	Široké spektrum; nižší toxicita, vyšší cena
Nystatin	Orální suspenze, topicky	Stejný jako amfotericin B	Vyvinuta je i.v. lipidová formulace s vyšší aktivitou (Arikan and Rex 2001)

<i>Echinokandiny</i>			
Kaspofofungin, anidulafungin, mikafungin	i.v.	Inhibice syntézy glukanů fungální buněčné stěny	Kaspofofungin je schválený pro léčbu invazivní kandidózy a aspergilózy; anidulafungin a mikafungin jsou schváleny pro léčbu invazivní kandidózy; vůči rodu <i>Candida</i> mají baktericidní aktivitu
Různé			
Amorolfin	Topicky		
Ciklopirox	Topicky		
Griseofulvin	p.o.		
Undecylenát	Topicky		

7 Experimentální část

7.1 Materiál

7.1.1 Pomůcky a přístroje

- automatické pipety, sterilní mikrotitrační destičky s víčky, 12ti jamkové rezervoáry na média, Bürkerovy komůrky, očkovací kličky, sterilní pipetovací špičky, zkumavky
- laminární box, vortex, denzitometr, termostat, mikroskop

7.1.2 Chemikálie

- 3-(N-morfolino)propansulfonová kyselina (MOPS), dimethylsulfoxid (DMSO), glukóza, 10M NaOH, sterilní voda

7.1.3 Růstová média

- RPMI 1640 (úplné složení viz Tabulka 7)
- Sabouraudův agar

Složení:	Pepton	10 g/l
	Dextróza	40 g/l
	Agar	15 g/l

Navážka je 65,0g přípravku na 1000 ml destilované vody – sterilizace probíhá v autoklávu při 121°C po dobu 15 minut.

- Mueller-Hintonův bujón (MH bujón)

Složení:	Hovězí výtažek	2 g/l
	Pepton	17,5 g/l
	Škrob	1,5 g/l

Tabulka 7: Složení média RPMI-1640 SEVAC 5x koncentrovaného (obsah v gramech na 1000 ml média)

Dusičnan vápenatý tetrahydrát	0,5	L- prolin	0,1
Chlorid draselný	2,0	L- serin	0,15
Hydrogenfosforečnan sodný .2H ₂ O	5,015	L- threonin	0,1
Síran hořečnatý heptahydrát	0,5	L- tryptofan	0,025
Chlorid sodný	30,0	L- tyrosin	0,1
L- arginin hydrochlorid	1,21	L- valin	0,1
L- asparagin monohydrát	0,27	Biotin	0,001
L- cystin	0,25	Cyanocobalamin	0,0000 25
L- glutamin	1,5	Cholin chlorid	0,015
Glutathion	0,005	I- inositol	0,175
Glycin	0,05	Kyselina listová	0,005
L- histidin HCl H ₂ O	0,102	Kyselina <i>p</i> -aminobenzová	0,005
L- hydroxyprolin	0,1	Nikotinamid	0,005
L- isoleucin	0,25	D- Ca- Pantothenát	0,0012 5
Kyselina L- asparagová	0,1	Pyridoxin hydrochlorid	0,005
Kyselina L- glutamová	0,1	Riboflavin	0,001
L- leucin	0,25	Thiamid hydrochlorid	0,005
L-lysin hydrochlorid	0,2	Glukóza	10,0
L- methionin	0,075	Fenolčerveň	0,05
L- phenylalanin	0,075		

7.2 Testované kmeny bakterií

- *Staphylococcus aureus* CCM 4516/08 (SA)
- *Staphylococcus aureus* methicilin rezistentní H 5996/08 (MRSA)
- *Staphylococcus epidermidis* H 6966/08 (SE)
- *Enterococcus sp.* J 14365/08 (EF)
- *Escherichia coli* CCM 4517 (EC)
- *Klebsiella pneumoniae* D 11750/08 (KP)
- *Klebsiella pneumoniae* ESBL pozitivní J 14368/08 (KP-E)
- *Pseudomonas aeruginosa* CCM 1961 (PA)

7.3 Testované kmeny kvasinek a hub

- *Candida albicans* ATCC 44859 (CA1)
- *Candida tropicalis* 156 (CT1)
- *Candida krusei* E28 (CK2)
- *Candida glabrata* 20/I (CG1)
- *Trichosporon asahii* 1188 (TA1)
- *Aspergillus fumigatus* 231 (AF)
- *Absidia corymbifera* 272 (AC)
- *Trichophyton mentagrophytes* 445 (TM)

7.4 Testované látky

Použité vzorky byly syntetizovány na Katedře anorganické a organické chemie a Katedře farmaceutické chemie a kontroly léčiv Farmaceutické fakulty Univerzity Karlovy. Testováno bylo celkem 63 látek, které jsou na základě společných strukturních znaků rozděleny do 7 hlavních skupin.

1. Deriváty 2-(5-karboxypentyl)isochinolinium-bromidu a 1-(5-karboxypentyl)pyridinium-bromidu
2. Deriváty 6-[(3-methylfenyl)amino]pyrazin-2-karboxylové kyseliny
3. Deriváty 2-hydroxythiobenzamidu, deriváty 2H-1,3-benzoxazin-2,4(3H)-dithionu a další příbuzné struktury
4. Deriváty 2-(2-fenylvinyl)chinolinu
5. 8-hydroxychinolin-2-karbaldehyd-N-fenylthiosemikarbazon a deriváty 7-hydroxychinolin-8-karbaldehyd-thiosemikarbazonu
6. 2,2'-dithiodianilin a deriváty 1,3-benzothiazol-2-aminu
7. Deriváty 4-methyl-3-fenyl-4,5-dihydroisoxazolu

7.5 Postup pro testování antibakteriálního působení

7.5.1 Příprava suspenzí testovaných kmenů

Do 8 sterilních zkumavek popsaných zkratkami testovaných kmenů napipetujeme po 3 ml sterilní vody. Z kultury bakterií narostlých na živném agaru odebereme malou část kolonie a resuspendujeme ji do sterilní vody ve zkumavce. Promícháme na vortexu a několikrát změříme hustotu na denzitometru. Vzniklá suspenze by měla mít hustotu 0,5 stupňů McFarlanda. Takto připravená inokula bakterií vydrží cca 14 dní při 2-8 °C.

7.5.2 Příprava ředící řady testované látky

1. Navážku testované látky rozpustíme v takovém objemu DMSO, aby první testovaná koncentrace byla $500 \mu\text{mol.l}^{-1}$ a zároveň koncentrace DMSO v jamce nepřesáhla 1%, proto při přípravě pracovních roztoků přidáváme k růstovému médiu (1, 98 ml) jen 1% látky rozpuštěné v DMSO (20 μl). Z tohoto důvodu musíme připravit látku 100x koncentrovanější, aby první testovaná koncentrace byla $500 \mu\text{mol.l}^{-1}$. Promícháme na vortexu.

Vzorec pro výpočet objemu DMSO:

$$V_{\text{DMSO}} = \frac{m \cdot 10^6 \text{ (převod na } \mu\text{l)}}{c \cdot M \cdot 100 \text{ (zakoncentrování)}} = x \mu\text{l DMSO}$$

m...navážka (g)

c...první testovaná koncentrace = $500 \mu\text{mol.l}^{-1}$

M...molární hmotnost

Pozn.: Údaje o navážce a molekulové hmotnosti byly dodány spolu s testovanou látkou.

2. Pokud se látka rozpustí nebo vytvoří homogenní suspenzi, přistoupíme k dalšímu kroku. Jestliže se látka vysráží nebo nerozpustí, přidáme druhý, případně třetí ekvivalent rozpouštědla. Každým přidáním ekvivalentu rozpouštědla se posouvá první testovaná koncentrace o jedno ředění dozadu (z $500 \mu\text{mol.l}^{-1}$ na 250

$\mu\text{mol.l}^{-1}$, atd.). Pokud nedojde k rozpuštění ani po přidání třetího ekvivalentu, látku z testování vyřadíme.

3. Do sterilní zkumavky (označenou 1) napipetujeme 1,98 ml MH bujónu a přidáme 20 μl rozpuštěné testované látky. Promícháme na vortexu.
4. Zkontrolujeme, jestli se látka v MH bujónu nevysrážela. Pokud ne, přistoupíme k dalšímu bodu. Pokud ano, přidáme druhý, případně třetí ekvivalent MH bujónu. Každým přidáním ekvivalentu MH bujónu se posouvá první testovaná koncentrace o jedno ředění dozadu (z 500 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ na 250 $\mu\text{mol.l}^{-1}$, atd.).
5. Tímto získáme pracovní roztok 1. testované koncentrace, který sterilně přemístíme do 1. jamky 12ti jamkového rezervoáru.
6. Do 10 sterilních zkumavek (označených 2-11) si připravíme dvojkovou ředící řadu testované látky v DMSO: do každé zkumavky napipetujeme 0,5 ml DMSO. Do 1. zkumavky (označené 2) napipetujeme 0,5 ml testované látky rozpuštěné v DMSO (viz vod 2.), promícháme a přeneseme 0,5 ml do zkumavky 3, promícháme a přeneseme 0,5 ml do zkumavky 4 atd., až po zkumavku 11.
7. Do jamek 2 – 12 12ti jamkového rezervoáru napipetujeme 1,98 ml MH bujónu a přidáme 20 μl naředěné testované látky (tzn. ze zkumavky 2 do jamky 2, ze zkumavky 3 do jamky 3, atd.). Do poslední 12. jamky přidáme 20 μl samotného DMSO (kontrola). V každé jamce rezervoáru získáme 2 ml pracovního roztoku s příslušnou koncentrací testované látky + kontrolu.

7.5.3 Příprava mikrotitrační destičky

Pomocí 12ti kanálové pipety napipetujeme 200 μl příslušného zásobního roztoku do všech řádků mikrotitrační destičky. Do každého řádku pak napipetujeme 10 μl připravené suspenze jednotlivých bakteriálních kmenů. Výsledkem je, že v každé z osmi řad o 12 jamkách je suspenze jednoho bakteriálního kmene a klesající koncentrace testované látky.

7.5.4 Inkubace

Mikrotitrační destičky přiklopené víčkem inkubujeme v termostatu při teplotě 37 °C po dobu 48 h (odečet probíhá po 24 a 48 hodinách).

7.5.5 Vyhodnocení

Po 24 a 48 hodinách inkubace hodnotíme nárůst v jamkách. Koncentrace látky inhibující růst bakterie odpovídá jamce, ve které dojde k 95%-nímu potlačení růstu bakterie (IC₉₅). Růst se projevuje okem pozorovatelným zákalem v jamce; dojde-li k inhibici růstu, je jamka čirá.

7.6 Postup pro testování antimykotického působení

K testování byla použita metodika vycházející z doporučených postupů CLSI pro *in vitro* testování citlivosti na antimykotika.

7.6.1 Příprava suspenzí testovaných kmenů

1. Do každé z 8 sterilních zkumavek napipetujeme 3 ml sterilní vody. Z kultur narostlých na Sabouraudově glukózovém agarů odebereme část kolonie a pomocí vortexu resuspendujeme v příslušné zkumavce, označené typem kmenu.
2. Z každé zkumavky odebereme 12 μ l pro stanovení hustoty suspenze Bürkerovou komůrkou. Optimální hustota je v rozmezí 1,0-2,5 x 10⁵ CFU/ml.
3. Při dodržení postupu je možné inokula použít podobu 14 dní, jsou-li uchovávána při teplotě 2-8 °C.

7.6.2 Příprava růstového média

Ke 4 dílům MOPS s 1% glukózy přidáme 1 díl RPMI 1640, konečný objem a přesná množství se odvíjí od očekávané spotřeby. Hodnota pH se upraví na 6,5 – 7,9 přidáním několika kapek NaOH, přičemž roztok změní barvu ze žluté na červeno-oranžovou.

7.6.3 Příprava ředící řady testované látky

Postup se shoduje s výše popsaným postupem pro testování antibakteriálního působení, pouze jako růstové médium se místo MH bujónu použije RPMI 1640.

7.6.4 Příprava mikrotitrační destičky

Pomocí 12ti kanálové pipety přeneseme z rezervoáru 200 μ l zásobního roztoku do 7 řádků na první destičce a do tolika řádků na druhé destičce, kolik máme testovaných látek. Poté do příslušných řádků první destičky napipetujeme 10 μ l připravených suspenzí jednotlivých kmenů. Do všech jamek druhé destičky pipetujeme pouze kmen *Trichophyton mentagrophytes*.

7.6.5 Inkubace

Destičky přiklopené víčkem inkubujeme v termostatu při 35 °C; první destičku 48 hodin (MIC se odečítá po 24 a 48 hodinách), druhou destičku s TM 120 hodin (odečet MIC po 72 a 120 hodinách).

7.6.6 Vyhodnocení

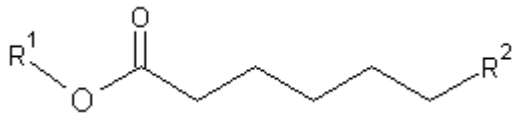
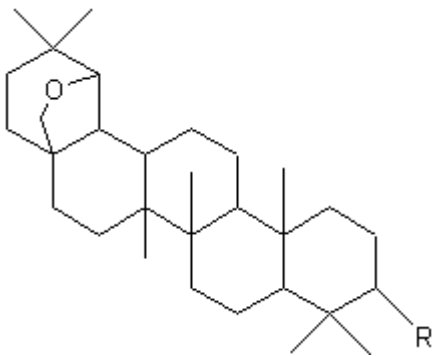
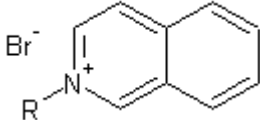
Po uplynutí předepsané doby porovnáme nárůst kolonií v jamkách s kontrolou. Minimální koncentrace inhibující růst kvasinek odpovídala alespoň 80%nímu potlačení růstu kolonií oproti kontrole (MIC = IC₈₀). Pro vláknité houby byla hodnota MIC stanovena jako 50% potlačení růstu oproti kontrole (MIC = IC₅₀).

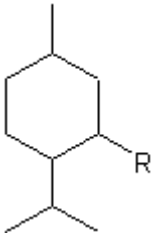
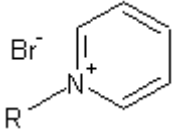
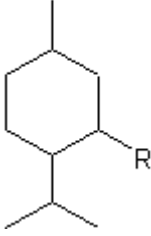
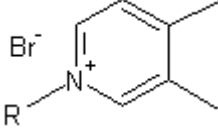
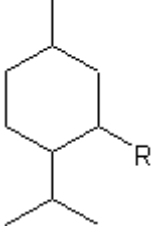
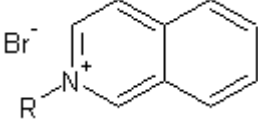
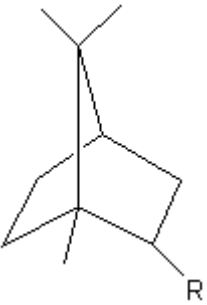
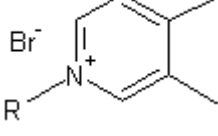
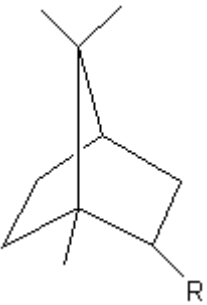
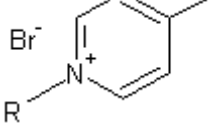
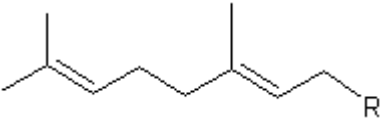
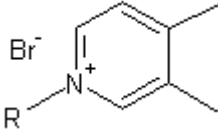
7.7 Výsledky

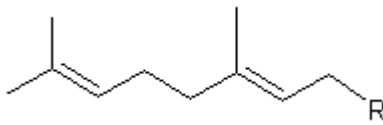
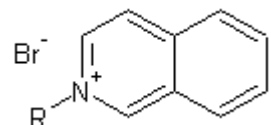
Zkoušené látky byly naředěny do koncentrací 500; 250; 125; 62,5; 31,25; 15,625; 7,813; 3,906; 1,953; 0,977; 0,488 $\mu\text{mol.l}^{-1}$. Odečtené hodnoty MIC jsou vyznačeny tučně.

7.7.1 Deriváty 2-(5-karboxypentyl)isochinolinium-bromidu a 1-(5-karboxypentyl)pyridinium-bromidu

Tabulka 8: Strukturní vzorce derivátů 2-(5-karboxypentyl)isochinolinium-bromidu a 1-(5-karboxypentyl)pyridinium-bromidu

			
Kód látky	R ¹	R ²	Mr
T6293			748,93

T6278			412,41
T6295			440,46
T6294			462,47
T6296			438,45
T6292			424,42
T6297			438,45

T6299			460,46
-------	---	--	--------

Tabulka 9: Výsledky testování antibakteriální aktivity derivátů 2-(5-karboxypentyl)isochinolinium-bromidu a 1-(5-karboxypentyl)pyridinium-bromidu

KMEN		TESTOVANÁ LÁTKA (kód) –MIC/IC ₈₀ (μmol.l ⁻¹)							
		T6293	T6278	T6295	T6294	T6296	T6292	T6297	T6299
SA	24h	3,9	31,25	7,81	15,62	15,62	31,25	7,81	>250
	48h	3,9	31,25	7,81	15,62	15,62	31,25	7,81	>250
MRSA	24h	3,9	62,5	7,81	31,25	31,25	31,25	62,5	>250
	48h	3,9	500	7,81	31,25	31,25	31,25	62,5	>250
SE	24h	3,9	31,25	3,9	15,62	7,81	31,25	31,25	>250
	48h	3,9	62,5	7,81	15,62	31,25	31,25	31,25	>250
EF	24h	7,81	125	15,62	62,5	62,5	62,5	500	>250
	48h	31,25	125	31,25	62,5	62,5	62,5	500	>250
EC	24h	>500	>500	31,25	500	125	500	>500	>250
	48h	>500	>500	31,25	500	125	500	>500	>250
KP	24h	>500	>500	62,5	500	500	>500	>500	>250
	48h	>500	>500	62,5	500	500	>500	>500	>250
KP-E	24h	>500	>500	125	500	500	>500	>500	>250
	48h	>500	>500	125	500	500	>500	>500	>250
PA	24h	>500	125	31,25	500	125	>500	>500	>250
	48h	>500	>500	31,25	500	125	>500	>500	>250

Látka T6293 vykázala nejlepší antistafylokovou aktivitu vůči SA, MRSA a SE po 24 i 48 h, a to 3,9 μmol.l⁻¹. Látka T6295 měla také velmi dobrou aktivitu vůči stafylokokům, po 12 h u SE dokonce stejnou jako T6293. Všechny ostatní látky vykázaly antistafylokovou aktivitu s výjimkou látky T6299, která měla pouze velmi slabou aktivitu u všech testovaných kmenů. Látky T6293 a T6295 byly také aktivní vůči

EF, kdy T6293 vykázala po 12 h nižší MIC než T6295, po 24 h byly hodnoty MIC u obou látek stejné. Látka T6295 dosáhla relativně nízkých MIC u všech testovaných kmenů, MIC 31,25 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ dosáhla i u EC a PA.

Tabulka 10: Výsledky testování antimykotické aktivity derivátů 2-(5-karboxypentyl)isochinolinium-bromidu a 1-(5-karboxypentyl)pyridinium-bromidu

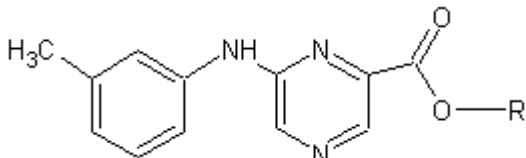
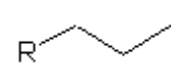
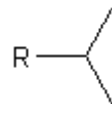

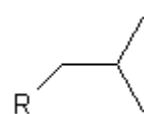
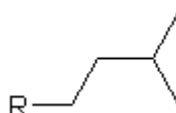
KMEN (kód)		TESTOVANÁ LÁTKA (kód) –MIC/IC ₈₀ /IC ₅₀ ($\mu\text{mol.l}^{-1}$)							
		T6293	T6278	T6295	T6294	T6296	T6292	T6297	T6299
CA	24h	3,9	125	7,81	15,62	31,25	31,25	31,25	62,5
	48h	15,62	125	15,62	31,25	62,5	31,25	62,5	250
CT	24h	500	62,5	15,62	31,25	62,5	31,25	15,62	250
	48h	>500	125	15,62	62,5	125	62,5	62,5	>250
CK	24h	31,25	125	15,62	31,25	31,25	31,25	62,5	250
	48h	62,5	125	15,62	62,5	31,25	31,25	62,5	250
CG	24h	3,9	62,5	7,81	31,25	15,62	7,81	31,25	62,5
	48h	7,81	125	31,25	62,5	125	31,25	31,25	250
TA	24h	7,81	125	15,62	62,5	62,5	31,25	62,5	250
	48h	15,62	250	31,25	125	62,5	62,5	250	>250
AF	24h	250	500	62,5	250	250	125	500	>250
	48h	500	500	125	250	500	250	>500	>250
AC	24h	>500	>500	250	500	500	250	>500	>250
	48h	>500	>500	250	500	>500	250	>500	>250
TM	72h	3,9	250	31,25	62,5	62,5	62,5	250	125
	120h	7,81	250	31,25	62,5	62,5	62,5	>500	250




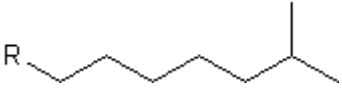
Jako nejúčinnější se jeví látka T6293, která dosáhla MIC 3,9 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ u kmenů CA a CG po 24h a u TM po 72h. Tato hodnota u CG po 48 h a TM po 120 h vzrostla na dvojnásobek a u CA o trojnásobek. U TA dosáhla tato látka 7,81 $\mu\text{mol.l}^{-1}$. Nízké hodnoty MIC vykazovala i látka T6295 u všech kmenů, nejlepší byly hodnoty 7,81 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ po 24 h u CA a CG, u dalších kandid dosáhla MIC 15,62 $\mu\text{mol.l}^{-1}$. Mírnou aktivitu vykazaly všechny látky téměř u všech kmenů, za zmínku stojí hodnota MIC

7,81 $\mu\text{mol}\cdot\Gamma^{-1}$ po 24 h u CG látky T6292, po 24h však vzrostla na 31,25 $\mu\text{mol}\cdot\Gamma^{-1}$. Mírnou aktivitu vykazala i látka T6299, která byla vůči bakteriím téměř neúčinná.

7.7.2 Deriváty 6-[(3-methylfenyl)amino]pyrazin-2-karboxylové kyseliny

Tabulka 11: Strukurní vzorce derivátů 6-[(3-methylfenyl)amino]pyrazin-2-karboxylové kyseliny

		
Kód	R ¹	Mr
MD 629/II	CH ₃	243,10
MD 630/II	C ₂ H ₅	257,12
MD 631/II		271,13
MD 632/II		271,13
MD 633/II		285,15
MD 634/II		285,15
MD 636/II		299,16

MD 637/II		313,18
MD 638/II		327,19
MD 644/II		341,21
MD 639/II		341,21

Tabulka 12: Výsledky testování antibakteriální aktivity derivátů 6-[(3-methylfenyl)amino] pyrazin-2-karboxylové kyseliny

KMEN		TESTOVANÁ LÁTKA (kód) –MIC/IC₈₀ (μmol.l⁻¹)						
(kód)		MD629	MD630	MD631	MD632	MD633	MD634	MD636
SA	24h	>500	>500	>250	250	125	>500	62,5
	48h	>500	>500	>250	>250	125	>500	62,5
MRSA	24h	>500	>500	>250	>250	125	>500	125
	48h	>500	>500	>250	>250	250	>500	125
SE	24h	>500	>500	>250	>250	250	>500	125
	48h	>500	>500	>250	>250	>500	>500	>500
EF	24h	>500	>500	>250	31,25	>500	>500	>500
	48h	>500	>500	>250	31,25	>500	>500	>500
EC	24h	>500	>500	>250	>250	>500	>500	>500
	48h	>500	>500	>250	>250	>500	>500	>500
KP	24h	>500	>500	>250	>250	>500	>500	>500
	48h	>500	>500	>250	>250	>500	>500	>500
KP-E	24h	>500	>500	>250	>250	>500	>500	>500
	48h	>500	>500	>250	>250	>500	>500	>500
PA	24h	>500	>500	>250	>250	>500	>500	>500
	48h	>500	>500	>250	>250	>500	>500	>500

Většina testovaných látek této skupiny neprokázala významnější antibakteriální aktivitu, pouze látka MD632 dosáhla hodnoty MIC 31,25 μmol.l⁻¹ po 24 i 28 h. Určitou aktivitu vykazala i látka MD636, a to 62,5 μmol.l⁻¹ u SA a 125 μmol.l⁻¹ u MRSA po 24 i 48 h.

Tabulka 12 – pokračování

KMEN		TESTOVANÁ LÁTKA (kód) –MIC/IC₈₀ (μmol.l⁻¹)							
(kód)		MD637	MD638	MD644	MD639				
SA	24h	15,62	15,62	62,5	125				
	48h	15,62	125	>500	>500				
MRSA	24h	31,25	62,5	250	500				
	48h	31,25	250	>500	>500				
SE	24h	31,25	62,5	250	>500				
	48h	>500	>500	>500	>500				
EF	24h	31,25	62,5	250	500				
	48h	>500	>500	>500	>500				
EC	24h	>500	>500	>500	>500				
	48h	>500	>500	>500	>500				
KP	24h	>500	>500	>500	>500				
	48h	>500	>500	>500	>500				
KP-E	24h	>500	>500	>500	>500				
	48h	>500	>500	>500	>500				
PA	24h	>500	>500	>500	>500				
	48h	>500	>500	>500	>500				

Látka MD637 vykázala dobrou aktivitu vůči SA, a to 15,62 μmol.l⁻¹ po 24 i 48 h. U MRSA byla hodnota MIC o něco vyšší, 31,25 μmol.l⁻¹. U SE se sice projevila aktivita po 24 h, ale neudržela se po 48 h inkubaci. Látka MD638 dosáhla dobrého výsledku po 24 h u SA, nicméně tuto hodnotu neudržela po 48 h, ani u MRSA nebo SE.

Tabulka 13: Výsledky testování antimykotické aktivity derivátů

6-[(3-methylfenyl)amino] pyrazin-2-karboxylové kyseliny

KMEN		TESTOVANÁ LÁTKA (kód) –MIC/IC₈₀ /IC₅₀ (μmol.l⁻¹)							
(kód)		MD629	MD630	MD631	MD632	MD633	MD634	MD636	
CA	24h	>500	>500	>250	>250	125	500	250	
	48h	>500	>500	>250	>250	250	>500	>500	
CT	24h	>500	>500	>250	>250	>500	>500	>500	
	48h	>500	>500	>250	>250	>500	>500	>500	
CK	24h	>500	>500	>250	>250	>500	>500	>500	
	48h	>500	>500	>250	>250	>500	>500	>500	
CG	24h	>500	>500	>250	>250	>500	>500	>500	
	48h	>500	>500	>250	>250	>500	>500	>500	
TA	24h	>500	>500	>250	>250	62,5	125	125	
	48h	>500	>500	>250	>250	125	>500	250	
AF	24h	>500	>500	>250	>250	>500	>500	>500	
	48h	>500	>500	>250	>250	>500	>500	>500	
AC	24h	>500	>500	>250	>250	250	>500	250	
	48h	>500	>500	>250	>250	250	>500	250	
TM	72h	500	500	>250	125	62,5	125	62,5	
	120h	500	500	>250	>250	62,5	500	62,5	

Antimykotická aktivita těchto látek byla ještě nižší než aktivita antibakteriální, za zmínku stojí pouze hodnota MIC 62,5 μmol.l⁻¹ látek MD633 a MD636 po 72 i 120 h u TM.

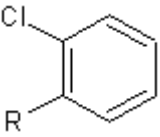
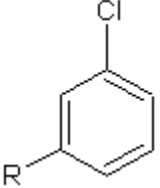
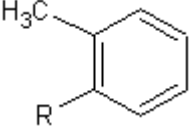
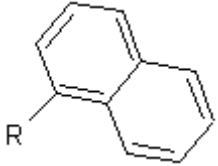
Tabulka 13 - pokračování

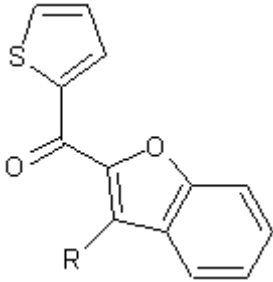
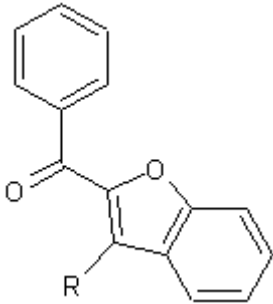
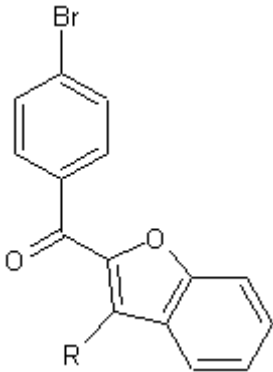
KMEN (kód)		TESTOVANÁ LÁTKA (kód) –MIC/IC ₈₀ /IC ₅₀ (μmol.Γ ⁻¹)							
		MD637	MD638	MD644	MD639				
CA	24h	500	>500	>500	500				
	48h	>500	>500	>500	>500				
CT	24h	>500	>500	>500	>500				
	48h	>500	>500	>500	>500				
CK	24h	>500	>500	>500	>500				
	48h	>500	>500	>500	>500				
CG	24h	>500	>500	>500	>500				
	48h	>500	>500	>500	>500				
TA	24h	125	>500	>500	>500				
	48h	>500	>500	>500	>500				
AF	24h	500	>500	>500	>500				
	48h	500	>500	>500	>500				
AC	24h	>500	>500	>500	>500				
	48h	>500	>500	>500	>500				
TM	72h	31,25	500	>500	>500				
	120h	31,25	500	>500	>500				

Nejvýraznější aktivitu vykázala látka MD637 u TM, a to 31,25 μmol.Γ⁻¹ po 72 i 120 h.

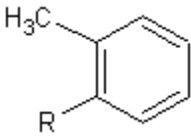
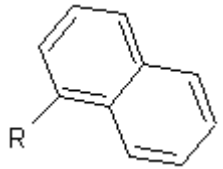
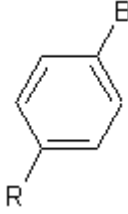
7.7.3 Deriváty 2-hydroxythiobenzamidu; 2*H*-1,3-benzoxazin-2,4(3*H*)-dithionu a další příbuzné struktury

Tabulka 14: Strukturní vzorce derivátů 2-hydroxythiobenzamidu

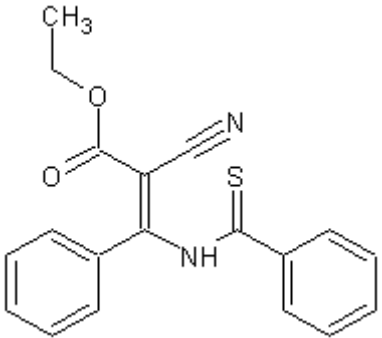
Kód	R ¹	Mr
RAM 417	H	153,202
RAM 407		263,743
RAM 408		263,743
RAM 409		243,324
RAM 410		279,356

RAM 416		379,034
RAM 421		373,424
RAM 422		452,320

Tabulka 15: Strukturální vzorce derivátů 2*H*-1,3-benzoxazin-2,4(3*H*)-dithionu

Kód	R^1	Mr
RAM 411		285,384
RAM 412		321,416
RAM 413		350,253

Tabulka 16: Strukturální vzorce dalších příbuzných látek

Kód	Struktura	Mr
RAM 414		336,408

RAM 415		376,260
RAM 418		277,296
RAM 419		359,419
RAM 420		300,442

Tabulka 17: Výsledky testování antibakteriální aktivity derivátů
2-hydroxythiobenzamidu

KMEN		TESTOVANÁ LÁTKA (kód) –MIC/IC₈₀ (μmol.l⁻¹)							
(kód)		RAM417	RAM407	RAM408	RAM409	RAM410	RAM416	RAM421	RAM422
SA	24h	250	31,25	1,95	31,25	7,81	15,62	31,25	>500
	48h	250	62,5	7,81	62,5	31,25	15,62	62,5	>500
MRSA	24h	250	31,25	7,81	125	15,62	15,62	250	>500
	48h	250	62,5	31,25	250	62,5	15,62	250	>500
SE	24h	125	62,5	3,9	125	31,25	15,62	250	>500
	48h	125	125	62,5	250	125	15,62	250	>500
EF	24h	>500	125	31,25	125	125	62,5	250	>500
	48h	>500	500	62,5	250	250	62,5	500	>500
EC	24h	>500	250	62,5	500	250	>500	>500	>500
	48h	>500	250	62,5	500	250	>500	>500	>500
KP	24h	>500	500	62,5	500	>500	>500	>500	>500
	48h	>500	500	62,5	500	>500	>500	>500	>500
KP-E	24h	>500	500	62,5	500	500	>500	>500	>500
	48h	>500	500	62,5	500	500	>500	>500	>500
PA	24h	>500	>500	250	>500	>500	>500	>500	>500
	48h	>500	>500	250	>500	>500	>500	>500	>500

Nejúčinnější látkou skupiny je RAM408, která vykazovala určitou aktivitu vůči všem testovaným kmenům a vynikající aktivitu vůči stafylokokům, MIC po 24 h u SA byla 1,95 μmol.l⁻¹, po 48 h se zvýšila na 7,81 μmol.l⁻¹. U MRSA byla MIC po 24 h 7,81 μmol.l⁻¹ a u SE 3,9 μmol.l⁻¹, po 48 h došlo ke zvýšení na 31,25 μmol.l⁻¹, resp. 62,5 μmol.l⁻¹. Látka RAM416 vykazovala taky dobrou aktivitu vůči stafylokokům, udržela si MIC 15,62 μmol.l⁻¹ u SA, MRSA i SE i po 48 h. Látky RAM 407, 409 a 410 byly aktivní vůči stafylokokům a částečně i EF. Základní látka RAM 417 měla jen slabou antistafylokokovou aktivitu, RAM422 se ukázala jako neaktivní.

Tabulka 18: Výsledky testování antimykotického působení derivátů 2-hydroxythiobenzamidu

KMEN		TESTOVANÁ LÁTKA (kód) –MIC/IC₈₀ /IC₅₀ (μmol.l⁻¹)							
		RAM417	RAM407	RAM408	RAM409	RAM410	RAM416	RAM421	RAM422
CA	24h	62,5	125	31,25	250	125	31,25	>125	>500
	48h	125	250	62,5	250	250	125	>125	>500
CT	24h	>500	250	31,25	250	62,5	>500	>125	>500
	48h	>500	500	62,5	500	250	>500	>125	>500
CK	24h	250	125	7,81	250	31,25	250	>125	>500
	48h	>500	250	31,25	250	62,5	500	>125	>500
CG	24h	>500	250	31,25	500	250	250	>125	>500
	48h	>500	500	62,5	>500	500	>500	>125	>500
TA	24h	500	31,25	7,81	62,5	31,25	125	>125	>500
	48h	>500	62,5	15,62	125	31,25	62,5	>125	>500
AF	24h	>500	125	31,25	125	125	>500	>125	>500
	48h	>500	250	62,5	250	250	>500	>125	>500
AC	24h	>500	1,95	0,49	1,95	1,95	250	>125	>500
	48h	>500	1,95	1,95	3,9	1,95	>500	>125	>500
TM	72h	125	15,62	3,9	31,25	15,62	31,25	>125	>500
	120h	125	31,25	3,9	62,5	31,25	62,5	>125	>500

Látky RAM407-410 vykazaly aktivitu vůči všem testovaným kmenům, obzvlášť účinné byly vůči AC, kde látka RAM 408 dosáhla po 24 h MIC až 0,49 μmol.l⁻¹, po 48 h 1,95 μmol.l⁻¹. Látky RAM407 a 410 měly MIC 1,95 μmol.l⁻¹ po 24 i 48 h, u látky RAM409 se zvedla po 48 h na 3,9 μmol.l⁻¹. Látky RAM407 a RAM410 vykazaly dobrou aktivitu i vůči TM, kde dosáhly hodnot MIC 15, 62 μmol.l⁻¹ po 72 h a 31,25 μmol.l⁻¹ po 120 h. Látka RAM417 byla mírně aktivní vůči CA, látka RAM410 prokázala mírnou aktivitu vůči CA a TM. Látky RAM421 a RAM 422 nevykazaly výraznější aktivitu vůči žádnému z testovaných kmenů.

Tabulka 19: Výsledky antibakteriálního působení derivátů 2*H*-1,3-benzoxazin-2,4(3*H*)-dithionu a dalších látek příbuzných struktur

KMEN		TESTOVANÁ LÁTKA (kód) –MIC/IC₈₀ (μmol.l⁻¹)							
(kód)		RAM411	RAM412	RAM413	RAM414	RAM415	RAM418	RAM419	RAM 420
SA	24h	125	15,62	3,9	500	125	>125		
	48h	>125	31,25	3,9	>500	125	>125		
MRSA	24h	125	15,62	7,81	500	>125	>125		
	48h	>125	31,25	7,81	>500	>125	>125		
SE	24h	125	15,62	7,81	500	>125	>125		
	48h	>125	125	15,62	>500	>125	>125		
EF	24h	>125	>125	31,25	500	62,5	>125		
	48h	>125	>125	62,5	>500	62,5	>125		
EC	24h	>125	>125	>125	>500	>125	>125		
	48h	>125	>125	>125	>500	>125	>125		
KP	24h	>125	>125	>125	>500	>125	>125		
	48h	>125	>125	>125	>500	>125	>125		
KP-E	24h	>125	>125	>125	>500	>125	>125		
	48h	>125	>125	>125	>500	>125	>125		
PA	24h	>125	>125	>125	>500	>125	>125		
	48h	>125	>125	>125	>500	>125	>125		

Látky RAM 419 a 420 byly nerozpustné v DMSO, proto byly z testování vyřazeny. RAM412 vykázala antistafylokokový účinek, a to hodnoty MIC 15,62 μmol.l⁻¹ u SA, MRSA i SE po 24 h. Nejúčinnější byla látka RAM413, která dosáhla 3,9 μmol.l⁻¹ vůči SA po 48 h, 7,81 μmol.l⁻¹ vůči MRSA po 48 h a 7,81 μmol.l⁻¹ po 24 h a 15,62 μmol.l⁻¹ po 48 h vůči SE. Mírnou aktivitu vykázala i vůči EF. Další látky této skupiny neměly výraznější účinek.

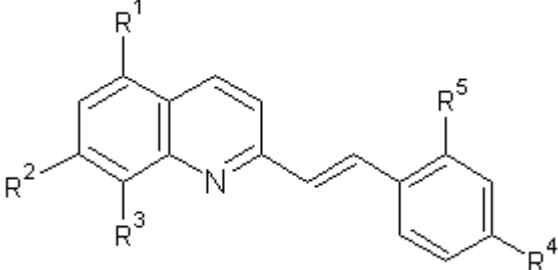


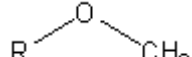
Tabulka 20: Výsledky antimykotického působení derivátů 2*H*-1,3-benzoxazin-2,4(3*H*)-dithionu a dalších látek příbuzných struktur

KMEN		TESTOVANÁ LÁTKA (kód) –MIC/IC₈₀ /IC₅₀ (μmol.l⁻¹)							
(kód)		RAM411	RAM412	RAM413	RAM414	RAM415	RAM418	RAM419	RAM 420
CA	24h	>125	>125	>500	125	>125	125		
	48h	>125	>125	>500	500	>125	>125		
CT	24h	>125	>125	>500	>500	>125	>125		
	48h	>125	>125	>500	>500	>125	>125		
CK	24h	>125	>125	>500	>500	>125	>125		
	48h	>125	>125	>500	>500	>125	>125		
CG	24h	>125	>125	>500	>500	>125	>125		
	48h	>125	>125	>500	>500	>125	>125		
TA	24h	>125	>125	>500	>500	>125	>125		
	48h	>125	>125	>500	>500	>125	>125		
AF	24h	>125	>125	>500	>500	>125	>125		
	48h	>125	>125	>500	>500	>125	>125		
AC	24h	15,62	>125	>500	>500	>125	>125		
	48h	62,5	>125	>500	>500	>125	>125		
TM	72h	>125	>125	>500	>500	>125	>125		
	120h	>125	>125	>500	>500	>125	>125		

Látky RAM 419 a 420 byly nerozpustné v DMSO, proto byly z testování vyřazeny. Žádná látka neprokázala výraznější antimykotickou účinnost s výjimkou RAM411, která dosáhla u AC hodnot MIC 15,62 μmol.l⁻¹ po 24 h a 62,5 μmol.l⁻¹ po 48 h.

7.7.4 Deriváty 2-(2-fenylvinyl)chinolinu

Tabulka 21: Strukturní vzorce derivátů 2-(2-fenylvinyl)chinolinu

						
Kód	R ¹	R ²	R ³	R ⁴	R ⁵	Mr
WK-1	Cl	Cl	-OH		H	360,234
WK-2	H	H	Cl	H	Cl	300,182
WK-3	H	H	H	H	Cl	265,737
WK-4	Cl	Cl	-OH	H		360,234
WK-5	H	H	H		H	261,318
WK-6	Cl	Cl	-OH	H	Cl	350,626

Tabulka 22: Výsledky testování antibakteriální aktivity derivátů
2-(2-fenylvinyl)chinolinu

KMEN		TESTOVANÁ LÁTKA (kód) –MIC/IC₈₀ (μmol.Γ⁻¹)							
(kód)		WK-1	WK-2	WK-3	WK-4	WK-5	WK-6		
SA	24h	125	>500	>500	3,9				
	48h	125	>500	>500	7,81				
MRSA	24h	125	>500	>500	3,9				
	48h	125	>500	>500	7,81				
SE	24h	125	>500	>500	3,9				
	48h	125	>500	>500	7,81				
EF	24h	>125	>500	>500	31,25				
	48h	>125	>500	>500	31,25				
EC	24h	>125	>500	>500	125				
	48h	>125	>500	>500	125				
KP	24h	>125	>500	>500	>500				
	48h	>125	>500	>500	>500				
KP-E	24h	>125	>500	>500	250				
	48h	>125	>500	>500	250				
PA	24h	>125	>500	>500	125				
	48h	>125	>500	>500	>500				

Látky WK-5 a WK-6 se vysrážely v MH-bujónu a proto byly z testování vyřazeny. Látky WK-1, WK-2 a WK-3 nevykázaly výraznější účinek, na rozdíl od látky WK-4, která dosáhla nízkých hodnot MIC hlavně u stafylokoků, a to 3,9 μmol.Γ⁻¹ po 24 h a 7,81 μmol.Γ⁻¹ po 48 h u SA, MRSA i SE.

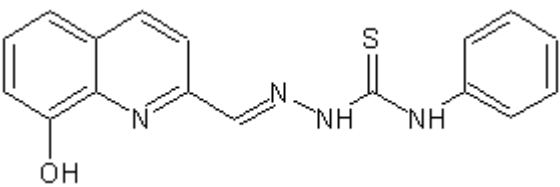
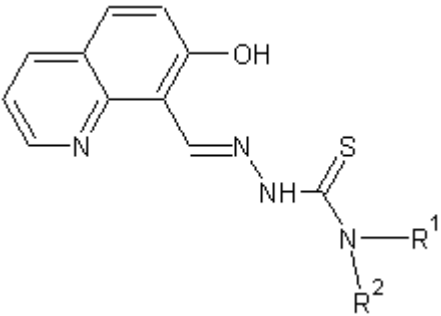
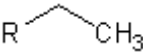
Tabulka 23: Výsledky testování antimykotické aktivity derivátů
2-(2-fenylvinyl) chinolinu

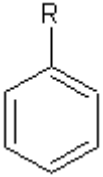
KMEN		TESTOVANÁ LÁTKA (kód) –MIC/IC₈₀ /IC₅₀ (μmol.l⁻¹)							
(kód)		WK-1	WK-2	WK-3	WK-4	WK-5	WK-6		
CA	24h	125	>500	>500	0,49				
	48h	125	>500	>500	0,98				
CT	24h	125	>500	>500	0,98				
	48h	125	>500	>500	0,98				
CK	24h	125	>500	>500	0,98				
	48h	125	>500	>500	3,9				
CG	24h	>125	>500	>500	0,98				
	48h	>125	>500	>500	1,95				
TA	24h	125	>500	>500	0,49				
	48h	125	>500	>500	1,95				
AF	24h	>125	>500	>500	3,9				
	48h	>125	>500	>500	3,9				
AC	24h	>125	>500	>500	15,62				
	48h	>125	>500	>500	15,62				
TM	72h	125	>500	>500	13,9				
	120h	125	>500	>500	15,62				

Látky WK-5 a WK-6 se vysrážely v RPMI a proto byly z testování vyřazeny. Látky WK-1, WK-2 a WK-3 znovu nevykázaly výraznější účinek. Látka WK-4 prokázala výrazný antimykotický účinek. Pozoruhodné jsou hlavně hodnoty MIC dosažené u kandid, které jsou v rozmezí 0,49 μmol.l⁻¹ až 3,9 μmol.l⁻¹, dále také velice nízké hodnoty u TA (0,49 μmol.l⁻¹ po 72 h a 1,95 μmol.l⁻¹ po 120 h) a AF (3,9 μmol.l⁻¹ po 24 i 48 h). Vůči AC dosáhla MIC 15,62 μmol.l⁻¹ po 48 h a u TM po 120 h.

7.7.5 8-hydroxychinolin-2-karbaldehyd *N*-fenylthiosemikarbazon a deriváty 7-hydroxychinolin-8-karbaldehyd-thiosemikarbazonu

Tabulka 24: Strukturní vzorce 8-hydroxychinolin-2-karbaldehyd-*N*-fenylthiosemikarbazonu a derivátů 7-hydroxychinolin-8-karbaldehyd-thiosemikarbazonu

Kód	Struktura	Mr	
MS-44		322,384	
			
Kód	R ¹	R ²	Mr
MS-46	-CH ₃	-CH ₃	274,341
MS-47		H	274,341

MS-48	-CH ₃	H	260,315
MS-49	H		322,384

Tabulka 25: Výsledky testování antibakteriální aktivity 8-hydroxychinolin-2-karbaldehyd-*N*-fenylthiosemikarbazonu a derivátů 7-hydroxychinolin-8-karbaldehyd-thiosemikarbazonu

KMEN		TESTOVANÁ LÁTKA (kód) –MIC/IC ₈₀ (μmol.l ⁻¹)						
		MS-44	MS-46	MS-47	MS-48	MS-49		
SA	24h	>250	>250	>500	>500	250		
	48h	>250	>250	>500	>500	250		
MRSA	24h	>250	>250	>500	>500	250		
	48h	>250	>250	>500	>500	>500		
SE	24h	>250	250	250	>500	125		
	48h	>250	>250	>500	>500	250		
EF	24h	>250	>250	>500	>500	250		
	48h	>250	>250	>500	>500	>500		
EC	24h	>250	>250	>500	>500	500		
	48h	>250	>250	>500	>500	>500		
KP	24h	>250	>250	>500	>500	>500		
	48h	>250	>250	>500	>500	>500		
KP-E	24h	>250	>250	>500	>500	500		
	48h	>250	>250	>500	>500	>500		
PA	24h	>250	>250	>500	>500	125		
	48h	>250	>250	>500	>500	125		

Žádná z látek této skupiny nevykázala výraznější antibakteriální účinek.

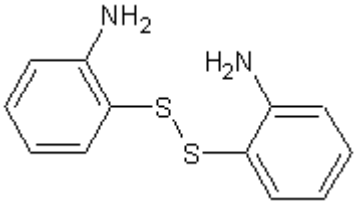
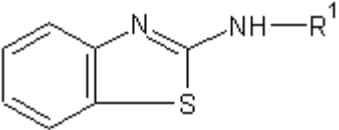
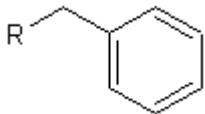
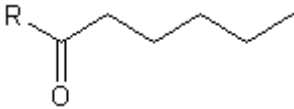
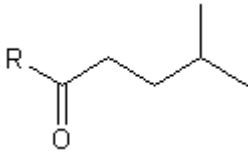
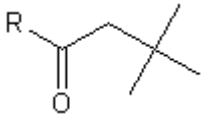
Tabulka 26: Výsledky testování antimykotické aktivity 8-hydroxychinolin-2-karbaldehyd-*N*-fenylthiosemikarbazonu a derivátů 7-hydroxychinolin-8-karbaldehyd-thiosemikarbazonu

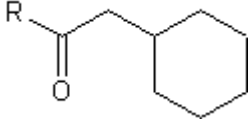
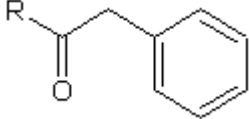
KMEN		TESTOVANÁ LÁTKA (kód) –MIC/IC₈₀ /IC₅₀ (μmol.l⁻¹)						
(kód)		MS-44	MS-46	MS-47	MS-48	MS-49		
CA	24h	>125	125	>500	>500	31,25		
	48h	>125	>250	>500	>500	62,5		
CT	24h	>125	>250	>500	>500	125		
	48h	>125	>250	>500	>500	125		
CK	24h	>125	>250	>500	>500	31,25		
	48h	>125	>250	>500	>500	125		
CG	24h	>125	125	62,5	250	15,62		
	48h	>125	125	125	>500	31,25		
TA	24h	>125	125	>500	>500	15,62		
	48h	>125	>250	>500	>500	125		
AF	24h	>125	>250	>500	>500	125		
	48h	>125	>250	>500	>500	>125		
AC	24h	>125	>250	>500	>500	15,62		
	48h	>125	>250	>500	>500	62,5		
TM	72h	>125	125	62,5	>500	15,62		
	120h	>125	125	62,5	>500	15,62		

Látka MS-47 dosáhla u TM MIC 62,5 μmol.l⁻¹ po 72 i 120 h; látky MS-44 a MS-46 nedosáhly výraznějšího antimykotického účinku; látka MS-48 byla nejméně aktivní. Látka MS-49 ovšem vykazala MIC 15,62 μmol.l⁻¹ po 24 h u CG, TA, AC a po 72 h u TM, tuto hodnotu si však dokázala udržet pouze u TM po 120 h.

7.7.6 2,2'-dithiodianilin a deriváty 1,3-benzothiazol-2-aminu

Tabulka 27: Strukturní vzorce 2,2'-dithiodianilinu a derivátů 1,3-benzothiazol-2-aminu

Kód	Struktura	Mr
DF-20		248,360
		
Kód	R ¹	Mr
DF-21		240,323
DF-22		234,317
DF-23		234,317
DF-24		234,317

DF-25		274,381
DF-26		268,334

Tabulka 28: Výsledky testování antibakteriální aktivity 2,2'-dithiodianilinu a derivátů 1,3-benzothiazol-2-aminu

KMEN		TESTOVANÁ LÁTKA (kód) –MIC/IC ₈₀ (μmol.l ⁻¹)						
(kód)		DF-20	DF-21	DF-22	DF-23	DF-24	DF-25	DF-26
SA	24h	62,5	>125	>125	>500		>125	>500
	48h	62,5	>125	>125	>500		>125	>500
MRSA	24h	31,25	>125	>125	125		>125	250
	48h	62,5	>125	>125	500		>125	500
SE	24h	125	>125	>125	>500		>125	125
	48h	500	>125	>125	>500		>125	500
EF	24h	62,5	>125	>125	>500		>125	>500
	48h	125	>125	>125	>500		>125	>500
EC	24h	>500	>125	>125	>500		>125	>500
	48h	>500	>125	>125	>500		>125	>500
KP	24h	>500	>125	>125	>500		>125	>500
	48h	>500	>125	>125	>500		>125	>500
KP-E	24h	>500	>125	>125	>500		>125	>500
	48h	>500	>125	>125	>500		>125	>500
PA	24h	125	>125	>125	>500		>125	>500
	48h	500	>125	>125	>500		>125	>500

Z této skupiny testovaných látek prokázala výraznější aktivitu pouze látka DF-20, a to MIC 31,25 μmol.l⁻¹ po 24 h u MRSA a 62,5 μmol.l⁻¹ po 48 h u SA a MRSA. Látka DF-24 se nerozpustila v DMSO, proto byla z testování vyřazena.

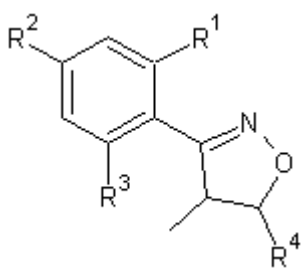
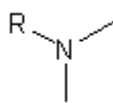
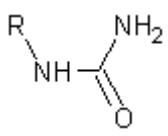
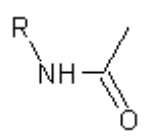
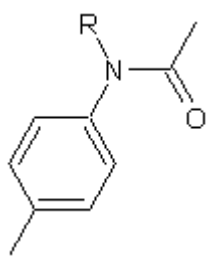
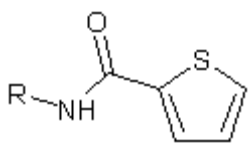
Tabulka 29: Výsledky testování antimykotické aktivity 2,2'-dithiodianilinu a derivátů 1,3-benzothiazol-2-aminu

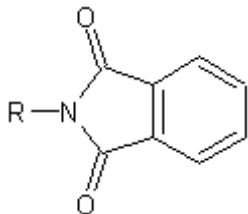
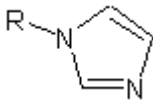
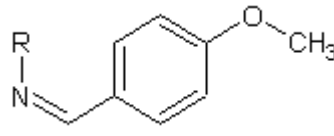


KMEN		TESTOVANÁ LÁTKA (kód) –MIC/IC₈₀ /IC₅₀ (μmol.l⁻¹)						
(kód)		DF-20	DF-21	DF-22	DF-23	DF-24	DF-25	DF-26
CA	24h	3,9	>125	>125	125		125	62,5
	48h	7,81	>125	>125	125		>125	250
CT	24h	15,62	>125	>125	>500		>125	>500
	48h	31,25	>125	>125	>500		>125	>500
CK	24h	62,5	>125	>125	500		>125	>500
	48h	125	>125	>125	>500		>125	>500
CG	24h	15,62	>125	>125	>500		>125	>500
	48h	31,25	>125	>125	>500		>125	>500
TA	24h	31,25	>125	>125	250		>125	>500
	48h	62,5	>125	>125	>500		>125	>500
AF	24h	31,25	>125	>125	250		>125	>500
	48h	125	>125	>125	>500		>125	>500
AC	24h	125	>125	>125	>500		>125	>500
	48h	125	>125	>125	>500		>125	>500
TM	72h	31,25	>125	>125	62,5		62,5	62,5
	120h	125	>125	>125	125		62,5	250

Látka DF-24 se nerozpustila v DMSO, proto byla z testování vyřazena. Látka DF-20 byla aktivní vůči všem testovaným fungálním kmenům, nejúčinnější se jevila vůči CA, kde dosáhla MIC 3,9 μmol.l⁻¹ po 24 h a 7,81 μmol.l⁻¹ po 48 h. Dále jsou výrazné hodnoty MIC dosažené u CT a CG, a to 15,62 μmol.l⁻¹ po 24 h a 31, 25 μmol.l⁻¹ po 48 h. Další látky této skupiny neprokázaly výraznější účinek.

7.7.7 Deriváty 4-methyl-3-fenyl-4,5-dihydroisoxazolu

Tabulka 30: Strukturní vzorce derivátů 4-methyl-3-fenyl-4,5-dihydroisoxazolu

					
Kód	R ¹	R ²	R ³	R ⁴	Mr
PB-1	Cl	H	Cl		273
PB-2	Cl	H	Cl		288
PB-3	Cl	H	Cl		287
PB-4	Cl	H	Cl		377
PB-5	Cl	H	Cl		355

PB-6	-CH ₃	-CH ₃	-CH ₃		348
PB-7	Cl	H	Cl		296
PB-8	Cl	H	Cl		363
PB-9	Cl	H	Cl		290
PB-10	Cl	H	Cl		318

Tabulka 31: Výsledky testování antibakteriální aktivity derivátů 4-methyl-3-fenyl-4,5-dihydroisoxazolu

KMEN		TESTOVANÁ LÁTKA (kód) –MIC/IC₈₀ (μmol.l⁻¹)									
(kód)		PB-1	PB-2	PB-3	PB-4	PB-5	PB-6	PB-7	PB-8	PB-9	PB-10
SA	24h	>500	>500	>500	>500	>500	>125	>500	500	>500	500
	48h	>500	>500	>500	>500	>500	>125	>500	500	>500	>500
MRSA	24h	>500	>500	>500	>500	>500	>125	>500	500	>500	>500
	48h	>500	>500	>500	>500	>500	>125	>500	>500	>500	>500
SE	24h	>500	>500	>500	>500	>500	>125	>500	>500	>500	>500
	48h	>500	>500	>500	>500	>500	>125	>500	>500	>500	>500
EF	24h	>500	>500	>500	>500	>500	>125	>500	>500	>500	>500
	48h	>500	>500	>500	>500	>500	>125	>500	>500	>500	>500
EC	24h	>500	>500	>500	>500	>500	>125	>500	>500	>500	>500
	48h	>500	>500	>500	>500	>500	>125	>500	>500	>500	>500
KP	24h	>500	>500	>500	>500	>500	>125	>500	>500	>500	>500
	48h	>500	>500	>500	>500	>500	>125	>500	>500	>500	>500
KP-E	24h	>500	>500	>500	>500	>500	>125	>500	>500	>500	>500
	48h	>500	>500	>500	>500	>500	>125	>500	>500	>500	>500
PA	24h	>500	>500	>500	>500	>500	>125	>500	>500	>500	>500
	48h	>500	>500	>500	>500	>500	>125	>500	>500	>500	>500

Žádná z testovaných látek nevykázala výraznější antibakteriální účinek.

Tabulka 32: Výsledky testování antimykotické aktivity derivátů 4-methyl-3-fenyl-4,5-dihydroisoxazolu

KMEN		TESTOVANÁ LÁTKA (kód) –MIC/IC ₈₀ /IC ₅₀ (μmol.l ⁻¹)									
		PB-1	PB-2	PB-3	PB-4	PB-5	PB-6	PB-7	PB-8	PB-9	PB-10
CA	24h	>500	62,5	62,5	31,25	250	>125	>500	>500	>500	>500
	48h	>500	125	125	62,5	250	>125	>500	>500	>500	>500
CT	24h	>500	250	500	250	>500	125	>500	>500	>500	>500
	48h	>500	500	>500	250	>500	>125	>500	>500	>500	>500
CK	24h	>500	250	500	125	>500	125	>500	>500	>500	>500
	48h	>500	500	>500	250	>500	>125	>500	>500	>500	>500
CG	24h	>500	250	500	250	>500	>125	125	>500	>500	>500
	48h	>500	500	>500	250	>500	>125	500	>500	>500	>500
TA	24h	>500	125	62,5	31,25	125	>125	>500	>500	>500	500
	48h	>500	125	500	31,25	125	>125	>500	>500	>500	>500
AF	24h	>500	>500	>500	>500	>500	>125	>500	>500	>500	500
	48h	>500	>500	>500	>500	>500	>125	>500	>500	>500	>500
AC	24h	>500	>500	>500	>500	>500	>125	>500	>500	>500	>500
	48h	>500	>500	>500	>500	>500	>125	>500	>500	>500	>500
TM	72h	>500	125	250	500	250	125	500	>500	>500	500
	120h	>500	500	250	500	>500	>125	500	>500	>500	>500

Látky PB-1 a PB7-10 byly neaktivní. U dalších látek z této skupiny za zmínku stojí pouze látka PB-4 s hodnotami MIC 31,25 μmol.l⁻¹ po 24 h a 62,5 μmol.l⁻¹ po 48 h u CA a 31,25 μmol.l⁻¹ po 24 i 48 h u TA.

8 Diskuze

Hodnocení antimikrobiální aktivity je stále se rozvíjející a velice významný obor, a to jak z hlediska testování citlivosti mikroba v rámci výběru racionální farmakoterapie, tak ve vývoji nových antimikrobních látek, které mohou v budoucnu díky neustále vzrůstající rezistenci patogenů nabýt klíčového významu. Pro průkaznost získaných výsledků je nezbytná co největší míra standardizace použitých metod, která zaručuje reprodukovatelnost, jednoznačnou interpretaci výsledků a interlaboratorní použitelnost výsledků v různých částech světa.

Jednou ze zavedených metod je mikrodiluční bujónová metoda, která byla v této práci použita právě z důvodu dobré reprodukovatelnosti, relativně nízké materiálové náročnosti a možnosti testovat širší spektrum koncentrací testovaných látek na 8 kmenech mikrobů najednou. Touto metodou bylo otestováno celkem 63 látek rozdělených do 7 skupin na základě chemické struktury. Všechny látky byly otestovány na 8 bakteriálních a 8 fungálních kmenech zároveň. Z bakterií byly testovány 4 Gram-pozitivní a 4 Gram-negativní kmeny, včetně rezistentních původců nozokomiálních infekcí (MRSA, *Klebsiella pneumoniae* ESBL-pozitivní). U hub bylo testováno 5 kmenů kvasinek a 3 kmeny vláknitých hub.

V podmínkách naší laboratoře byly prováděny všechny kroky ručně, což vede k většímu zatížení chybou, a to hlavně v kroku inokulace mikrobiálními kmeny každé jamky zvlášť, kde je možná kontaminace nebo falešně pozitivní výsledek. Dalším potencionálním zdrojem chyb může být vizuální odečet výsledků.

Odečtené hodnoty MIC byly rozděleny do 3 kategorií, a to:

- Slabě účinné (MIC = 500, 250, 125 $\mu\text{mol.l}^{-1}$)
- Středně účinné (MIC = 62,5; 31,25; 15,62; 7,81 $\mu\text{mol.l}^{-1}$)
- Silně účinné (MIC = 3,9; 1,95; 0,98; 0,49 $\mu\text{mol.l}^{-1}$)

První testovanou skupinou látek byly deriváty 2-(5-karboxypentyl)isochinolinium-bromidu a 1-(5-karboxypentyl)pyridinium-bromidu. Z těchto látek prokázaly všechny střední účinnost vůči G+ bakteriím, s výjimkou látky T6299, která byla neaktivní, a látky T6293, která vykazala silnou účinnost vůči stafylokokům. MIC byla v případě SA, MRSA i SE shodně 3,9 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ po 24 i 48 h inkubace. Látka T6295 měla

antistafylokokovou účinnost nižší pouze o jeden koncentrační stupeň oproti T6293, u SE po 24 h byla MIC stejná. Navíc T6295 vykázala středně silný účinek i vůči G-bakteriím, a to EC, KP a PA. Látky T6278 a T6295 jsou obě estery mentholu a liší se pouze zavedením dvou methylů na pyridinový skelet. Tato změna vedla k výraznější aktivitě vůči G⁺ a částečné aktivitě proti G⁻ bakteriím. Po rozšíření 3,4-dimethylpyridínia na isochinolínium u látky T6294 došlo k ztrátě aktivity vůči G-bakteriím. Ester geraniolu s 2-(5-karboxypentyl)isocholinium-bromidem se ukázal být neaktivní, kdežto ester geraniolu s 1-(5-karboxypentyl)-3,4-dimethylpyridinium-bromidem vykazoval alespoň střední účinnost vůči stafylokokům. Tyto výsledky naznačují, že látky s 3,4-dimethylpyridiniovým skeletem se jeví celkově aktivnější, než se skeletem isochinoliniovým, pokud je alkoholická část esteru stejná. Příčinou celkově lepší aktivity tohoto souboru vůči G⁺ bakteriím může být kladný náboj molekuly, která pak snadněji proniká negativně nabitou stěnou G⁺ buněk.

Antimykotická účinnost látek skupiny 1 zhruba koreluje s antibakteriální aktivitou, znovu byly nejnižší hodnoty MIC pozorovány u látky T6293, a to 3,9 $\mu\text{mol}\cdot\Gamma^{-1}$ po 24 h u CA a CG a po 72 h u TM. Po 48 h, resp. 120 h u TM byla účinnost již pouze střední, a jak u již zmíněných kmenů, tak i u CK, CG, TA. Celkově se soubor látek ukázal jako středně účinný hlavně na kvasinky. Širší spektrum vykázala kromě T6293 pouze látka T6295, která měla střední účinnost i na TM.

Druhou skupinu látek tvořily deriváty 6-[(3-methylfenyl)amino]pyrazin-2-karboxylové kyseliny. Kyselina pyrazin-2-karboxylová je vlastní antituberkuloticky aktivní formou důležitého antituberkulotika pyrazinamidu vznikající pomocí pyrazinamidáz v buňkách *Mycobacterium tuberculosis* (Konno, Feldmann et al. 1967). Proto bylo mnoho derivátů této látky testováno na antituberkulotickou aktivitu.

V naší skupině derivátů 6-[(3-methylfenyl)amino]pyrazin-2-karboxylové kyseliny bylo modifikací dosaženo prodlužováním uhlíkového řetězce v alkoholické části esteru. Antibakteriální účinnost tohoto souboru látek byla celkově velmi nízká, střední účinnost vůči stafylokokům můžeme pozorovat teprve u látky MD637 esterifikované hexanolem. Prodloužením řetězce o další uhlík u látky MD638 aktivita poklesla, a dalším prodloužením u MD644 již téměř vymizela.

V testování antimykotické účinnosti neuspěla skupina 2 o moc lépe. Za zmínku stojí snad pouze hodnota MIC 31,25 $\mu\text{mol}\cdot\Gamma^{-1}$ dosažena látkou MD637 u TM po 72 i 120 h.

Třetí skupina je poněkud strukturálně různorodější, pozůstává z derivátů 2-hydroxythiobenzamidu, derivátů 2*H*-1,3-benzoxazin-2,4(3*H*)-dithionu a dalších látek

příbuzných struktur. Ve všech těchto látkách lze nalézt alespoň částečnou příbuznost se strukturou 2-hydroxythiobenzamidu.

Co se týče antibakteriální aktivity přímých derivátů 2-hydroxythiobenzamidu, čistý 2-hydroxythiobenzamid pod kódem RAM417 se ukázal být antibakteriálně pouze slabě účinný. Substituce chlorfenylem na dusíku ovšem aktivitu výrazně zvýšila. Látka RAM407 s atomem chloru v poloze 2 fenylu již vykazuje střední účinnost vůči stafylokokům a látka RAM408 s chlorem v poloze 3 fenylu má nejvyšší antibakteriální účinnost z celého souboru. Nejnižší hodnoty MIC jsou u stafylokoků, a to $1,95 \mu\text{mol.l}^{-1}$ u SA a $3,9 \mu\text{mol.l}^{-1}$ u SE po 24 h. Po 48 h je tato látka u všech stafylokoků, ale i G-bakterií s výjimkou PA pouze středně účinná. Vynechání chloru a substituce fenylu v poloze 2 methylem vedla u látky RAM409 ke snížení účinnosti vůči všem bakteriím, u SA také zůstala pouze střední. Náhrada fenylu 1-naftylem u RAM410 vedlo ke střední antistafylokokové účinnosti. Substituce složitějším N-(2-thenoyl-1-benzofuran-3-yl)-em u látky RAM416 vedlo ke konstantní střední hodnotě MIC $15,62 \mu\text{mol.l}^{-1}$ po 24 i 48 h u všech stafylokoků, a ke střední účinnosti i vůči EF. Náhrada thiofenu za benzen u N-(2-benzoyl-1-benzofuran-3-yl)-u (látka RAM421) vedla ke střední účinnosti pouze u SA. Látka RAM422, která má oproti RAM421 v poloze 4 benzoylu atom bromu, již postrádá jakoukoliv antibakteriální účinnost.

Přímé deriváty 2-hydroxythiobenzamidu prokázaly také dobrou antimykotickou aktivitu. Nesubstituovaná látka RAM417 byla opět bez výraznější aktivity, spolu s RAM416, RAM421 a RAM 422. Na rozdíl od bakterií měl RAM410 lepší aktivitu než RAM16, a to střední u CK, TA a TM a silnou u CA. Látka RAM408 byla znovu neúčinnější, aktivitu prokázala vůči všem testovaným kmenům, přesněji střední aktivitu u kandid, TA a AF, a silnou aktivitu u TM a CA (až $0,49 \mu\text{mol.l}^{-1}$ po 24 h, resp. $1,95 \mu\text{mol.l}^{-1}$ po 48 h). Významnou se zdá být silná aktivita látek RAM407-RAM410 zejména vůči AC, která dosahuje výborných hodnot i po 48 hodinách. Celkově se tato skupina látek jeví být účinnější vůči vláknitým houbám (zejména AC a TM) než vůči kvasinkám.

Látky odvozené od N-benzylsalicylthioamidu se liší od našeho souboru látek pouze jedním uhlíkem. Tyto látky byly původně vyvinuty kvůli testování na antimykobakteriální účinnost, která byla u nich i prokázána (Dolezal, Waisser et al. 2009). Následně byla otestována i jejich antibakteriální účinnost, která se ukázala být slibnou hlavně u G+ bakterií. Aktivita vůči bakteriím vzrůstala se zvyšující se lipofilitou a zavedením halogenů do molekuly (Petrlikova, Waisser et al. 2010a). Podobných

závěrů bylo dosaženo i po otestování antifungální aktivity (Petrlikova, Waisser et al. 2010b). Pokud aplikujeme tyto zjištění na naši příbuznou skupinu látek, závěry mohou být podobné. Samotný 2-hydroxythiobenzamid byl neaktivní, nejspíše kvůli nedostatečné lipofilitě. Látka RAM 410 byla o něco antibakteriálně i antimykoticky účinnější, než méně lipofilní RAM 409. Nejaktivnější byly ovšem chlorované deriváty, tady se jako klíčová ukázala být poloha atomu chloru. Pro další závěry ohledně závislosti účinku na struktuře, a zejména pro rozhodnutí, zda jsou aktivnější N-benzylsalicylthioamidy nebo N-fenylsalicylthioamidy, by byla potřeba otestování širšího spektra obdobných látek. Aktivita látek RAM407-410 vůči *Absidia corymbifera* je ovšem velice zajímavá a jeví se být dokonce vyšší než u N-benzylsalicylthioamidů.

Látky obdobné základní struktury jako naše deriváty 2*H*-1,3-benzoxazin-2,4(3*H*)-dithionu byly původně testovány na antimykobakteriální účinnost jako velice aktivní (Petrlikova, Waisser et al. 2010c). Námi testované deriváty 2*H*-1,3-benzoxazin-2,4(3*H*)-dithionu měly oproti derivátům 2-hydroxythiobenzamidu nižší antibakteriální účinnost. Substituce 2-methylfenylem na atomu dusíku u RAM411 nevedla k žádné aktivitě, střední účinek vůči stafylokokům vykazovala látka RAM412 substituovaná 1-naftylem. Nejlepší účinek vůči G⁺ bakteriím však vykazovala RAM413 substituovaná 4-bromfenylem, a to střední účinnost u MRSA, SE i EF a silnou účinnost u SA (3,9 μmol.l⁻¹ po 24 i 48 h). Vůči G⁻ bakteriím nevykázala aktivitu žádná z látek. Další složitější struktury již jen vzdáleně připomínající strukturu 2-hydroxythiobenzamidu byly již bez aktivity nebo se nerozpustily v DMSO a z testování byly vyřazeny (RAM419 a RAM420).

Deriváty 2*H*-1,3-benzoxazin-2,4(3*H*)-dithionu a další struktury neprokázaly žádný výraznější antimykotický účinek s výjimkou látky RAM411, která dosáhla střední aktivity vůči AC, což může být považováno za pozůstatek aktivity pozorované u podobné látky RAM409.

Čtvrtou skupinu tvoří deriváty 2-(2-fenylvinyl)chinolinu. Tento soubor není obzvláště rozsáhlý, ale obsahuje jednu z nejaktivnějších látek ze všech testovaných, a to hlavně co se týče antimykotické účinnosti. Látky WK-2 a WK-3 jsou substituovány chlorem v poloze 2 fenylu, WK-2 má navíc ještě chlor v poloze 9 chinolinu, ani jedna z těchto substitucí však nevedla k výraznější antibakteriální nebo antimykotické aktivitě. Neosvědčila se ani substituce methoxyskupinou v poloze 4 fenylu u látky WK-5, tato látka se totiž vysrážela v MH bujónu a byla tudíž vyřazena z testování. Podobně dopadla i látka WK-6, která má na chinolinu v poloze 6a 8 atomy a chloru a v poloze 9

hydroxyl, na fenylu je v poloze 2 atom chloru. Výměna chloru v poloze 2 fenylu za ethoxyskupinu vedlo k vzniku látky WK-4, která vykazuje silnou aktivitu u SA, MRSA a SE po 24 h ($3,9 \mu\text{mol}\cdot\Gamma^{-1}$) a střední aktivitu po 48 h u všech G⁺ bakterií, na G⁻ bakterie má pouze slabý účinek. U hub ale vykazuje silný účinek (v rozmezí 0,49 až $3,9 \mu\text{mol}\cdot\Gamma^{-1}$) na všechny kvasinky a AF, a střední účinek na AC a TM. Tímto se stává nejsilněji antimykoticky působící látkou ze všech testovaných. Zajímavé je, že látka WK-1 se od WK-4 liší pouze polohou ethoxylové skupiny, které je u WK-1 v poloze 4 fenylu, tato látka je však pouze slabě antibioticky i antimykoticky účinná. Látky stejné základní struktury jako WK-1, WK-4 a WK-6 byly již otestované na antimykobakteriální i antimykotickou účinnost, kde jedna z látek, 5,7-dichloro-2-(2-{4-[2-(5,7-dichloro-8-hydroxy-chinolin-2-yl)viny]fenyl}vinyl)chinolin-8-ol vykazala vysokou antimykobakteriální i antimykotickou aktivitu (Musiol, Jampilek et al. 2010). Tato struktura je zrcadlově symetrická a nelze najít přímou souvislost mezi ní a látkou WK-4.

Pátá testovaná skupina pozůstává z 8-hydroxychinolin-2-karbaldehyd-*N*-fenyl-thiosemikarbazonu a derivátů 7-hydroxychinolin-8-karbaldehyd-thiosemikarbazonu. První jmenovaná látka pod kódem MS-44 se neukázala být antibakteriálně ani antimykoticky účinná. Další látky vznikly přesunutím hydroxylové skupiny na chinolinu do polohy 7 a karbaldehydu do polohy 8. Dále pak docházelo k obměnám na dusíku thiosemikarbazonu, ovšem zavedení jednoho methylu (MS48), dvou methylů (MS46) ani ethylu (MS47) nepřineslo výrazné zvýšení antimikrobiální aktivity. Avšak po návratu k původnímu fenylu z MS-44 u MS-48 již byla patrná určitá velmi slabá, ovšem pořád bezvýznamná antibakteriální aktivita. Naopak u hub dosáhla látka MS-49 střední účinnosti vůči CA, CG, AC a TM.

2,2'-dithiodianilin a deriváty 1,3-benzothiazol-2-aminu představují šestou testovanou skupinu látek. Ve struktuře derivátů 1,3-benzothiazol-2-aminu lze vystopovat strukturní rysy 2-thioanilinu, dále byly tyto látky modifikovány na dusíku aminu. Žádná ze substitucí jak alifatickým, tak aromatickým zbytkem však nepřinesla výrazné zvýšení aktivity. Nejaktivnější látkou skupiny se tak stal 2,2'-dithiodianilin, který má střední antibakteriální účinnost vůči SA a MRSA, ovšem o dost výraznější antimykotickou aktivitu, a to střední hodnoty MIC vůči CA CT, CG a TA po 48 h, u CA dokonce $3,9 \mu\text{mol}\cdot\Gamma^{-1}$ po 24 h. U CK, AF a TM dosáhl středních hodnot MIC pouze po 24 h, resp. 72 hodinách.

Poslední, sedmá skupina patří sice mezi nejpočetnější, antimikrobiální aktivita derivátů 4-methyl-3-fenyl-4,5-dihydroisoxazolu ovšem patřila mezi nejslabší. Jako antibakteriálně účinná se neprojevila ani jedna z testovaných látek tohoto souboru, z antimykotické účinnosti lze zmínit pouze středních hodnot MIC látky PB-4 u CA a TA.

Nejnižších hodnot MIC u jednotlivých testovaných kmenů dosáhly tyto látky:

- *Staphylococcus aureus* – **RAM408** (1,95 $\mu\text{mol}\cdot\Gamma^{-1}$ po 24 h a 7,81 $\mu\text{mol}\cdot\Gamma^{-1}$ po 48 h) ze skupiny derivátů 2-hydroxythiobenzamidu; **T6293** (3,9 $\mu\text{mol}\cdot\Gamma^{-1}$ po 24 i 48 h) ze skupiny derivátů 2-(5-karboxypentyl)isochinolinium-bromidu; **RAM413** (3,9 $\mu\text{mol}\cdot\Gamma^{-1}$ po 24 i 48 h) ze skupiny derivátů 2*H*-1,3-benzoxazin-2,4(3*H*)-dithionu
- *Staphylococcus aureus* methicilin rezistentní – **T6293** (3,9 $\mu\text{mol}\cdot\Gamma^{-1}$ po 24 i 48 h) ze skupiny derivátů 2-(5-karboxypentyl)isochinolinium-bromidu
- *Staphylococcus epidermidis* - **T6293** (3,9 $\mu\text{mol}\cdot\Gamma^{-1}$ po 24 i 48 h) ze skupiny derivátů 2-(5-karboxypentyl)isochinolinium-bromidu
- *Enterococcus sp.* – **T6293** (7,81 $\mu\text{mol}\cdot\Gamma^{-1}$ po 24 h a 31,25 $\mu\text{mol}\cdot\Gamma^{-1}$ po 48 h) ze skupiny derivátů 2-(5-karboxypentyl)isochinolinium-bromidu
- *Escherichia coli* – **T6295** (31,25 $\mu\text{mol}\cdot\Gamma^{-1}$ po 24 i 48 h) ze skupiny derivátů 1-(5-karboxypentyl)pyridinium-bromidu
- *Klebsiella pneumoniae* – **T6295** (62,5 $\mu\text{mol}\cdot\Gamma^{-1}$ po 24 i 48 h) ze skupiny derivátů 1-(5-karboxypentyl)pyridinium-bromidu a **RAM408** (62,5 $\mu\text{mol}\cdot\Gamma^{-1}$ po 24 i 48 h) ze skupiny derivátů 2-hydroxythiobenzamidu
- *Klebsiella pneumoniae* ESBL – **RAM408** (62,5 $\mu\text{mol}\cdot\Gamma^{-1}$ po 24 i 48 h) ze skupiny derivátů 2-hydroxythiobenzamidu

- *Pseudomonas aeruginosa* – **T6295** (31,25 $\mu\text{mol}\cdot\Gamma^{-1}$ po 24 i 48 h) ze skupiny derivátů 1-(5-karboxypentyl)pyridinium-bromidu
- *Candida albicans* – **WK-4** (0,49 $\mu\text{mol}\cdot\Gamma^{-1}$ po 24 h a 0,98 $\mu\text{mol}\cdot\Gamma^{-1}$ po 48 h) ze skupiny derivátů 2-(2-fenylvinyl)chinolinu
- *Candida tropicalis* – **WK-4** (0,98 $\mu\text{mol}\cdot\Gamma^{-1}$ po 24 i 48 h) ze skupiny derivátů 2-(2-fenylvinyl)chinolinu
- *Candida krusei* – **WK-4** (0,98 $\mu\text{mol}\cdot\Gamma^{-1}$ po 24 h a 3,9 $\mu\text{mol}\cdot\Gamma^{-1}$ po 48 h) ze skupiny derivátů 2-(2-fenylvinyl)chinolinu
- *Candida glabrata* – **WK-4** (0,98 $\mu\text{mol}\cdot\Gamma^{-1}$ po 24 h a 1,95 $\mu\text{mol}\cdot\Gamma^{-1}$ po 48 h) ze skupiny derivátů 2-(2-fenylvinyl)chinolinu
- *Trichosporon asahii* – **WK-4** (0,49 $\mu\text{mol}\cdot\Gamma^{-1}$ po 24 h a 1,95 $\mu\text{mol}\cdot\Gamma^{-1}$ po 48 h) ze skupiny derivátů 2-(2-fenylvinyl)chinolinu
- *Aspergillus fumigatus* – **WK-4** (3,9 $\mu\text{mol}\cdot\Gamma^{-1}$ po 24 i 48 h) ze skupiny derivátů 2-(2-fenylvinyl)chinolinu
- *Absidia corymbifera* – **RAM408** (0,49 $\mu\text{mol}\cdot\Gamma^{-1}$ po 24 h a 1,95 $\mu\text{mol}\cdot\Gamma^{-1}$ po 48 h) ze skupiny derivátů 2-hydroxythiobenzamidu
- *Trichophyton mentagrophytes* – **RAM408** (3,9 $\mu\text{mol}\cdot\Gamma^{-1}$ po 24 i 48 h) ze skupiny derivátů 2-hydroxythiobenzamidu

Z výše uvedeného je jasně patrné, že nejúčinnější látky vykazovaly určitou selektivitu vůči specifickým daných skupin mikrobů. Prokázaly rozdílnou aktivitu na prokaryota a eukaryota (jiné látky byly účinné na bakterie a jiné na houby – výjimkou je RAM 408, který byl silně aktivní vůči stafylokokům i vůči vláknitým houbám) a působily odlišně na Gram-pozitivní koky a Gram-negativní tyčky a také na kvasinky a vláknité houby. Pro G+ bakterie se ukázala být nejúčinnější látka T6293 s pozitivním nábojem v molekule, což může významně přispět k její aktivitě, pokud vezmeme

v potaz negativní náboj peptidoglykanů obsažených ve velké míře v buněčné stěně G+ organismů. Látka T6295, nejúčinnější vůči G- bakteriím má taky kladný náboj, ovšem oproti T6293 o dost nižší, pouze střední aktivitu. To může být vysvětleno mnohem tenčí vrstvou peptidoglykanu v buněčné stěně G- bakterií a její mnohem větší složitostí.

Cílem této práce bylo zjistit první orientační informace ohledně účinnosti nově syntetizovaných látek. Pravděpodobnost, že by se kterákoliv testovaná látka prosadila jako opravdový lék, je velmi nízká, jelikož by musela splňovat velice přísná kritéria toxikologických zkoušek a posléze klinických studií. Nicméně tyto výsledky mohou být zajímavým impulzem pro syntézu chemicky podobných látek a prozkoumání účinnosti dalších modifikací.

9 Závěr

- Pomocí mikrodiluční bujónové metody bylo otestováno celkem 63 látek rozdělených do 7 skupin na základě chemické struktury. Všechny látky byly otestovány na 8 bakteriálních a 8 fungálních kmenech zároveň.
- Látky 1. skupiny, deriváty 2-(5-karboxypentyl)isochinolinium-bromidu a 1-(5-karboxypentyl)pyridinium-bromidu, prokázaly téměř každá alespoň střední účinnost vůči G⁺ bakteriím, látka T6293 měla dokonce nejvyšší antistafylokokovou účinnost ze všech testovaných látek.
- Ze 3. skupiny se jako nejúčinnější ukázaly deriváty 2-hydroxythiobenzamidu. Nejaktivnější látka skupiny, RAM408 substituovaná chlorem v poloze 3 fenylu vykazovala minimálně střední antibakteriální účinnost vůči všem testovaným bakteriím i houbám s výjimkou PA. Zajímavá je silná aktivita látek RAM407 až RAM410 zejména vůči AC. Deriváty 2H-1,3-benzoxazin-2,4(3H)-dithionu a další příbuzné struktury prokázaly významně nižší účinnost.
- 4. skupina, deriváty 2-(2-fenylvinyl)chinolinu zahrnuje nejsilněji antimykoticky působící látku ze všech testovaných, a to WK-4, která má v poloze 2 fenylu ethoxyskupinu. Vykazuje silný účinek na všechny kvasinky a AF, a střední účinek na AC a TM. Vykazuje také silnou aktivitu u SA, MRSA a SE po 24 h, a střední aktivitu po 48 h u všech G⁺ bakterií. Na G⁻ bakterie má pouze slabý účinek. Látka WK-1, která má ethoxyskupinu v poloze 4 fenylu, je pouze slabě antimikrobiálně účinná.
- Z 6. skupiny prokázala látka 2,2'-dithiodianilin střední antibakteriální účinnost vůči SA a MRSA, ovšem o dost výraznější antimykotickou aktivitu vůči kvasinkám.
- Ze skupin 2, 5 a 7 žádná látka nedosáhla výrazné antimikrobiální aktivity.
- Pro každý kmen byla určena nejúčinnější látka.

10 Seznam obrázků a tabulek

Obrázek 1: MRSA zachycen skenovacím elektronovým mikroskopem

Obrázek 2: *E. coli* zachycena skenovacím elektronovým mikroskopem

Obrázek 3: Biofilm *C. albicans* zachycený skenovacím elektronovým mikroskopem

Obrázek 4: Diskový difuzní test kmenu *E. coli* získaného kultivací ze vzorku moče

Obrázek 5: Kmen *Staphylococcus aureus* testovaný gradientovou difuzní metodou vankomycinem (VA), daptomycinem (DM) a linezolidem (LZ) na Mueller-Hintonově agaru

Tabulka 1: Rozdíly mezi podmínkami CLSI a EUCAST pro testování antifungální citlivosti kvasinek

Tabulka 2: Rozdíly mezi podmínkami CLSI a EUCAST pro testování antifungální citlivosti plísní

Tabulka 3: Antibakteriální spektrum β -laktámových antibiotik

Tabulka 4: Antibakteriální spektrum inhibitorů proteosyntézy

Tabulka 5: Antibakteriální spektrum chinolonů

Tabulka 6: Nejpoužívanější topické a systémové antifungální látky

Tabulka 7: Složení média RPMI-1640 SEVAC 5x koncentrovaného (obsah v gramech na 1000 ml média)

Tabulka 8: Strukturální vzorce derivátů 2-(5-karboxypentyl)isochinolinium-bromidu a 1-(5-karboxypentyl)pyridinium-bromidu

Tabulka 9: Výsledky testování antibakteriální aktivity derivátů 2-(5-karboxypentyl)isochinolinium-bromidu a 1-(5-karboxypentyl)pyridinium-bromidu

Tabulka 10: Výsledky testování antimykotické aktivity derivátů 2-(5-karboxypentyl)isochinolinium-bromidu a 1-(5-karboxypentyl)pyridinium-bromidu

Tabulka 11: Strukturální vzorce derivátů 6-[(3-methylfenyl)amino]pyrazin-2-karboxylové kyseliny

Tabulka 12: Výsledky testování antibakteriální aktivity derivátů 6-[(3-methylfenyl)amino] pyrazin-2-karboxylové kyseliny

Tabulka 13: Výsledky testování antimykotické aktivity derivátů 6-[(3-methylfenyl)amino] pyrazin-2-karboxylové kyseliny

Tabulka 14: Strukturální vzorce derivátů 2-hydroxythiobenzamidu

Tabulka 15: Strukturální vzorce derivátů 2*H*-1,3-benzoxazin-2,4(3*H*)-dithionu

Tabulka 16: Strukturní vzorce dalších příbuzných látek

Tabulka 17: Výsledky testování antibakteriální aktivity derivátů

2-hydroxythiobenzamidu

Tabulka 18: Výsledky testování antimykotického působení derivátů

2-hydroxythiobenzamidu

Tabulka 19: Výsledky antibakteriálního působení derivátů 2*H*-1,3-benzoxazin-2,4(3*H*)-dithionu a dalších látek příbuzných struktur

Tabulka 20: Výsledky antimykotického působení derivátů 2*H*-1,3-benzoxazin-2,4(3*H*)-dithionu a dalších látek příbuzných struktur

Tabulka 21: Strukturní vzorce derivátů 2-(2-fenylvinyl)chinolinu

Tabulka 22: Výsledky testování antibakteriální aktivity derivátů

2-(2-fenylvinyl)chinolinu

Tabulka 23: Výsledky testování antimykotické aktivity derivátů

2-(2-fenylvinyl)chinolinu

Tabulka 24: Strukturní vzorce 8-hydroxychinolin-2-karbaldehyd-*N*-fenyl-

thiosemikarbazonu a derivátů 7-hydroxychinolin-8-karbaldehyd-thiosemikarbazonu

Tabulka 25: Výsledky testování antibakteriální aktivity 8-hydroxychinolin-2-

karbaldehyd-*N*-fenylthiosemikarbazonu a derivátů 7-hydroxychinolin-8-karbaldehyd-thiosemikarbazonu

Tabulka 26: Výsledky testování antimykotické aktivity 8-hydroxychinolin-2-

karbaldehyd-*N*-fenylthiosemikarbazonu a derivátů 7-hydroxychinolin-8-karbaldehyd-thiosemikarbazonu

Tabulka 27: Strukturní vzorce 2,2'-dithiodianilinu a derivátů 1,3-benzothiazol-2-aminu

Tabulka 28: Výsledky testování antibakteriální aktivity 2,2'-dithiodianilinu a derivátů 1,3-benzothiazol-2-aminu

Tabulka 29: Výsledky testování antimykotické aktivity 2,2'-dithiodianilinu a derivátů 1,3-benzothiazol-2-aminu

Tabulka 30: Strukturní vzorce derivátů 4-methyl-3-fenyl-4,5-dihydroisoxazolu

Tabulka 31: Výsledky testování antibakteriální aktivity derivátů 4-methyl-3-fenyl-4,5-dihydroisoxazolu

Tabulka 32: Výsledky testování antimykotické aktivity derivátů 4-methyl-3-fenyl-4,5-dihydroisoxazolu

11 Literatura

1. ALMASLAMANI, M., TAJ-ALDEEN, S. J., *et al.* An increasing trend of cutaneous zygomycosis caused by *Mycoclados corymbifer* (formerly *Absidia corymbifera*): report of two cases and review of primary cutaneous *Mycoclados* infections *Med Mycol* (2009) **47**(5): 532-8.
2. ARIKAN, S., LOZANO-CHIU, M., *et al.* In vitro susceptibility testing methods for caspofungin against *Aspergillus* and *Fusarium* isolates *Antimicrob Agents Chemother* (2001) **45**(1): 327-30.
3. ARIKAN, S. and REX, J. H. Nystatin LF (Aronex/Abbott) *Curr Opin Investig Drugs* (2001) **2**(4): 488-95.
4. BEDNÁŘ, M. *Lékařská mikrobiologie*. Praha, Marvil.(1996)
5. DAGENAIS, T. R. and KELLER, N. P. Pathogenesis of *Aspergillus fumigatus* in Invasive Aspergillosis *Clin Microbiol Rev* (2009) **22**(3): 447-65.
6. DOLEZAL, R., WAISSER, K., *et al.* N-benzylsalicylthioamides: highly active potential antituberculotics *Arch Pharm (Weinheim)* (2009) **342**(2): 113-9.
7. ESPINEL-INGROFF, A., ARTHINGTON-SKAGGS, B., *et al.* Multicenter evaluation of a new disk agar diffusion method for susceptibility testing of filamentous fungi with voriconazole, posaconazole, itraconazole, amphotericin B, and caspofungin *J Clin Microbiol* (2007) **45**(6): 1811-20.
8. FRENCH, G. L. The continuing crisis in antibiotic resistance *Int J Antimicrob Agents* (2010) **36 Suppl 3**: S3-7.
9. GARCIA-HERMOSO, D., HOINARD, D., *et al.* Molecular and phenotypic evaluation of *Lichtheimia corymbifera* (formerly *Absidia corymbifera*) complex isolates associated with human mucormycosis: rehabilitation of *L. ramosa* *J Clin Microbiol* (2009) **47**(12): 3862-70.
10. GREENBERG, R. N., MULLANE, K., *et al.* Posaconazole as salvage therapy for zygomycosis *Antimicrob Agents Chemother* (2006) **50**(1): 126-33.
11. GUPTA, K., SCHOLE, D., *et al.* Increasing prevalence of antimicrobial resistance among uropathogens causing acute uncomplicated cystitis in women *JAMA* (1999) **281**(8): 736-8.
12. HIRSCH, E. B. and TAM, V. H. Detection and treatment options for *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases (KPCs): an emerging cause of multidrug-resistant infection *J Antimicrob Chemother* (2010) **65**(6): 1119-25.
13. HOFFMANN, K., DISCHER, S., *et al.* Revision of the genus *Absidia* (Mucorales, Zygomycetes) based on physiological, phylogenetic, and morphological

characters; thermotolerant *Absidia* spp. form a coherent group, *Mycocladaceae* fam. nov *Mycol Res* (2007) **111**(Pt 10): 1169-83.

14. HOWARD, S. J. and ARENDRUP, M. C. Acquired antifungal drug resistance in *Aspergillus fumigatus*: epidemiology and detection *Med Mycol* (2011) **49 Suppl 1**: S90-5.
15. HOWARD, S. J., CERAR, D., *et al.* Frequency and evolution of Azole resistance in *Aspergillus fumigatus* associated with treatment failure *Emerg Infect Dis* (2009) **15**(7): 1068-76.
16. HOWDEN, B. P., DAVIES, J. K., *et al.* Reduced vancomycin susceptibility in *Staphylococcus aureus*, including vancomycin-intermediate and heterogeneous vancomycin-intermediate strains: resistance mechanisms, laboratory detection, and clinical implications *Clin Microbiol Rev* (2010) **23**(1): 99-139.
17. CHAKRABARTI, A., MOHAN, B., *et al.* Change in distribution & antifungal susceptibility of *Candida* species isolated from candidaemia cases in a tertiary care centre during 1996-2000 *Indian J Med Res* (2002) **116**: 5-12.
18. CHEN, L. F., CHOPRA, T., *et al.* Pathogens resistant to antibacterial agents *Infect Dis Clin North Am* (2009) **23**(4): 817-45, vii.
19. JÍLEK, P., BUCHTA, V., *et al.* *Úvod do mikrobiologických vyšetřovacích metod ve zdravotnictví*. 1. vydání Praha, Karolinum (2002) 104 s. 80-246-0459-0
20. JOHNSON, E. M. Issues in antifungal susceptibility testing *J Antimicrob Chemother* (2008) **61 Suppl 1**: i13-8.
21. JORGENSEN, J. H. and FERRARO, M. J. Antimicrobial susceptibility testing: a review of general principles and contemporary practices *Clin Infect Dis* (2009) **49**(11): 1749-55.
22. KAYSER, F. H., BIENZ, K. A., *et al.* *Medical Microbiology*. New York, Thieme.(2005) 1-58890-245-5
23. KONNO, K., FELDMANN, F. M., *et al.* Pyrazinamide susceptibility and amidase activity of tubercle bacilli *Am Rev Respir Dis* (1967) **95**(3): 461-9.
24. KOTHAVADE, R. J., KURA, M. M., *et al.* *Candida tropicalis*: its prevalence, pathogenicity and increasing resistance to fluconazole *J Med Microbiol* (2010) **59**(Pt 8): 873-80.
25. KUFE, D. W., POLLOCK, R. E., *et al.* *Holland-Frei Cancer Medicine, 6th edition*. Hamilton, BC Decker.(2003) 1-55009-213-8
26. LASS-FLORL, C., PERKHOFER, S., *et al.* In vitro susceptibility testing in fungi: a global perspective on a variety of methods *Mycoses* (2010) **53**(1): 1-11.

27. LECLERCQ, R. and COURVALIN, P. Resistance to glycopeptides in enterococci *Clin Infect Dis* (1997) **24**(4): 545-54; quiz 555-6.
28. LI, H., QIAO, J., *et al.* In vitro interaction of itraconazole with amphotericin B, caspofungin, and terbinafine against clinical isolates of *Trichosporon asahii* *Mycopathologia* (2010) **171**(5): 345-8.
29. LIU, C. and CHAMBERS, H. F. Staphylococcus aureus with heterogeneous resistance to vancomycin: epidemiology, clinical significance, and critical assessment of diagnostic methods *Antimicrob Agents Chemother* (2003) **47**(10): 3040-5.
30. LIVERMORE, D. M. Multiple mechanisms of antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: our worst nightmare? *Clin Infect Dis* (2002) **34**(5): 634-40.
31. LOPEZ-MARTINEZ, R. Candidosis, a new challenge *Clin Dermatol* (2010) **28**(2): 178-84.
32. LÜLLMANN, H., MOHR, K., *et al.* *Farmakologie a toxikologie*. 2. české vydání Praha, Grada Publishing.(2004) 728 s. 80-247-0836-1
33. MALTEZOU, H. C. and GIAMARELLOU, H. Community-acquired methicillin-resistant Staphylococcus aureus infections *Int J Antimicrob Agents* (2006) **27**(2): 87-96.
34. MESSER, S. A., DIEKEMA, D. J., *et al.* Evaluation of disk diffusion and Etest compared to broth microdilution for antifungal susceptibility testing of posaconazole against clinical isolates of filamentous fungi *J Clin Microbiol* (2007) **45**(4): 1322-4.
35. MICELI, M. H., DIAZ, J. A., *et al.* Emerging opportunistic yeast infections *Lancet Infect Dis* (2011) **11**(2): 142-51.
36. MOORE, N. M. and FLAWS, M. L. Antimicrobial resistance mechanisms in *Pseudomonas aeruginosa* *Clin Lab Sci* (2011) **24**(1): 47-51.
37. MORSCHHAUSER, J. Regulation of multidrug resistance in pathogenic fungi *Fungal Genet Biol* (2010) **47**(2): 94-106.
38. MURRAY, P. R., ROSENTHAL, K. S., *et al.* *Medical Microbiology*. 6th edition, Philadelphia, Mosby Elsevier.(2009) 978-0-323-05470-6
39. MUSIOL, R., JAMPILEK, J., *et al.* Investigating the activity spectrum for ring-substituted 8-hydroxyquinolines *Molecules* (2010) **15**(1): 288-304.
40. NANNINI, E., MURRAY, B. E., *et al.* Resistance or decreased susceptibility to glycopeptides, daptomycin, and linezolid in methicillin-resistant Staphylococcus aureus *Curr Opin Pharmacol* (2010) **10**(5): 516-21.

41. NGUYEN, M. H., PEACOCK, J. E., JR., *et al.* The changing face of candidemia: emergence of non-*Candida albicans* species and antifungal resistance *Am J Med* (1996) **100**(6): 617-23.
42. NIIMI, M., FIRTH, N. A., *et al.* Antifungal drug resistance of oral fungi *Odontology* (2010) **98**(1): 15-25.
43. PETRLIKOVA, E., WAISSER, K., *et al.* N-Benzylsalicylthioamides as novel compounds with promising antimycotic activity *Bioorg Med Chem Lett* (2010b) **20**(15): 4535-8.
44. PETRLIKOVA, E., WAISSER, K., *et al.* Highly active antimycobacterial derivatives of benzoxazine *Bioorg Med Chem* (2010c) **18**(23): 8178-87.
45. PETRLIKOVA, E., WAISSER, K., *et al.* Antibacterial activity of N-benzylsalicylthioamides *Folia Microbiol (Praha)* (2010a) **55**(5): 418-21.
46. RAMAGE, G., SAVILLE, S. P., *et al.* *Candida* biofilms: an update *Eukaryot Cell* (2005) **4**(4): 633-8.
47. RAMBALI, B., FERNANDEZ, J. A., *et al.* Susceptibility testing of pathogenic fungi with itraconazole: a process analysis of test variables *J Antimicrob Chemother* (2001) **48**(2): 163-77.
48. RAMIREZ, M., SERRANO, M. C., *et al.* Comparative study of disc diffusion and microdilution methods in susceptibility testing of micafungin against *Candida* species *J Antimicrob Chemother* (2006) **58**(4): 861-3.
49. RANG, H. P., DALE, M. M., *et al.* *Pharmacology*. 6th edition, Philadelphia, Churchill Livingstone Elsevier.(2007) 829 s. 9780443069116
50. RODRIGUEZ-BANO, J. and PATERSON, D. L. A change in the epidemiology of infections due to extended-spectrum beta-lactamase-producing organisms *Clin Infect Dis* (2006) **42**(7): 935-7.
51. ROGERS, B. A., SIDJABAT, H. E., *et al.* *Escherichia coli* O25b-ST131: a pandemic, multiresistant, community-associated strain *J Antimicrob Chemother* (2010) **66**(1): 1-14.
52. SERENA, C., PASTOR, F. J., *et al.* Efficacy of micafungin in combination with other drugs in a murine model of disseminated trichosporonosis *Antimicrob Agents Chemother* (2005) **49**(2): 497-502.
53. SCHINDLER, J. *Mikrobiologie pro studenty zdravotnických oborů*. Praha, Grada.(2010) 978-80-247-3170-4
54. SCHOENFELDER, S. M., LANGE, C., *et al.* Success through diversity - how *Staphylococcus epidermidis* establishes as a nosocomial pathogen *Int J Med Microbiol* (2010) **300**(6): 380-6.

55. SILVA, S., HENRIQUES, M., *et al.* Biofilms of non-Candida albicans Candida species: quantification, structure and matrix composition *Med Mycol* (2009) **47**(7): 681-9.
56. SILVA, S., NEGRI, M., *et al.* Candida glabrata, Candida parapsilosis and Candida tropicalis: biology, epidemiology, pathogenicity and antifungal resistance *FEMS Microbiol Rev* (2011).
57. SKIADA, A., VRANA, L., *et al.* Disseminated zygomycosis with involvement of the central nervous system *Clin Microbiol Infect* (2009) **15 Suppl 5**: 46-9.
58. SZEKELY, A., JOHNSON, E. M., *et al.* Comparison of E-test and broth microdilution methods for antifungal drug susceptibility testing of molds *J Clin Microbiol* (1999) **37**(5): 1480-3.
59. WALSH, T. J., GROLL, A., *et al.* Infections due to emerging and uncommon medically important fungal pathogens *Clin Microbiol Infect* (2004) **10 Suppl 1**: 48-66.
60. WELSH, O., VERA-CABRERA, L., *et al.* Onychomycosis *Clin Dermatol* (2010) **28**(2): 151-9.
61. WINGARD, J. R., MERZ, W. G., *et al.* Increase in Candida krusei infection among patients with bone marrow transplantation and neutropenia treated prophylactically with fluconazole *N Engl J Med* (1991) **325**(18): 1274-7.
62. WOODFORD, N., WARD, M. E., *et al.* Community and hospital spread of Escherichia coli producing CTX-M extended-spectrum beta-lactamases in the UK *J Antimicrob Chemother* (2004) **54**(4): 735-43.
63. ZAIAS, N. and REBELL, G. Clinical and mycological status of the Trichophyton mentagrophytes (interdigitale) syndrome of chronic dermatophytosis of the skin and nails *Int J Dermatol* (2003) **42**(10): 779-88.

WWW.WHO.INT, dostupné z:

<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs194/en/index.html>,

posl. úprava 10.4.2011, citováno 15.4.2011