

UNIVERZITA KARLOVA

FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

KATEDRA BIOLOGICKÝCH A LÉKAŘSKÝCH VĚD



DIPLOMOVÁ PRÁCE

In vitro screening nových, potenciálně antibakteriálně účinných sloučenin III

Bc. Marcela Vízková

Vedoucí diplomové práce: PharmDr. Ondřej Jand'ourek, Ph.D.

HRADEC KRÁLOVÉ, 2020

Poděkování

Ráda bych poděkovala panu PharmDr. Ondřeji Jandourkovi, Ph.D. za cenné rady, věcné připomínky, ochotu a vstřícnost při psaní diplomové práce. Dále bych chtěla poděkovat paní laborantce Idě Dufkové za ochotu, pomoc a odborný dohled při experimentální části diplomové práce.

„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci jsou řádně citovány. Práce nebyla použita k získání jiného nebo stejného titulu.“

V Hradci Králové dne: 27. 4. 2020

Podpis: 

OBSAH

ABSTRAKT.....	7
ABSTRACT.....	8
1. ÚVOD.....	9
2. ZADÁNÍ – CÍL PRÁCE	11
3. BAKTERIE	12
4. HISTORIE ANTIBIOTIK	14
5. ANTIBIOTICKÁ POLITIKA	16
5.1 Antibiotická politika v České republice.....	16
5.2 Antibiotická politika ve světě.....	17
5.3 Antibiotický stewardship	19
6. Antibiotická terapie	20
6.1 Nežádoucí účinky.....	21
7. ROZDĚLENÍ ANTIBIOTIK	22
7.1 Rozdělení dle chemické struktury	23
7.1.1 β -laktamová antibiotika.....	23
7.1.2 Aminoglykosidová antibiotika.....	29
7.1.3 Tetracykliny	30
7.1.4 Amfenikoly.....	31
7.1.5 Makrolidy	32
7.1.6 Glykopeptidová antibiotika.....	33
7.1.7 Fosfomycin	33
7.1.8 Nitrofurany a nitroimidazoly	34
7.1.9 Chinolony.....	35
7.1.10 Sulfonamidy.....	36
7.1.11 Linkosamidy.....	36
7.1.12 Cyklické lipopeptidy.....	37
7.1.13 Ansamyciny.....	38

7.2	Rozdělení dle mechanismu účinku	38
7.2.1	Mechanismus účinku u vybrané skupiny antibiotik	39
7.3	NOVÉ TRENDY	46
7.3.1	Oritavancin, dalbavancin	47
7.3.2	Tedizolid	48
7.3.3	Plazomicin.....	49
7.3.4	Solithromycin.....	50
7.4	Registrace nového antibiotika	51
8.	REZISTENCE	53
8.1	Primární rezistence.....	53
8.2	Sekundární rezistence	54
8.3	Genetický přenos rezistence	56
8.4	Multirezistence.....	56
8.5	MRSA.....	57
8.6	Situace v Evropě	57
9.	TESTY HODNOCENÍ ANTIMIKROBIÁLNÍ AKTIVITY	59
9.1	Diskový difúzní test	59
9.2	Mikrodiluční bujónová metoda	60
9.3	E-test	61
9.4	Testování kombinace antibiotik	62
9.5	Průkaz β -laktamáz	63
10.	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	65
10.1	Testované látky	65
10.2	Testované kmeny	75
10.3	Standardy antibiotik	84
10.4	Pomůcky.....	85
10.5	Postup práce	86
11.	VÝSLEDKY.....	89
11.1	Skupina látek číslo 1	89
11.2	Skupina látek číslo 2	90
11.3	Skupina látek číslo 3	91

12. DISKUSE	97
13. ZÁVĚR	101
14. POUŽITÉ ZKRATKY.....	102
15. SEZNAM TABULEK	104
16. SEZNAM OBRÁZKŮ	105
17. POUŽITÁ LITERATURA.....	106

ABSTRAKT

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra biologických a lékařských věd

Studijní obor: Odborný pracovník v laboratorních metodách

Autor: Bc. Marcela Vízková

Školitel: PharmDr. Ondřej Jandourek, Ph.D.

Název: *In vitro* screening nových, potenciálně antibakteriálně účinných sloučenin III

Od objevu penicilinu se stala antibiotika součástí moderní medicíny. Díky globálnímu šíření rezistence je ale jejich budoucnost nejistá. Je zapotřebí hledat nové antibakteriální látky využitelné v praxi. Jelikož rezistence představuje celosvětovou hrozbu, zabývá se teoretická část touto problematikou. Kromě rezistence jsou v teoretické části také stručně popsána využívaná antibiotika, včetně nových, která byla v nedávné době, případně teprve pravděpodobně budou registrována. U vybraných skupin je podrobněji popsán jejich mechanismus účinku. Pro správnou indikaci antibiotika je třeba stanovení citlivosti. Z tohoto důvodu jsou v teoretické části popsány také metody, kterými lze zjistit kvalitativně nebo i kvantitativně citlivost daného mikroba ke konkrétnímu antibiotiku. Teoretická část neopomíjí ani historii vývoje antibakteriálních látek a seznámení s antibiotickou politikou v České republice.

Tato diplomová práce je založena na testování potenciálně antibakteriálně působících látek a stanovení jejich minimální inhibiční koncentrace pomocí mikrodiluční bujónové metody. Experimentální část uvádí postup práce, včetně charakteristiky testovaných kmenů a informace o testovaných látkách. Celkem bylo testováno 54 látek a aktivita proti některým bakteriím byla zaznamenána u 11 z nich. Citlivosti jednotlivých látek ke konkrétním kmenům jsou zaznamenány ve výsledcích experimentální části této práce.

Klíčová slova: antibiotika, bakterie, rezistence, minimální inhibiční koncentrace, mikrodiluční bujónová metoda.

ABSTRACT

Charles University

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Biological and Medical Sciences

Study program: Specialist on Laboratory Methods

Autor: Bc. Marcela Vízková

Supervisor: PharmDr. Ondřej Jand'ourek, Ph.D.

Title: *In vitro* screening of novel potentially active antibacterial compounds III

Since the discovery of penicillin, antibiotics have become part of modern therapeutic approaches. But the global spread of resistance makes their future uncertain. It is necessary to find new antibacterial substances useful in practice. As resistance is a global threat, the theoretical part deals with this issue. In addition to resistance, the theoretical part also briefly describes the antibiotics used, including new antibiotics, which were recently registered or likely to be registered. For selected groups, their mechanism of action is described in detail. Sensitivity should be determined to correctly indicate the antibiotic treatment. For this reason, the theoretical part also describes methods by which the sensitivity of a microbe to an antibiotic can be determined qualitatively or quantitatively. The theoretical part does not neglect the history of the development of antibacterial substances and familiarization with antibiotic policy in the Czech Republic.

This diploma thesis is based on screening of potentially antibacterial compounds and determination of their minimum inhibitory concentration using the microdilution broth method. The experimental part describes the procedure of the work, including the characteristics of tested strains and information about the tested substances. A total of 54 substances were tested and activity against some bacteria was recorded for 11 of them. Sensitivity of strains to these compounds are recorded in the results of the experimental part of this work.

Key words: antibiotics, bacteria, resistance, minimum inhibitory concentration, microdilution broth method.

1. ÚVOD

Antibiotika představují velkou skupinu látek využívanou k léčbě infekcí vyvolaných bakteriálními původci. První antibiotika byla zavedena do praxe ve 30. letech minulého století a znamenala pro medicínu velký posun. Možná právě i tak velký pokrok, jako bylo objevení antibiotik, vyvolal v lidech pocit, že infekční choroby byly poraženy a stanou se minulostí. Antibiotika se předepisovala ve velké míře na různé infekce s názorem, že pokud nemocnému nepomohou, tak ale ani neuškodí. Což se bohužel v průběhu času ukázalo jako mylné. I v dnešní době, kdy již známe rizika rezistence, je spotřeba antibiotik nadměrná a neadekvátní. Je to dáno tím, že někdy dochází k předepsání léčiva na jinou než bakteriální infekci. V takovém případě je ale antibiotikum naprosto zbytečné a neúčinné. Nesprávná indikace antibiotika s sebou přináší nejen riziko nežádoucích účinků, lékových interakcí, ale také velké riziko vzniku, rozvoje a šíření rezistence. V poslední dekádě se ve vědecké i lékařské komunitě objevuje strach ze vzniku a rychlého rozšíření rezistence na stávající, ale i nejnovější antibiotika. S rostoucím výskytem rezistence dochází k tomu, že u některých pacientů není možné najít antibiotikum, které by jim pomohlo. Každý rok zemře v evropských zemích přibližně 25 tisíc osob v důsledku infekce vyvolané rezistentními bakteriemi. Pro představu aktuálního výskytu rezistentních kmenů je zde uvedena tabulka **1**. V tabulce je procentuálně vyjádřen výskyt vybraných rezistentních kmenů ke konkrétním antibiotikům v jednotlivých státech v roce 2018. (Slíva, 2015; Rolain, 2016; Lochmann, 2006)

Tabulka 1 Výskyt vybraných rezistentních bakterií ke konkrétním antibiotikům v jednotlivých evropských zemích.

Kmen (antibiotikum)	Země						
	ČR	NOR	ITA	UK	SP	GR	POL
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (karbapenemy)	0,3 %	0,1 %	26,8 %	0,7 %	3,8 %	63,9 %	8,1 %
<i>Acinetobacter spp.</i> (aminoglykosidy)	22,0 %	0 %	77,0 %	5,1 %	49,4 %	81,6 %	67,4 %
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (karbapenemy)	18,0 %	4,8 %	15,8 %	6,0 %	18,6 %	37,5 %	33,2 %
<i>Escherichia coli</i> (cefalosporiny 3. generace)	15,2 %	6,8 %	28,7 %	11,0 %	13,8 %	19,3 %	17,6 %
<i>Streptococcus pneumoniae</i> (peniciliny)	0,5 %	0,4 %	2,8 %	1,3 %	18,1 %	-	2,3 %
<i>Enterococcus faecium</i> (aminopeniciliny)	95,3 %	75,3 %	86,7 %	91,5 %	87,3 %	90,5 %	96,1 %

ČR – Česká republika, NOR – Norsko, ITA-Itálie, UK-Velká Británie, SP – Španělsko, GR – Řecko, POL – Polsko.

Zdroj: <https://atlas.ecdc.europa.eu/public/index.aspx>

2. ZADÁNÍ – CÍL PRÁCE

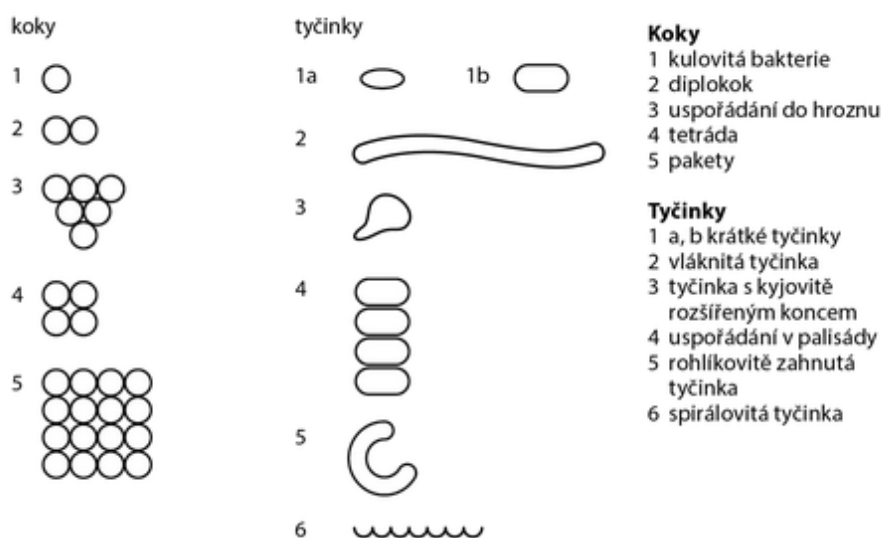
Jak již bylo zmíněno, rezistence je celosvětovým problémem. Se vzrůstajícím počtem rezistentních kmenů je i vyšší snaha o vývoj nových léků, účinných na rezistentní kmeny.

Náplní této práce je *in vitro* testování antibiotické aktivity potenciálně antibakteriálních látek a stanovení jejich minimální inhibiční koncentrace (MIC). Aktivita i MIC jsou stanovovány mikrodiluční bujónovou metodou na základě standardů EUCAST. K testování jsou využívány standardní kmeny bakterií zakoupené z České sbírky mikroorganismů v Brně či z německé sbírky Deutsche Sammlung der Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig, Německo. Testované látky byly do laboratoře dodány paní Dr. Kučerovou a panem Dr. Juhásem z katedry Farmaceutické chemie a Farmaceutické analýzy Farmaceutické fakulty Univerzity Karlovy.

V případě prokázání jejich citlivosti se předpokládá, že by studie těchto látek pokračovala. Sledoval by se vztah mezi strukturou a aktivitou. Tato nová zjištění by mohla přispět k vývoji dalších nových účinných látek.

3. BAKTERIE

Bakterie jsou jednobuněčné organismy patřící mezi prokaryota. Jedná se o velmi malé organismy různých tvarů. Jednotlivé tvary a uspořádání jsou zobrazené na obrázku 1.

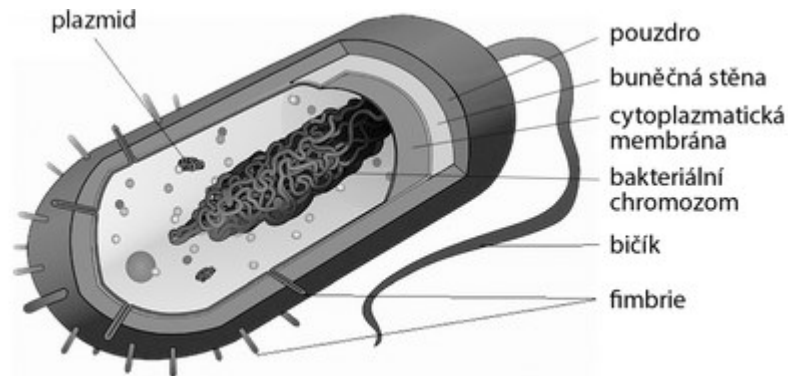


Obrázek 1 Tvary a uspořádání bakterií.

Zdroj: Drnková, 2019

Velikost bakterií je v řádu mikrometrů a lze je sledovat ve světelném mikroskopu. Nemají klasické jádro oddělené membránou, ale nukleoid tvořený kruhovou DNA. Jedinou jejich membránou je membrána cytoplazmatická. V cytoplazmě můžeme nalézt extrachromozomální DNA ve formě plazmidů nebo transpozonů. Plazmidy ani transpozony nepředstavují pro bakterie životně důležitou funkci, ale mohou je v některých případech zvýhodňovat. Mohou nést informaci o produkci toxinů nebo rezistenci na antibiotika. Většina buněčných organel, kromě ribozomů, nacházejících se v eukaryotních buňkách, jim chybí. Bakteriální ribozomy mají od eukaryotních odlišnou strukturu. Plazmatická membrána je semipermeabilní. Typická pro bakterie je buněčná stěna. Představuje pro ně mechanickou a osmotickou bariéru. Složení buněčné stěny se liší a díky těmto rozdílům rozlišujeme 3 skupiny bakterií – grampozitivní, gramnegativní a acidorezistentní. Bakteriální stěna grampozitivních bakterií je tvořena větším množstvím peptidoglykanu, kyselinou teichoovou a je silnější a pevnější. U gramnegativních najdeme v buněčné stěně lipopolysacharidy. Tyto dvě skupiny se

barví dle Grama, což umožňuje jejich rozdělení. Grampozitivní se barví modře, gramnegativní naopak červeně. Acidorezistentní bakterie mají nepropustný povrch pro Gramovo barvení, proto se barví dle Ziehl-Neelsena. Významným zástupcem jejich bakteriální stěny je kyselina mykolová. U některých bakterií se také můžeme setkat s pouzdem, bičíky nebo fimbriemi. Stavba bakteriální buňky je znázorněna na obrázku 2. (Julák, 2006; Peutherer, 1999; Buchta, 1998; Drnková, 2019)



Obrázek 2 Stavba bakteriální buňky.

Zdroj: Drnková, 2019

Na lidském těle lze odhadem nalézt až 10^{14} bakterií. Jejich složení a množství záleží na věku, potravě, místě osídlení, ale také okolním prostředí. Tyto bakterie žijící přirozeně na těle člověka představují fyziologickou flóru. Nejbohatší osídlení je v trávicím traktu. Některé z bakterií fyziologické flóry člověka mohou představovat potenciální patogeny. V případě oslabení jedince pak stojí za propuknutím infekce. Potenciálním patogenem na lidském těle může být například *Staphylococcus aureus* (SA) nebo *Neisseria meningitidis*. (Drnková, 2019)

4. HISTORIE ANTIBIOTIK

Infekce již dlouhou dobu představují jednu z hlavních příčin úmrtí lidí na světě. Po tisíce let byli lidé bezmocně vystavováni infekcím, které stály životy milionů lidí. Během 19. století představovala onemocnění jako je tuberkulóza, záškrta a další hlavní příčinu úmrtí jak dětí, tak dospělých. Teprve ke konci 19. století docházelo zejména vlivem lepší hygieny ke snížení úmrtnosti na některá infekční onemocnění. Od zavedení prvních antimikrobních látek na počátku 20. století se úmrtnost na tato onemocnění snížila ještě víc. Příkladem může být úmrtnost po operacích. Před zavedením antibiotik umíralo až 40 % osob po operacích na postoperační infekce. S příchodem antibiotik to byly už jen 2 %. (Zaffiri, 2012; Mohr, 2016)

Jako první si význam selektivního antibakteriálního účinku uvědomil lékař a chemik Paul Ehrlich. Po dlouhém zkoumání sloučenin arsenu objevil v roce 1910 za pomoci svého žáka arsfenamin. Arsfenamin byl přípravek využívaný v té době k léčbě velice rozšířené syfilidy a trypanozomiázy, a tak se pod obchodním jménem Salvarsan stal prvním moderním antibakteriálním lékem. Do této doby se využívaly neselektivní, málo účinné a také velmi toxické medikamenty. Jejich základ byl tvořen zejména sloučeninami síry, rtuti či arsenu. Podobný princip jako Ehrlich využil také německý lékař Gerhard Domagk, který objevil ještě účinnější přípravek, a to Prontosil, který byl do té doby využíván jako textilní barvivo. To, že objevil základ pozdějších sulfonamidů, bylo zjištěno až později. (Beneš, 2018; Zaffiri, 2012)

S antibiotiky je v běžné populaci spojován zejména Alexandr Fleming, který při studiu antimikrobních vlastností lysozymu objevil v roce 1928 náhodou plíseň produkující látky, které ničily mikroby v okolí. Jeho objev otevřel cestu pro začínající éru antibiotik. Sám Fleming nebyl ale schopný objasnit strukturu penicilinu ani ho syntetizovat ve velkém množství.

Teprve v roce 1939 skupina vědců v čele s Howardem Floreyem a Ernstem Chainem na základě objevů Alexandra Fleminga dokázala objasnit strukturu penicilinu a připravit první celkově použitelný antibakteriální lék. Jejich objev vedl k hromadné produkci a distribuci penicilinu, která začala v roce 1945. Tento počín vedl k intenzivnímu hledání dalších, podobně působících látek a všechny tyto látky dostaly

souhrnný název antibiotika. Tento název zavedl v roce 1947 americký mikrobiolog Selman Abraham Waksman, též objevitel streptomycinu. (Clardy, 2009; Aminov, 2010)

Jelikož tato antibiotika byla mnohonásobně účinnější než původně chemicky připravované sulfonamidy, platilo přibližně do poloviny 70. let minulého století rozdělení na chemické antibakteriální sloučeniny (chemoterapeutika) a přírodní antibakteriální látky (antibiotika). Postupně bylo od tohoto dělení upouštěno, protože se začaly vyvíjet semisyntetické přípravky, a tím se dříve striktní hranice mezi těmito skupinami začala prolínat. (Beneš, 2018)

V současnosti se využívá pokroku v technice a při hledání nových antibakteriálních látek se uplatňují algoritmická řešení pro predikci molekulárních vlastností k identifikaci nových tříd antibiotik. Už v minulosti byly vyvinuty modely, které predikovaly molekulární vlastnosti. Jejich přesnost a množství dat, z kterých vycházely, nebylo dostatečné, a proto byly velmi nepřesné. Příkladem úspěchu těchto metod je objevení antibakteriálních vlastností halicinu. Vědci k tomuto objevu došli díky svému algoritmu vyhledávajícímu antibakteriální látky a velkému množství vložených dat o antibakteriálních molekulách. Dle zatím proběhlých preklinických studií se halicin jeví jako slibné, širokospektré baktericidní antibiotikum. (Stokes, 2020; Torres, 2019)

5. ANTIBIOTICKÁ POLITIKA

Antibiotická politika spočívá v tvorbě strategií pro optimalizaci indikace, výběru, dávkování, cesty podání, trvání a načasování antibiotické terapie. Je to také snaha, aby se co nejvíce zvyšovalo klinické vyléčení, ale také míra prevence a omezily se tak nezamýšlené důsledky užívání, včetně toxicity a rezistence. Dalším cílem antibiotické politiky je snížit náklady na zdravotní péči v takovém rozsahu, aby nedocházelo k nepříznivému ovlivnění kvality péče. Smyslem všech těchto aktivit je zachování účinnosti antimikrobních látek. (De Man, 2000)

Existuje jasná souvislost mezi užíváním antibiotik a rezistencí jak na úrovni jednotlivce, tak i populace. V Evropské unii mají země s vyšší spotřebou antibiotik i vyšší míru rezistence, která vede k selhání léčby, ale také k prodlouženým hospitalizacím, úmrtím a s tím i spojeným zvyšováním nákladů. Vzhledem k rozdílným podmínkám v jednotlivých zemích, je nezbytné, aby každá země formulovala svoji vlastní antibiotickou politiku. Jednotlivé národní kampaně mohou pomoci zvýšit informovanost občanů o problému rezistence a poučit je o správném užívání antibiotik. Správným zacházením se rozumí omezení použití na nezbytné situace a také omezení profylaktického využití. Opakování takových kampaní zvyšuje jejich účinnost. (www.sukl.cz; Pražský, 2013)

5.1 Antibiotická politika v České republice

V posledních letech došlo k výraznému vzestupu rezistence některých původců infekcí až o desítky procent. Tento nebezpečný trend se netýká jen České republiky, ale většiny evropských zemí. V České republice je ale situace u některých mikrobů jedna z nejhorších v Evropě. Studie provedené v České republice prokázaly vysoký podíl neadekvátního použití antibiotik jak v primární, tak v ambulantní i nemocniční péči. I proto byl 9. června 2009 ustanoven komplexní, mezioborový a mezisektorový Národní antibiotický program (NAP). Cílem NAP je zajistit dostupnou, účinnou, bezpečnou a také nákladově efektivní antibiotickou léčbu. Nevhodná preskripce antibiotik představuje dle Ministerstva zdravotnictví České republiky náklady ve výši 1-1,5 miliardy Kč. Základním principem, který NAP využívá, je koordinace činností mezi humánním a veterinárním zdravotnictvím a všemi dalšími zapojenými subjekty, jako je

například státní správa, státní zdravotnické a veterinární organizace, profesní organizace, plátcí zdravotní péče a další. Mezi hlavní organizační složky NAP se řadí centrální a regionální koordinační skupiny, antibiotická střediska, veterinární antibiotická střediska, subkomise pro antibiotickou politiku a národní referenční laboratoř pro antibiotika. (www.szu.cz; www.mzcr.cz)

Centrální koordinační jednotka NAP sestavuje akční plány (AP), které určují priority pro období 2 až 4 let. Do přípravy AP se ale zapojují i další organizace jako například Státní ústav pro kontrolu léčiv. Součástí těchto AP je i zabezpečení jejich realizace z legislativního, finančního, personálního i technického hlediska. Schválení akčního plánu je v kompetenci Ministerstva zdravotnictví ve spolupráci s Ministerstvem zemědělství. Na realizaci těchto plánů se kromě centrální koordinační skupiny podílí také regionální koordinační skupina a antibiotická střediska. (www.szu.cz; www.mzcr.cz)

V České republice se můžeme také setkat se seznamem esenciálních antiinfektiv (SEAI). Tento seznam je vypracovaný s ohledem na stav rezistence, spektrum a etiologii infekcí. SEAI byl prvně zveřejněn roku 2009 ve Věstníku Ministerstva zdravotnictví. Od té doby dochází k jeho pravidelné aktualizaci. Cílem SEAI je zajistit dlouhodobou dostupnost citlivých antibiotik. Studie ukazují, že země, které se řídí takto vypracovanými seznamy, mají menší spotřebu antibiotik. (Vrablík, 2019)

5.2 Antibiotická politika ve světě

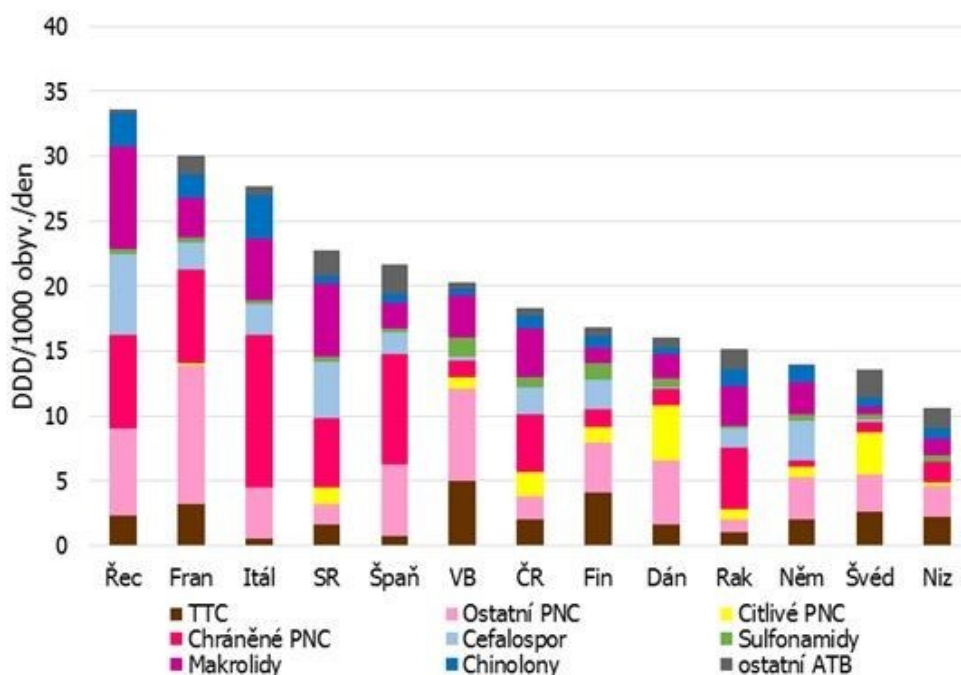
Problém rezistence se týká celého světa, proto je třeba, aby i nadnárodní orgány definovaly svoji antibiotickou politiku, případně vydávaly alespoň potřebná doporučení.

Celosvětovou organizací zabývající se antibiotickou politikou je Světová zdravotnická organizace (WHO). V roce 2001 WHO zahájila celosvětovou strategii proti rozvoji rezistence. Tuto strategii podrobně popisuje dokument s názvem „Global strategy for Containment of Antimicrobial Resistance“. WHO také vydává seznam antibiotik, který napomáhá státům s výběrem nejvhodnějších antibiotik pro primární terapii. Na tento seznam navazuje v České republice již zmíněný SEAI. U států, které

dodržují tato doporučení od WHO, je spotřeba antibiotik nižší než u států, které tyto postupy nerespektují. (www.who.int; Pražský,2013)

I když se i v rámci Evropské unie liší mezi jednotlivými státy míra rezistence, zakládá každý členský stát svoji antibiotickou politiku na stejném evropském principu, který je popsán v doporučení o opatrném používání antimikrobních látek v humánní medicíně. Hlavní evropskou institucí v oblasti sledování antibiotické léčby je Evropské středisko pro prevenci a kontrolu nemocí (ECDC). ECDC koordinuje a financuje evropskou síť národních kontrolních systémů. Další významnou složkou evropské antibiotické politiky je Evropský úřad pro bezpečnost potravin (EFSA), který informuje o rizicích šíření a možnosti přenosu rezistentních mikrobů prostřednictvím potravin. (Marieke, 2011)

Následující obrázek 3 prezentuje rozdíly v užívání antibiotik mezi jednotlivými státy Evropské unie. Mezi státy se liší i struktura užívaných léčiv. Tyto rozdíly se projevují i v počtu rezistentních kmenů. V zemích jako je například Řecko, Itálie nebo Španělsko je vyšší výskyt rezistentních bakterií, což koreluje se spotřebou antibiotik. (www.sukl.cz)



Obrázek 3 Spotřeba a struktura antibiotik v některých zemích EU.

TTC – tetracykliny, PNC – peniciliny, ATB - antibiotika

Zdroj: Antibiotická politika ČR, www.sukl.cz

Některé státy si s nadužíváním antibiotik dokážou poradit lépe než jiné, jak ukazuje obrázek 3. Příkladem je Švédsko, kde existuje program s názvem STRAMA. Díky tomuto programu spolu se systematickou podporou vlády se daří kontrolovat nadužívání antibiotik, a i proto zaujímá Švédsko ve spotřebě antibiotik jedno z posledních míst. (Vrablík, 2019)

5.3 Antibiotický stewardship

Antibiotický stewardship (ABS) se stává čím dál tím více využívaným pojmem, a to jak na úrovni primární nebo nemocniční péče, tak také na globální úrovni. Poprvé se tento pojem objevil v roce 1996 v odborném článku. Tento článek upozorňoval na správný přístup k antibiotikům. Antibiotika označil jako vzácný neobnovitelný přírodní zdroj a v této souvislosti využil pojem stewardship, který je dnes již běžně využíván. (Adámková, 2019)

Antibiotický stewardship není konkrétně definován. Jedná se o obecný soubor postupů, které vedou ke správnému užívání antibiotik takovým způsobem, že léčba i nadále zůstane efektivní pro další osoby, které ji budou potřebovat. ABS sleduje správné chování lékařů, sester, samotných pacientů, ale také zemědělců, farmaceutických firem i vlády. Zaměřuje se na zamezení nevhodného používání antibiotik. ABS doplňuje stávající pokyny a standardy od zdravotnických organizací. (Adámková, 2019)

6. ANTIBIOTICKÁ TERAPIE

U antibiotické léčby rozlišujeme 3 typy terapie, a to empirickou, úvodní a cílenou. U empirické terapie se setkáváme s velmi obecnými kritérii pro volbu antibiotika. Před zahájením léčby není provedeno mikrobiologické vyšetření, neznáme tedy původce infekce. Tato terapie se využívá v případech, kdy nelze získat vhodný biologický materiál. Příkladem může být sinusitida. Také může být indikována v situaci, kdy lékař nepokládá mikrobiologické vyšetření za nutné. Klinické příznaky jsou v tomto případě naprosto prokazatelné. Velmi často se tak děje u běžných komunitních infekcí. V dnešní době, kdy je laboratoř schopna prokázat původce a výsledky dodat velmi rychle a spolehlivě, se od této terapie upouští. A to zejména proto, že není v souladu s národní antibiotickou politikou a představuje riziko rozvoje rezistentních kmenů bakterií.

Dalším typem je terapie úvodní, někdy také označována jako iniciální. Některé infekce vyžadují neodkladné zahájení léčby, proto je pacientovi podáno antibiotikum na základě nejvyšší pravděpodobnosti bakterie způsobující danou infekci a její běžné citlivosti. Spolu s neodkladnou indikací antibiotika dochází k odběru biologického materiálu pro mikrobiologické vyšetření. Dle výsledků mikrobiologického vyšetření pak dojde, pokud je třeba, ke změně indikovaného antibiotika. Podstatou této léčby je co nejrychlejší zahájení terapie a zároveň v co nejkratší době přechod na léčbu cílenou.

Terapie cílená představuje z epidemiologického pohledu nejideálnější formu léčby. Bohužel ne vždy ji lze aplikovat. Tuto léčbu volíme až po identifikaci bakterie a zjištění její citlivosti k antimikrobním látkám. Jedná se o terapii vysoce účinnou a klinicky bezpečnou. Její nevýhodou jsou však vyšší náklady. (Vrablík, 2019; Hynie, 2003)

V některých případech se můžeme setkat se současným podáváním více antimikrobních látek. Touto kombinací lze docílit rozšíření spektra účinku, zvýšení účinnosti, zpomalení nebo úplnému omezení vývoje rezistence, obnovení účinku některého antibiotika nebo snížení nežádoucích účinků, což je dáno snížením potřebných dávek antibiotika. Tato kombinovaná terapie by měla být indikována až po odborném zhodnocení, jelikož může pro pacienta přinést i spoustu nežádoucích účinků, jako je dysmikrobie, případně výskyt superinfekce. Indikace by měla vždy

proběhnout na základně vyšetření citlivosti mikroba a po poradě s antibiotickým střediskem daného zařízení.

Antibiotika nejsou podávána pouze při infekcích. Existuje profylaktická léčba, kdy je antimikrobní látka podávána jako ochrana před možnou infekcí. Indikací pro tuto léčbu je vysoké riziko infekce, případně nemocný člověk, pro kterého by mohla mít daná infekce vážné následky. Často se s profylaktickým podáním setkáváme po operačních výkonech. (Hynie, 2003; Adámková, 2015)

6.1 Nežádoucí účinky

Při léčbě antibiotiky se kromě jejich antibakteriálního účinku můžeme setkat i s jejich nežádoucími vlivy. Běžně se nežádoucí účinky rozdělují do několika tříd, a to konkrétně na toxické, alergické, biologické a účinky vycházející z rezistence. Z toxických účinků antibiotik se lze setkat s neurotoxicitou, hepatotoxicitou, nefrotoxicitou či ototoxicitou. Toxický vliv mohou mít antibiotika také na kostní dřeň a gastrointestinální trakt. Nejčastěji vznikají po podání vysoké dávky.

Za poměrně běžné nežádoucí účinky se považují alergické reakce, se kterými se setkáme zejména při léčbě peniciliny nebo cefalosporiny, ale mohou se vyskytnout po podání jakéhokoliv antibiotika.

Do skupiny biologických nežádoucích účinků bychom mohli zařadit ovlivnění normální mikroflóry. Antibiotika narušují fyziologickou mikroflóru dutiny ústní, střeva a vagíny. Problém představuje zejména porušení střevní mikroflóry, což může vést k závažným gastrointestinálním dysfunkcím. Ve většině případů se jedná o nevolnost, průjem, zácpu a různé střevní diskomforty, u kterých není třeba vysazovat nebo upravovat léčbu antibiotiky. Po ukončení léčby a podávání probiotik by mělo dojít k vymizení těchto příznaků. Někdy ale může dojít i k závažnějším projevům. Za nejzávažnějšího původce postantibiotických průjmů je označována bakterie *Clostridium difficile*. Tato bakterie se v lidském organismu vyskytuje běžně, ale po podání antibiotik, kdy dojde k vyhubení velké části střevní mikroflóry, může dojít k jejímu přemnožení a produkci nebezpečných toxinů, což může vést až ke vzniku pseudomembranózní kolitidy. V tomto případě je nutné antibiotikum vysadit, případně zaměnit za jiné. (Votava, 2010; Lochmann, 2006; Taušová, 2019; Urbánek, 2003)

7. ROZDĚLENÍ ANTIBIOTIK

V klinické praxi je možné použít celou řadu antibiotik. Antibiotika mohou být rozdělena do různých skupin.

Jedním z rozdělení je klasifikace podle způsobu přípravy, a to na přirozená, semisyntetická a syntetická. Přirozená antibiotika jsou produkována přímo příslušnými mikroorganismy. Semisyntetická jsou připravována chemickou obměnou molekuly přirozeného antibiotika a syntetická pouze chemickou syntézou. Dříve byl pro antibiotika vytvořená chemickou syntézou využíván pojem chemoterapeutika. Od tohoto termínu se již dnes opouští, jelikož většina antibiotik při výrobě prošla alespoň částečnou chemickou obměnou.

Další možnost rozdělení je dle způsobu účinku na bakteriostatická a baktericidní. Bakteriostatická antibiotika inhibují růst bakterie na rozdíl od baktericidních, která bakterii usmrcují. Rozdělení vybraných antibiotik na bakteriostatická a baktericidní uvádí tabulka 2. Některá bakteriostatická antibiotika ale mohou ve vyšších koncentracích působit baktericidně, například chloramfenikol, a naopak některá baktericidní zase neusmrcují konkrétní bakterie ani ve vysokých koncentracích, a proto takto striktní rozdělení na bakteriostatická a baktericidní není zcela přesné.

Tabulka 2 Příklady některých baktericidně a bakteriostaticky působících antimikrobních látek.

Baktericidní	Bakteriostatická
Peniciliny	Chloramfenikol
Cefalosporiny	Tetracykliny
Karbapenemy	Makrolidy
Aminoglykosidy	Linkosamidy
Peptidy	Sulfonamidy
Nitrofurany	Imidazoly

Zdroj: Lochmanová, 2008

Antibiotika můžeme také klasifikovat dle místa svého účinku. Zde rozlišujeme dvě skupiny. První jsou celková antibiotika, která jsou podávána perorální či parenterální cestou. A druhá jsou antibiotika místní, která jsou podávána lokálně. Mezi místní antibiotika se řadí například neomycin nebo bacitracin. (Lochmannová, 2008; Simon, 1998).

Antibiotika, která působí pouze na určité původce, například pouze na stafylokoky, můžeme nazvat jako antistafylokoková. Toto označení vede k možnosti dalšího rozdělení dle původce, na kterého působí. Vznikají tak skupiny již zmíněných antistafylokokových antibiotik, ale také třeba antipseudomonádová, antistreptokoková antibiotika a další. S tímto rozdělením je spojeno i rozdělení na úzkospektrá a širokospektrá antibiotika. Spektrum účinku představuje soubor bakterií, na které dané antibiotikum působí. Toto spektrum může být úzké, střední nebo široké. Čím širší spektrum dané antibiotikum má, tím více druhů bakterií je schopno zneškodnit. Velikost spektra určuje, zda je antibiotikum širokospektré nebo úzkospektré. Mezi úzkospektrá antibiotika patří například antituberkulotika. Skupiny antibiotik se středním spektrem účinku působí například na všechny grampozitivní nebo gramnegativní bakterie. Do širokospektrých můžeme zařadit tetracykliny nebo cefalosporiny, v jejichž spektru účinku najdeme velké množství bakterií ze skupiny grampozitivních i gramnegativních bakterií. (Simon, 1998; Drnková, 2019; Votava, 2010)

7.1 Rozdělení dle chemické struktury

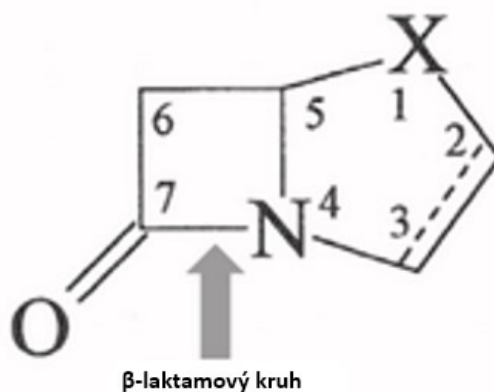
Z praktického hlediska se zdá být rozdělení dle chemické struktury jako nejjednodušší, jelikož antibiotika s podobnou chemickou strukturou mívají stejné spektrum účinnosti, zkříženou rezistenci a také podobný výskyt nežádoucích účinků, proto jim je zde věnovaná samostatná kapitola.

7.1.1 β -laktamová antibiotika

β -laktamová antibiotika jsou nejpoužívanější skupinou, do které řadíme peniciliny, cefalosporiny, karbapenemy, monobaktamy a inhibitory β -laktamázy. Jsou to

baktericidní antibiotika a dle mechanismu účinku jsou řazena do skupiny inhibitorů syntézy buněčné stěny bakterií. (Bush, 2016)

Mezi společnou vlastnost této skupiny patří β -laktamový kruh, který existuje buď samostatně nebo je připojen k další kruhové formaci. Na obrázku 4 je zobrazena základní struktura některých β -laktamů s vyznačeným β -laktamovým kruhem. (Švihovec, 2018)



Obrázek 4 Struktura β -laktamového kruhu.

Zdroj: Švihovec, 2018

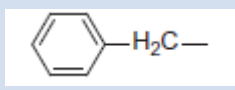
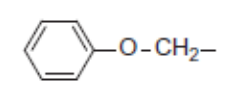
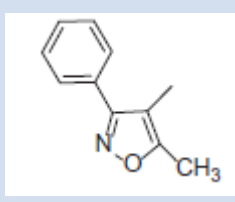
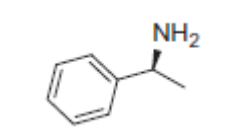
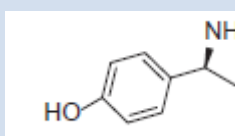
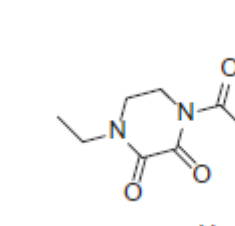
Jejich mechanismus účinku je založen na inaktivaci enzymů, které využívají bakterie pro výstavbu své buněčné stěny. Konkrétními zasaženými enzymy jsou bakteriální transpeptidázy, DD-peptidázy, které vytvářejí a formují peptidoglykan spojováním postranních peptidových řetězců. Na konci těchto peptidových řetězců je D-alanin-D-alanin, který β -laktamy napodobují a působí tedy jako falešné substráty pro bakteriální DD-peptidázy. DD-peptidázy bývají také označovány jako proteiny vázající penicilin (PBPs). (Beneš, 2018)

7.1.1.1 Peniciliny

Peniciliny jsou nejznámější antibiotika a lze je také považovat za nejstarší. Jsou využívány k léčbě zejména závažných a rychle probíhajících pyogenních infekcí. Jejich β -laktamový kruh je kondenzován s thiazolidinovým kruhem a tvoří derivát 6-aminopenicilanové kyseliny. Na aminoskupinu v pozici 6- tohoto derivátu kyseliny mohou být navázány různé postranní řetězce, které dávají vzniku konkrétním

penicilinovým derivátům. Struktura vybraných postranních řetězců je zobrazena v tabulce 3.

Tabulka 3 Přehled nejdůležitějších penicilinových antibiotik a struktura jejich postranního řetězce.

Antibiotikum	Struktura postranního řetězce
Penicilin G (benzylpenicilin)	
Penicilin V	
Oxacilin	
Ampicilin	
Amoxicilin	
Piperacilin	

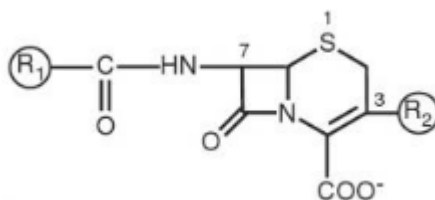
Zdroj: Beneš, 2018; Bush, 2016

Peniciliny jsou považovány za poměrně netoxická antibiotika, mohou být tedy podávány jak dětem, gravidním ženám, tak seniorům. Hlavním rizikem při jejich podávání jsou alergické reakce. Většina nežádoucích účinků vymizí po vysazení léků. Po širokospektrých penicilínech může dojít k rozvoji postantibiotické kolitidy. Peniciliny mohou způsobit zesílení účinku warfarinu anebo naopak snížení účinku orálních kontraceptiv. (Beneš, 2018; Švihovec, 2018)

7.1.1.2 Cefalosporiny

V roce 1945 byla z odtoku odpadních vod na Sardinii izolována plíseň *Cephalosporium acremonium*, která produkovala látky s antimikrobní aktivitou, později pojmenované jako cefalosporiny. (Abraham,1987)

Cefalosporiny jsou spolu s peniciliny jedny z nejpoužívanějších antibiotik. Jedná se o deriváty kyseliny 7-aminocefalosporanové. Na obrázku 5 je zobrazena její struktura, substitucí na R1 a R2 vznikají různé deriváty cefalosporinů. (Švihovec, 2018)



Obrázek 5 Základní cefalosporinové jádro.

Zdroj: Bennett, 2015

Existuje několik rozdílů, které by mohly sloužit jako základ pro klasifikaci cefalosporinů do jednotlivých tříd. Nejrozšířenější a nejvyužívanější klasifikace zahrnuje čtyři až pět generací, do kterých jsou cefalosporiny řazeny na základě jejich antimikrobiálního spektra aktivity. Příklady jednotlivých zástupců cefalosporinů registrovaných v České republice spolu s rozdělením do generací uvádí tabulka 4.

Cefalosporiny první generace vykazují aktivitu zaměřenou především na grampozitivní bakterie a používají se zejména v léčbě infekcí kůže a měkkých tkání a také jako alternativa k penicilinu. Naopak druhá generace má zvýšenou aktivitu proti gramnegativním bacilům, ale zároveň působí i proti grampozitivním kokům. Cefalosporiny druhé generace se podávají při léčbě respiračních a otorinolaryngologických infekcí, ale mohou se využívat i při léčbě zánětů močových cest nebo žlučových cest. Do druhé generace bývá také někdy řazena skupina cefomycinů, která je známá svou aktivitou proti gramnegativním anaerobním bakteriím. Někteří autoři ale považují skupinu cefomycinů za samostatnou podskupinu antibiotik. Třetí generace má výrazně zvýšenou aktivitu proti gramnegativním bacilům, ale jejich účinek na grampozitivní bakterie bývá podstatně nižší než u první a druhé generace. Tato generace je vyhrazena pro léčbu vážných infekcí. Některá

cefalosporinová antibiotika třetí generace, zejména ceftazidim, vykazují významnou aktivitu proti *Pseudomonas aeruginosa*. Čtvrtá generace má nejširší spektrum účinku. Její zástupci vykazují aktivitu proti většině gramnegativních bacilů a zároveň si zachovávají svou účinnost proti grampozitivním kokům. Využívají se jako záložní širokospektrá antibiotika k léčbě závažných infekcí. V některých publikacích se můžeme setkat ještě s pátou generací. Tato generace bývá také někdy díky svému spektru účinku označována jako antistafylokoková. Ceftarolin, patřící do této generace, je jediným cefalosporinem účinným proti meticilin rezistentnímu kmenu *Staphylococcus aureus* (MRSA). (Bennett, 2015)

Tabulka 4 Vybraná cefalosporinová antibiotika registrovaná v ČR.

Cefalosporiny I. generace	Cefalosporiny II. generace	Cefalosporiny III. generace	Cefalosporiny IV. generace	Cefalosporiny V. generace
Cefazolin	Cefuroxim	Cefotaxim	Cefepim	Ceftarolin
Cefadroxil	Cefuroxim- axetil	Cefixim		
	Cefprozil	Ceftazidim		
	Cefoxitin (ze skupiny cefomycinů)	Cefoperazon		

Zdroj: Beneš, 2018

Stejně jako peniciliny, ani cefalosporiny nevykazují žádnou závažnou orgánovou toxicitu. Jejich podávání je spojeno s výskytem alergických reakcí, který je ale menší než u penicilinů. Během léčby se mohou objevovat změny v krevním obraze (eozinofilie, neutropenie) nebo například gastrointestinální obtíže. Lékové interakce se u cefalosporinů vyskytují jen výjimečně. (Jedličková, 2009)

7.1.1.3 Monobaktamy

Monobaktamy se od ostatních β -laktamových antibiotik liší svojí strukturou. Jejich β -laktamový kruh není konjugován s žádnou další kruhovou strukturou. Prvním monobaktamem uvedeným na trh byl aztreonam a je stále jediným využívaným monobaktamem. Působí baktericidně pouze na gramnegativní bakterie. Má tedy podobné spektrum účinku jako některá aminoglykosidová antibiotika (gentamicin, tobramycin). Jeho výhodou ale je, že není nefrotoxický, je slabě imunogenní a není spojován s poruchami koagulace. Podává se intramuskulárně nebo intravenózně, jelikož jeho absorpce po perorálním podání je nedostatečná. Využívá se především při léčbě močových cest, dolních dýchacích cest, gynekologických infekcí, septikémie nebo například při léčbě kožních infekcí. (Brewer, 1991; Bennett, 2015)

7.1.1.4 Karbapenemy

Karbapenemy mají nejširší spektrum aktivity a také největší účinnost proti grampozitivním a gramnegativním bakteriím, představují tedy neúčinnější skupinu β -laktamových antibiotik. Využívají se často jako rezervní antibiotika při léčbě závažných infekcí. Jsou stabilní vůči většině β -laktamáz. Jádro jejich molekuly tvoří β -laktamový kruh spojený s dihydropyrolovým kruhem. (Zhanel, 2007).

Prvním objeveným karbapenemem byl thienamycin. Vzhledem ke své nestabilitě byl modifikován za vzniku karbapenemu nesoucího název imipenem. Později bylo syntetizováno několik dalších karbapenemů. V dnešní době jsou nepoužívanějšími imipenem, meropenem, ertapenem, doripenem.

Nežádoucí účinky jsou spíše nespecifické, jako je bolest hlavy, nauzea, exantém a další. Velmi vzácným nežádoucím účinkem jsou křeče, nejčastěji byly hlášeny po podávání imipenemu. (Papp-Wallace, 2011; Beneš, 2018; Ragnar, 1995).

7.1.1.5 Inhibitory β -laktamáz

Inhibitory β -laktamáz jsou svoji chemickou strukturou podobné penicilinům. Jejich mechanismus spočívá v blokaci bakteriálních inaktivujících enzymů (β -laktamáz), aby nedocházelo k rozkladu β -laktamových antibiotik, což je v dnešní době nárůstu

počtu rezistentních kmenů velice žádoucí. Obnoví se tak účinek penicilinového nebo cefalosporinového antibiotika.

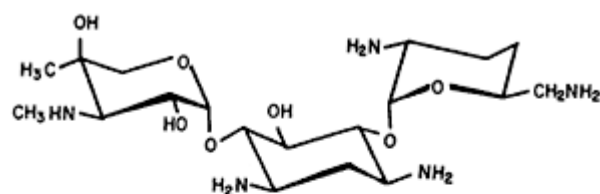
V kombinaci s penicilinovými nebo cefalosporinovými antibiotiky se využívají zejména u infekcí způsobených běžnými patogeny, tvořícími základní β -laktamázy. Hlavní indikace pro podání jsou smíšené infekce způsobené gram pozitivními i gram negativními mikroby a současně i anaeroby. První přípravek, který kombinuje penicilinové antibiotikum amoxicilin a inhibitor β -laktamáz kyselinu klavulanovou, byl uveden na trh v roce 1981 a nesl jméno Augmentin®. V dnešní době máme i další zástupce jako jsou avibaktam, relebaktam, sulbaktam, nebo nový vaborbaktam. Sulbaktam se od ostatních zástupců odlišuje svoji jedinečnou vlastností. Má vlastní antibakteriální účinnost na některé bakteriální druhy. Působí například na bakterii *Acinetobacter baumannii*. A další výhodou je i existence molekuly sultamicilin, která spojuje dvě aktivní látky – ampicilin a sulbaktam. (Drawz, 2010; Penwell, 2015)

Stejně jako u většiny β -laktamových antibiotik jsou jejich nežádoucí účinky hlavně nespecifické. (Beneš, 2018; Bush, 1988)

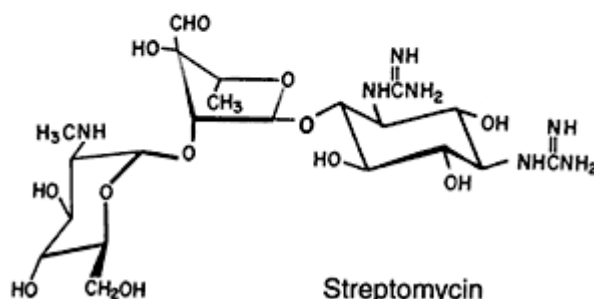
7.1.2 Aminoglykosidová antibiotika

Aminoglykosidy jsou baktericidně působící antibiotika, která byla objevena ve 40. letech 20. století a využívala se jako lék na tuberkulózu a jiné závažné bakteriální infekce. Jejich vedlejší účinky spojené s renální a sluchovou toxicitou způsobily v 70. letech pokles užívání, ale i přesto jsou to dnes jedny z velmi často používaných antibiotik, a to zejména díky kombinaci jejich vysoké účinnosti a nízkých nákladů. Chemická struktura nejvyužívanějších aminoglykosidů gentamicinu a streptomycinu je zobrazena na obrázku 6. (Forge, 2000)

Z chemického hlediska se jedná o cyklický aminopolyalkohol, na který jsou glykosidickou vazbou připojeny jedna nebo dvě molekuly aminocukrů. V případě streptomycinu a neomycinu je do molekuly antibiotika vsazen ještě pentózový kruh. (Beneš, 2018)



Gentamicin



Streptomycin

Obrázek 6 *Struktura gentamicinu a streptomycinu.*

Zdroj: Forge, 2000

Mechanismus jejich účinku spočívá ve vazbě antibiotika na 30S podjednotku ribozomu, kde inhibují proteosyntézu. Poškozují také buněčnou membránu bakterií. Spektrum účinku zahrnuje zejména gramnegativní aerobně rostoucí bakterie a také některé grampozitivní bakterie. Působí zejména na enterobakterie, stafylokoky a pseudomonády. Naopak nepůsobí na anaerobní, metabolicky neaktivní, intracelulární bakterie a ani na bakterie žijící v biofilmu. Aminoglykosidy se široce využívají k léčbě chronických bakteriálních infekcí srdce, plic a močových cest. (Hoffman, 2005; Simon,1998; Beneš, 2018)

Z nežádoucích účinků byla již zmíněna ototoxicita a nefrotoxicita. Kromě těchto dvou závažných komplikací se můžeme setkat například i s neuromuskulární bloádou. Ostatní nežádoucí účinky jsou nespecifické a podobné jako u dalších antibiotik. (Beneš, 2018; Forge,2000)

7.1.3 Tetracykliny

Tetracykliny jsou bakteriostatická, širokospektrá antibiotika objevena v roce 1945 jako produkt půdní bakterie. V dnešní době můžeme rozdělit tetracykliny do tří generací. Jednotlivé zástupce uvádí tabulka 5.

Tabulka 5 Přehled vybraných tetracyklinových antibiotik.

Generace	Antibiotikum
1. generace	tetracyklin
2. generace	doxycyklin, minocyklin
3. generace	omadacyklin, tigecyklin, eravacyklin

Zdroj: Beneš, 2018

Z výše uvedených antibiotik jsou v České republice registrovány pouze doxycyklin, tigecyklin a nově i eravacyklin. (www.mediately.co)

Název tetracyklin je odvozen od jejich jádrové struktury, která je tvořena čtyřmi aromatickými kruhy. Váží se silně, ale reverzibilně na 30S podjednotku ribozomu, čímž narušují translaci proteinů. (Thaker, 2010)

Jelikož se jedná o širokospektrá antibiotika, jejich spektrum účinku je velmi široké, působí jak na grampozitivní, tak gramnegativní bakterie, ale byly využity například i k léčbě infekcí způsobených chlamydiemi, mykoplazmaty nebo boréliemi. (Roberts, 2003; Chopra, 2001)

Mezi nežádoucí účinky při jejich používání patří zejména u dětí poškození zubní skloviny a porucha tvorby růstové chrupavky. Z toho důvodu nelze tetracykliny podávat dětem do 8 let a zároveň těhotným a kojícím ženám. Při užívání se lze také setkat s různými gastrointestinálními obtížemi, dysmikrobií, alergickou reakcí nebo nitrolební hypertenzí. (Beneš, 2018)

7.1.4 Amfenikoly

Hlavním představitelem této skupiny je chloramfenikol, který byl objeven v roce 1947 a v České republice je jediným registrovaným amfenikolem. Amfenikoly jsou bakteriostatická antibiotika s velmi širokým spektrem účinku. Jejich použití je ale vyhrazeno pouze pro těžké infekce vyvolané citlivými mikroby, na které nelze použít

jiná, méně toxická antibiotika. Mechanismus jejich účinku spočívá v inhibici proteosyntézy navázáním na 50S podjednotku ribozomu.

Amfenikoly představují jednoduchou sloučeninu tvořenou benzenovým jádrem s připojenou nitroskupinou v případě chloramfenikolu. U thiamfenikolu je nitroskupina nahrazena methylsulfonovou skupinou. Jedná se o malé lipofilní molekuly, což jim umožňuje průchod přes různé biologické bariéry. Výhodou je hlavně průnik přes hematoencefalickou bariéru. I z tohoto důvodu se velmi často využívají k léčbě mozkových abscesů, hnisavé meningitidy a také neurosyfilitidy.

Nežádoucí účinky jsou z většiny nespecifické. Mezi méně závažné řadíme nauzeu, alergickou reakci a různé formy dyspepsie. Závažnějšími nežádoucími účinky jsou různé neurologické projevy, jako například zmatenost, deprese nebo poruchy chování. Nejvýznamnějším je ale postižení hematopoetické tkáně. Jsou vedeny i studie o schopnosti chloramfenikolu vyvolat akutní leukémii. Vzhledem k závažnosti nežádoucích účinků se chloramfenikol podává pouze u vážných infekcí, u kterých není možná bezpečnější léčba. (Bennett, 2015; Beneš, 2018)

7.1.5 Makrolidy

Makrolidy představují velkou skupinu bakteriostatických antibiotik, jejichž mechanismus je založen na inhibici proteosyntézy vazbou na bakteriální 50S ribozomální podjednotku. První makrolid byl objeven roku 1950. Z této generace prvních objevených makrolidů byl nejúčinnější erytromycin. Od té doby bylo syntetizováno mnoho dalších derivátů. Působí proti grampozitivním bakteriím, včetně anaerobních druhů. Ze skupiny gramnegativních bakterií jsou účinné hlavně na kultivačně náročné druhy. Do jejich spektra můžeme zařadit také mykoplazmata, chlamydie, spirochety a některé mykobakterie.

Makrolidy jsou složeny z makrocyclického laktonového kruhu o různých velikostech, konkrétně 14ti až 16ti-členných, ke kterému je připojen glykosidickou vazbou cukr nebo aminocukr. Laktonový kruh může být substituován hydroxylovými nebo alkylovými skupinami, může také obsahovat ketoskupinu, iminovou skupinu či dvojnou vazbu. (Janas, 2019; Periti, 1992; Zuckerman, 2004)

Hlavními nežádoucími účinky, které se projevují spíše při dlouhodobém užívání, jsou hepatotoxicita, gastrointestinální potíže a kožní alergické reakce, které se vyskytují zejména při kombinované léčbě s jinými antibiotiky. (Jedličková, 2009; Lochmannová, 2008)

7.1.6 Glykopeptidová antibiotika

Vankomycin byl prvním objeveným glykopeptidem na počátku 50. let a používaný zejména na těžké infekce vyvolané zlatými stafylokoky. Postupem času ale jeho obliba klesala a byl nahrazován penicilinovými antibiotiky. S rostoucí rezistencí, zejména u oxacilin rezistentních stafylokoků, ale tyto látky opět získávaly na významu. Dnes je vankomycin nejčastěji používané antibiotikum na léčbu infekcí způsobených MRSA. (Agarwal, 2018; Simon, 1998; Nagarajan, 1994)

Základními antibiotiky v této skupině jsou vankomycin a teikoplanin. Hlavním spektrem jejich účinku jsou grampozitivní bakterie. Gramnegativní bakterie jsou přirozeně rezistentní, což je dáno strukturou jejich buněčné stěny. Glykopeptidy díky své velikosti neproniknou skrze poriny. Mechanismus působení glykopeptidů spočívá v inhibici tvorby buněčné stěny.

Glykopeptidy jsou komplexní velké molekuly, složené ze třech hlavních částí. Peptidovým řetězcem, který je tvořen sedmi aminokyselinami, 5 až 7 propojenými aromatickými kruhy a 2 až 3 cukry po obvodu molekuly. (Beneš, 2018)

Z nežádoucích účinků je důležité zmínit nefrotoxicitu, neurotoxicitu a ototoxicitu. Opatřením proti těmto účinkům je správné dávkování. (Julák, 2006)

7.1.7 Fosfomycin

Fosfomycin tvoří samostatnou skupinu. Jedná se o baktericidní antibiotikum objevené v roce 1969. Inhibuje enzymaticky katalyzovanou reakci v prvním kroku syntézy buněčné stěny. Má široké spektrum účinnosti proti grampozitivním i gramnegativním bakteriím včetně MRSA. Existují tři formy, dvě pro orální použití (fosfomycin trometamol a fosfomycin vápenatý) a jedno pro intravenózní (fosfomycin disodný). Orální fosfomycin se využívá zejména k léčbě močových infekcí. Intravenózní fosfomycin může být podáván v kombinaci s jinými antibiotiky k léčbě nozokomiálních

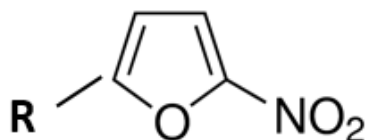
infekcí. V České republice se můžeme setkat pouze s orální formou fosfomycinu trometamol, předepisovanou na infekce dolních cest močových. (Falagas, 2016; www.sukl.cz; Fajfr, 2015)

Fosfomycin má velmi malou molekulovou hmotnost a díky tomu snadno pronikne do tkání. Je tvořen jednoduchou tříuhlíkatou sloučeninou, která obsahuje epoxidový kruh a fosfátovou skupinu. Další nespornou výhodou je jeho farmakokinetika. Běžnou praxí je jednorázové podání vysoké dávky (3 g fosfomycinu). (Fajfr, 2015)

Výskyt nežádoucích účinků je nízký. Mohou se objevit gastrointestinální obtíže, bolest hlavy, nauzea, velmi vzácně i alergické reakce. Všechny tyto obtíže odezní s koncem léčby. (Michalopoulos, 2011)

7.1.8 Nitrofurany a nitroimidazoly

Nitrofurany jsou chemické sloučeniny, u kterých byla jejich antibakteriální účinnosti objevena počátkem 40. let minulého století. Prvním přípravkem ze skupiny nitroimidazolů byl metronidazol, uvedený do praxe v roce 1959. Mechanismus jejich účinku je založen na poškození DNA. Základní strukturu nitrofuranů charakterizuje obrázek 7. Připojením různých postranních řetězců dochází k změně spektra účinku. Nitroimidazoly jsou z chemického hlediska sloučeniny tvořené imidazolem s navázanou nitroskupinou a dvěma vedlejšími řetězci.



Obrázek 7 Struktura nitrofuranů.

Zdroj: <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/319740?lang=en®ion=CZ>

Nitrofurany působí na grampozitivní i gramnegativní bakterie. Jejich využití je zejména při infekcích dolních cest močových. Mohou být podávány i jako profylaxe. Indikace pro léčbu nitrofurany mohou být také některé gynekologické nebo střevní

obtíže. V případě nitroimidazolů je jejich hlavní uplatnění v rámci antibakteriální léčby u infekcí způsobených anaerobními kmeny.

Z nežádoucích účinků je u nitrofuranů velmi častá nauzea a můžeme se setkat i s hemolytickou anémií. U nitroimidazolů se může vyskytnout disulfiramový efekt, někdy také označovaný jako antabusový efekt. Disulfiramový efekt se vyskytuje po kombinaci alkoholu a metronidazolu. Na těle pacienta se objeví rudé fleky po celém těle, nevolnost až zvracení a další nepříjemné reakce. Všechny tyto příznaky jsou obdobné jako po požití alkoholu a samotného disulfiramu, léku podávanému při terapii alkoholismu, a právě z toho důvodu nese tento efekt označení disulfiramový. Hlavní předností zejména nitrofuranů je jejich nízká cena. (Grayson, 2017; Jedličková, 2009; Vrablík, 2019; Skinner, 2014; Edwards, 1980)

7.1.9 Chinolony

Chinolony jsou velkou a stále se rozšiřující skupinou baktericidních antibiotik. Na počátku šedesátých let byla jako první z této skupiny objevena kyselina nalidixová. Inhibují bakteriální topoizomerázy. Inhibicí těchto enzymů zabraňují replikaci DNA a tím i množení bakterií. (Jacoby, 2005; Beneš, 2018; Švihovec, 2018)

Na základě antimikrobní aktivity můžeme chinolony rozdělit do čtyř generací. Dnes nejméně využívaná je první generace, která vykazuje aktivitu proti gramnegativním bakteriím, zejména neiseriím, hemofilům a *Escherichia coli* (*E. coli*). Chinolony druhé generace mají vyšší účinnost proti již zmíněným gramnegativním bakteriím a jejich spektrum se rozšiřuje například o pseudomonády, stafylokoky a chlamydie. U třetí generace se setkáváme se zesíleným působením na grampozitivní bakterie, přičemž jejich aktivita proti gramnegativním zůstává zachována. Čtvrtá generace, v některých studiích spadající do třetí generace, je rozšířena o působení na některé anaerobně rostoucí bakterie. Mezi nejznámější zástupce patří norfloxacin, pefloxacin, ciprofloxacin, ofloxacin, levofloxacin, moxifloxacin nebo prulifloxacin. (Oliphant, 2002)

V roce 2018 doporučila Evropská agentura pro léčivé přípravky omezení používání chinolonů. U pacientů docházelo k poškození převážně šlach, kloubů a svalů a také centrálního a periferního nervového systému. Je třeba, aby chinolonová

antibiotika byla využívána s opatrností, a to zejména u rizikových pacientů. Ani u chinolonů nejsou vyloučeny alergické reakce a vzácně se můžeme setkat i s hematologickými obtížemi. (Julák, 2006; Švihovec, 2018)

7.1.10 Sulfonamidy

Historie sulfonamidů sahá až do roku 1908, kdy byl syntetizován první sulfonamid, ale o jeho antibakteriální aktivitě nebylo nic známo. Až v roce 1932 vyšla publikace, která informovala o antibakteriálním účinku sulfachrysoidinu (Prontosilu).

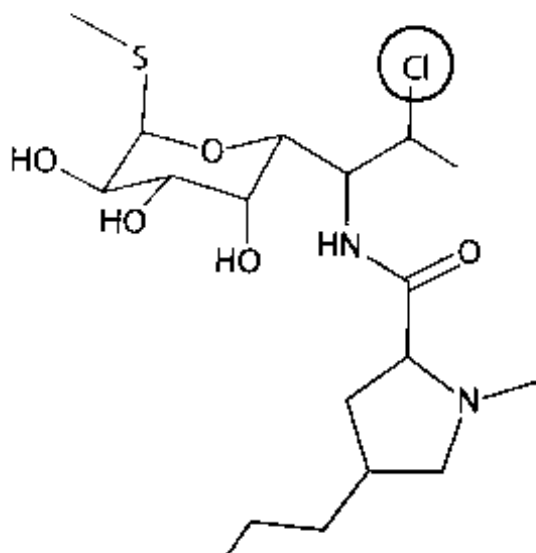
Sulfonamidy bývají tříděny do dvou skupin. První skupina má celkové účinky a dobře se vstřebává ze zažívacího traktu, druhá lokálně užívaná skupina, která není z gastrointestinálního traktu absorbována, se využívá v dermatologii. V jejich širokém spektru účinku nalezneme grampozitivní i gramnegativní bakterie, ale i některé houby nebo prvoky. Mechanismus působení je založen na inhibici syntézy kyseliny listové. V praxi se často využívají v kombinaci s trimetoprimem, kdy vytváří tzv. duální blokádu.

Pro svůj správný účinek musejí být sulfonamidy podávány ve vyšších dávkách, což může u některých pacientů vyvolat nežádoucí účinky jako je nauzea, bolesti hlavy, zvracení, průjem. Mohou se také vyskytnout alergické reakce, různé hepatopatie, případně hematologické abnormality. (Beneš, 2018; Jedličková, 2009; Lochmannová, 2008).

7.1.11 Linkosamidy

Mezi dva hlavní představitele těchto bakteriostatických antibiotik patří linkomycin a klindamycin. Prvním objeveným linkosamidem z této dvojice byl v roce 1962 linkomycin. Spektrum jejich účinnosti zahrnuje zejména grampozitivní bakterie, včetně anaerobních. Mají schopnost navázat se na 50S podjednotku bakteriálního ribozomu a tím zabránit tvorbě nového peptidového řetězce. (Lochmannová, 2008; Beneš, 2018)

Z chemického hlediska se jedná o aminocukr, ke kterému je peptidickou vazbou připojena aminokyselina. Klindamycin se od linkomycinu liší pouze výměnou hydroxylové skupiny za atom chloru, jak znázorňuje obrázek 8. (Beneš, 2018)



Obrázek 8 Chemická struktura klindamycinu.

Zdroj: Beneš, 2018

Jsou velmi málo toxická. Při jejich užívání se mohou vyskytnout gastrointestinální potíže, může dojít k vaginální, případně střevní dysmikrobii, včetně klostridiové kolitidy. Všechny tyto symptomy jsou zapříčiněny narušením fyziologické mikroflóry. Klostridia jsou na linkosamidy rezistentní, proto se mohou ve střevě díky vymýcení ostatních bakterií snadněji množit a vyvolat klostridiovou kolitidu. Stejně jako u většiny antibiotik se i u této skupiny můžeme setkat s alergickými reakcemi. (Julák, 2006; Simon, 1998; Morar, 2009)

7.1.12 Cyklické lipopeptidy

V posledních 50 letech bylo popsáno velké množství peptidových antibiotik. Do této široké skupiny cyklických lipopeptidů můžeme zahrnout polypeptidy, polymyxiny nebo i poměrně nové lipopeptidy. Historie této skupiny se datuje k roku 1939 objevem antibiotika tyrotrycinu, jednalo se ale o velmi toxickou látku. S vývojem nových, méně toxických látek, bylo od jeho užívání upuštěno. Obecně si tuto skupinu můžeme z chemického hlediska představit jako peptidy složené z šesti až patnácti aminokyselin, kdy část z nich tvoří kruhovou formaci a zbytek vytváří pomyslný ocas, ke kterému může být připojena lipidová část.

Spektrum účinku se u jednotlivých podskupin liší. Daptomycin, zástupce lipopeptidů, působí pouze na grampozitivní bakterie. Polypeptidové lokální antibiotikum bacitracin má své uplatnění u některých grampozitivních, ale i gramnegativních bakterií. Kolistin, spadající do skupiny polymyxinových antibiotik, je účinný na gramnegativní kmeny.

Velmi často se cyklické lipopeptidy používají jako záložní antibiotika, případně pro léčbu nozokomiálních nákaz. Jejich nevýhodou je nutnost podávání intravenózně a potenciální toxicita, která u některých zástupců, například bacitracinu, umožňuje pouze lokální použití. Nežádoucí účinky mohou být různé v závislosti na konkrétním antibiotiku. (Beneš, 2018; Jedličková, 2009; Lochmannová, 2008)

7.1.13 Ansamyciny

První antibiotikum z této skupiny bylo syntetizováno v roce 1959. Ansamyciny inhibují bakteriální enzym DNA-dependentní-RNA-polymerázu. Baktericidně působí především na grampozitivní bakterie a mykobakterie. Jejich molekula je složena ze dvou spojených aromatických kruhů, které obepíná uhlovodíkový řetězec. Mezi hlavní zástupce patří nejznámější a nejvyužívanější rifampicin, primárně určený k léčbě tuberkulózy. Dalšími zástupci jsou rifapentin, rifabutin, rifaximin.

Pouze u přibližně 2 % pacientů se setkáme s nežádoucími účinky, kterými mohou být gastrointestinální obtíže, alergické reakce, postižení jater, diskolorace, což je změna zbarvení, nejčastěji se projevující oranžovým zbarvením slin, potu, slz a dalších sekretů. Tento nežádoucí účinek s ukončením terapie odeznívá. (Simon, 1998; Vrablík, 2019)

7.2 Rozdělení dle mechanismu účinku

Spolu s rozdělením dle chemické struktury bývá nejčastěji využíváno rozdělení dle mechanismu účinku. Zde se můžeme setkat s několika mechanismy, které spolu s příklady uvádí tabulka 6.

Tabulka 6 Rozdělení antibiotik dle mechanismu účinku.

Mechanismus	Skupina
Inhibice syntézy buněčné stěny	β -laktamová antibiotika glykopeptidy, lipopeptidy
Poškození DNA	nitrofurany
Inhibice RNA polymerázy	ansamyciny
Inhibice DNA gyrázy	chinolony
Inhibice proteosyntézy (30S podjednotka ribozomu)	aminoglykosidy tetracykliny
Inhibice proteosyntézy (50S podjednotka ribozomu)	chloramfenikol makrolidy linkosamidy
Inhibice syntézy kyseliny listové	sulfonamidy

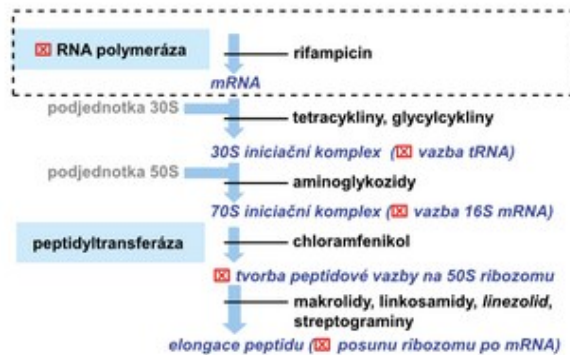
Zdroj: Buchta, 1998

7.2.1 Mechanismus účinku u vybrané skupiny antibiotik

7.2.1.1 Aminoglykosidy

Aminoglykosidy patří do skupiny antibiotik, která inhibují proteosyntézu. Váží se na různé části bakteriálního ribozomu. Na obrázku 9 jsou znázorněna místa působení jednotlivých skupin antibiotik inhibujících syntézu proteinů. Proteosyntéza je přenos genetické informace z messengerové RNA (mRNA) do peptidového řetězce probíhající na ribozomu. Jelikož se ribozomy bakterií liší od eukaryotních, mohou existovat antibiotika, která inhibují činnost bakteriálních ribozomů, aniž by docházelo k vlivu na ribozomy eukaryotní. Bakteriální ribozomy jsou menší, označují se jako 70S, a jsou složeny ze dvou podjednotek 50S a 30S. Eukaryotní, označované 80S, jsou naopak větší a složeny z podjednotek 40S a 60S. Ke čtení informací z mRNA dochází na 30S podjednotce. Každá podjednotka obsahuje ribozomální RNA (rRNA). Podjednotka 30S

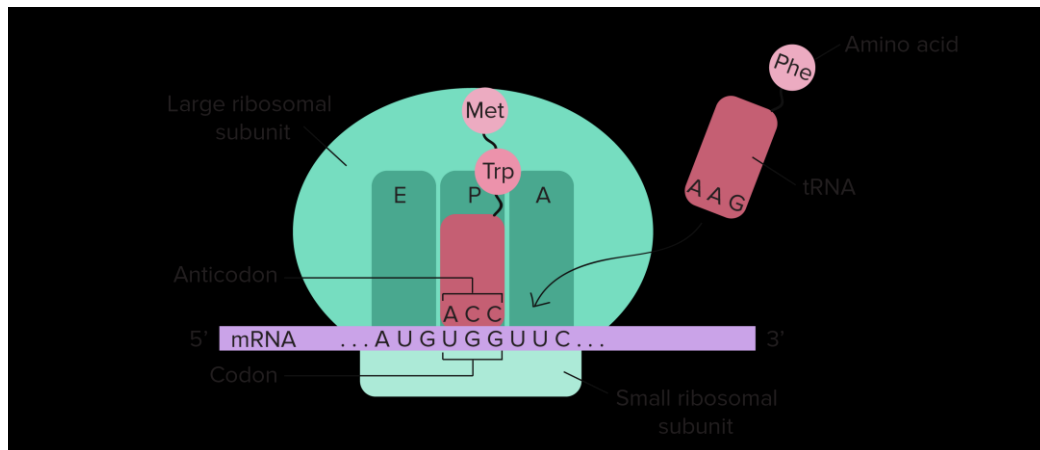
obsahuje 16S rRNA a podjednotka 50S má 23S a 5S rRNA. Svou funkci má rRNA zejména při iniciaci, kdy jednotka 16S rRNA obsahuje sekvenci komplementární k startovacímu kodonu a může tak spojit ribozom a mRNA k zahájení syntézy proteinů. (Peutherer, 1999; Lullmann, 2007)



Obrázek 9 Místa působení antibiotik inhibujících proteosyntézu.

Zdroj: Švihovec, 2018

Na velké podjednotce ribozomu lze rozeznat aminoacylové místo A, peptidylové místo P a exitové místo E. Jejich umístění na ribozomu je zobrazeno na obrázku 10. V místě A dochází k navázání molekuly transferové RNA (tRNA), přijímá tedy nové tRNA. Tato tRNA nese na jednom konci aminokyselinu a na druhém konci má trojici nukleotidů komplementárních ke kodonu na mRNA. Na místě P je navázána peptidylová tRNA. Na konci této tRNA je tvořící se peptid. Místo E představuje část, kde se deacylovaná molekula tRNA uvolňuje z ribozomu.

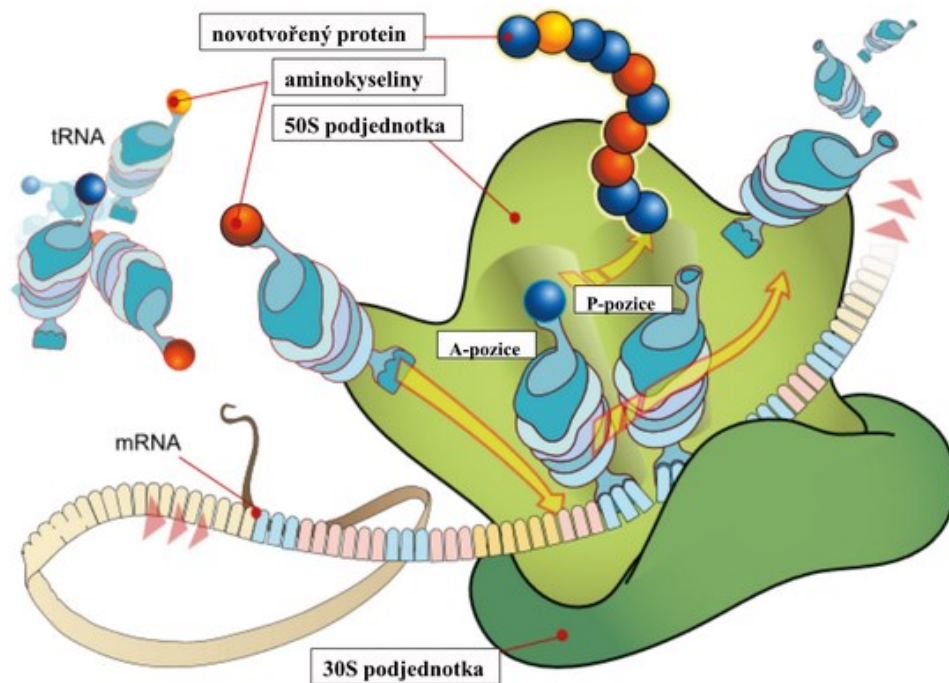


Obrázek 10 Znárodnění A, P, E míst na bakteriálním ribozomu při syntéze proteinů.

Large ribosomal subunit – velká ribozomální podjednotka (50S), *Small ribosomal subunit* – malá ribozomální podjednotka (30S), *Codon* – Kodon, *Anticodon* – antikodon, *Amino acid* – aminokyselina.

Zdroj: <https://www.khanacademy.org/science/biology/gene-expression-central-dogma/translation-polypeptides/a/the-stages-of-translation>

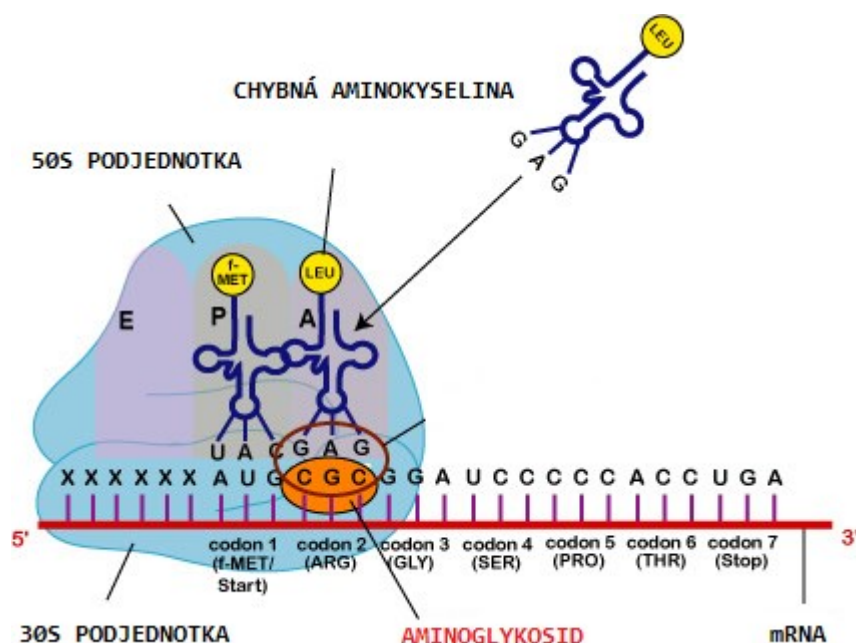
Syntéza bakteriálních proteinů se skládá ze tří klíčových fází - iniciace, elongace a terminace. Schéma proteosyntézy ilustruje obrázek 11. Při iniciaci je počáteční kodon mRNA, což je kodon AUG, umístěn v místě P spolu s iniciační tRNA, která nese první aminokyselinu polypeptidu. U bakterií je tato aminokyselina *N*-formylmethionin. Následuje druhá fáze proteosyntézy, elongace. Nová tRNA nesoucí aminokyselinu (aminoacyl-tRNA) vstupuje do místa A. Antikodon této tRNA musí být komplementární ke kodonu na mRNA. Aminokyselina je přidávána do rostoucího polypeptidového řetězce. Polypeptidová vazba mezi aminokyselinami je tvořena za pomoci peptidyltransferázy. Peptidyl tRNA je deacylována a vstupuje do místa E, zatímco aminoacyl-tRNA obsahující nový polypeptid se pohybuje do místa P, což umožňuje nové aminoacyl-tRNA dodávat další aminokyselinu do ribozomu. Prodlužování pokračuje tímto způsobem, dokud se nedojde na mRNA ke stop kodonu. Tento kodon je rozpoznán uvolňovacím faktorem (RF). Vazba RF katalyzuje štěpení vazby mezi polypeptidem a tRNA. V tomto okamžiku je translace ukončena a je uvolněn polypeptid z ribozomu. Tato poslední fáze je označována jako terminace. (Laursen, 2005; Serio, 2016; Švihovec, 2018)



Obrázek 11 Ilustrace proteosyntézy.

Zdroj: Švihovec, 2018

Účinek aminoglykosidů na ribozomy je dán jejich vazbou na 30S podjednotku ribozomu (viz obrázek 12) s vysokou afinitou k A místu. Jednotliví zástupci aminoglykosidů mají různé specifity pro různé oblasti A místa. Ale u všech se předpokládá, že mění konformaci. Vazba na ribozom může vést k chybné translaci, kdy dochází k nesprávnému párování. To má za následek syntézu chybných proteinů. Následně se uvolňuje chybný polypeptid, který může způsobit poškození buněčné membrány a jiných struktur buňky. Kromě nesprávného párování mohou aminoglykosidy zapříčinit poruchu čtení informace v mRNA a zablokují tak přesun tRNA s navázaným peptidovým řetězcem z místa A na místo P a blokuje se tak celá elongace. (Serio, 2018; Krause 2016)



Obrázek 12 Znáznornění aminoglykosidu navázaného na 30S podjednotku ribozomu.

Zdroj:

http://faculty.ccbcmd.edu/courses/bio141/lecguide/unit2/control/aglycomiscode_illus.html

I přesto, že se aminoglykosidy řadí do skupiny antibiotik inhibujících proteosyntézu, jejich primární mechanismus účinku je inhibice klíčových kroků v syntéze bakteriálních proteinů. Aminoglykosidy jsou polykationtové, hydrofobní molekuly. Do bakteriálních buněk vstupují v třístupeňovém procesu. První stupeň vstupu aminoglykosidů je zprostředkován elektrostatickou vazbou pozitivně nabitých aminoglykosidových molekul na záporně nabitě komponenty na povrchu bakteriální buňky. V případě gramnegativních bakterií se nejprve elektrostaticky naváží na fosfolipidy a lipopolysacharidy přítomné ve vnější membráně. Tato vazba zapříčiní vytěsnění hořčnatých a vápenatých kationtů. Tím se rozruší zevní membrána a vzniknou otvory, které umožní průchod antibiotika do periplazmatického prostoru. U grampozitivních bakterií se váží na fosfolipidy a kyselinu teichoovou. Druhý stupeň jejich vstupu probíhá za pomoci aktivního transportu. Tato fáze je závislá na transportu elektronů a vyžaduje dodání energie. Dochází k absorpci malého počtu aminoglykosidových molekul, které začínají inhibovat proteosyntézu. Akumulací aminoglykosidů v buňce se zrychluje inhibice proteosyntézy. Tato akumulace a následné rychlé zabíjení bakterií je označováno jako třetí stupeň.

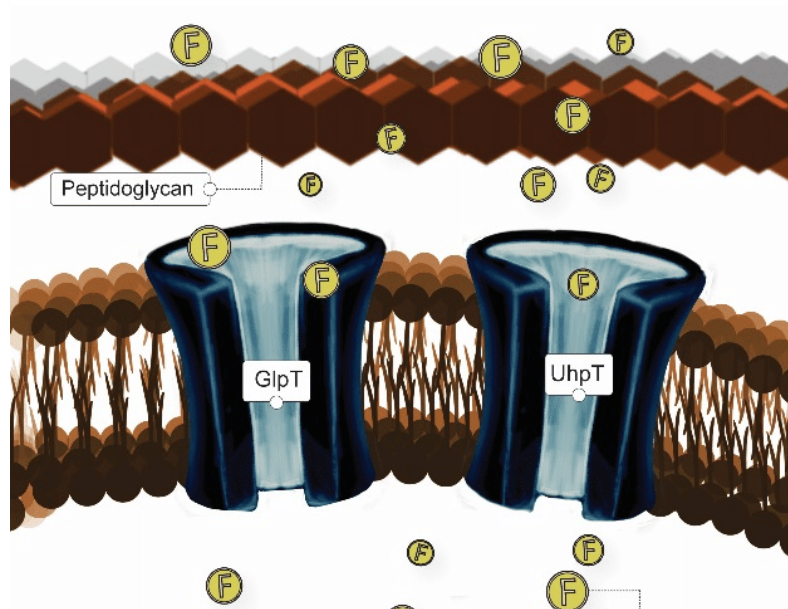
Dalo by se tedy říct, že aminoglykosidy mají duální účinek. Inhibují proteosyntézu, ale zároveň poškozují buněčnou membránu bakterií. Zároveň představují jediného zástupce ze skupiny inhibitorů syntézy proteinů, jehož účinek je baktericidní. Všechny ostatní třídy antibiotik, které inhibují proteosyntézu, jsou klasifikovány jako bakteriostatické. (Bennett, 2015; Krause, 2016; Švihovec, 2018; Serio, 2016; Mingeot-Leclercq, 1999)

7.2.1.2 Fosfomycin

Fosfomycin patří do skupiny antibiotik inhibujících syntézu buněčné stěny. Cílem všech těchto antibiotik je peptidoglykan. Peptidoglykan je součástí buněčné stěny grampozitivních i gramnegativních bakterií. Je pro ně nepostradatelný a nachází se hned na povrchu buňky, což z něj dělá ideální cíl pro působení antibiotik. Fosfomycin, stejně jako například β -laktamová antibiotika, působí jako falešné substráty, a tím zablokují klíčovou metabolickou reakci při syntéze peptidoglykanu.

Základními prvky peptidoglykanu jsou *N*-acetyl-glukosamin (NAG) a kyselina *N*-acetylmuramová (NAMA). Tyto prvky vznikají jako první. Postupně se k NAMA připojuje peptidový řetězec, obsahující nejdříve tři a poté pět aminokyselin. Koncovou část tohoto řetězce tvoří D-alanin-D-alanin. Takto vzniklá NAMA s peptidovým řetězcem se naváže na NAG a vytvořená struktura je transportována přes buněčnou membránu, kde na ni působí enzymy. Vlivem těchto enzymů dojde ke spojení NAG a NAMA glykosidickou vazbou a vzniká jedno dlouhé polysacharidové vlákno. Poté se vytvoří příčné vazby mezi vlákny a vzniká mřížka. (Vollmer, 2008; Beneš, 2018)

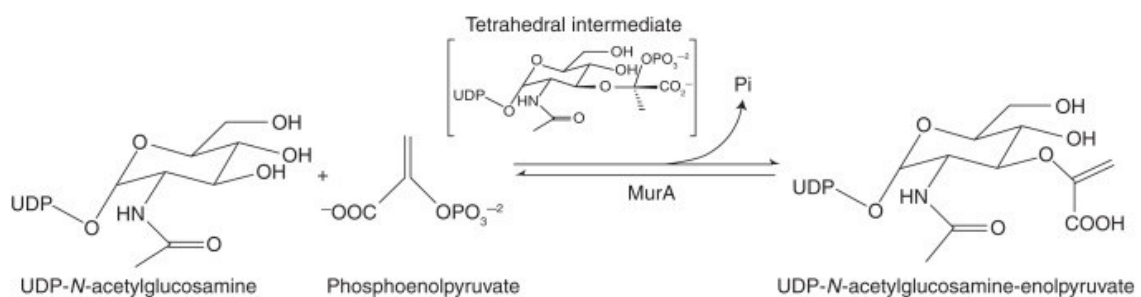
Fosfomycin inhibuje enzymaticky katalyzovanou reakci v prvním kroku syntézy peptidoglykanu. Transport fosfomycinu do buňky je realizován pomocí transportéru glycerol-3-fosfátu (GlpT) a transportéru glukóza-6-fosfátu (G6P) zobrazených na obrázku **13**. Primárně využívá fosfomycin transport pomocí GlpT. Transportní systém G6P je indukován pouze v přítomnosti glukóza-6-fosfátu.



Obrázek 13 Transportní systémy pro fosfomycin.

Zdroj: https://www.researchgate.net/figure/Mechanism-of-action-of-fosfomycin-F_fig3_320742923

Jakmile je fosfomycin v buňce, brání tvorbě NAMA z *N*-acetylglukosaminu a fosfoenolpyruvátu (PEP). Je strukturním analogem PEP a působí tak jako falešný substrát pro enzym UDP-*N*-acetylglukosamin-3-enolpyruvyltransferázu (MurA). MurA je zapojena do biosyntézy peptidoglykanu katalyzováním přenosu PEP na 3-hydroxylovou skupinu *N*-acetylglukosaminu. Reakce katalyzovaná MurA je znázorněna na obrázku 14. Konkrétně alkyluje aktivní místo, -SH skupinu, tohoto enzymu.



Obrázek 14 Reakce katalyzovaná MurA.

Zdroj: Silver, 2017

Skutečnost, že grampozitivní i gramnegativní bakterie vyžadují pro syntézu peptidoglykanu tvorbu NAMA znamená, že spektrum působení fosfomycinu je velmi široké. (Falagas, 2016; Michalopoulos, 2011; Sastry, 2016)

7.3 NOVÉ TRENDY

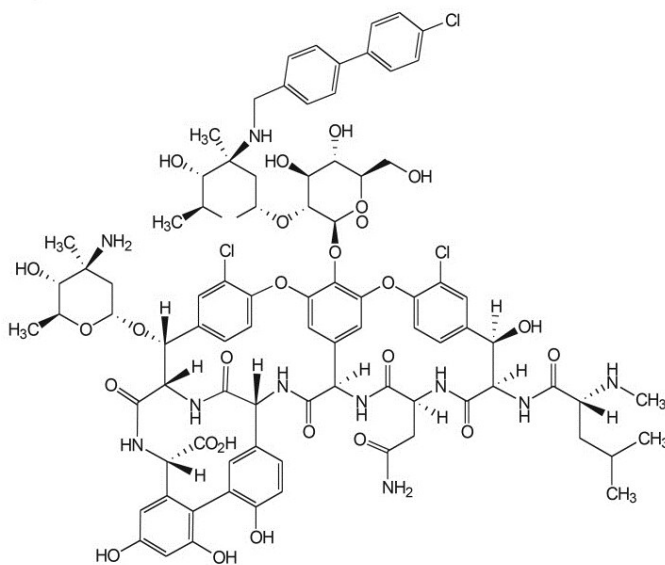
S rostoucí rezistencí je kladen vysoký nárok na vývoj nových účinných antibakteriálních látek. S vyvíjejícím se nátlakem je třeba zvyšovat investice do vývoje a urychlovat hodnocení a registraci nově vyvinutých léčiv. Bohužel vlivem těchto faktorů dochází spíše ke zpomalování vývoje nových antibiotik. Možná i z toho důvodů se velmi často vývoj vrací k antibiotikům, která dříve upadla v zapomnění v důsledku jejich toxicity. Mezi taková antibiotika, která znovu získávají popularitu v léčbě multirezistentních kmenů, se řadí kolistin, fosfomycin, minocyklin nebo například mecilinam. Z úplně nových látek jsou registrovány dva nové glykopeptidy, a to oritavancin a dalbavancin, a také jeden nový oxazolidinon, nesoucí název tedizolid. K novějším trendům by se také dala zařadit kombinace cefalosporinů s inhibitory β -laktamázy, příkladem může být kombinace ceftolozan a tazobaktam nebo ceftazidim a avibaktam. Globálně se zvyšuje prevalence rezistentních gramnegativních patogenů. Je třeba vyvíjet i nová léčiva účinná proti těmto patogenům. Jedním z nich je plazomicin. Dalším ze zástupců nové generace by mohl být solithromycin, u kterého probíhají klinické studie a ověřuje se jeho bezpečnost. (Buege, 2017; Rolain, 2016)

V roce 2016 požádaly státy WHO o vytvoření seznamu rezistentních bakterií seřazených dle priorit při výzkumu antibiotik. Při tvorbě tohoto seznamu se bralo v úvahu několik kritérií a to úmrtnost, zdravotní a komunitní zátěž, prevalence rezistence, schopnost přenosu, prevence a léčby. Seznam byl rozdělen do tří úrovní, a to na kritickou, vysokou a střední úroveň dle priority. Mezi bakterie s kritickou prioritou byly zařazeny *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* a bakterie z čeledi *Enterobacteriaceae*. Do skupiny bakterií s vysokou prioritou patřily *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Helicobacter pylori*, *Campylobacter*, *Neisseria gonorrhoeae* a *Salmonella enterica* sérotyp Typhi. Třetí skupina se střední prioritou zahrnovala tyto bakterie: *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* a *Shigella spp.* Tento seznam není jediný, podobný vytvořilo také Centrum pro kontrolu a prevenci nemocí a další zdravotnické instituce. Každý z těchto seznamů se lehce liší v závislosti na hodnocených kritériích. Ovšem existence těchto seznamů poukazuje na mezinárodní zájem o vývoj nových potřebných antibiotik účinných zejména na rezistentní kmeny. (Tacconelli, 2018)

7.3.1 Oritavancin, dalbavancin

Na konci 80. let minulého století se začaly objevovat první kmeny rezistentní na vankomycin. Vankomycin sloužil po dlouhou dobu jako lék první volby při léčbě infekcí zapříčiněných MRSA. Poslední dobou ale dochází ke stále častějšímu výskytu kmenů rezistentních na vankomycin, proto je důležité najít alternativní látku, která by byla účinná při léčbě rezistentních gram pozitivních bakterií. Příkladem nových antimikrobních látek ze skupiny glykopeptidů, konkrétně lipoglykopeptidů, nahrazujících vankomycin je oritavancin a dalbavancin.

Oritavancin je lipoglykopeptid indikovaný k léčbě infekcí kůže a měkkých tkání. Evropská komise udělila rozhodnutí o registraci v březnu roku 2015. Jedná se o baktericidní látku. Je účinný proti gram pozitivním aerobním bakteriím včetně MRSA a jeho aktivita je prokázána také u bakterií rezistentních k vankomycinu. Z anaerobních bakterií se do jeho spektra účinku řadí *Clostridium difficile*, *Clostridium perfringens*, *Peptostreptococcus spp.* a *Propionibacterium acnes*. Oritavancin je odvozen od chloreremomycinu, analogu vankomycinu. Spektrum účinku i chemická struktura je velmi podobná vankomycinu. Oritavancin se ale od vankomycinu liší zejména nižšími MIC. Chemickou strukturu zobrazuje obrázek 15.



Obrázek 15 Chemická struktura oritavancinu.

Zdroj: Rosental, 2018

Stejně jako další glykopeptidy, inhibuje i oritavancin syntézu buněčné stěny. Jeho unikátní vlastností je schopnost inhibovat syntézu bakteriální RNA, což umožňuje rychlé baktericidní působení. Z provedených studií lze za nežádoucí účinky při jeho užívání považovat nauzeu, bolesti hlavy, průjem a další nespecifické symptomy. Na rozdíl od vankomycinu u něj nebyla prokázána nefrotoxicita ani ototoxicita. (Rosental, 2018)

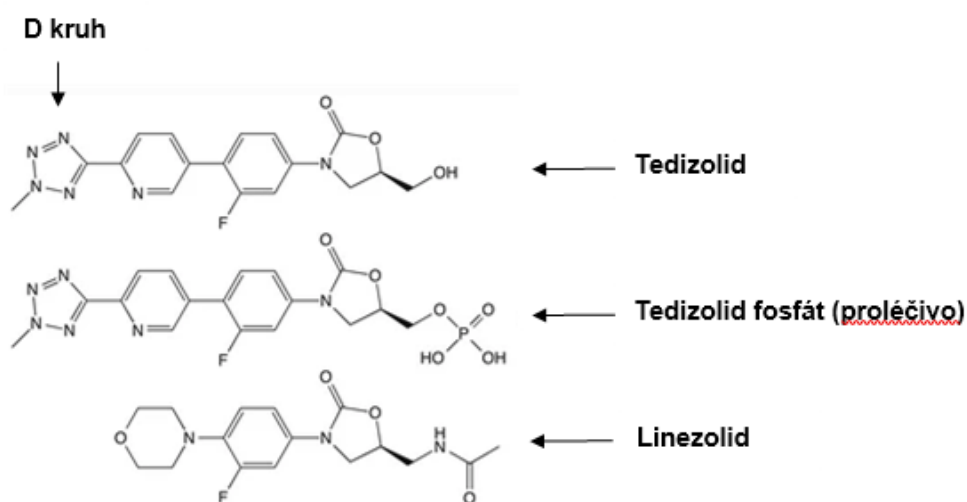
Dalbavancin je semisyntetický lipoglykopeptid působící proti široké škále gram pozitivních patogenů. Evropskou agenturou pro léčivé přípravky byl schválen v únoru roku 2015 jako látka využívaná k léčbě infekcí kůže. Stejně jako všechny glykopeptidy, včetně oritavancinu, je mechanismus účinku založen na tvorbě komplexu s koncovým D-alanyl-D-alaninem peptidoglykanových řetězců, čímž dochází k inhibici syntézy buněčné stěny. Afinita dalbavancinu k cílovému místu je vyšší než u ostatních glykopeptidů, tím se zvyšuje jeho antimikrobiální účinnost. Vykazuje silnější baktericidní aktivitu proti mnoha rezistentním gram pozitivním organismům. Vzhledem k jeho dlouhému biologickému poločasu ho lze podávat pouze jednou týdně. Stejně jako další glykopeptidová antibiotika ho je třeba podávat intravenózně. Dalbavancin bývá velmi dobře tolerován. Nežádoucí účinky se vyskytují jen mírné a lze mezi ně zařadit průjem, horečku, nauzeu, bolesti hlavy, orální kandidózu a další. Stejně jako oritavancin, ani dalbavancin nemá ototoxické či nefrotoxické účinky. (Chen, 2007; Ramdeen, 2015; Lin, 2016).

7.3.2 Tedizolid

Vzhledem k rostoucím obavám z rezistence a selhání léčby vankomycinem, je třeba hledat další alternativní antibiotika na gram pozitivní infekce. Na začátku tohoto století se začal pro rezistentní kmeny využívat lék linezolid, patřící do skupiny oxazolidinových antibiotik. Po jeho uvedení na trh se začaly objevovat bakterie rezistentní i na jeho působení, z toho důvodu došlo k vývoji nového léku ze skupiny oxazolidinových antibiotik a tím je tedizolid.

Tedizolid je oxazolidinová antibakteriální látka. Stejně jako u oritavancinu udělila komise Evropské unie rozhodnutí o registraci přípravku v březnu roku 2015. Prokazuje silnou aktivitu proti gram pozitivním bakteriím, včetně multirezistentních kmenů jako je MRSA a některých kmenů rezistentních k linezolidu. Mechanismus působení je založen

na inhibici syntézy proteinů. Tedizolid, podobně jako linezolid, se váže na ribozomální RNA 50S podjednotku, čímž brání tvorbě iniciačního komplexu. Hlavní uplatnění je zejména při akutních infekcích kůže a měkkých tkání, ale probíhají též studie jeho užití při léčbě pneumonie. Jeho příznivá farmakokinetika umožňuje podání pouze jednou denně v perorální i intravenózní formě. Strukturální rozdíly od linezolidu zahrnují hydroxymethylovou skupinu místo acetamidové skupiny v poloze C-5 a substituent D-kruhu, který u linezolidu chybí. Právě tyto změny mohou zvýšit interakci tedizolidu s vazebným místem pro peptidyl-transferázu a zvýšit tak jeho účinnost. Tedizolid je využíván ve formě fosfátového proléčiva, což umožňuje lepší rozpustnost. V krvi je pak štěpen sérovými fosfatázami na aktivní léčivo. Následující obrázek **16** zobrazuje porovnání linezolidu s tedizolidem a také proléčiva tedizolid fosfátu.



Obrázek 16 Struktura linezolidu, tedizolidu a tedizolid fosfátu.

Zdroj: Tacconelli, 2018

Nežádoucí účinky jsou srovnatelné nebo nižší než u linezolidu a jsou ve většině případů mírné. Výhodou oproti linezolidu ve výskytu nežádoucích účinků je snížený výskyt trombocytopenie. (Kisgen, 2014; Rybak, 2015)

7.3.3 Plazomicin

Plazomicin je nový aminoglykosid, synteticky odvozený od sisomicinu. Odlišuje se od něj přidáním skupiny hydroxyaminomáselné v poloze 1 a hydroxymethylové skupiny v poloze 6. Těmito strukturními změnami se zvyšuje spektrum aktivity proti

organismům, které mají enzymy modifikující aminoglykosidy. Stejně jako je tomu u ostatních aminoglykosidů, i plazomicin se váže na 30S podjednotku bakteriálního ribozomu a inhibuje tak syntézu bakteriálních proteinů. Plazomicin prokazuje aktivitu proti velkému spektru mikrobů, jako je *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus spp.* a bakterie z čeledi *Enterobacteriaceae*, a to včetně těch produkujících karbapenemázu a patogenů produkujících širokospektré β -laktamázy (ESBL). Tento aminoglykosid byl zatím schválen pro použití jen americkým Úřadem pro potraviny a léčiva (FDA). Je určen pro dospělé osoby zejména při léčbě komplikovaných infekcí močových cest. Většina aminoglykosidů je spojována s nefrotoxitou a ototoxicitou. Údaje z provedených studií ukazují, že pokud je plazomicin podáván po krátkou dobu, je výskyt těchto nežádoucích účinků nižší než u ostatních aminoglykosidů. Nejčastějšími nežádoucími účinky pozorovanými v průběhu klinických studií byly bolesti hlavy, závratě, průjemy a rozmazané vidění. Do budoucna lze předpokládat, že se využití plazomicinu bude rozšiřovat, a to například na nozokomiální pneumonie, sepse a další infekce. (Shaeer, 2019; Eljaaly, 2019; Saravolatz, 2019)

7.3.4 Solithromycin

Solithromycin, řazený do skupiny makrolidů, je novým vyvíjeným fluoroketolidovým antibiotikem. Je vyvinut ve formě pro perorální i intravenózní užití. Předpokládá se, že by měl být využit v terapii komunitní pneumonie. Působí proti většině patogenů způsobujících komunitní pneumonie jako je *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* a další. Stále více se vyskytuje rezistence pneumokoků na používaná antibiotika. Studie uvádí, že v Americe je až 50 % pneumokoků rezistentních k makrolidům a přibližně 40 % k penicilinům. V Evropě jsou tato procenta obdobná. Solithromycin se váže na 50S podjednotku ribozomu, kde na rozdíl od ostatních makrolidů, kteří interagují pouze s jedním místem, interaguje se třemi místy na ribozomu, což mu poskytuje aktivitu proti rezistentním bakteriím. Celkově byl solithromycin v klinických studiích dobře tolerován, nejčastěji se vyskytovaly gastrointestinální potíže. Klinická účinnost se pohybovala okolo 80-90 %. (MacLauchin, 2018; Okusanya, 2019; Viasus, 2016)

V roce 2016 FDA zamítlo žádost o schválení solithromycinu a vyžaduje novou větší klinickou studii pro posouzení bezpečnosti léčiva. Konkrétně se jednalo o riziko hepatotoxicity, které nebylo dostatečně charakterizováno, jelikož bylo do studie zapojeno jen 920 pacientů. Tento počet pacientů není dostatečný pro posouzení jaterních nežádoucích účinků. (Owens, 2017)

7.4 Registrace nového antibiotika

Ještě v polovině minulého století doba od objevu antibakteriální látky po její uvedení na trh činila přibližně 1 až 2 roky. Dnes je kladen mnohem větší důraz na bezpečnost a účinnost, a i z toho důvodu se uvedení nového přípravku na trh stává složitější, časově náročnější a také dražší. Jen málo farmaceutických firem na světě má dostatek prostředků pro vývoj nového léku.

Uvedení nového léku na trh předchází několikaletý výzkum. Cílem výzkumu je prokázat kvalitu, účinnost a bezpečnost testované látky. Sledují se také nežádoucí účinky, farmakokinetické parametry a chování léku v lidském organismu. Samotné klinické testování probíhá na lidech. Než ale k takovému kroku dojde dochází k preklinickému testování. Preklinické testování zahrnuje hodnocení fyzikálních a chemických vlastností, jako je stabilita, rozpustnost a kompatibilita s fyziologickým prostředím. Následuje testování na zvířatech, případně buněčných kulturách. V některých případech je také možné testovat na izolovaných orgánech. Při preklinických studiích se zjišťuje například toxicita, karcinogenita, mutagenita a další nežádoucí faktory, které by při podání člověku mohly mít nechtěné následky. V České republice musí být žádost o klinické hodnocení zhodnocena a odsouhlasena Státním ústavem pro kontrolu léčiv a alespoň jednou etickou komisí. V rámci Evropské unie se na registraci léčiv podílí zejména Evropská agentura pro léčivé přípravky. V Americe je to FDA.

Samotné klinické hodnocení je rozděleno do čtyř fází. Ve fázi první je lék podán zdravým dobrovolníkům. V této fázi se zjišťuje tolerance látky lidským organismem. Začíná se podáváním nízkých dávek, které jsou postupně zvyšovány až do výše maximální tolerované dávky, která je v této fázi definována.

Ve druhé fázi je lék podáván malé skupině konkrétně definovaných pacientů. Po podání se prokazují účinky a stanovuje se vhodná dávka. Zaznamenávají se také další údaje o léku. V případě úspěšnosti této fáze, kdy je prokázán účinek převyšující nežádoucí účinky, je možné přejít do třetí fáze.

Třetí fáze také ověřuje účinnosti léků a nežádoucí účinky. Na rozdíl od fáze druhé ale již zahrnuje větší skupinu pacientů. Čím více osob je do této fáze zapojeno, tím lépe se ověří účinnost léku. Pokud lék projde třetí fází, jsou organizacím schvalujícím nové léky předloženy žádosti o jeho registraci. Je-li lék schválen, lze ho využívat v rámci zdravotní péče. Ovšem následuje ještě čtvrtá, poslední fáze, tzv. postregistrační.

V této poslední fázi se důkladně sleduje incidence nežádoucích účinků, zejména při dlouhodobém užívání a také interakce s jinými užívanými léčivy. V této fázi také lze provést další klinická hodnocení, kdy dochází k podání například dětem, starším pacientům nebo těhotným ženám. (www.sukl.cz; Beneš, 2018)

8. REZISTENCE

Bakteriální rezistence je definována jako schopnost bakterie odolávat inhibiční koncentraci antimikrobní látky. Existují dva základní typy rezistence, a to primární a sekundární, označované také jako přirozená a získaná. S přirozenou se setkáváme již od prvních objevů antibiotik. Získaná rezistence se rozvíjela společně se zvyšující se spotřebou antibiotik a dnes tvoří celosvětový problém, kdy původně citlivé bakterie se stávají odolnými proti antimikrobním látkám. I když v rozvojových zemích se stále potkáme s úmrtím pacientů z důvodu nedostatku vhodných antibiotik, ve vyspělých zemích není hlavním problémem jejich dostupnost, ale rostoucí rezistence. Rezistentní mikroorganismy způsobují těžce léčitelné infekce, které mohou skončit smrtí. Léčba takových infekcí vyžaduje delší hospitalizace a dochází tak i ke zvyšování nákladů na léčbu. (Lochmannová, 2008; Jedličková, 2009)

8.1 Primární rezistence

Primární rezistence je přirozená, geneticky podmíněná vlastnost mikrobiálního druhu. Rezistentní bakterie se nenachází ve spektru účinku daného antibiotika, proto na rozdíl od získané ani není žádná souvislost s předchozím kontaktem bakterie a antibiotika. Neexistuje žádná antimikrobní látka, která by svým spektrem pokryla všechny bakterie. Běžným důvodem primární rezistence je absence cílového místa, nepropustnost buněčné stěny nebo například produkce inaktivujících enzymů. Někdy je možné využít rezistenci k identifikaci bakterie, případně selektivní izolaci. (Vrablík, 2019; Schindler, 2010)

Příkladem přirozené rezistence mohou být například aminoglykosidy, jejichž transport cytoplazmatickou membránou bakterií vyžaduje kyslík. Z tohoto důvodu nebudou účinné na anaerobní bakterie, jelikož jim bude znemožněn průchod cytoplazmatickou membránou. Některé bakterie zase mohou tvořit enzym β -laktamázu, čímž inaktivují β -laktamová antibiotika. (Beneš, 2018; Serio, 2018)

Některé konkrétní příklady primární rezistence uvádí následující tabulka 7.

Tabulka 7 Vybrané příklady primární rezistence.

Bakterie	Antibiotikum
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	vankomycin
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	ampicilin
<i>Listeria monocytogenes</i>	cefalosporiny
<i>Staphylococcus aureus</i>	ceftazidim
<i>Escherichia coli</i>	penicilin
<i>Enterococcus faecium</i>	cefalosporiny

Zdroj: Beneš, 2018

8.2 Sekundární rezistence

Sekundární neboli získaná rezistence se vyskytuje u mikrobů původně citlivých. Je spojena s užíváním antibiotik. Bakterie po kontaktu s antibiotikem má prostor adaptovat své metabolické pochody a může získat rezistenci proti antibiotiku. Častěji se vyskytujícím důvodem vzniku rezistence než adaptace bakterie, je genetická podstata. Může dojít k modifikaci genu zodpovědnému za citlivost bakterie nebo převzetí genetického materiálu od rezistentní buňky.

Rizikovými faktory pro vznik sekundární rezistence jsou dlouhodobé podávání antibiotik nebo nevhodná profylaxe. Velmi často se také setkáváme s předepisováním antibiotik na jiné než bakteriální infekce. V takovém případě je podání antibiotika zbytečné a napomáhá vzniku rezistence. Nedodržování intervalů nebo špatně zvolená dávka mohou k rezistenci také přispět. (Vrablík, 2019; Adámková, 2019)

Můžeme se setkat s několika typy mechanismů, které využívají bakterie pro vznik rezistence. Jedním z nich je zabránění přístupu antibiotika k cílovému místu. První zábranou pro vstup antibiotika je bakteriální pouzdro, které může nést náboj odpuzující molekuly antibiotika. Antibiotika se do periplazmatického prostoru bakterií

dostávají skrz poriny. Určitou mutací může dojít ke snížení, případně strukturální změně porinů a znemožní se tak průchod antibakteriální látky do buňky. Poslední bariérou, která může znemožnit vstup antibiotika do buňky je cytoplazmatická membrána. Přes tuto membránu procházejí bakterie ve většině případů pomocí transportních systému. V případě, že bakterie omezí aktivitu těchto systému, znemožní se tak průchod antibiotika.

Kromě znepřístupnění cílového místa mohou bakterie také změnit jeho strukturu. Antibiotikum pak ke strukturně změněným cílovým místům ztrácí afinitu. Za změnu struktury může být zodpovědná mutace genu, který kóduje cílové místo. Může se jednat o enzym, ribozom nebo prvky buněčné membrány. Kromě mutace se může uplatnit i dodatečná úprava molekuly. Příklad takové úpravy je metylace ribozomů.

Dalším mechanismem získané rezistence je enzymatická inaktivace antibiotika. Princip je založen na rozštěpení molekuly antibiotika nebo připojení chemické skupiny. Antibiotikum může být například acetylováno, což znemožní jeho vazbu na cílové místo.

Bakterie také mohou bránit aktivaci antibiotika. Tento mechanismus ale funguje jen u antibiotik, která jsou přijímána jako neaktivní a až působením bakteriálních enzymů dojde k jejich aktivaci. Bakterie sníží produkci aktivujícího enzymu nebo díky mutaci vytvoří enzym, který bude neúčinný a nedojde tak ke vzniku aktivní formy antibiotika.

Posledním mechanismem je vylučování antibiotika z bakteriálních buněk. Tomuto mechanismu se také někdy říká efluxní, a to z toho důvodu, že bakterie využívají pro eliminaci antibiotika právě efluxní systémy. Těmito efluxními systémy vyčerpávají nežádoucí látky, v tomto případě antibiotika, z buňky, a to i proti koncentračnímu gradientu. Jedná se o energeticky náročný mechanismus. Efluxní pumpy mají ale omezenou kapacitu a odstraňují molekuly antibiotika, které již do buňky pronikly, to znamená, že některé se již mohly navázat na své cílové místo. Z tohoto důvodu je ochrana před účinkem antimikrobní látky jen částečná. Dochází spíše ke snížení aktivity antibiotika než k jeho úplnému zneškodnění. (Lochmann,2006; Schindler, 2010; Beneš, 2018)

8.3 Genetický přenos rezistence

Při genetickém přenosu rezistence rozlišujeme dva typy, vertikální a horizontální přenos. Pokud dochází k přenosu genů rezistence na potomstvo, hovoříme o vertikálním přenosu. V případě, že dojde k přenosu v jedné generační vrstvě, pak přenos označujeme jako horizontální.

V horizontálním přenosu se uplatňují zejména plazmidy a transpozony. Plazmidy jsou malé kruhové molekuly DNA, které se nachází v cytoplazmě bakteriálních buněk. Genetickou informaci v nich uloženou může bakterie využívat stejně jako genetickou informaci z nukleoidu. Plazmidy s geny rezistence se označují jako R-plazmidy. Transpozony jsou geny, které jsou schopné se přemísťovat z jednoho místa DNA na jiné. Může dojít k přenosu genu z chromozomu na plazmid, ale také z plazmidu na chromozom. Tyto geny se pak stávají stálou součástí genetické výbavy.

Mezi mechanismy schopné horizontálního přenosu řadíme konjugaci, transdukcii a transformaci. Konjugace je přenos mezi bakteriemi pomocí speciálního výběžku cytoplazmy – tzv. sex pili. Transdukcce je přenos zprostředkovaný bakteriofágem. Transformace je příjem exogenní DNA. (Beneš, 2018; Lochmann, 2006)

8.4 Multirezistence

Bakterie mohou být rezistentní k většímu množství antibiotik, jak příbuzných, tak s naprosto odlišnou chemickou strukturou. Tato rezistence přináší největší problémy zejména v nemocničních zařízeních, kde způsobuje omezení možnosti léčby. Za vznikem multirezistence velice často stojí získání genu z plazmidu nebo transpozonu. Mezi multirezistentní druhy můžeme zařadit pneumokoky, stafylokoky nebo například enterokoky.

Pojem multirezistence se poprvé objevil v souvislosti s rezistencí *Mycobacterium tuberculosis*, která byla rezistentní ke dvěma nejdůležitějším a nejpoužívanějším antituberkulotikům. Multirezistenci lze rozdělit do třech skupin. Multiléková rezistence (MDR) znamená necitlivost alespoň k jedné látce ve třech skupinách antibiotik. Druhá skupina extenzivní rezistence (XDR) představuje rezistenci k alespoň jednomu antibiotiku z většiny skupin. U XDR mohou být maximálně dvě skupiny citlivé. Poslední

je panrezistence (PDR), kdy není citlivost k žádnému antibiotiku. (Schindler, 2010; Livermore, 2007; Hrabák, 2016)

8.5 MRSA

Jednou z nejznámějších multirezistentních bakterií je MRSA. Jde o bakterii *Staphylococcus aureus* charakteristického rezistencí k oxacilinu a všem β -laktamovým antibiotikům. Infekce způsobené MRSA jsou spojeny s vyšší úmrtností, než je tomu u infekcí nerezistentním kmenem *Staphylococcus aureus*. Větší úmrtnost není zapříčiněna vyšší virulencí, ale neschopností najít citlivé antibiotikum. Na vzniku rezistence se podílí gen *mecA*, který stojí za syntézou PBP2a. PBP2a má mnohem menší afinitu než klasický PBP2. Nedojde tedy k poruše syntézy buněčné stěny.

Dříve byla MRSA spojována pouze s nemocničním prostředím. Dnes se ale velmi často vyskytují i komunitní kmeny označované jako CA-MRSA. Nozokomiální kmeny mají zkratku HA-MRSA. CA-MRSA kmeny byly omezeny pouze na populaci mimo nemocnici. Způsobovaly nekomplikované infekce kůže a měkkých tkání. V poslední době ale dochází k prolínání těchto dvou skupin a nelze v některých případech přesně definovat o jaký konkrétní typ se jedná. CA-MRSA bývá agresivnější, ale dostatečně citlivá na jiná antibiotika. U HA-MRSA je hlavním problémem velmi špatná citlivost na různé skupiny antibiotik.

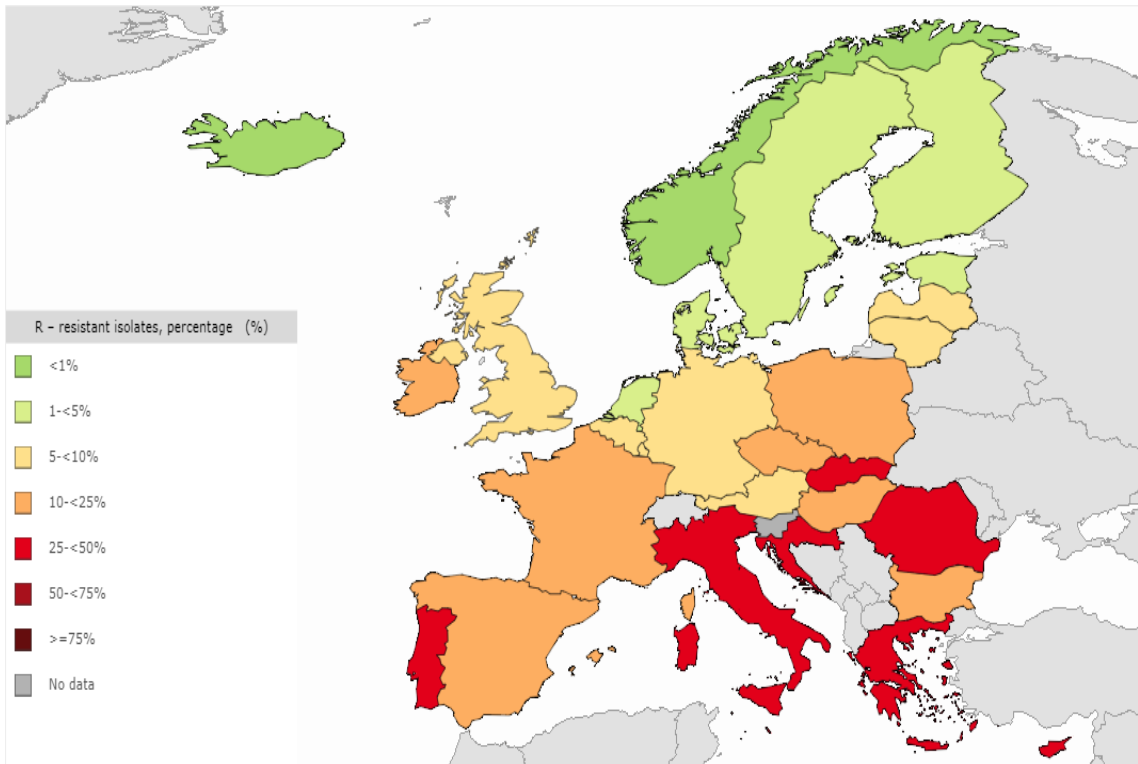
S tímto patogenem se můžeme setkat na sliznici či kůži u více jak poloviny zdravých jedinců. Pro tyto osoby bez oslabení nepředstavuje MRSA žádné komplikace. MRSA u citlivých jedinců může způsobit infekce kůže, měkkých tkání, dýchacích cest, sepsi, endokarditidu nebo například osteomyelitidu. Léčba závisí na místě infekce a na *in vitro* citlivosti k antibakteriálním látkám. Mezi látky, které vykazují citlivost k MRSA, patří daptomycin, linezolid a vankomycin. (Lakhundi, 2018; Schindler, 2018; Cunha, 2005)

8.6 Situace v Evropě

Ve výskytu rezistentních bakterií existují ve světě velké rozdíly. Dalo by se čekat, že u členů Evropské unie bude situace obdobná, ovšem ani to není pravda. Nejvyšší spotřebu antibiotik po přepočtu na velikost populace má Řecko nebo například Kypr.

Nejmenší spotřebu najdeme u Nizozemska. Rozdíl mezi těmito dvěma extrémny je přibližně trojnásobný. (www.ecdc.eu)

Rozdíly nejsou jen v spotřebě antibiotik, ale také ve výskytu multirezistentních kmenů. Procentuální rozložení MRSA ukazuje obrázek 17. Nejnižší výskyt mají severské státy, naopak u jižních států je procentuální podíl MRSA až 75 %. I zde je vidět souvislost mezi mírou užívání antibiotik a výskytem multirezistentních kmenů. Vyšší míře výskytu rezistence v jižních státech přispívají i vhodné klimatické podmínky. U severských zemí je jejich podnebí naopak výhodou v boji proti rezistenci. (ww.ecdc.eu)



Obrázek 17 Výskyt MRSA v Evropě.

Zdroj: <https://atlas.ecdc.europa.eu/public/index.aspx?Dataset=27&HealthTopic=4>

9. TESTY HODNOCENÍ ANTIMIKROBIÁLNÍ AKTIVITY

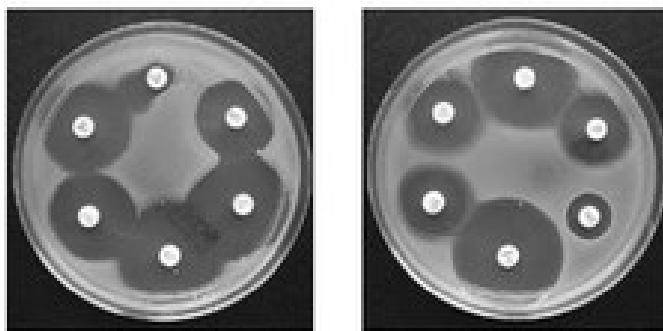
Pro správnou léčbu je kromě identifikace mikroorganismu důležité také hodnocení antimikrobiální aktivity vykultivovaného kmene. Při testech účinnosti se pozoruje interakce mezi antibiotikem a bakterií v *in vitro* prostředí. V případě, že je kmen rezistentní v laboratorních podmínkách, je skoro jisté, že nebude citlivý ani v *in vivo* prostředí. Naopak vlivem pozdě zahájené léčby, nerespektování farmakokinetiky nebo dalších faktorů může dojít k selhání léčby i v případě, kdy v podmínkách *in vitro* byl kmen citlivý. (Lochmann, 2006; Goering, 2016)

Hodnocení aktivity může být kvalitativní nebo kvantitativní. U kvalitativního hodnocení získáme pouze informaci o tom, zda daný kmen je, anebo není citlivý. Při kvantitativním zjistíme i informaci o MIC. MIC je nejnižší možná koncentrace, při které dojde k potlačení růstu testovaného kmene. Někdy se také můžeme setkat i s minimální baktericidní koncentrací (MBC). MBC představuje nejnižší koncentraci, která bakterie usmrcuje. Při práci by se vždy mělo pracovat s čistou kulturou, aby nedošlo k ovlivnění výsledku a nesprávné interpretaci. (Ryšková, 2010; Šulcová, 2018)

9.1 Diskový difúzní test

Diskový difúzní test je v praxi jednou z nejpoužívanějších metod. Jedná se o kvalitativní test, kde nás velikost inhibiční zóny informuje o rezistenci či citlivosti. Ve většině případů se provádí na Mueller-Hintonové agaru (MHA). U některých bakterií může být MHA obohacen o ovčí krev. Pro testování je třeba mít suspenzi testovaného mikroba ve fyziologickém roztoku, případně bujónu, o zákalu 0,5 stupně dle McFarlanda. Tato připravená suspenze o správném zákalu se očkuje pomocí tampónu nebo pipety na MHA. Je třeba, aby se suspenze rozprostřela po celé plotně a přebytek se odsál. Na lehce zaschnutou půdu se pak umísťují disky. Disky představují filtrační papíry nasycené danou koncentrací testovaného antibiotika. Plotny s antibiotickými disky se před hodnocením nechají 18-24 hodin při 37 °C inkubovat. Ukázka půdy po inkubaci je na obrázku 18. Hodnocení probíhá měřením průměru inhibičních zón, které se následně porovnávají s limity pro citlivé kmeny. Pokud je inhibiční zóna menší než hraniční, kmen je rezistentní. V případě, že je zóna větší, testovaná bakterie je citlivá.

Jednotlivé breakpointy jsou stanoveny na základě norem Evropské komise pro testování antimikrobní citlivosti (EUCAST) či Institutem pro klinické a laboratorní standardy (CLSI). Pro testování lze využít několik sestav antibiotik. Jednotlivé sestavy se vybírají dle konkrétního mikroorganismu a infekce kterou způsobuje, ale také podle toho, zda se jedná o ambulantního pacienta nebo pacienta na nemocničním lůžku. Výhodou metody je nízká cena a snadné provedení. (Ryšková, 2010; Schindler, 2010)



Obrázek 18 Diskový difúzní test u bakterie *Klebsiella pneumoniae*.

*Citlivost je prokázána ke všem testovaným antibiotikům, kromě ampicilinu (1. obr), ke kterému je *Klebsiella pneumoniae* přirozeně rezistentní.*

Zdroj: Melter, 2014

9.2 Mikrodiluční bujónová metoda

Mikrodiluční metoda je nejčastěji prováděným kvantitativním testem. Tímto testem lze v laboratorních podmínkách určit MIC, případně MBC. Jako růstové médium se ve většině případů využívá tekutý Mueller-Hinton (MH) bujón. Pro začátek testování je třeba mít připravené naředěné antibiotikum geometrickou řadou v tekuté půdě. Koncentrace antibiotika se volí dle hraniční koncentrace, která by měla být přibližně uprostřed. Většinou se využívají komerční destičky s 12 sloupci a 8 řádky. Na jedné destičce lze tak otestovat až 12 antibiotik o 8 různých koncentracích. Do každé jamky se naočkuje suspenze mikroba a testované antibiotikum. Takto připravená mikrotitrační destička přikrytá víčkem se nechá inkubovat 18–24 hodin při 37 °C. Při hodnocení se sleduje zákal půdy. Hodnota MIC odpovídá první jamce bez viditelného růstu, respektive zákalu. Součástí každé destičky je i jamka bez antibiotika, která slouží jako kontrola růstu. Výhodou této metody je možnost testovat několik antibiotik najednou, případně u komerčních souprav, kdy jedna destička představuje jedno

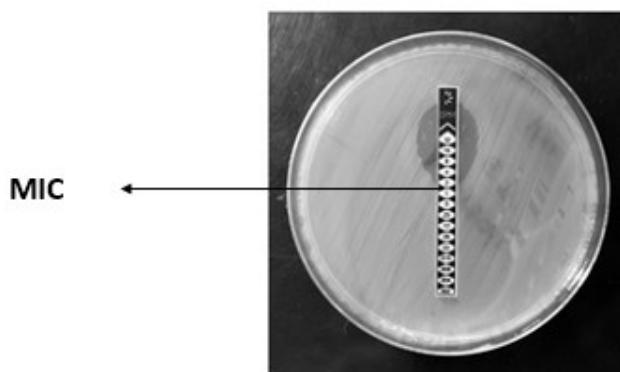
antibiotikum, je možné otestovat několik testovaných vzorků současně. Jedná se o přesnou a levnou metodu použitelnou nejen u bakterií, ale také kvasinek nebo plísní.

V případě, že bychom chtěli stanovit MBC, vyočkujeme z jamek, kde byla zaznamenána inhibice růstu, část bujónu a necháme inkubovat. Pokud byl účinek antibiotika baktericidní, na půdě nedojde k žádnému nárůstu.

Obdobou mikrodiluční metody je makrodiluční bujónová metoda. Při tomto testování se MIC hodnotí na Petriho miskách. Jedna miska představuje jednu koncentraci daného antibiotika. Jedná se o metodu velmi pracnou a nákladnou, a proto se s ní v praxi setkáme jen málo. Výhodou oproti mikrodiluční metodě může být snadnější možnost odhalení kontaminace. (Lochmann, 2006; Drnková, 2019)

9.3 E-test

Některé mikroby je obtížné kultivovat pomocí mikrodiluční bujónové metody. Pro takové bakterie je vhodné použít jednu z dalších kvantitativních metod a tou je E-test. E-test se využívá také například pro ověření nerozhodných výsledků. Stejně jako u diskového difúzního testu se naočkuje suspenze testovaného kmene na MHA. Sterilní pinzetou se na tuto plotnu vloží plastický proužek, který má v sobě exponenciální gradient koncentrace testovaného antibiotika. Na tomto proužku je vyznačena stupnice ředění antibiotika. Plotna s položeným proužkem se nechá inkubovat. Po inkubaci je okolo proužku zřetelná inhibiční zóna ve tvaru elipsy/kapky, viz obrázek 19. MIC představuje hodnotu uvedenou na proužku v místě, kde inhibiční zóna protíná proužek. (Drnková, 2019; Melter, 2014)

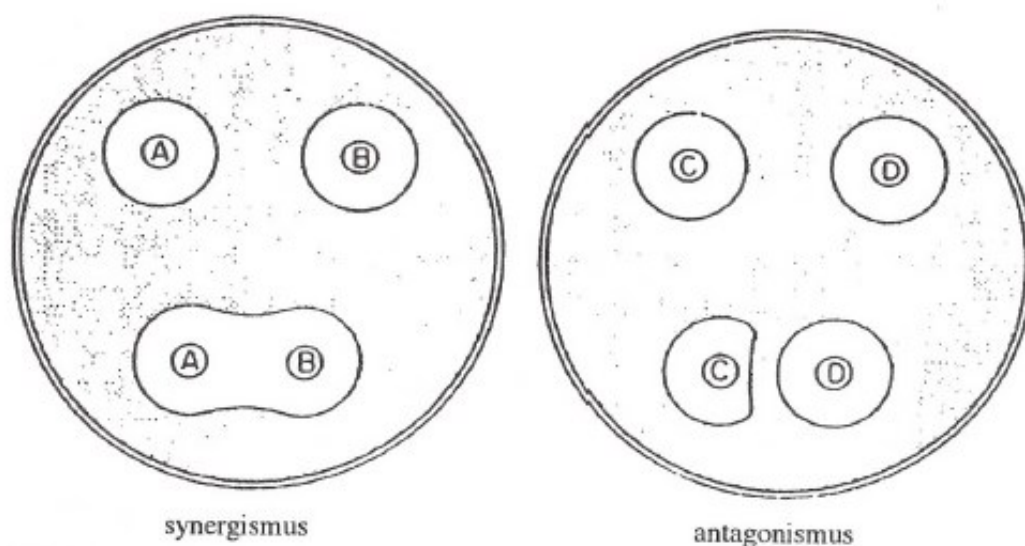


Obrázek 19 E-test s vyznačenou MIC.

Zdroj: Drnková, 2019

9.4 Testování kombinace antibiotik

Někdy je třeba podat pacientům více než jedno antibiotikum. Antibiotika se ale mohou ve svém působení podporovat nebo naopak zeslabovat. Pokud se antibiotika navzájem podporují, označujeme takový vztah jako synergismus či aditivitu. Pokud ale působení jednoho antibiotika zeslabuje účinnost jiného, vzniká vztah, který nazýváme antagonismus. Pokud se antibiotika vůbec neovlivňují, nazýváme takový vztah jako indiferentní. Tyto vztahy se dají testovat i v laboratorních podmínkách, a to jak difúzními, tak dilučními testy. Nejjednodušším je diskový difúzní test, kdy disky s antibiotiky, jejichž vztah chceme testovat, umístíme na povrch testované půdy ve vzdálenosti 12 mm a necháme inkubovat. Dle tvaru inhibičních zón pak vyhodnotíme vztah testovaných antibiotik. Příklady synergismu a antagonismu uvádí obrázek 20. (Ryšková, 2010; Goering,2016)



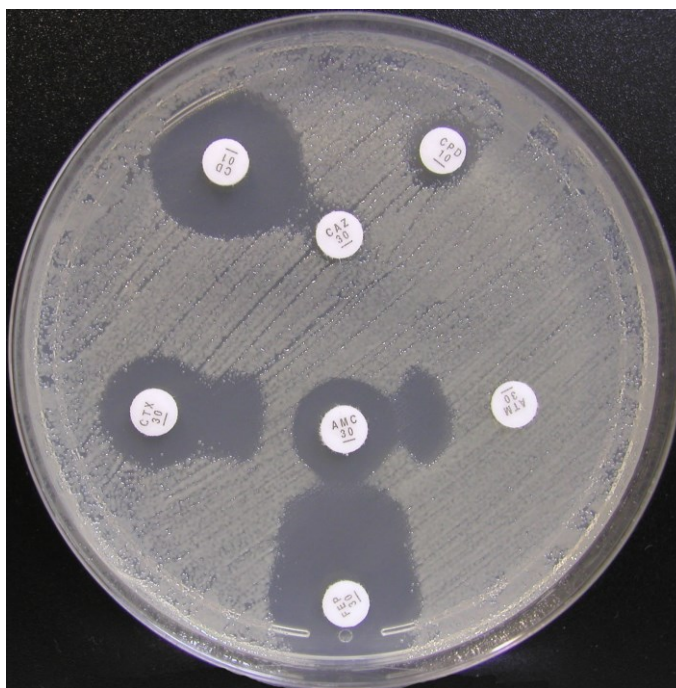
Obrázek 20 Synergismus a antagonismus u antibiotik.

Sledováním inhibičních zón lze vidět, že v případě synergismu se inhibiční zóny A i B spojily a jejich společný účinek je tak navzájem prospěšný. Naopak u antagonistického působení zóna D utlačuje zónu C, která je menší a mění svůj tvar.

Zdroj: Ryšková, 2010

9.5 Průkaz β -laktamáz

Průkaz β -laktamáz nepatří do běžně prováděných testů antibiotické účinnosti. Jedná se o specializované vyšetření. Nejvyužívanějším testem pro průkaz β -laktamáz je double disc synergy test (DDST), kterým můžeme identifikovat ESBL nebo inducibilní AmpC β -laktamázy. Základem DDST je detekce deformace inhibičních zón mezi disky s cefalosporiny a aztreonamem a diskem s amoxicilinem/klavulanovou kyselinou. Pokud je mikrob producentem ESBL, vytvoří se inhibiční zóna ve tvaru zátky od šampaňského kolem alespoň jednoho z antibiotik na straně, která sousedí s diskem s amoxicilinem/kyselinou klavulanovou. Jako průkaz inducibilní AmpC je vytvoření inhibiční zóny tvaru písmene D u antibiotika na straně sousedící s diskem obsahujícím amoxicilin/klavulanovou kyselinu. Příklady inhibičních zón uvádí obrázky 21 a 22. (www.szu.cz; Lochmann, 2006)

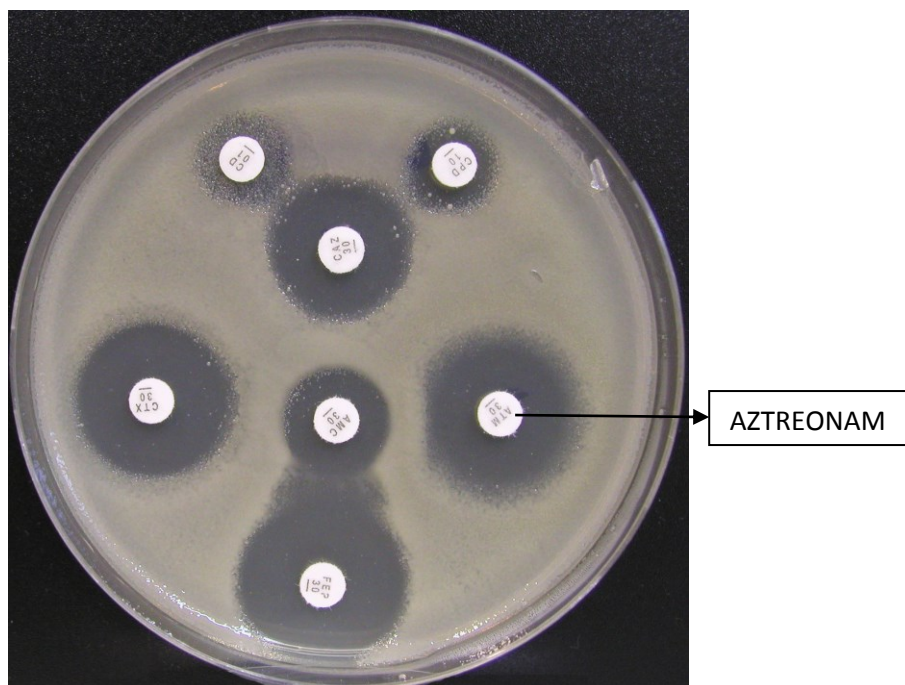


Obrázek 21 Výsledek DDST s produkcí ESBL.

AMC – amoxicilin/kyselina klavulanová, CTX-cefotaxim, CAZ – ceftazidim, FEP – cefepim, ATM – aztreonam, CPD – cefpodoxim, CD – cefpodoxim/kyselina klavulanová.

Na tomto obrázku je patrné rozšíření inhibiční zóny mezi disky s amoxicilinem/ kyselinou klavulanovou a cefalosporinem. Inhibiční zóna připomíná tvar zátky od šampaňského.

Zdroj: <http://www.szu.cz/prukaz-beta-laktamaz-sirokeho-spektra-esbl-a-typu-ampc-u>



Obrázek 22 Výsledek DDST s produkcí inducibilní AmpC.

AMC – amoxicilin/kyselina klavulanová, CTX – cefotaxim, CAZ – ceftazidim, FEP – cefepim, ATM – aztreonam, CPD – cefpodoxim, CD – cefpodoxim/kyselina klavulanová.

U disku s aztreonamem je vidět inhibiční zóna připomínající písmeno D směrem k disku s amoxicilinem/kyselinou klavulanovou.

Zdroj:<http://www.szu.cz/prukaz-beta-laktamaz-sirokeho-spektra-esbl-a-typu-ampc-u>

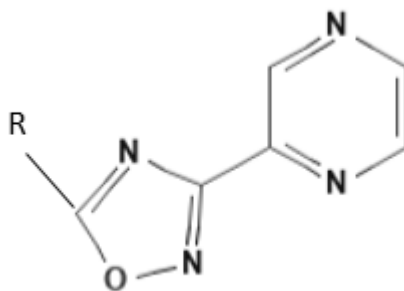
10. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

10.1 Testované látky

Testované látky byly dodány od pana Dr. Martina Juháse a paní Dr. Marty Kučerové. Žádanka o antimikrobní screening zahrnovala jméno zadavatele, kontakt, datum. Kromě těchto základních informací byl na žádance uveden kód testované látky, její vzorec, molekulová hmotnost, teoretická a skutečná navážka. Všechny tyto informace o testovaných látkách uvádí tabulky **8** až **13**. Látky jsou rozděleny do 3 skupin dle chemické struktury.

1. skupina testovaných látek.

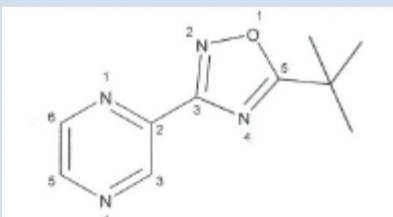
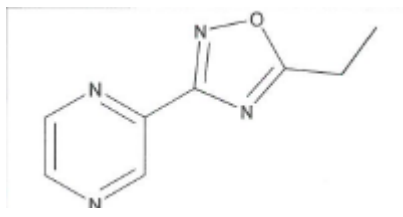
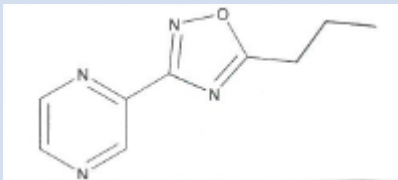
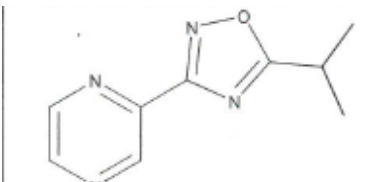
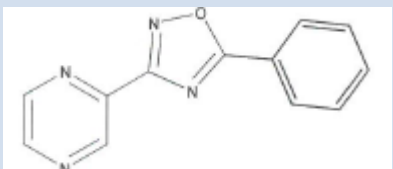
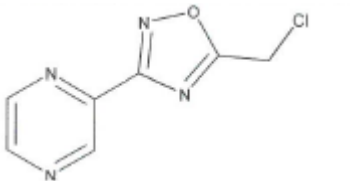
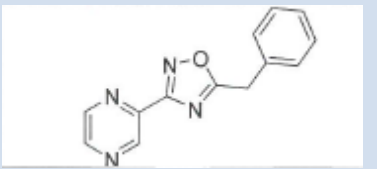
V této skupině látek od paní Dr. Kučerové je 10 sloučenin. Žádanka spolu s látkami byla dodána 18.1.2019. Jedná se o deriváty 3-pyrazinyl-1,2,4-oxadiazolu. Základní struktura je zobrazena na obrázku **23**. Výjimku tvoří látka 10, která má navíc na pozici 5- pyrazinu připojen *tert*-butyl. Její struktura i struktura ostatních zástupců této skupiny je uvedena v tabulce **8**.

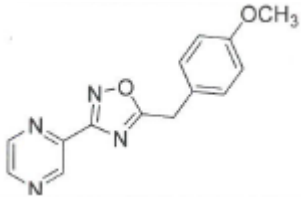
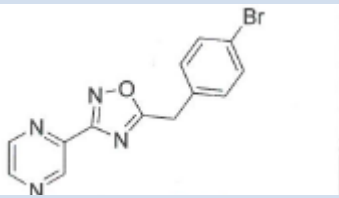
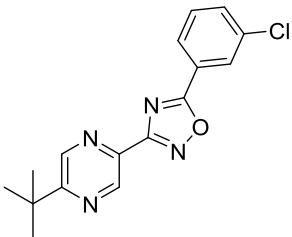


Obrázek 23 Základní chemická struktura látek ze skupiny číslo 1.

Zdroj: https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/3-Pyrazinyl-1_2_4-oxadiazole

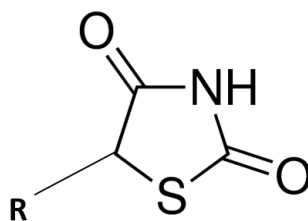
Tabulka 8 Látky skupiny číslo 1.

Číslo	Kód	Vzorec	Molekulová hmotnost	Teoretická navážka	Skutečná navážka
1	OX-0b		204,23	8,17 mg	8,5 mg
2	OX-0c		176,18	7,05 mg	9,4 mg
3	OX-0d		190,21	7,61 mg	8,8 mg
4	OX-0e		190,21	7,61 mg	9,0 mg
5	OX-0f		224,22	8,97 mg	9,1 mg
6	OX-0g		196,59	7,86 mg	8,0 mg
7	OX-15		238,25	9,53 mg	9,8 mg

8	OX-17		268,28	10,73 mg	12,1 mg
9	OX-18		317,15	12,69 mg	13,6 mg
10	1-OX-3C		314,77	12,59 mg	13 mg

2. skupina testovaných látek.

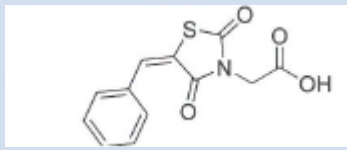
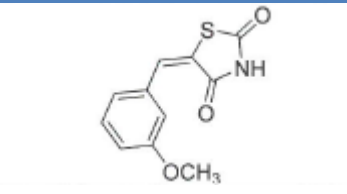
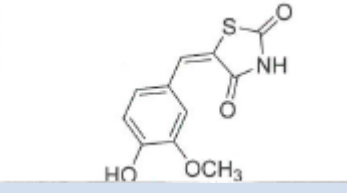
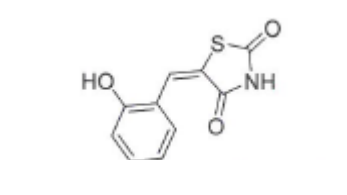
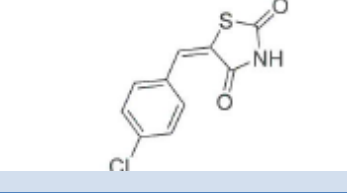
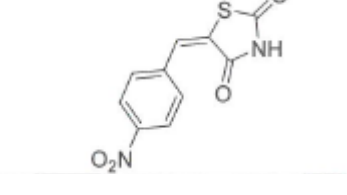
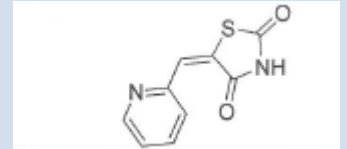
Ve 2 skupině najdeme 7 látek dodaných stejně jako u látek skupiny číslo 1 paní Dr. M. Kučerovou. Datum dodání těchto látek je 25. 9. 2019. Z chemického hlediska jde o deriváty 2,4-thiazolidindionu. Základní struktura je vyobrazena na obrázku **24**. Výjimkou, která nesplňuje strukturu uvedenou na obrázku **24**, je látka 1 s kódem Tab. Její struktura je zobrazena v tabulce **9**.



Obrázek 24 Základní struktura látek ze skupiny číslo 2.

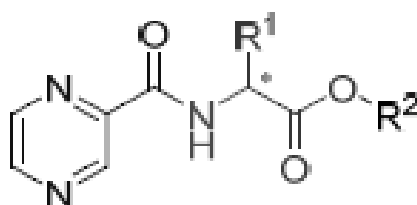
Zdroj: <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/375004?lang=en®ion=CZ>

Tabulka 9 Látky skupiny číslo 2.

Číslo	Kód	Vzorec	Molekulová hmotnost	Teoretická navážka	Skutečná navážka
1	Tab		263,27	10,53 mg	10,7 mg
2	Tp		235,26	9,41 mg	15,2 mg
3	Ta		251,26	10,05 mg	12,2 mg
4	Tc		221,23	8,85 mg	9,8 mg
5	Tm		239,67	9,59 mg	12,1 mg
6	Ti		250,23	10,01 mg	11,1 mg
7	Tt		206,22	8,25 mg	8,8 mg

3. skupina testovaných látek.

Třetí skupina obsahuje 37 látek. Tyto látky představují aminokyselinami *N*-substituovaný pyrazinkarboxamid. Základní struktura je zobrazena na obrázku 25. Tyto látky byly dodány panem Dr. Juhásem. Látky jsou rozděleny do podskupin dle substituce aminokyselin (substituent R² viz obrázek 25). Skupina 3A je tvořena 8 látkami, kde jsou aminokyseliny bez substituce. Ve skupině 3B je 14 látek a aminokyseliny jsou methylované. U skupiny 3C, tvořené 12 látkami, jsou aminokyseliny ethylované, a ve skupině 3D zastoupené 3 látkami, je na pozici 5- pyrazinového jádra chlor. Jejich rozdělení spolu s kódem, vzorcem, molekulovou hmotností a navážkami zobrazují tabulky 10, 11, 12 a 13.

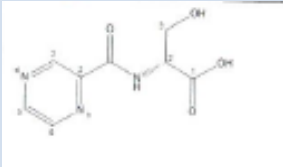
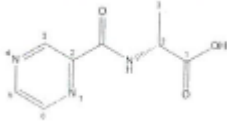
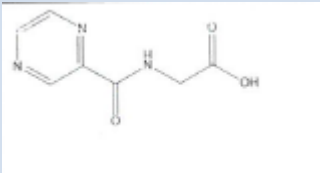
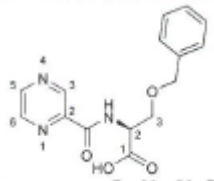
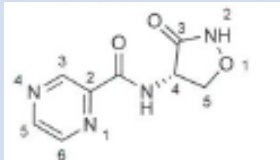
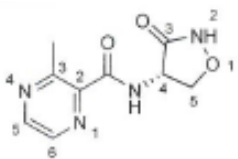


Obrázek 25 Základní struktura látek ze skupiny číslo 3.

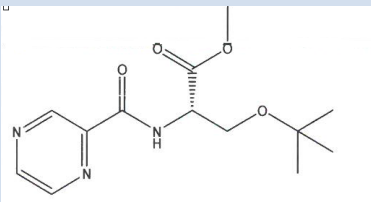
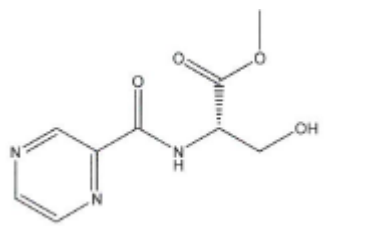
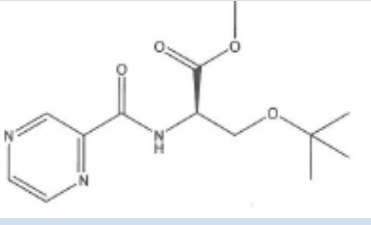
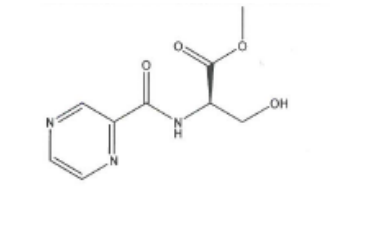
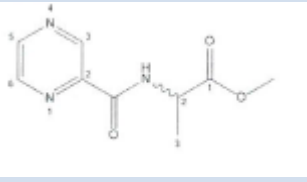
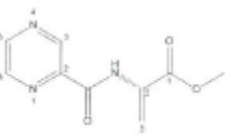
Zdroj: Juhás, 2020

Tabulka 10 Látky skupiny číslo 3 – podskupina A

Číslo	Kód	Vzorec	Molekulová hmotnost	Teoretická navážka	Skutečná navážka
1	PC-L-Ala		195,18	7,81 mg	12,0 mg
2	B-D-Ser		209,20	8,37 mg	10,10 mg

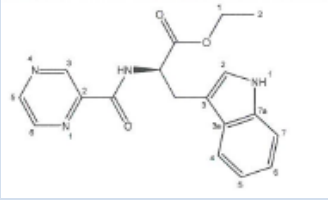
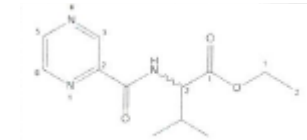
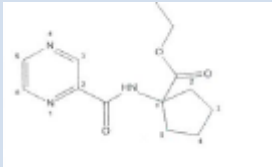
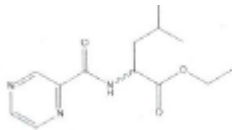
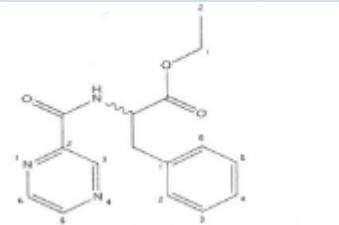
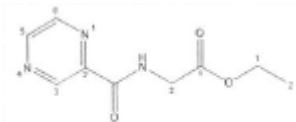
3	PC-D-Ser		211,18	8,45 mg	9,10 mg
4	PC-D-Ala		195,18	7,81 mg	8,30 mg
5	PC-Gly		181,15	7,25 mg	7,70 mg
6	PC-L-OBz-Ser		301,30	12,05 mg	13,50 mg
7	PC-DCS		208,18	8,33 mg	10,4 mg
8	3Me-PC-DCS		222,20	8,89 mg	9,3 mg

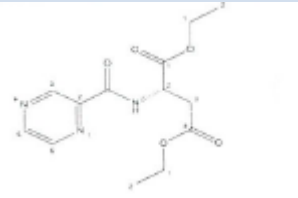
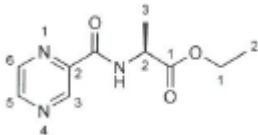
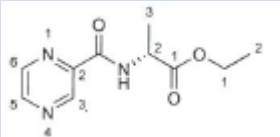
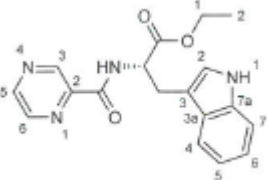
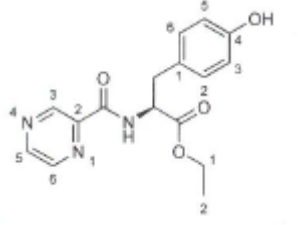
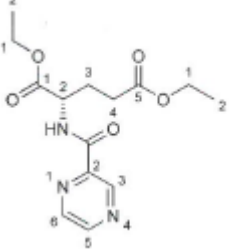
Tabulka 11 Látky skupiny číslo 3 – podskupina B.

Číslo	Kód	Vzorec	Molekulová hmotnost	Teoretická navážka	Skutečná navážka
1	PC-L-OtBu-Ser-Me		281,31	11,25 mg	19,3 mg
2	PC-L-Ser-Me		225,20	9,01 mg	11,8 mg
3	PC-D-OtBu-Ser-Me		281,31	11,25 mg	13,3 mg
4	PC-D-Ser-Me		225,20	9,01 mg	7,9 mg
5	PC-DL-Ala-Me		209,21	8,37 mg	12,60 mg
6	PC-MeAc		207,19	8,29 mg	9,60 mg

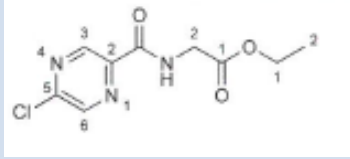
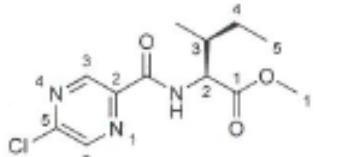
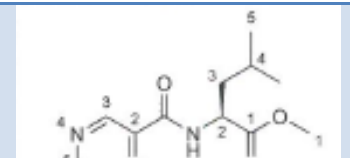
7	PC-L-Leu-Me		251,29	10,05 mg	12,70 mg
8	PC-D-Val-Me		237,26	9,49 mg	15,10 mg
9	PC-L-Val-Me		237,26	9,49 mg	12,80 mg
10	PC-D-Leu-Me		251,29	10,05 mg	12,60 mg
11	PC-D-Pgl-Me		271,28	10,85 mg	14,50 mg
12	PC-L-OtBu-Thr-Me		295,34	11,81 mg	16,60 mg
13	PC-L-Thr-Me		239,23	9,57 mg	10,40 mg
14	PC-L-Met-Me		269,32	10,77 mg	22,5 mg

Tabulka 12 Látky skupiny číslo 3 – podskupina C.

Číslo	Kód	Vzorec	Molekulová hmotnost	Teoretická navážka	Skutečná navážka
1	PC-D-Trp-Et		338,37	13,53 mg	17,1 mg
2	PC-DL-Val-Et		251,29	10,05 mg	11,0 mg
3	PC-CPC-Et		263,30	10,53 mg	13,50 mg
4	PC-DL-Leu-Et		265,31	10,61 mg	25,70 mg
5	PC-DL-Phe-Et		299,33	11,97 mg	19,90 mg
6	PC-Gly-Et		209,21	8,37 mg	10,30 mg

7	PC-L-Asp-diEt		295,30	11,81 mg	12,70 mg
8	PC-L-Ala-Et		223,23	8,93 mg	9,50 mg
9	PC-D-Ala-Et		223,23	8,93 mg	11,60 mg
10	PC-L-Trp-Et		338,37	13,53 mg	18,00 mg
11	PC-L-Tyr-Et		315,33	12,61 mg	13,40 mg
12	PC-L-Glu-diEt		309,32	12,37 mg	16,70 mg

Tabulka 13 Látky skupiny číslo 3 - podskupina D.

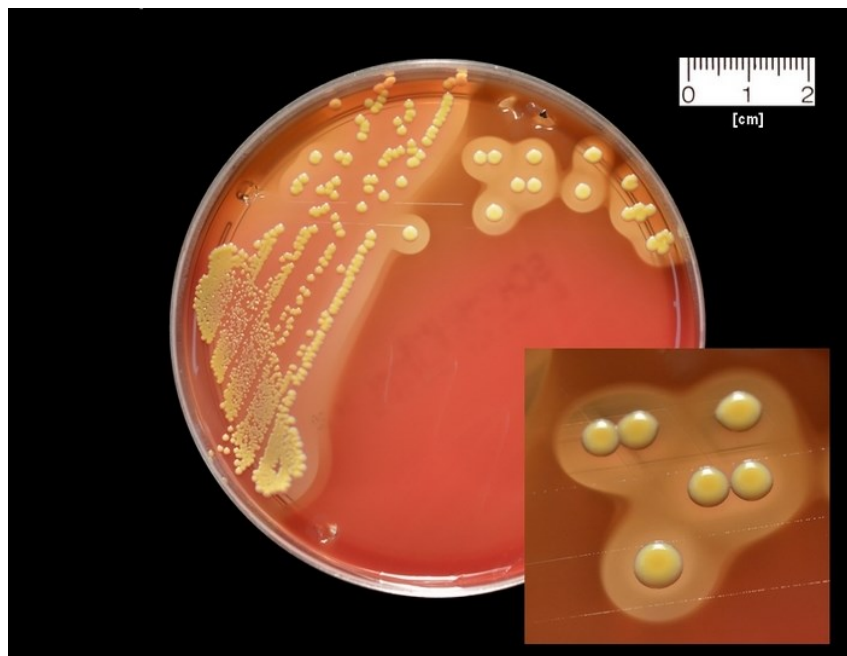
Číslo	Kód	Vzorec	Molekulová hmotnost	Teoretická navážka	Skutečná navážka
1	5Cl-PC-Gly-Et		243,65	9,75 mg	10,20 mg
2	5Cl-PC-L-Ile-Me		285,73	11,43 mg	16,20 mg
3	5Cl-PC-L-Leu-Me		285,73	11,43 mg	12,2 mg

10.2 Testované kmeny

Pro testování jsme využili osm kmenů bakterií. Tyto bakterie byly získány kultivací na vhodném agaru, kterým byl MHA. Kmeny pocházejí z České sbírky organismů v Brně, případně se jedná o kmen získaný z německé sbírky Deutsche Sammlung der Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ), Braunschweig, Německo. Testovanými kmeny jsou *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* (SA), (ATCC 29213, CCM 4223), meticilin-rezistentní *Staphylococcus aureus* (MRSA), (ATCC 43300, CCM 4750), *Staphylococcus epidermidis* (SE), (ATCC 12228, CCM 4418), *Enterococcus faecalis* (EF), (ATCC 29212, CCM 4224), *Escherichia coli* (EC), (ATCC 25922, CCM 3954), *Klebsiella pneumoniae* (KP), (ATCC 10031, CCM 4415), *Acinetobacter baumannii* (ACI), (ATCC 19606, DSM 30007), *Pseudomonas aeruginosa* (PA), (ATCC 27853, CCM 3955).

Staphylococcus aureus

SA je grampozitivní, koaguláza pozitivní bakterie tvaru koka, která tvoří hroznovité shluky. V populaci je běžně nazývána jako zlatý stafylokok díky svým zlatožlutě až zlatohnědě zbarveným koloniím. Na krevním agaru můžeme vidět úplnou hemolýzu, viz obrázek 26. Vzhledem k její toleranci až 10 % NaCl, lze využívat půdy s přidavkem 10 % NaCl pro její selekci. Mezi faktory virulence SA patří schopnost tvořit řadu enzymů a toxinů. Jde o jeden z nejčastějších lidských patogenů. Z epidemiologického hlediska je velmi významné bezpříznakové nosičství na nosní sliznici, což ohrožuje citlivé pacienty. Bývá velmi častým původcem různých kožních onemocnění. Z orgánových postižení se mezi nejvýznamnější řadí například osteomyelitida, sepse, endokarditida nebo bronchopneumonie. (Julák, 2006; Schindler, 2010; Ryšková, 2010)



Obrázek 26 *Staphylococcus aureus* na krevním agaru.

SA roste na krevním agaru v hladkých nažloutlých koloniích. Na obrázku je též vidět úplná hemolýza. Kultivace 24 hodin při 37 °C.

Zdroj:

http://www.bacteriaiphotos.com/Staphylococcus_aureus_on_Schaedler_a_naerobe_agar.html

MRSA

Jak již bylo řečeno v teoretické části této práce a jak také vyplývá ze zkratky MRSA, jedná se o stafylokoka rezistentního k meticilinu, ale i dalším penicilinovým a jiným antibiotikům. Roste na všech základních půdách, kde ale nelze odlišit přítomnost rezistence. Proto se MRSA kultivuje na selektivní půdě s přidavkem NaCl a oxacilinu, případně cefoxitinu. Příklad chromogenní selektivní půdy pro kultivaci MRSA je zobrazen na obrázku 27. Jde o významného nozokomiálního patogena s celosvětovým výskytem. Stejně jako SA i MRSA se může vyskytovat bezpříznakově na těle člověka. Problém představuje zejména pro osoby s oslabenou imunitou, případně po operacích. (Ryšková, 2010)



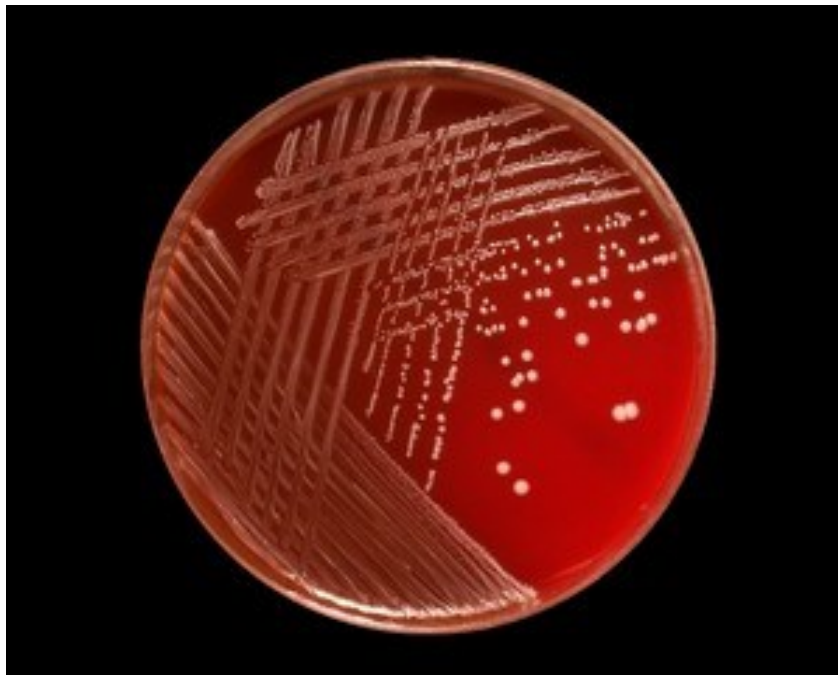
Obrázek 27 MRSA na selektivní půdě

BBL™ CHROMagar™ MRSA II je selektivní agar, obsahující cefoxitin, který slouží k detekci MRSA. MRSA hydrolyzuje chromogenní substráty přítomné v agaru a touto reakcí dochází ke specifickému růžovo fialovému zbarvení.

Zdroj: <https://www.bd.com/en-uk/products/diagnostics-systems/prepared-culture-media/bbl-chromagar-mrsa-ii>

Staphylococcus epidermidis

SE patří do skupiny koaguláza negativních stafylokoků. Bývá součástí fyziologické mikroflóry kůže a sliznic člověka. Jeho patogenita se projevuje jen u citlivých jedinců, kdy může stát za infekcemi jako jsou katérové sepse, endokarditidy, hnisavé infekce a další. U zdravého člověka infekci nezpůsobí. Na krevním agaru roste v porcelánově bílých koloniích bez zóny hemolýzy. O mechanismech virulence u SE se ví podstatně méně, než je tomu u SA. Neprodukuje ani tolik enzymů a toxinů jako SA. Jedním z nejvýznamnějších mechanismů může být tvorba biofilmů na povrchu různých implantátů a náhrad. Ukázka růstu na krevním agaru je na obrázku 28. (Ryšková, 2010; Peutherer, 1999)



Obrázek 28 *Staphylococcus epidermidis* na krevním agaru.

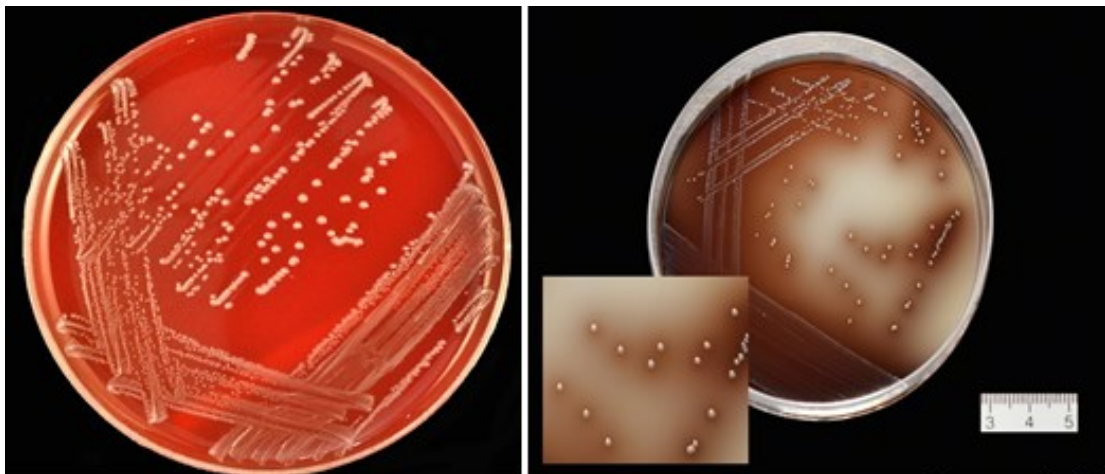
SE se kultivuje 24 hodin při 37 °C. Na krevním agaru vytváří porcelánově bílé kolonie bez zóny hemolýzy.

Zdroj:

<http://www.bacteriainphotos.com/bacteria%20under%20microscope/staphylococcus%20epidermidis%20microscopy.html>

Enterococcus faecalis

EF je grampozitivní kok vytvářející řetízky. Přirozeně se vyskytuje ve střevní mikroflóře člověka. U oslabených osob může vyvolat hnisavé břišní záněty, endokarditidy, sepse. Pokud se dostane do močových cest, způsobuje infekce močových cest. Charakteristická je pro něj poměrně vysoká odolnost vůči fyzikálním i chemickým vlivům. Přežije například až 30 minut při 60 °C nebo je schopen růst na půdách s přidavkem až 6 % NaCl. Roste na krevním agaru v šedobílých koloniích. Jeho kultivace je také možná na žluč-eskulinovém agaru, což je agar s přidavkem až 40 % žluči a eskulinu. Porovnání růstu na krevním a žluč eskulinovém agaru je zobrazeno na obrázku 29. EF má pozitivní pyrrolidonylpeptidázovou aktivitu. (Schindler, 2010; Ryšková, 2010)



Krevní agar

Žluč - eskulinový agar

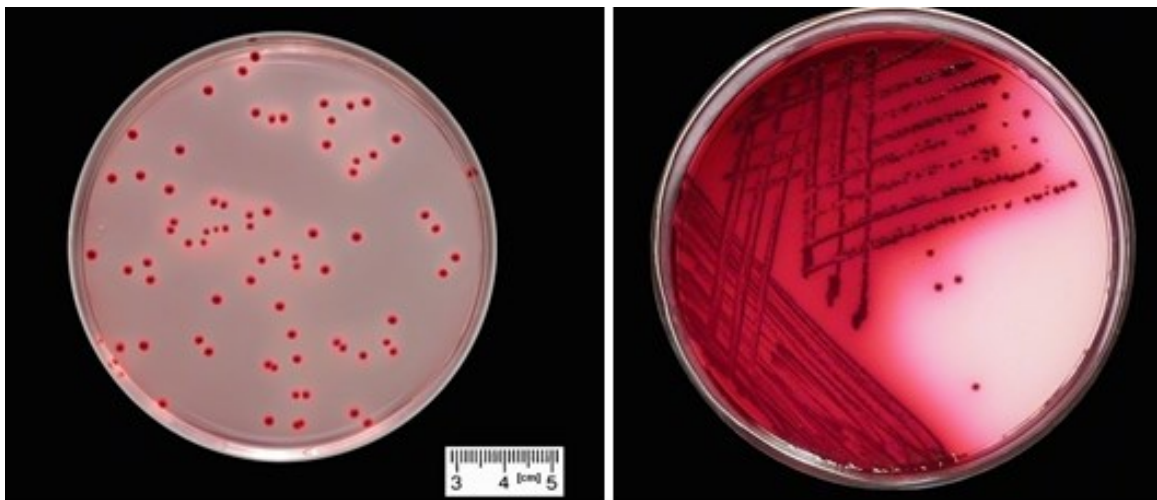
Obrázek 29 Enterococcus faecalis na krevním a na žluč-eskulinovém agaru.

Na krevním agaru vytváří EF kruhové kolonie s hladkým okrajem. EF hydrolyzuje eskulin v přítomnosti žluči. Hydolýza má za následek černání média kolem narostlé kolonie. Kultivuje se 24 hodin při 37 °C.

*Zdroj: <https://www.flickrriver.com/photos/13930485@N05/1417959903/>;
<https://www.microbiologyinpictures.com/bacteria-photos/enterococcus-faecalis-images/bile-esculin-agar-plate.html>*

Escherichia coli

E. coli je gramnegativní, fakultativně anaerobní tyčinka. *E. coli* je schopna metabolizovat laktózu, čehož se využívá zejména při její kultivaci. Kultivuje se na Endově a MacConkey agaru, kde má narůžovělé zbarvení viz obrázek 30. Identifikace se provádí biochemicky případně zpětnou aglutinací. *E. coli* představuje typickou součást střevní mikroflóry člověka, ale může být příčinou závažných klinických infekcí, jako je sepse nebo infekce močového traktu. Patogenita se projevuje zejména při masivní kontaminaci potravin, při dlouhodobé léčbě antibiotiky, u oslabených jedinců nebo při kontaminaci mimo zažívací trakt. Rozlišujeme 4 střevní typy *E. coli* – enteropatogenní, enterotoxigenní, enteroinvazivní a enterohemoragické. (Kramář, 2008; Ryšková, 2010)



Mac Conkey agar

Endův agar

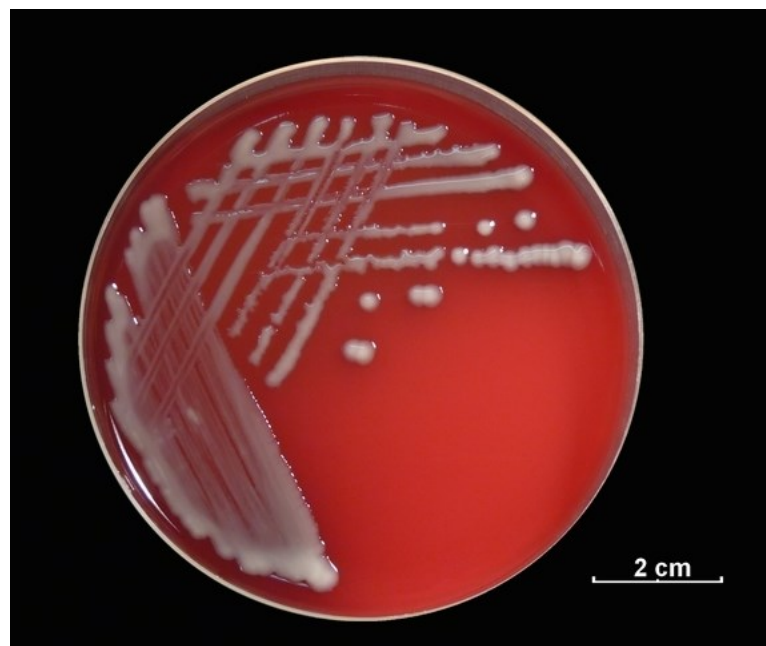
Obrázek 30 E. coli na MacConkey a Endově agaru.

Na Endově půdě bakterie kvasící laktózu vytváří tmavě růžové zbarvení. EC má na Endově agaru kovových lesk. I v případě Mac Conkey agaru bakterie, které jsou schopny kvasit laktózu, rostou v růžových koloniích.

Zdroj: <https://www.microbiologyinpictures.com/bacteria-photos/escherichia-coli-photos/e.-coli.html>; <https://www.microbiologyinpictures.com/bacteria-photos/escherichia-coli-photos/e.-coli-endo.html>

Klebsiella pneumoniae

KP je gramnegativní tyčinka. Tvoří přirozenou součást gastrointestinálního traktu a dýchacího ústrojí. KP je zodpovědná za celou řadu nemocí, jako jsou infekce močových cest, pneumonie, jaterní abscesy, ale i další. Ve většině případů tyto infekce postihnou pouze oslabené jedince. Kultivuje se na krevním agaru, kde roste ve formě bílých hlenovitých kolonií (obrázek 31). Řadí se také k laktóza pozitivním kmenům, které rostou na MacConkey agaru v růžových koloniích. U KP nalezneme pouzdra, která lze zvýraznit Burriho metodou. Pouzdra jsou také jedním z faktorů virulence. (Ryšková, 2010)



Obrázek 31 *Klebsiella pneumoniae* na krevním agaru.

KP tvoří na krevním agaru bílé mukoidní kolonie. Kultivuje se 24 hodin v aerobní atmosféře při 37 °C.

Zdroj:

<https://www.microbiologyinpictures.com/bacteria%20photos/klebsiella%20pneumoniae%20photos/KLPN1.html>

Acinetobacter baumannii

ACI je gramnegativní, nepohyblivá, nefermentující tyčinka. Při několikanásobných kultivacích mění morfologii a vytváří kokobacily. Obvykle se vyskytuje ve dvojicích, případně tvoří různě dlouhé řetízky. Je oxidáza negativní a kataláza pozitivní. ACI se běžně vyskytuje ve vodě, půdě, na rostlinách a dalších organických substrátech. Infekce může způsobit zejména u oslabených osob, a to pneumonie, sepse a infekce ran. Díky svému rozsáhlému spektru rezistence vůči antibiotikům představuje velmi nebezpečného nozokomiálního patogena. Na krevním agaru vytváří šedavě bílé kolonie. Jeho růst na základním živném agaru je zobrazen na obrázku **32**. (Howard, 2014; Peleg, 2008)



Obrázek 32 *Acinetobacter baumannii* na živném agaru.

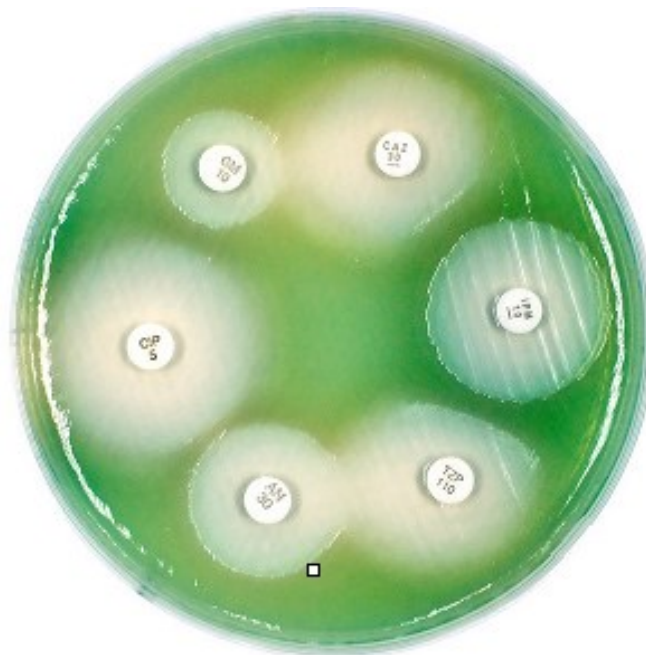
ACI tvoří šedavě bílé kolonie. Kultivuje se 24 hodin při 37 °C

Zdroj:

<http://old.vscht.cz/obsah/fakulty/fpbt/ostatni/miniatlas/images/bakterie/kolonie/abaumh.jpg>

Pseudomonas aeruginosa

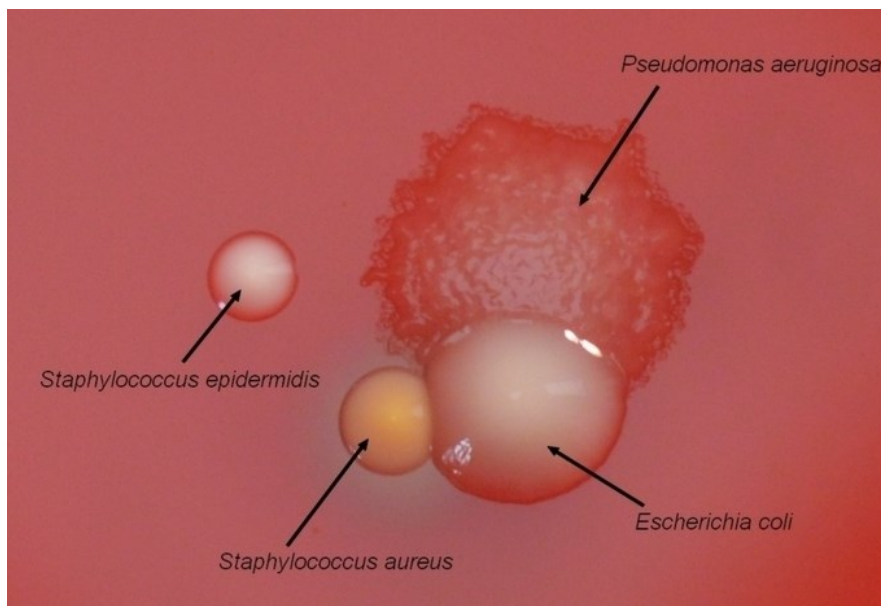
PA je gramnegativní tyčinka. Její kultivace je poměrně snadná a lehce identifikovatelná. PA je typická tvorbou pigmentů (některé jsou zobrazeny na obrázku 33) a úplnou hemolýzou na krevním agaru. Má i svoji typickou vůni připomínající jasmínový, případně lipový květ. Vykazuje oxidázovou i katalázovou pozitivitu. Vyskytuje se v různých vodách, ve střevě obratlovců, na rostlinách, ale i v půdě. Patogenní je zejména pro oslabené jedince a může způsobit infekci jakéhokoliv orgánu či systému těla. Nejtypičtějšími infekcemi jsou sepse, infekce popálenin, osteomyelitidy a infekce oka. (Kramář, 2008; Votava, 2003)



Obrázek 33 Typický pigment bakterie *Pseudomonas aeruginosa* – kultivace na MHA.

Zdroj: https://www.flickr.com/photos/point_blank/2805482783

Porovnání růstu vybraných bakterií z našeho testování, konkrétně EC, PA, SA a SE na krevním agaru po 24hodinové inkubaci při 37 °C je znázorněno na obrázku **34**.



Obrázek 34 *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* – porovnání na krevním agaru.

SE, SA a EC rostou na krevním agaru v hladkých koloniích. *SA* má nažloutlou barvu, zatímco *SE* má porcelánově bílé kolonie a *EC* tvoří kolonie načedlé. *PA* na krevním agaru roste v mukoidních koloniích. Na krevním agaru má *PA* šedobílý pigment.

Zdroj: <https://www.microbiologyinpictures.com/bacteria-photos/escherichia-coli-photos/e-coli-bacteria.html>

10.3 Standardy antibiotik

Jako standardy jsme využili dvě antibiotika, konkrétně ciprofloxacin a gentamicin od firmy Sigma-Aldrich, Co., Steinheim, Německo. Pro gramnegativní bakterie je doporučeným standardem dle EUCAST ciprofloxacin. U grampozitivních bakterií je tímto standardem, též určeným dle EUCAST, gentamicin. Tyto standardy slouží k ověření funkčnosti naší metody. K ověření jsme využili 4 referenční kmeny (*SA*, *EF*, *EC*, *PA*). Námi naměřené hodnoty, které uvádí tabulka **14**, jsme porovnali s rozmezími danými dle směrnic EUCAST a na základě těchto srovnání jsme určili, že je metoda validní.

Tabulka 14. Porovnání rozmezí stanovených dle EUCAST s našimi zjištěnými hodnotami.

Kmen	Inkubační doba	Testovaná látka			
		Gentamicin	Rozmezí (EUCAST)	Ciprofloxacin	Rozmezí (EUCAST)
SA	24 h	1 mg/l	0,125 - 1 mg/l	0,25 mg/l	0,125 – 0,5 mg/l
EF	24 h	4 mg/l	4 – 16 mg/l	0,25 mg/l	0,25 – 2 mg/l
EC	24 h	1 mg/l	0,25 – 1 mg/l	0,004 mg/l	0,004 - 0,016 mg/l
PA	24 h	0,5 mg/l	0,5 – 2 mg/l	0,5 mg/l	0,25 – 1 mg/l

*Zdroj: The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing.
Routine and extended internal quality control as recommended by EUCAST
Version 9, 2019.*

10.4 Pomůcky

Veškerá manipulace s kmeny testovaných bakterií a testovanými látky probíhala v laminárním boxu. Kromě laminárního boxu Esco Class II type A2 od firmy Esco Technologies, USA, jsme z přístrojů v laboratoři využili také termostat Binder WTB od firmy Binder, Německo, denzitometr DEN-18 McFarland Biosan od firmy Biosan Ltd, Lotyšsko, vortex MS2 Minishaker IKA od firmy IKA, Německo, ultrazvukovou lázeň a autokláv.

K naší práci byly také zapotřebí tyto pomůcky a chemikálie.

- Mikrotitrační destičky s víčky (Gamedium, Jesenice, Česká republika)
- Mikropipety (Eppendorf, Hamburk, Německo)
- Sterilní špičky (Eppendorf, Hamburk, Německo)
- Rezervoár na médium, tvořený 12 jamkami
- Očkovací kličky (Biologix, Lenexa, USA)
- Sterilní skleněné zkumavky

- Sterilní PP zkumavky (Gamedium, Jesenice, Česká republika)
- Stojánky na zkumavky
- Dimethylsulfoxid (DMSO) (Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo)
- Sterilní voda (Ardeapharma, Ševětín, Česká republika)
- Kationtově upravený Mueller-Hintonové bujón, CAMHB, pH 7,0 (Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo)

10.5 Postup práce

Nejprve jsme si připravili suspenze testovaných kmenů bakterií dle následujícího postupu:

- 1) Sterilní zkumavky jsme popsali zkratkami testovacích kmenů.
- 2) Do každé této zkumavky jsme napipetovali 3ml sterilní vody.
- 3) Z kultury kmenů narostlých na MHA jsme odebrali menší část kolonie a rozsuspendovali ji do připravené popsané zkumavky se sterilní vodou. Následně jsme zkumavku promíchali na Vortexu, několikrát změřili na denzitometru hustotu suspenze, než jsme získali hodnotu 0,5 stupně dle McFarlanda.

Po přípravě suspenzí testovacích kmenů jsme pokračovali v přípravě ředící řady testované látky. U testované látky byla vždy informace o navážce a molekulové hmotnosti. Před začátkem práce bylo nutné provést výpočet vhodného objemu DMSO dle vzorce na obrázku **35**.

$$V_{\text{DMSO}} = \frac{m \cdot 10^6}{c \cdot M_r \cdot 100} = X \mu\text{l DMSO}$$

...

Obrázek 35 Vzorec pro výpočet DMSO

*V_{DMSO} -vypočtený objem DMSO; m -navážka v gramech;
 c -první testovaná koncentrace převedená na μl ; M_r -molární hmotnost.*

- 1) Jako první jsme rozpustili navážku ve vypočteném objemu DMSO. Testovaná koncentrace v první jamce tak byla 500 $\mu\text{mol/l}$ a koncentrace DMSO v jamce nepřesáhla 1 %.
- 2) Promíchali jsme na vortexu. V případě, že došlo k vysrážení látky nebo se látka nerozpustila, tak jsme přidali 2. případně 3. ekvivalent rozpouštědla. Přidáním rozpouštědla dojde k posunu koncentrace o jedno ředění dozadu. K urychlení rozpouštění jsme také mohli použít ultrazvukovou lázeň.
- 3) Do první zkumavky označené číslem 1 jsme napipetovali 1,98 ml růstového média a přidali 20 μl testované látky.
- 4) Zkumavku jsme promíchali na vortexu a opět zkontrolovali, jestli nedošlo k vysrážení. Pokud ano, postupovali jsme stejně jako v kroku č. 2.
- 5) Získali jsme pracovní roztok první testované koncentrace. Tento roztok byl přemístěn do první jamky plastového rezervoáru.
- 6) Připravili jsme si 10 sterilních zkumavek označených čísly 2 až 11.
- 7) Do každé zkumavky jsme napipetovali 200 μl DMSO.
- 8) Z první zkumavky jsme vzali 200 μl a přetáhli tento objem do druhé zkumavky a promíchali pomocí pipety. Z druhé jsme pak vzali stejný objem a přenesli ho do zkumavky třetí. Tímto postupem jsme pokračovali až k poslední zkumavce.
- 9) Popsali jsme si jamkový rezervoár čísly 1 až 12.
- 10) Do jamek 2 až 12 jamkového rezervoáru jsme napipetovali 1,98 ml média a ze zkumavky se stejným číslem jsme přidali 20 μl testované látky. Do poslední jamky s číslem 12, která představuje kontrolu, jsme přidali 20 μl DMSO bez testované látky.

Připravené pracovní roztoky s testovanou látkou jsme pipetovali do destičky. Jedna destička vždy odpovídala jedné testované látce.

- 1) Mikrotitrační destičku jsme označili datem, kódem testované látky. Vyznačili jsme si na ni příslušné kmeny a čísla 1 až 12, stejně jako u ředící řady.

- 2) 12ti kanálovou pipetou jsme napipetovali z jamkového rezervoáru 200 μ l zásobního roztoku.
- 3) Každý řádek představoval jeden kmen. Do všech jamek jednoho řádku jsme přidali 10 μ l připravené suspenze konkrétního kmene.
- 4) Připravenou mikrotitrační destičku přiklopenou víčkem jsme inkubovali v termostatu při teplotě 35 °C.
- 5) Odečet jsme prováděli za 24 a 48 hodin. Vyhodnocovali jsme vizuálně a hodnotili jsme MIC. MIC se hodnotí dle nárůstu v jamkách.

11. VÝSLEDKY

Po inkubaci jsme hodnotili nárůst v mikrotitračních destičkách. Poslední jamka, v které jsme nezaznamenali růst, to znamená, že neměla žádný zákal ani sediment, představovala MIC. MIC jednotlivých látek uvádí tabulky 15 až 20. U většiny látek byla nejvyšší testovaná koncentrace 500 $\mu\text{mol/l}$. U tří látek vzhledem k jejich rozpustnosti se tato koncentrace snižovala. Celkem jsme hodnotili 54 látek a alespoň nějaká aktivita byla zachycena u 11 z nich.

11.1 Skupina látek číslo 1

Tabulka 15 Výsledky skupiny látek číslo 1.

KMEN		TESTOVANÁ LÁTKA – MIC ($\mu\text{mol/l}$)									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
SA	24 h	>500	>500	>500	>500	>500	500	>500	>500	>500	>125
	48 h	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>125
MRSA	24 h	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>125
	48 h	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>125
SE	24 h	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>125
	48 h	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>125
EF	24 h	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>125
	48 h	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>125
EC	24 h	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>125
	48 h	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>125
KP	24 h	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>125
	48 h	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>125
ACI	24 h	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>125
	48 h	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>125
PA	24 h	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>125
	48 h	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>125

Z tabulky **15** lze vyčíst, že jedinou, velice slabě účinnou látkou, je látka č. 6 s kódem OX-0g. Tato látka působí v koncentraci 500 $\mu\text{mol/l}$ pouze na kmen SA a to jen v časovém intervalu 24 hodin. Po 48 hodinách jsme působení této látky již nezaznamenali. U žádné z ostatních látek z této skupiny se účinek na testované kmeny v námi zkoušených koncentracích neprokázal. U látky číslo 8 (kód 1-OX-3C) byla nejvyšší testovaná koncentrace pouze 125 $\mu\text{mol/l}$ a to z důvodu její špatné rozpustnosti.

11.2 Skupina látek číslo 2

Tabulka 16 Výsledky skupiny látek číslo 2.

KMEN	TESTOVANÁ LÁTKA – MIC ($\mu\text{mol/l}$)							
		1	2	3	4	5	6	7
SA	24 h	>500	500	>500	>500	>500	500	>500
	48 h	>500	>500	>500	>500	>500	500	>500
MRSA	24 h	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
	48 h	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
SE	24 h	>500	500	500	>500	>500	>500	>500
	48 h	>500	>500	500	>500	>500	>500	>500
EF	24 h	>500	500	500	>500	>500	>500	>500
	48 h	>500	500	500	>500	>500	>500	>500
EC	24 h	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
	48 h	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
KP	24 h	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
	48 h	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
ACI	24 h	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
	48 h	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
PA	24 h	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
	48 h	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500

Z tabulky **16** je vidět, že v této skupině jsme zaznamenali 3 látky, které působily v nejvyšších testovaných koncentracích a to konkrétně 500 $\mu\text{mol/l}$. Jedná se o látky

s kódem Tp, Ta a Ti. Látka Tp byla účinná po 24hodinové inkubaci na kmen SA, po 48 hodinách nebyla již účinnost zaznamenána. Tato látka dále také jen po 24hodinové inkubaci působila na kmen SE a po 24 i 48hodinovém intervalu inhibovala růst v nejvyšší testované koncentraci také u EF. Druhá účinná látka, látka Ta, prokázala aktivitu proti kmenům SE a EF v nejvyšší hodnocené koncentraci v obou časových intervalech. Poslední účinnou látkou je látka č.6 s kódem Ti, která působila pouze na SA v koncentraci 500 µmol/l v obou délkách inkubace.

11.3 Skupina látek číslo 3

Tabulka 17 Výsledky skupiny látek číslo 3 – podskupina A.

KMEN	TESTOVANÁ LÁTKA – MIC (µmol/l)								
		1	2	3	4	5	6	7	8
SA	24 h	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
	48 h	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
MRSA	24 h	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
	48 h	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
SE	24 h	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
	48 h	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
EF	24 h	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
	48 h	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
EC	24 h	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
	48 h	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
KP	24 h	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
	48 h	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
ACI	24 h	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
	48 h	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
PA	24 h	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
	48 h	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500

V podskupině A, která zahrnuje deriváty bez substituce aminokyselin nebyla zaznamenána žádná účinnost (tabulka 17). Všechny látky byly dobře rozpustné, proto nejvyšší testovaná koncentrace byla u všech 500 µmol/l.

Tabulka 18 Výsledky skupiny látek číslo 3 – podskupina B.

KMEN	TESTOVANÁ LÁTKA – MIC (µmol/l)									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9
SA	24 h	>500	>500	>500	250	>500	>125	>500	>500	>500
	48 h	>500	>500	>500	250	>500	>125	>500	>500	>500
MRSA	24 h	>500	>500	>500	>500	>500	>125	>500	>500	>500
	48 h	>500	>500	>500	>500	>500	>125	>500	>500	>500
SE	24 h	>500	>500	>500	>500	>500	>125	500	>500	>500
	48 h	>500	>500	>500	>500	>500	>125	500	>500	>500
EF	24 h	>500	>500	>500	>500	>500	>125	>500	>500	>500
	48 h	>500	>500	>500	>500	>500	>125	>500	>500	>500
EC	24 h	>500	>500	>500	>500	>500	>125	>500	>500	>500
	48 h	>500	>500	>500	>500	>500	>125	>500	>500	>500
KP	24 h	>500	>500	>500	>500	>500	>125	>500	>500	>500
	48 h	>500	>500	>500	>500	>500	>125	>500	>500	>500
ACI	24 h	>500	>500	>500	>500	>500	>125	>500	>500	>500
	48 h	>500	>500	>500	>500	>500	>125	>500	>500	>500
PA	24 h	>500	>500	>500	>500	>500	>125	>500	>500	>500
	48 h	>500	>500	>500	>500	>500	>125	>500	>500	>500

KMEN	TESTOVANÁ LÁTKA – MIC ($\mu\text{mol/l}$)					
		10	11	12	13	14
SA	24 h	>500	>500	31,25	500	>500
	48 h	>500	>500	31,25	500	>500
MRSA	24 h	>500	>500	31,25	500	>500
	48 h	>500	>500	31,25	500	>500
SE	24 h	>500	>500	62,5	>500	>500
	48 h	>500	>500	62,5	>500	>500
EF	24 h	>500	>500	>500	>500	>500
	48 h	>500	>500	>500	>500	>500
EC	24 h	>500	>500	>500	>500	>500
	48 h	>500	>500	>500	>500	>500
KP	24 h	>500	>500	>500	>500	>500
	48 h	>500	>500	>500	>500	>500
ACI	24 h	>500	>500	>500	>500	>500
	48 h	>500	>500	>500	>500	>500
PA	24 h	>500	>500	>500	>500	>500
	48 h	>500	>500	>500	>500	>500

V této podskupině B s methylovanými aminokyselinami jsme zachytili antibakteriální aktivitu u čtyř látek (tabulka 18). Jednalo se o látky č. 4, 7, 12 a 13 s kódy PC-D-Ser-Me, PC-L-Leu-Me, PC-L-OtBu-Thr-Me a PC-L-Thr-Me. V případě dvou z nich, konkrétně PC-L-Leu-Me a PC-L-Thr-Me je účinnost jen velmi slabá a to v nejvyšší testované koncentraci 500 $\mu\text{mol/l}$ po 24 i 48 hodinové inkubaci. První zmiňovaná látka z této dvojice vykazovala aktivitu proti SE. V případě druhé látky se jednalo o kmeny SA a MRSA. U látky PC-D-Ser-Me je MIC 250 $\mu\text{mol/l}$. Tato účinnost byla zachycena po 24 i 48 hodinách, a to na kmen SA. Látka č.12 (PC-L-OtBu-Thr-Me) vykazuje aktivitu při koncentraci 31,25 $\mu\text{mol/l}$ na kmeny SA a MRSA. Jedná se o nejnižší zaznamenanou MIC v našem testování. Tato látka je též účinná proti kmenu SE a to v koncentraci 62,5 $\mu\text{mol/l}$ v obou časech inkubace. U ostatních látek nebyla aktivita v testovaných koncentracích prokázána. V případě látky č. 6 (kód PC-MeAcr) byla vzhledem k její špatné rozpustnosti nejvyšší testovaná koncentrace 125 $\mu\text{mol/l}$.

KMEN	TESTOVANÁ LÁTKA – MIC ($\mu\text{mol/l}$)			
		10	11	12
SA	24 h	>500	>500	>500
	48 h	>500	>500	>500
MRSA	24 h	>500	>500	>500
	48 h	>500	>500	>500
SE	24 h	>500	>500	>500
	48 h	>500	>500	>500
EF	24 h	>500	>500	>500
	48 h	>500	>500	>500
EC	24 h	>500	>500	>500
	48 h	>500	>500	>500
KP	24 h	>500	>500	>500
	48 h	>500	>500	>500
ACI	24 h	>500	>500	>500
	48 h	>500	>500	>500
PA	24 h	>500	>500	>500
	48 h	>500	>500	>500

U podskupiny C (tabulka 19) byla velmi slabá aktivita zaznamenaná u sloučenin č. 5 (PC-DL-Phe-Et) a č.7 (PC-L-Asp-diEt) a to u kmene SE. MIC v tomto případě byla nejvyšší testovaná, to znamená 500 $\mu\text{mol/l}$ v obou časových intervalech. Třetí účinnou látkou z této podskupiny je látka č.8 s kódem PC-L-Ala-Et. Její účinnost byla zachycena u tří kmenů – SA, MRSA a SE. V případě kmene SA tlumila jeho růst v koncentraci 125 $\mu\text{mol/l}$ po 24 i 48 hodinách. Jedná se tak o látku s druhou nejnižší MIC z našeho testování. U kmenů MRSA a SE byla aktivita zaznamenána po obou časech inkubace v koncentraci 250 $\mu\text{mol/l}$. Všechny látky byly dobře rozpustné, u všech byla tedy nejvyšší testovaná koncentrace 500 $\mu\text{mol/l}$.

Tabulka 20 Výsledky skupiny látek číslo 3 – podskupina D.

KMEN	TESTOVANÁ LÁTKA – MIC ($\mu\text{mol/l}$)			
		1	2	3
SA	24 h	>500	>250	>500
	48 h	>500	>250	>500
MRSA	24 h	>500	>250	>500
	48 h	>500	>250	>500
SE	24 h	>500	>250	>500
	48 h	>500	>250	>500
EF	24 h	>500	>250	>500
	48 h	>500	>250	>500
EC	24 h	>500	>250	>500
	48 h	>500	>250	>500
KP	24 h	>500	>250	>500
	48 h	>500	>250	>500
ACI	24 h	>500	>250	>500
	48 h	>500	>250	>500
PA	24 h	>500	>250	>500
	48 h	>500	>250	>500

U poslední nejméně početné skupiny byla nejvyšší testovaná koncentrace 500 $\mu\text{mol/l}$ kromě látky s kódem 5Cl-PC-L-Ile-Me, která kvůli své horší rozpustnosti měla nejvyšší testovanou koncentraci 250 $\mu\text{mol/l}$. V této skupině, jak ukazuje tabulka **20**, se v námi testovaných koncentracích neprokázala aktivita u žádného z kmenů.

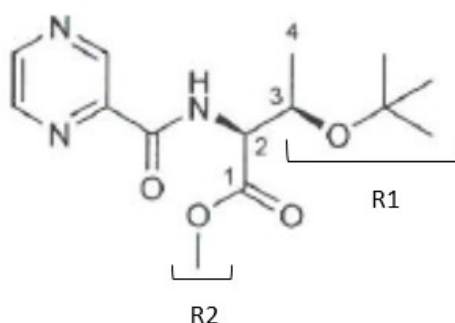
12. DISKUSE

Navzdory skutečnosti, že šíření bakterií rezistentních na antibiotika představuje značné riziko morbidity a mortality na celém světě, farmaceutický výzkum a vývoj nesplnil potřebu nových antibiotik. V posledních 20 letech bylo vyvinuto a schváleno několik málo nových skupin antibiotik. Novými skupinami jsou například lipopeptidy a oxazolidinony. Obě tyto skupiny, ale i většina dalších, působí na grampozitivní bakterie, lze tedy říct, že u grampozitivních bakterií můžeme vidět alespoň naději, která dává záruku úspěšné léčby na několik příštích let. Problém ale představují gramnegativní bakterie. Rozvoj rezistentních pseudomonád a acinetobakterů představuje obrovské riziko a pokud nedojde k vývoji nového účinného léčiva, stanou se tyto infekce prakticky neléčitelné. Tyto dvě bakterie spolu s dalšími čtyřmi (EC, SA, KP, *Enterobacter spp.*) tvoří skupinu zvanou ESKAPE. Jako ESKAPE se označuje skupina bakterií, které stojí za většinou nozokomiálních nákaz na celém světě. Jelikož většina bakterií z této skupiny vykazuje rezistenci na antibiotika, představuje jejich léčba velkou výzvu pro budoucnost. Všechna tato fakta ukazují, že je třeba vývoje nových antibiotik i navzdory klinickým, vědeckým, regulačním i ekonomickým obtížím. Je důležité, aby docházelo k vývoji nových vysoce aktivních, bezpečných antibiotik s přijatelnými farmakokinetickými vlastnostmi. (Tacconelli, 2018; Santajit, 2016)

I přesto, že v posledních několika desetiletích jsme zaznamenali velký pokrok v chápání mnoha faktorů, které ovlivňují vznik a šíření rezistence, není jednoduché vyvinout novou účinnou a zároveň bezpečnou látku. I cílem této práce bylo testování účinnosti látek, které by mohly být potenciálně antibakteriální. Také naše výsledky potvrzují, že není jednoduché najít látku, která bude v přijatelné koncentraci účinná. Pokud už taková látka bude nalezena, nastává dlouhé období zkoumání a testování. Ve velkém množství případů se například z finančních důvodů vývoj zastaví i přesto, že látka má svůj potenciál v léčbě. Příkladem může být solithromycin, kdy firma Cempra, USA investovala nemalé peníze do vývoje léčiva, které ale bylo FDA zamítnuto a bylo doporučeno další testování. Jelikož ale takové testování s sebou přináší další výdaje a nejistý výsledek, je možné, že by některé firmy přemýšlely o ukončení vývoje i přesto, že by jejich látka vykazovala dostatečnou aktivitu proti rezistentním kmenům. Firma

Cempra, USA ale dle Wena (Wen, 2019) svůj boj nevzdává a pokračuje v klinickém testování. Ovšem zjednodušit proces registrace léčiva by s sebou přinášelo jistá rizika. Po nedostatečném prokázání bezpečnosti by mohlo dojít k nežádoucím účinkům. Například lék telithromycin byl uveden na trh a následně bylo prokázáno hepatotoxické působení a z trhu byl stáhnut. Je tedy velmi těžké nastavit správné podmínky, které by vyhovovaly farmaceutickým firmám, ale zároveň byla zajištěna bezpečnost pro pacienty. I z toho důvodu nelze předpokládat, že se v krátké době objeví na trhu látka, která ukončí problém rezistence. Je tedy třeba zaměřit se zejména na prevenci v podávání antibiotik.

Při našem testování se z celkem 54 testovaných látek alespoň nějaká účinnost ukázala u 11 z nich, a to buď pouze na jeden kmen nebo i na více, maximálně však na 3 zároveň. Látky jsme testovali na 8 bakteriálních kmenech a účinnost byla prokázána pouze u 4. A to konkrétně u bakterií SA, MRSA, SE, EF. Všechny tyto bakterie jsou grampozitivní. I zde lze poukázat na to, že vývoj antibakteriálních látek působících na grampozitivní bakterie představuje jistou naději pro budoucí vývoj. Ovšem i přesto, že 11 látek bylo účinných, pouze tři vykazovaly aktivitu při nižší než maximální testované koncentraci. Vysoká koncentrace podaného léčiva s sebou přináší značné riziko vedlejších nežádoucích účinků. U látky 12 ze skupiny 3B jsme jako u jediné zaznamenali účinnost při koncentraci 31,25 $\mu\text{mol/l}$. U této látky s kódem PC-L-OtBu-Thr-Me by byl jistě vhodný další výzkum zaměřený na její antibakteriální účinnost. V této koncentraci látka působila na SA a MRSA. Struktura této látky je zobrazena na obrázku 36.

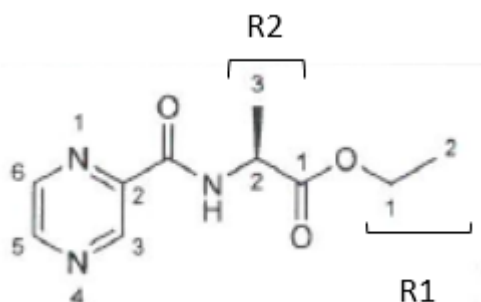


Obrázek 36 Struktura látky s nejnižší MIC z našeho testování.

R1 – aminokyselinový postranní řetězec, R2 - alkylový zbytek

Zdroj: Žádanky o antimikrobní screening, zadavatel: PharmDr. Martin Juhás.

Pro porovnání je zde na obrázku **37** uvedena struktura i další účinné látky v nižší než maximální testované koncentraci, konkrétně látky PC-L-Ala-Et. Obě tyto látky jsou účinné na stejné bakterie, konkrétně na SA, MRSA a SE. Tato druhá látka, ale vykazuje MIC rovnu 125 $\mu\text{mol/l}$ u SA a 250 $\mu\text{mol/l}$ u MRSA a SE. Rozdíl v jejich struktuře by mohl představovat vodítko pro další výzkum. Zároveň i jejich podobnosti ve struktuře mohou být náповědou pro další výzkum. Obě tyto látky patří do 3. skupiny, která představuje zástupce aminokyselinami *N*-substituovaného pyrazinkarboxamidu. Stejně tak třetí látka, látka s kódem PC-D-Ser-Me, která působila v nižší koncentraci než 500 $\mu\text{mol/l}$, se řadí do této skupiny. Právě tato skutečnost by mohla být onou náповědou pro další výzkum. Jelikož látky ze 3. skupiny, které neměly aminokyselinu substituovanou, nebyly účinné, dalo by se říct, že substituce by mohla stát za antibakteriálním působením. Jelikož ale, ostatní látky z podskupiny B i C nevykázaly žádnou aktivitu, je nepravděpodobné, že by tomu tak bylo.



Obrázek 37 Struktura látky s kódem *PC-L-Ala-Et*

R1 – aminokyselinový postranní řetězec, R2 - alkylový zbytek

Zdroj: Žádanky o antimikrobní screening, zadavatel: PharmDr. Martin Juhás.

Problém s gramnegativními bakteriemi a látkami účinnými na ně se projevil i při našem testování. Žádný z gramnegativních kmenů nebyl citlivý ani v nejvyšší testované koncentraci.

Dle Stokesa (Stokes, 2020) se předpokládá, že počet úmrtí způsobených rezistentními bakteriemi dosáhne do roku 2050 až 10 milionů ročně. Budoucnost antibiotik se díky nedostatečnému vývoji a vzrůstající rezistenci jeví jako nejistá. Základem pro budoucnost bez rizika vysokého výskytu rezistentních kmenů je dodržování základních pravidel při užívání antibiotik. Důležitá je správná indikace, ale

také dodržování intervalů nebo správně zvolená dávka. Pokud se tato pravidla budou dodržovat, dostane výzkum více času na své objevy. Nebude na pokrok vyvíjen takový tlak a výsledkem může být účinné, a hlavně také bezpečné antibiotikum.

Jako slibné se také jeví využívání moderních technologií. Například použití algoritmických programů pro predikci molekulárních vlastností by mohla být do budoucna jedna z hlavních metod pro identifikaci nových skupin antibakteriálních látek. Dle Saqiba (Saqib, 2019) je také velmi důležitý nedávný pokrok v oblasti nanotechnologií. Tento pokrok umožňuje například připravit nanočástice oxidu kovu, které působí proti bakteriálnímu růstu. Nanočástice vykazují široké spektrum aktivity zahrnující jak grampozitivní, tak gramnegativní bakterie. Jsou také schopny překonat běžné rezistentní mechanismy jako je inaktivace enzymů, snížení permeability buněk nebo například modifikace cílových míst, ale i další mechanismy rezistence. Kromě nanočástic se antibakteriální účinnost ukázala i u některých polymerů. Antibakteriální polymery jsou schopny potlačovat růst bakterie díky své vlastní chemické struktuře nebo mohou napomáhat působení již existujících antibiotik. Dle Kamaruzzamana (Kamaruzzaman, 2019) polymery představují velmi rozsáhlou skupinu, která umožňuje navrhovat a zkoušet jejich velké množství a zároveň provádět různé modifikace, které mohou v budoucnu přispět k vývoji bezpečného antibakteriálního léčiva. Jedním z dalších moderních přístupů je také využití bakteriofágů majících specifickou antibakteriální aktivitu. Všechny tyto moderní přístupy poukazují na fakt, že je třeba kromě hledání nových molekul také zkoušet hledat nové principy či technologie, které by výzkum alespoň usnadnily. Nelze se spoléhat na to, že bude v přírodě objevena nová zázračná antibakteriální molekula.

13. ZÁVĚR

Cílem této práce bylo *in vitro* testování antibiotické aktivity potenciálně antibakteriálních látek a stanovení jejich MIC. Mezi testovanými kmeny byli zástupci jak grampozitivní, tak gramnegativní skupiny bakterií.

Z katedry Farmaceutické chemie a Farmaceutické analýzy Farmaceutické fakulty Univerzity Karlovy bylo dodáno 54 látek. Z těchto 54 látek byla aktivita zaznamenána u 11 z nich. Jejich aktivita byla ale prokázána jen u některých grampozitivních kmenů. Naši nejvyšší testovanou koncentrací bylo 500 $\mu\text{mol/l}$. Pokud už byla prokázána aktivita potenciálně antibakteriální látky na některý kmen, jednalo se ve většině případů o působení v této nejvyšší testované koncentraci. Pouze u 3 látek byla MIC nižší než 500 $\mu\text{mol/l}$, a to konkrétně u látek s kódem PC-L-OtBu-Thr-Me, PC-L-Ala-Et a PC-D-Ser-Me dodaných panem Dr. Juhásem. Všechny tyto látky patří do skupiny zahrnující aminokyselinami *N*-substituovaný pyrazinkarboxamid. U této skupiny látek by mohla pokračovat studie, která by sledovala podrobněji vztah mezi strukturou a aktivitou, což by mohlo následně alespoň přispět k rozvoji nových antibakteriálně účinných látek.

Jelikož v dnešní době představuje riziko zejména rezistence gramnegativních kmenů, bylo by třeba, aby se našly látky účinné zejména na ně. Při našem testování nebyla ani jedna látka účinná na gramnegativní bakterie.

14. POUŽITÉ ZKRATKY

ZKRATKA	VÝZNAM ZKRATKY
ABS	Antibiotický stewardship
ACI	<i>Acinetobacter baumannii</i>
AP	Akční plán
CLSI	Institut pro klinické a laboratorní standardy
DDST	Double disc synergy test
DMSO	Dimethylsulfoxid
DSM	Německá sbírka mikroorganismů
ECDC	Evropské středisko pro prevenci a kontrolu nemocí
EC	<i>Escherichia coli</i>
EF	<i>Enterococcus faecalis</i>
EFSA	Evropský úřad pro bezpečnost potravin
ESBL	Širokospektré β -laktamázy
EUCAST	Evropská komise pro testování antimikrobní citlivosti
FDA	Americký úřad pro potraviny a léčiva
G6P	Transportér glukóza-6-fosfát
GlpT	Transportér glycerol-3-fosfát
KP	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
MBC	Minimální baktericidní koncentrace
MDR	Multiléková rezistence
MH	Muller Hinton
MHA	Muller Hintonové agar
MIC	Minimální inhibiční koncentrace
mRNA	Messengerová RNA
MRSA	Meticilin rezistentní <i>Staphylococcus aureus</i>
MurA	UDP-N-acetylglukosamin-3-enolpyruvyltransferáza
NAG	N-acetyl-glukosamin
NAMA	Kyselina N-acetylmuramová
NAP	Národní antibiotický program
PA	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>

PBPs	Penicilin vázající protein
PDR	Panrezistence
PEP	Fosfoenolpyruvát
RF	Uvolňovací faktor
rRNA	Ribozomální RNA
SA	<i>Staphylococcus aureus</i>
SE	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
SEAI	Seznam esenciálních antiinfektiv
tRNA	Transferová RNA
WHO	Světová zdravotnická organizace
XDR	Extenzivní rezistence

15. SEZNAM TABULEK

Tabulka 1 Výskyt vybraných rezistentních bakterií ke konkrétním antibiotikům v jednotlivých evropských zemích.	10
Tabulka 2 Příklady některých baktericidně a bakteriostaticky působících antimikrobních látek.	22
Tabulka 3 Přehled nejdůležitějších penicilinových antibiotik a struktura jejich postranního řetězce.	25
Tabulka 4 Vybraná cefalosporinová antibiotika registrovaná v ČR.	27
Tabulka 5 Přehled vybraných tetracyklinových antibiotik.	31
Tabulka 6 Rozdělení antibiotik dle mechanismu účinku.	39
Tabulka 7 Vybrané příklady primární rezistence.	54
Tabulka 8 Látky skupiny číslo 1.	66
Tabulka 9 Látky skupiny číslo 2.	68
Tabulka 10 Látky skupiny číslo 3 – podskupina A.	69
Tabulka 11 Látky skupiny číslo 3 – podskupina B.	71
Tabulka 12 Látky skupiny číslo 3 – podskupina C.	73
Tabulka 13 Látky skupiny číslo 3 - podskupina D.	75
Tabulka 14. Porovnání rozmezí stanovených dle EUCAST s našimi zjištěnými hodnotami.	85
Tabulka 15 Výsledky skupiny látek číslo 1.	89
Tabulka 16 Výsledky skupiny látek číslo 2.	90
Tabulka 17 Výsledky skupiny látek číslo 3 – podskupina A.	91
Tabulka 18 Výsledky skupiny látek číslo 3 – podskupina B.	92
Tabulka 19 Výsledky skupiny látek číslo 3 – podskupina C.	94
Tabulka 20 Výsledky skupiny látek číslo 3 – podskupina D.	96

16. SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1 Tvary a uspořádání bakterií.	12
Obrázek 2 Stavba bakteriální buňky.	13
Obrázek 3 Spotřeba a struktura antibiotik v některých zemích EU.	18
Obrázek 4 Struktura β -laktamového kruhu.	24
Obrázek 5 Základní cefalosporinové jádro.	26
Obrázek 6 Struktura gentamicinu a streptomycinu.	30
Obrázek 7 Struktura nitrofuránů.	34
Obrázek 8 Chemická struktura klindamycinu.	37
Obrázek 9 Místa působení antibiotik inhibujících proteosyntézu.	40
Obrázek 10 Znázornění A, P, E míst na bakteriálním ribozomu při syntéze proteinů.	41
Obrázek 11 Ilustrace proteosyntézy.	42
Obrázek 12 Znázornění aminoglykosidu navázaného na 30S podjednotku ribozomu.	43
Obrázek 13 Transportní systémy pro fosfomycin.	45
Obrázek 14 Reakce katalyzovaná MurA.	45
Obrázek 15 Chemická struktura oritavancinu.	47
Obrázek 16 Struktura linezolidu, tedizolidu a tedizolid fosfátu.	49
Obrázek 17 Výskyt MRSA v Evropě.	58
Obrázek 18 Diskový difúzní test u bakterie <i>Klebsiella pneumoniae</i>	60
Obrázek 19 E-test s vyznačenou MIC.	61
Obrázek 20 Synergismus a antagonismus u antibiotik.	62
Obrázek 21 Výsledek DDST s produkcí ESBL.	63
Obrázek 22 Výsledek DDST s produkcí inducibilní AmpC.	64
Obrázek 23 Základní chemická struktura látek ze skupiny číslo 1.	65
Obrázek 24 Základní struktura látek ze skupiny číslo 2.	67
Obrázek 25 Základní struktura látek ze skupiny číslo 3.	69
Obrázek 26 <i>Staphylococcus aureus</i> na krevním agaru.	76
Obrázek 27 MRSA na selektivní půdě.	77
Obrázek 28 <i>Staphylococcus epidermidis</i> na krevním agaru.	78
Obrázek 29 <i>Enterococcus faecalis</i> na krevním a na žluč-eskulinovém agaru.	79
Obrázek 30 <i>E. coli</i> na MacConkey a Endově agaru.	80
Obrázek 31 <i>Klebsiella pneumoniae</i> na krevním agaru.	81
Obrázek 32 <i>Acinetobacter baumannii</i> na živném agaru.	82
Obrázek 33 Typický pigment bakterie <i>Pseudomonas aeruginosa</i> – kultivace na MHA.	83
Obrázek 34 <i>Escherichia coli</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Staphylococcus epidermidis</i> – porovnání na krevním agaru.	84
Obrázek 35 Vzorec pro výpočet DMSO.	86
Obrázek 36 Struktura látky s nejnižší MIC z našeho testování.	98
Obrázek 37 Struktura látky s kódem PC-L-Ala-Et.	99

17. POUŽITÁ LITERATURA

KNIŽNÍ ZDROJE

- 1) ADÁMKOVÁ, V. *Antibiotika v léčbě infekcí*. Olomouc: Solen, 2015. Meduca. ISBN 978-80-7471-137-4.
- 2) ADÁMKOVÁ, V. *Antibiotika v primární péči*. Praha: Mladá fronta, 2019. Edice postgraduální medicíny. ISBN 978-80-204-5247-4.
- 3) BENEŠ, J. *Antibiotika: systematika, vlastnosti, použití*. Praha: Grada Publishing, 2018. ISBN 978-80-271-0636-3.
- 4) BENNETT, J. E., DOLIN, J., BLASER, B. J. *Mandell, Douglas, and Bennett's principles and practice of infectious diseases*. Eighth edition. Philadelphia, PA: Elsevier/Saunders, [2015]. ISBN 978-1-4557-4801-3.
- 5) BUCHTA, V. *Základy mikrobiologie a parazitologie pro farmaceuty*. Praha: Karolinum, 1998. ISBN 80-7184-565-5.
- 6) DRNKOVÁ, B. *Mikrobiologie, imunologie, epidemiologie a hygiena: pro zdravotnické obory*. Praha: Grada Publishing, 2019. Sestra (Grada). ISBN 978-80-271-0693-6.
- 7) GOERING, R. V., DOCKRELL, H.M., ZUCKERMAN, M. A., CHIODINI, P.L., JULÁK, J. ed. *Mimsova lékařská mikrobiologie*. Praha: Stanislav Juhaňák – Triton, 2016. ISBN 978-80-7387-928-0.
- 8) GRAYSON, M. L. *Kucers' the use of antibiotics: a clinical review of antibacterial, antifungal, antiparasitic and antiviral drugs*. Seventh edition. Boca Raton: CRC Press, 2017. ISBN 9781498747950.
- 9) HYNIE, S. *Speciální farmakologie*. 2., přeprac. vyd. Praha: Karolinum, 2003. ISBN 80-246-0657-7.
- 10) JEDLIČKOVÁ, A. *Antimikrobiální terapie v každodenní praxi*. 3., rozš. vyd. Praha: Maxdorf, c2009. Jessenius. ISBN 978-80-7345-208-7.
- 11) JULÁK, J. *Úvod do lékařské bakteriologie*. Praha: Karolinum, 2006. ISBN 80-246-1270-4.
- 12) KRAMÁŘ, R. *Lékařská mikrobiologie*. České Budějovice: Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Zdravotně sociální fakulta, 2007. ISBN 978-80-7394-021-8.
- 13) LOCHMANN, O. *Antimikrobní terapie v praxi*. Praha: Triton, 2006. ISBN 80-7254-826.3.

- 14) LOCHMANNOVÁ, J. *Praktické využití antibiotik ve vnitřním lékařství*. Praha: Karolinum, 2008. ISBN 978-80-246-1550-9.
- 15) LÜLLMANN, H., MOHR, K., HEIN, L. *Barevný atlas farmakologie*. Praha: Grada, 2007. ISBN isbn978-80-247-1672-5.
- 16) MELTER, O. MALMGREN A. *Principy a praktika lékařské mikrobiologie*. Praha: Karolinum, 2014. ISBN 978-80-246-2414-3.
- 17) NAGARAJAN, R. *Glycopeptide antibiotics*. New York: M. Dekker, c1994. ISBN 0-8247-9193-2.
- 18) PEUTHERER, J. F., SLACK, R. C. B., GREENWOOD, D. *Lékařská mikrobiologie: přehled infekčních onemocnění: patogeneze, imunita, laboratorní diagnostika a epidemiologie*. Vyd. 1., čes. Praha: Grada, 1999. ISBN 80-7169-365-0.
- 19) RYŠKOVÁ, O. *Praktická cvičení a semináře z lékařské mikrobiologie: pro studující všeobecného a zubního lékařství*. Praha: Karolinum, 2010. ISBN 978-80-246-1834-0.
- 20) SCHINDLER, J. *Mikrobiologie: pro studenty zdravotnických oborů*. Praha: Grada, 2010. Sestra (Grada). ISBN 978-80-247-3170-4.
- 21) SIMON, C., STILLE, W. *Antibiotika v současné lékařské praxi*. Vyd. 1. čes. Praha: Grada, 1998. ISBN 80-7169-268-9.
- 22) SLÍVA, J., MÜLLER ZÁVALOVÁ, V., PATOČKOVÁ, J. *Moderní farmakoterapie pro první linii*. Praha: Axonite CZ, 2015. Asclepius. ISBN 978-80-88046-00-4.
- 23) ŠULCOVÁ, M. *Mikrobiologie, epidemiologie, hygiena: učební texty pro zdravotnické obory*. Vydání třetí přepracované. Ústí nad Labem: Univerzita Jana Evangelisty Purkyně v Ústí nad Labem, Fakulta zdravotnických studií, 2018. ISBN 978-80-7561-116-1.
- 24) ŠVIHOVEC, J., BULTAS, J., ANZENBACHER, P., CHLÁDEK, J., PŘÍBORSKÝ, J., SLÍVA, J., VOTAVA, M. *Farmakologie*. Ilustroval Miroslav BARTÁK. Praha: Grada Publishing, 2018. ISBN 978-80-247-5558-8.
- 25) VOTAVA, M. *Lékařská mikrobiologie – vyšetřovací metody*. Brno: Neptun, c2010. ISBN 9788086850047.
- 26) VOTAVA, M. *Lékařská mikrobiologie speciální*. Brno: Neptun, 2003. ISBN 80-902896-6-5.
- 27) VRABLÍK, M., MAREK, J. *Markova farmakoterapie vnitřních nemocí*. Praha: Grada Publishing, 2019. ISBN 978-80-247-5078-1.

INTERNETOVÉ ZDROJE

- 1) ABRAHAM, E. P. Cephalosporins 1945-1986. *Drugs* [online]. 1987, 34 (Supplement 2), 1-14 [cit. 2019-12-11]. DOI: 10.2165/00003495-198700342-00003. ISSN 0012-6667. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.2165/00003495-198700342-00003>
- 2) AGARWAL, R., BARTSCH, S. M., KELLY, B. J., PREWITT, M., LIU, Y. CHEN, Y, UMSCHIED, C. A. Newer glycopeptide antibiotics for treatment of complicated skin and soft tissue infections: systematic review, network meta-analysis and cost analysis. *Clinical Microbiology and Infection* [online]. 2018, 24(4), 361-368 [cit. 2020-01-26]. DOI: 10.1016/j.cmi.2017.08.028. ISSN 1198743X. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1198743X17304913>
- 3) Akční plán Národního antibiotického programu. [online]. [cit. 2020-01-25]. Dostupné z: http://www.mzcr.cz/Verejne/dokumenty/akcni-plan-narodniho-antibiotickeho-programu_7725_2926_5.html
- 4) AMINOV, R. I. A Brief History of the Antibiotic Era: Lessons Learned and Challenges for the Future. *Frontiers in Microbiology* [online]. 2010, 1 [cit. 2020-02-20]. DOI: 10.3389/fmicb.2010.00134. ISSN 1664-302X. Dostupné z: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2010.00134/abstract>
- 5) Antibiotická politika ČR. [online]. [cit. 2019-30-11]. Dostupné z: <http://www.sukl.cz/antibioticka-politika-cr>
- 6) ATC klasifikace. [online]. [cit. 2020-01-25] Dostupné z: <https://mediately.co/cz/atcs/J01A/tetracykliny>
- 7) BREWER, NELSON S., WALTER C., HELLINGER. The Monobactams. *Mayo Clinic Proceedings* [online]. 1991, 66(11), 1152-1157 [cit. 2019-12-22]. DOI: 10.1016/S0025-6196(12)65797-8. ISSN 00256196. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0025619612657978>
- 8) BUEGE, M. J., BROWN, J. E., AITKEN, S.L. Solithromycin: A novel ketolide antibiotic. *American Journal of Health-System Pharmacy* [online]. 2017, 74(12), 875-887 [cit. 2020-03-04]. DOI: 10.2146/ajhp160934. ISSN 1079-2082. Dostupné z: <https://academic.oup.com/ajhp/article/74/12/875/5102528>
- 9) BUSH, K, BRADFORD P. A. β -Lactams and β -Lactamase Inhibitors: An Overview. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* [online]. 2016, 6(8) [cit. 2019-12-10]. DOI: 10.1101/cshperspect.a025247. ISSN 2157-1422. Dostupné z: <http://perspectivesinmedicine.cshlp.org/lookup/doi/10.1101/cshperspect.a025247>
- 10) BUSH, K. Beta-lactamase inhibitors from laboratory to clinic. *Clinical Microbiology Reviews* [online]. 1988, 1(1), 109-123 [cit. 2020-01-14]. DOI: 10.1128/CMR.1.1.109. ISSN 0893-8512. Dostupné z: <http://cmr.asm.org/lookup/doi/10.1128/CMR.1.1.109>

- 11) CLARDY, J., FISCHBACH, M. A., CURRIE, C. R. The natural history of antibiotics. *Current Biology* [online]. 2009, 19(11), R437-R441 [cit. 2019-11-27]. DOI: 10.1016/j.cub.2009.04.001. ISSN 09609822. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S096098220900918X>
- 12) CUNHA, B. A. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: clinical manifestations and antimicrobial therapy. *Clinical Microbiology and Infection* [online]. 2005, 11, 33-42 [cit. 2020-03-11]. DOI: 10.1111/j.1469-0691.2005.01162.x. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1198743X15300392>
- 13) DE MAN, P., VERHOEN, B. A. N., VERBRUGH, H. A., VOS, M. C., VAN DER ANKER, J. An antibiotic policy to prevent emergence of resistant bacilli. *The Lancet* [online]. 2000, 355(9208), 973-978 [cit. 2019-11-28]. DOI: 10.1016/S0140-6736(00)90015-1. ISSN 01406736. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0140673600900151>
- 14) DRAWZ, S. M., BONOMO, R. A. Three Decades of β – Lactamase Inhibitors. *Clinical Microbiology Reviews* [online]. 2010, 23(1), 160-201 [cit. 2020-01-25]. DOI: 10.1128/CMR.00037-09. ISSN 0893-8512. Dostupné z: <http://cmr.asm.org/cgi/doi/10.1128/CMR.00037-09>
- 15) EDWARDS, D. I. Mechanisms of selective toxicity of metronidazole and other nitroimidazole drugs. *Sexually Transmitted Infections* [online]. 1980, 56(5), 285-290 [cit. 2020-03-09]. DOI: 10.1136/sti.56.5.285. ISSN 1368-4973. Dostupné z: <http://sti.bmj.com/cgi/doi/10.1136/sti.56.5.285>
- 16) ELJAALY, K., ALHARBI, A., ALSHEHRI S., ORTWINE, J. K., POGUE, J. M. Plazomicin: A Novel Aminoglycoside for the Treatment of Resistant Gram-Negative Bacterial Infections. *Drugs* [online]. 2019, 79(3), 243-269 [cit. 2020-01-23]. DOI: 10.1007/s40265-019-1054-3. ISSN 0012-6667. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s40265-019-1054-3>
- 17) FAJFR, M. Fosfomycin trometamol – staronové antibiotikum v urologické praxi. *Urologie pro praxi* [online]. 2015, (16(4), 148-150 [cit. 2020-02-26]. Dostupné z: <https://www.urologiepropraxi.cz/pdfs/uro/2015/04/03.pdf>
- 18) *Fakta pro odborníky* [online]. [cit. 2020-03-26]. Dostupné z: <https://antibiotic.ecdc.europa.eu/cs/informujte-seinformacni-listy/fakta-pro-odborniky>
- 19) FALAGAS, M. E., GRAMMATIKOS, A. P., MICHALOPOULOS, A. Potential of old-generation antibiotics to address current need for new antibiotics. *Expert Review of Anti-infective Therapy* [online]. 2014, 6(5), 593-600 [cit. 2020-02-20]. DOI: 10.1586/14787210.6.5.593. ISSN 1478-7210. Dostupné z: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1586/14787210.6.5.593>
- 20) FALAGAS, M. E., VOULOUMANOU, E. K., SAMONIS, G., VARDAKAS, K. Z. Fosfomycin. *Clinical Microbiology Reviews* [online]. 2016, 29(2), 321-347 [cit.

2020-01-26]. DOI: 10.1128/CMR.00068-15. ISSN 0893-8512. Dostupné z:
<http://cmr.asm.org/lookup/doi/10.1128/CMR.00068-15>

- 21) FORGE, A., SCHACHT, J. Aminoglycoside Antibiotics. *Audiology and Neuro-Otology* [online]. 2000, 5(1), 3-22 [cit. 2020-01-24]. DOI: 10.1159/000013861. ISSN 1421-9700. Dostupné z: <https://www.karger.com/Article/FullText/13861>
- 22) HOFFMAN, L. R., D'ARGENIO, D. A., MACCOSS, M. J., ZHANG, Z., JONES, R. A., MILLER, S. I. Aminoglycoside antibiotics induce bacterial biofilm formation. *Nature* [online]. 2005, 436(7054), 1171-1175 [cit. 2020-01-24]. DOI: 10.1038/nature03912. ISSN 0028-0836. Dostupné z: <http://www.nature.com/articles/nature03912>
- 23) HOWARD, A., O'DONOGHUE, M., FEENEY, A., SLEATOR, R. D. *Acinetobacter baumannii*. *Virulence* [online]. 2014, 3(3), 243-250 [cit. 2020-03-31]. DOI: 10.4161/viru.19700. ISSN 2150-5594. Dostupné z: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.4161/viru.19700>
- 24) HRABÁK, J. *Panrezistentní bakterie – jak může výzkum v oblasti antibiotické rezistence pomoci?* [online]. 2016, [cit. 2020-03-26]. Dostupné z: https://mikro.fnplzen.cz/sites//users/mikro/Hrabak_TK_ATBden_2016.pdf
- 25) CHEN, A. Y., ZERVOS M. J., VAZQUEZ, J. A. Dalbavancin: a novel antimicrobial. *International Journal of Clinical Practice* [online]. 2007, 61(5), 853-863 [cit. 2020-02-18]. DOI: 10.1111/j.1742-1241.2007.01318.x. ISSN 13685031. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1742-1241.2007.01318.x>
- 26) CHOPRA, I., ROBERTS, M. Tetracycline Antibiotics: Mode of Action, Applications, Molecular Biology, and Epidemiology of Bacterial Resistance. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* [online]. 2001, 65(2), 232-260 [cit. 2020-01-24]. DOI: 10.1128/MMBR.65.2.232-260.2001. ISSN 1092-2172. Dostupné z: <http://mmbbr.asm.org/cgi/doi/10.1128/MMBR.65.2.232-260.2001>
- 27) JACOBY, G. A. Mechanisms of Resistance to Quinolones. *Clinical Infectious Diseases* [online]. 2005, 41(2), S120-S126 [cit. 2020-02-26]. DOI: 10.1086/428052. ISSN 1537-6591. Dostupné z: http://academic.oup.com/cid/article/41/Supplement_2/S120/307501/Mechanisms-of-Resistance-to-Quinolones
- 28) JANAS, A., PRZYBYLSKI, P. 14- and 15-membered lactone macrolides and their analogues and hybrids: structure, molecular mechanism of action and biological activity. *European Journal of Medicinal Chemistry* [online]. 2019, 182 [cit. 2020-01-25]. DOI: 10.1016/j.ejmech.2019.111662. ISSN 02235234. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0223523419308062>
- 29) JUHÁS, M., KUČEROVÁ, L., HORÁČEK, O., JANĎOUREK, O., KUBÍČEK, V., KONEČNÁ, K., KUČERA, R., BÁRTA, P., JANOUŠEK, J., PATEROVÁ, P., KUNEŠ, J., DOLEŽAL, M., ZÍTKO, J. *N*-Pyrazinoyl Substituted Amino Acids as Potential Antimycobacterial Agents—the Synthesis and Biological Evaluation of Enantiomers. *Molecules* [online]. 2020, 25(7) [cit. 2020-04-04]. DOI:

10.3390/molecules25071518. ISSN 1420-3049. Dostupné z:
<https://www.mdpi.com/1420-3049/25/7/1518>

- 30) KAMARUZZAMAN, N. F., TAN, L. P., HAMDAN, R. H., CHOONG, S. S., WONG, W. K., GIBSON, A. J., CHIVU, A., PINA, M. F. Antimicrobial Polymers: The Potential Replacement of Existing Antibiotics? *International Journal of Molecular Sciences* [online]. 2019, 20(11) [cit. 2020-04-27]. DOI: 10.3390/ijms20112747. ISSN 1422-0067. Dostupné z: <https://www.mdpi.com/1422-0067/20/11/2747>
- 31) KISGEN, J. J., MANSOUR H., UNGER, N. R., CHILDS, L. M. Tedizolid: A new oxazolidinone antimicrobial. *American Journal of Health-System Pharmacy* [online]. 2014, 71(8), 621-633 [cit. 2020-03-19]. DOI: 10.2146/ajhp130482. ISSN 1079-2082. Dostupné z:
<https://academic.oup.com/ajhp/article/71/8/621/5111253>
- 32) Klinické hodnocení léků [online]. [cit. 2019-30-11]. Dostupné z:
<http://www.sukl.cz/klinicke-hodnoceni-leku>
- 33) KRAUSE, K. M., SERIO, A. W., KANE, T. R., CONNOLLY, L. E. Aminoglycosides: An Overview. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* [online]. 2016, 6(6) [cit. 2020-02-28]. DOI: 10.1101/cshperspect.a027029. ISSN 2157-1422. Dostupné z:
<http://perspectivesinmedicine.cshlp.org/lookup/doi/10.1101/cshperspect.a027029>
- 34) LAKHUNDI, S., ZHANG, K. Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*: Molecular Characterization, Evolution, and Epidemiology. *Clinical Microbiology Reviews* [online]. 2018, 31(4), e00020-18 [cit. 2020-03-11]. DOI: 10.1128/CMR.00020-18. ISSN 0893-8512. Dostupné z:
<http://cmr.asm.org/lookup/doi/10.1128/CMR.00020-18>
- 35) LIN, S., CARVER, P. L., DEPESTEL, D. D. Dalbavancin: A New Option for the Treatment of Gram-Positive Infections. *Annals of Pharmacotherapy* [online]. 2016, 40(3), 449-460 [cit. 2020-03-11]. DOI: 10.1345/aph.1G158. ISSN 1060-0280. Dostupné z: <http://journals.sagepub.com/doi/10.1345/aph.1G158>
- 36) LIVERMORE, D. M. Introduction: the challenge of multiresistance. *International Journal of Antimicrobial Agents* [online]. 2007, 29, S1-S7 [cit. 2020-03-11]. DOI: 10.1016/S0924-8579(07)00158-6. ISSN 09248579. Dostupné z:
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0924857907001586>
- 37) MACLAUHLIN, CH., SCHNEIDER, S. E., KEEDY, K., FERNANDES, P., JAMIESON, B. D. Metabolism, Excretion, and Mass Balance of Solithromycin in Humans. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* [online]. 2018, 62(5), e01474-17 [cit. 2020-02-25]. DOI: 10.1128/AAC.01474-17. ISSN 0066-4804. Dostupné z:
<http://aac.asm.org/lookup/doi/10.1128/AAC.01474-17>
- 38) MARIEKE, G. *International Policy Overview: Antibiotic resistance* [online]. 2011 [cit. 2019-12]. Dostupné z:
<https://apps.who.int/medicinedocs/en/m/abstract/Js19478en/>

- 39) MICHALOPOULOS, A. S., LIVADITIS, I. G., GOUGOUTAS, V. The revival of fosfomycin. *International Journal of Infectious Diseases* [online]. 2011, 15(11), e732-e739 [cit. 2020-01-26]. DOI: 10.1016/j.ijid.2011.07.007. ISSN 12019712. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1201971211001664>
- 40) MINGEOT-LECLERCQ, M., GLUPCZYNSKI, Y., TULKENS, P. M., Aminoglycosides: Activity and Resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* [online]. 1999, 43(4), 727-737 [cit. 2020-01-25]. DOI: 10.1128/AAC.43.4.727. ISSN 0066-4804. Dostupné z: <http://aac.asm.org/lookup/doi/10.1128/AAC.43.4.727>
- 41) MOHR, K. I. History of Antibiotics Research. STADLER, Marc a Petra DERSCH, ed. *How to Overcome the Antibiotic Crisis* [online]. Cham: Springer International Publishing, 2016, 2016-10-15, s. 237-272 [cit. 2019-11-27]. Current Topics in Microbiology and Immunology. DOI: 10.1007/82_2016_499. ISBN 978-3-319-49282-7. Dostupné z: http://link.springer.com/10.1007/82_2016_499
- 42) MORAR, M., BHULLAR, K., HUGHES, D. W., JUNOP, M., WRIGHT, G. D. Structure and Mechanism of the Lincosamide Antibiotic Adenylyltransferase LinB. *Structure* [online]. 2009, 17(12), 1649-1659 [cit. 2020-02-25]. DOI: 10.1016/j.str.2009.10.013. ISSN 09692126. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0969212609004201>
- 43) Národní antibiotický program [online]. [cit. 2019-10-12]. Dostupné z: <http://www.szu.cz/tema/narodni-antibioticky-program>
- 44) OKUSANYA, O. O., FORREST, A., BHAVNANI, S. M., FERNANDES, P., AMBROSE, P. G., ANDES, D. R. Pharmacokinetic/Pharmacodynamic Evaluation of Solithromycin against *Streptococcus pneumoniae* Using Data from a Neutropenic Murine Lung Infection Model. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* [online]. 2019, 63(8), e02606-18 [cit. 2020-02-25]. DOI: 10.1128/AAC.02606-18. ISSN 0066-4804. Dostupné z: <http://aac.asm.org/lookup/doi/10.1128/AAC.02606-18>
- 45) OLIPHANT, C., GREEN, G. Quinolones: A Comprehensive Review. *American family physician* [online]. 2002(65/3) [cit. 2020-02-26]. Dostupné z: <https://www.aafp.org/afp/2002/0201/p455.html>
- 46) OWENS, B. Solithromycin rejection chills antibiotic sector. *Nature Biotechnology* [online]. 2017, 35(3), 187-188 [cit. 2020-02-25]. DOI: 10.1038/nbt0317-187. ISSN 1087-0156. Dostupné z: <http://www.nature.com/articles/nbt0317-187>
- 47) PAPP-WALLACE, K. M., ENDIMIANI, A., TARACILA, M. A., BONOMO, R. A. Carbapenems: Past, Present, and Future. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* [online]. 2011, 55(11), 4943-4960 [cit. 2020-01-10]. DOI: 10.1128/AAC.00296-11. ISSN 0066-4804. Dostupné z: <http://aac.asm.org/lookup/doi/10.1128/AAC.00296-11>
- 48) PELEG, A. Y., SEIFERT, H., PATERSON, D. L. *Acinetobacter baumannii*: Emergence of a Successful Pathogen. *Clinical Microbiology Reviews* [online]. 2008, 21(3),

538-582 [cit. 2020-03-31]. DOI: 10.1128/CMR.00058-07. ISSN 0893-8512.

Dostupné z: <http://cmr.asm.org/cgi/doi/10.1128/CMR.00058-07>

- 49) PENWELL, W. F., SHAPIRO, A. B., GIACOBBE, R. A., Molecular Mechanisms of Sulbactam Antibacterial Activity and Resistance Determinants in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* [online]. 2015, 59(3), 1680-1689 [cit. 2020-02-25]. DOI: 10.1128/AAC.04808-14. ISSN 0066-4804. Dostupné z: <http://aac.asm.org/lookup/doi/10.1128/AAC.04808-14>
- 50) PERITI, P., MAZZEI, T., MINI, E., NOVELLI, A. Pharmacokinetic Drug Interactions of Macrolides. *Clinical Pharmacokinetics* [online]. 1992, 23(2), 106-131 [cit. 2020-01-25]. DOI: 10.2165/00003088-199223020-00004. ISSN 0312-5963. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.2165/00003088-199223020-00004>
- 51) PRAŽSKÝ, B. Antibiotická politika v České republice [online]. 2013 [cit. 2019-30-11]. Dostupné z: <https://zdravi.euro.cz/clanek/postgradualni-medicina/antibioticka-0politika-v-ceske-republice-472463>
- 52) Průkaz beta-laktamáz širokého spektra (ESBL) a typu AmpC u enterobakterií. [online]. [cit. 2020-01-25] Dostupné z: <http://www.szu.cz/prukaz-beta-laktamaz-sirokeho-spektra-esbl-a-typu-ampc-u>
- 53) RAGNAR NORRBY, S. Carbapenems. *Medical Clinics of North America* [online]. 1995, 79(4), 745-759 [cit. 2020-01-05]. DOI: 10.1016/S0025-7125(16)30037-2. ISSN 00257125. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0025712516300372>
- 54) RAMDEEN, S., BOUCHER, H. W. Dalbavancin for the treatment of acute bacterial skin and skin structure infections. *Expert Opin Pharmacother.* [online] 2015;16(13):2073–2081[cit.2020-03-11]. doi:10.1517/14656566.2015.1075508
- 55) ROBERTS, M. C. Tetracycline Therapy: Update. *Clinical Infectious Diseases* [online]. 2003, 36(4), 462-467 [cit. 2020-01-24]. DOI: 10.1086/367622. ISSN 1058-4838. Dostupné z: <https://academic.oup.com/cid/article-lookup/doi/10.1086/367622>
- 56) ROLAIN, J. M., ABAT, C., JIMENO, M. T., FOURNIER, P. E., RAOULT, D. Do we need new antibiotics? *Clinical Microbiology and Infection* [online]. 2016, 22(5), 408-415 [cit. 2020-02-19]. DOI: 10.1016/j.cmi.2016.03.012. ISSN 1198743X. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1198743X16300271>
- 57) ROSENTAL S., DEKANO, A. G., BANDALI, A., LAI, D., MALAT, G. E., BIAS, T. E. Oritavancin (Orbactiv): A New-Generation LipoglycOpeptide for the Treatment Of Acute Bacterial Skin and Skin Structure Infections. *P T.* [online] 2018;43(3):143–179. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5821239/>
- 58) RYBAK, J. M., ROBERTS, K. Tedizolid Phosphate: a Next-Generation Oxazolidinone. *Infectious Diseases and Therapy* [online]. 2015, 4(1), 1-14 [cit. 2020-03-19]. DOI: 10.1007/s40121-015-0060-3. ISSN 2193-8229. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s40121-015-0060-3>

- 59) SANTAJIT, S., INDRAWATTANA, N. Mechanisms of Antimicrobial Resistance in ESKAPE Pathogens. *BioMed Research International* [online]. 2016, 2016, 1-8 [cit. 2020-04-27]. DOI: 10.1155/2016/2475067. ISSN 2314-6133. Dostupné z: <http://www.hindawi.com/journals/bmri/2016/2475067/>
- 60) SAQIB, S., MUNIS, M. F. H., ZAMAN, W., ULLAH, F., SHAH, S. N., AYAZ, A., FAROOQ, M., BAHADUR, S. Synthesis, characterization and use of iron oxide nano particles for antibacterial activity. *Microscopy Research and Technique* [online]. 2019, 82(4), 415-420 [cit. 2020-04-10]. DOI: 10.1002/jemt.23182. ISSN 1059-910X. Dostupné z: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/jemt.23182>
- 61) SARAVOLATZ, L. D., STEIN, G. E. Plazomicin: A New Aminoglycoside. *Clinical Infectious Diseases* [online]. 2019 [cit. 2020-02-23]. DOI: 10.1093/cid/ciz640. ISSN 1058-4838. Dostupné z: <https://academic.oup.com/cid/advance-article/doi/10.1093/cid/ciz640/5536695>
- 62) SASTRY, S., DOI, Y. Fosfomycin: Resurgence of an old companion. *Journal of Infection and Chemotherapy* [online]. 2016, 22(5), 273-280 [cit. 2020-02-28]. DOI: 10.1016/j.jiac.2016.01.010. ISSN 1341321X. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1341321X16000313>
- 63) SERIO, A. W., KEEPERS, T., ANDREWS, L., KRAUSE, K. M. Aminoglycoside Revival: Review of a Historically Important Class of Antimicrobials Undergoing Rejuvenation. *EcoSal Plus* [online]. 2018, 8(1) [cit. 2020-02-24]. DOI: 10.1128/ecosalplus.ESP-0002-2018. ISSN 2324-6200. Dostupné z: <http://www.asmscience.org/content/journal/ecosalplus/10.1128/ecosalplus.ES P-0002-2018>
- 64) SHAEER, K. M., ZMARLICKA, M. T., CHAHINE, E. B., PICCICACCO, N., CHO, J. C. Plazomicin: A Next-Generation Aminoglycoside. *Pharmacotherapy: The Journal of Human Pharmacology and Drug Therapy* [online]. 2019, 39(1), 77-93 [cit. 2020-01-23]. DOI: 10.1002/phar.2203. ISSN 0277-0008. Dostupné z: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/phar.2203>
- 65) SILVER, L. L. Fosfomycin: Mechanism and Resistance. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* [online]. 2017, 7(2) [cit. 2020-02-28]. DOI: 10.1101/cshperspect.a025262. ISSN 2157-1422. Dostupné z: <http://perspectivesinmedicine.cshlp.org/lookup/doi/10.1101/cshperspect.a025262>
- 66) SKINNER, M. D., LAHMEK, P., PHAM, H., AUBIN, H. J., LAKS, J. Disulfiram Efficacy in the Treatment of Alcohol Dependence: A Meta-Analysis. *PLoS ONE* [online]. 2014, 9(2) [cit. 2020-02-25]. DOI: 10.1371/journal.pone.0087366. ISSN 1932-6203. Dostupné z: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0087366>
- 67) STOKES, J. M., YANG, K., SWANSON, K, JIN, W., CUBILLOS-RUIZ, A., DONGHIA, N. M., MACNAIR, C. R., FRENCH, S., CARFRAE, L. A. M ACKERMANN, Z. B., TRAN, V. M., CHIAPPINO-PEPE, A., BADRAN, A. H., ANDREWS, I. W., CHORY, E. J., CHURCH, G. M., BROWN, E. D., JAAKKOLA, T. S., BARZILAY, R., COLLINS, J. J. A

- Deep Learning Approach to Antibiotic Discovery. *Cell* [online]. 2020, 180(4), 688-702.e13 [cit. 2020-04-06]. DOI: 10.1016/j.cell.2020.01.021. ISSN 00928674. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0092867420301021>
- 68) TACCONELLI, E., CARRARA, E., SAVOLDI, A. Discovery, research, and development of new antibiotics: the WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis. *The Lancet Infectious Diseases* [online]. 2018, 18(3), 318-327 [cit. 2020-01-19]. DOI: 10.1016/S1473-3099(17)30753-3. ISSN 14733099. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1473309917307533>
- 69) TAUŠOVÁ, B. Antibiotika se musí předepisovat s rozumem. [online]. 2019, [cit. 2019-30-11]. Dostupné z: <https://www.canadian.cz/cs/clanky-a-novinky/antibiotika-se-musi-predepisovat-s-rozumem>
- 70) THAKER, M., SPANOGIANNOPOULOS, P., WRIGHT, G. D. The tetracycline resistome. *Cellular and Molecular Life Sciences* [online]. 2010, 67(3), 419-431 [cit. 2020-01-24]. DOI: 10.1007/s00018-009-0172-6. ISSN 1420-682X. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00018-009-0172-6>
- 71) The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Routine and extended internal quality control as recommended by EUCAST Version 9, 2019. [online]. [cit.2020-01-25]Dostupné z http://www.szu.cz/uploads/documents/CeM/NRLs/atb/EUCAST/kontrola_kvality/Tabulky_pro_kontrolu_kvality_EUCAST_v_9.pdf
- 72) TORRES, M. D. T., DE LA FUENTE-NUNEZ, C. Toward computer-made artificial antibiotics. *Current Opinion in Microbiology* [online]. 2019, 51, 30-38 [cit. 2020-04-06]. DOI: 10.1016/j.mib.2019.03.004. ISSN 13695274. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1369527419300050>
- 73) URBÁNEK, K. Nežádoucí účinky antibiotik na gastrointestinální trakt. *Klinická farmakologie* [online]. 2003, 17, 92-95 [cit. 2020-01-25]. Dostupné z: <https://www.klinickafarmakologie.cz/pdfs/far/2003/02/06.pdf>
- 74) VIASUS, D., RAMOS, O., RAMOS, L., SIMONETTI, A. F., CARRATALÀ, J. Solithromycin for the treatment of community-acquired bacterial pneumonia. *Expert Review of Respiratory Medicine* [online]. 2016, 11(1), 5-12 [cit. 2020-02-25]. DOI: 10.1080/17476348.2017.1249852. ISSN 1747-6348. Dostupné z: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/17476348.2017.1249852>
- 75) VOLLMER, W., BLANOT, D., DE PEDRO, M. A. Peptidoglycan structure and architecture. *FEMS Microbiology Reviews* [online]. 2008, 32(2), 149-167 [cit. 2020-02-28]. DOI: 10.1111/j.1574-6976.2007.00094.x. ISSN 1574-6976. Dostupné z: <https://academic.oup.com/femsre/article-lookup/doi/10.1111/j.1574-6976.2007.00094.x><https://mediately.co/cz/drugs>
- 76) WEN, J., CHEN, F., ZHAO, M., WANG, X. Solithromycin monotherapy for treatment of community-acquired bacterial pneumonia: A meta-analysis of randomised controlled trials. *International Journal of Clinical Practice* [online].

2019, **73**(5) [cit. 2020-04-06]. DOI: 10.1111/ijcp.13333. ISSN 1368-5031.
Dostupné z: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/ijcp.13333>

- 77) WHO. Global Strategy for Containment of Antimicrobial Resistance. [online].
Cit. [2019-29-11] Dostupné z
http://www.who.int/csr/resources/publications/drugresist/en/EGlobal_Strat.pdf
- 78) ZAFFIRI, L., GARDNER J., TOLEDO-PEREYRA, L. H. History of Antibiotics. From Salvarsan to Cephalosporins. *Journal of Investigative Surgery* [online]. 2012, 25(2), 67-77 [cit. 2019-11-27]. DOI: 10.3109/08941939.2012.664099. ISSN 0894-1939. Dostupné z:
<http://www.tandfonline.com/doi/full/10.3109/08941939.2012.664099>
- 79) ZHANEL, G. G., WIEBE, R., DILAY, L., THOMSON, K., RUBINSTEIN, E., HOBAN, D. J., NOREDDIN, A. M., KARLOWSKY, J. A. Comparative Review of the Carbapenems. *Drugs* [online]. 2007, 67(7), 1027-1052 [cit. 2020-01-10]. DOI: 10.2165/00003495-200767070-00006. ISSN 0012-6667. Dostupné z:
<http://link.springer.com/10.2165/00003495-200767070-00006>
- 80) ZUCKERMAN, J. M. Macrolides and ketolides: azithromycin, clarithromycin, telithromycin. *Infectious Disease Clinics of North America* [online]. 2004, 18(3), 621-649 [cit. 2020-01-25]. DOI: 10.1016/j.idc.2004.04.010. ISSN 08915520.
Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0891552004000716>