

UNIVERZITA KARLOVA
Lékařská fakulta v Hradci Králové

DISERTAČNÍ PRÁCE

Pavla Paterová

2020

Doktorský studijní program
Lékařská mikrobiologie

Mikrobiologické aspekty léčby infekčních onemocnění

Microbiological Aspects of Infectious Diseases Therapy

MUDr. Pavla Paterová

Školitel: doc. RNDr. Vladimír Buchta CSc.
Školitel konzultant: doc. MUDr. Pavel Žák, Ph. D.

Hradec Králové, 2020

1 PROHLÁŠENÍ AUTORA

Prohlašuji tímto, že jsem doktorskou disertační práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje. Zároveň dávám souhlas k tomu, aby tato práce byla uložena v Lékařské knihovně Lékařské fakulty v Hradci Králové a zde užívána ke studijním účelům za předpokladu, že každý, kdo tuto práci použije pro svou publikační nebo přednáškovou činnost, se zavazuje, že bude tento zdroj informací řádně citovat.

Souhlasím se zpřístupněním elektronické verze mé práce v informačním systému Univerzity Karlovy, Praha.

Hradec Králové, 2020

podpis autora

2 PODĚKOVÁNÍ

Děkuji doc. MUDr. Jakubu Radochovi Ph. D. za neocenitelnou pomoc a statistické zpracování výsledků, PharmDr. Janě Malákové Ph. D. za konzultace z oblasti klinické biochemie a testování koncentrací antibiotik, paní laborantce Jitce Sobotkové za bezchybnou spolupráci při laboratorních pokusech.

Dále děkuji svým školitelům doc. RNDr. Vladimíru Buchtovi CSc. a školiteli konzultantovi doc. MUDr. Pavlu Žákovi Ph. D. za odborné rady a vedení práce.

3 Obsah

1	Prohlášení autora	3
2	Poděkování.....	4
4	Použité zkratky.....	7
5	Souhrn.....	10
6	Summary	12
7	Úvod do problematiky	14
7.1	Terapie infekčních onemocnění antibiotiky	14
7.1.1	Farmakodynamika antibiotik.....	15
7.1.2	Farmakokinetika antibiotik.....	17
7.1.3	Farmakokinetické a farmakodynamické principy (PK/PD).....	19
7.2	Imunitní systém a antibiotika	21
7.2.1	Antibakteriální imunita.....	21
7.2.2	Antibiotika v imunitní reakci	24
7.2.3	Imunomodulační účinek antibiotik	24
7.2.4	Antibakteriální komponenty krevního séra	25
7.3	Možnosti testování účinku antibiotika	27
7.3.1	Testování hladin antibiotik.....	27
7.3.2	Testování účinku tělních tekutin na mikroorganismy.....	33
8	Cíle disertační práce.....	48
9	Metodika	49
	Testování baktericidie antibiotik kmeny <i>Escherichia coli</i> z hemokultivací	49
9.1	Materiál a přístroje	49
9.2	Pracovní postup	50
9.2.1	Soubor bakteriálních kmenů	50
9.2.2	Příprava zásobního roztoku antibiotik	51
9.2.3	Příprava mikrotitračních destiček	51
9.2.4	Příprava bakteriálního inokula	53
9.2.5	Inokulace suspenze kmenů	53
9.2.6	Kontrola velikosti a čistoty inokula	54
9.2.7	Inkubace destiček.....	55
9.2.8	Stanovení MIC a MBC (skupina inokulovaných destiček A)	55
9.2.9	Modifikace barvení resazurinem (skupina inokulovaných destiček B)	56

9.3	Statistické zpracování	58
	Testování baktericidie séra	60
9.4	Materiál a přístroje	60
9.5	Pracovní postup	60
9.5.1	Soubor pacientů, odběr, transport a uchování sér	60
9.5.2	Příprava zásobního roztoku antibiotik	62
9.5.3	Příprava mikrotitračních destiček	62
9.5.4	Příprava bakteriálního inokula	63
9.5.5	Inokulace suspenze kmene	63
9.5.6	Kontrola velikosti inokula	64
9.5.7	Inkubace destiček	64
9.5.8	Stanovení MIC a MBC (skupina inokulovaných destiček A)	64
9.5.9	Stanovení MIC a MBC modifikací resazurinem (skupina inokulovaných destiček B)	66
9.6	Statistické zpracování	67
10	Výsledky	68
10.1	Výsledky testování baktericidie antibiotik kmeny <i>Escherichia coli</i> z hemokultivací .	68
10.2	Výsledky testování baktericidie séra	80
10.3	Celkové výsledky	86
11	Diskuze	89
12	Závěr	98
13	Seznam literatury	100
14	Seznam obrázků, tabulek a grafů	106

4 POUŽITÉ ZKRATKY

AMI	amikacin
ATCC	American Type Culture Collection
ATP	adenosin-tri-fosfát
AUC	area-under-the curve, plocha pod křivkou
AUC/SBT	area under the bactericidal titre curve, plocha pod křivkou baktericidie
CAMHB	cation adjusted Mueller Hinton broth
CFU	colony forming unit
CIP	ciprofloxacin
Cl	clearance
CLA	klaritromycin
CLSI	The Clinical & Laboratory Standards Institute
C_{max}	maximální koncentrace
C_{min}	minimální koncentrace
COT	trimetoprim-sulfametoxazol
CRP	C-reaktivní protein
CRRT	continual renal replacement therapy, kontinuální renální eliminace
ds-DNA	double-stranded deoxyribonucleic acid
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ESBL	extended spectrum betalactamase, širokospektrá beta-laktamáza
EUCAST	The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing
FPIA	kompetitivní fluorescenční imunoanalýza

GEN	gentamicin
GF-AFC	glycylfenylalanyl-aminofluorokumarin
HAI	hospital acquired infection, infekce vzniklé v souvislosti se zdravotní péčí
HPLC	high performance liquid chromatography
IL	interleukin
KA	krevní agar
LC-MS	liquid chromatography-mass spectrometry
MAC	membrane attack complex
MAMP	microbe associated molecular patterns
MBC	minimální baktericidní koncentrace
MBL	manose binding lectin, manózu vázající lektin
MDR	multidrug resistant
MER	meropenem
MIC	minimální inhibiční koncentrace
MRSA	metilicilin-rezistentní <i>Staphylococcus aureus</i>
MTS	metyl-sulfofenyl-tetrazol
MTT	tetrazol
NEGK	negativní kontrola
NK	natural killer
PAE	postantibiotický efekt
PAMP	pathogen associated molecular patterns
PD	farmakodynamika
PK	farmakokinetika

PMS	fenazine-metyl-sulfát
POZK	pozitivní kontrola
PPT	piperacilin/tazobaktam
PRR	pattern recognition receptors
PST	párový Studentův t-test
RNA	ribonukleová kyselina
SBT	sérový baktericidní test/titr
SBT-rate	serum bactericidal rate
SIT	sérum inhibiční titr
SPE	solid phase extraction, extrakce na pevné fázi
spp.	druhy, species
ss-DNA	single-stranded deoxyribonukleová kyselina
Tb	turbidance
TDM	therapeutic drug monitoring, terapeutické monitorování léčiv
TLR	Toll-like receptor
TNF	tumor necrosis faktor
UV	ultrafialový
Vd	distribuční objem
VRE	vankomycin rezistentní enterokoky
WSRT	Wilcoxon signed ranks test
XDR	extensive drug resistant
ΔT_b	změna turbidance

5 SOUHRN

Úvod: Metoda stanovení baktericidního titru séra představuje alternativní možnost optimalizace léčby infekce a podávání antibiotik. Ukazuje skutečnou aktivitu jednoho nebo více podávaných antibiotik v komplexním systému antibakteriálního působení séra pacienta. Tuto laboratorní metodu je možno použít k potvrzení a kvantifikaci baktericidního účinku séra pacienta léčeného antibiotiky, zvláště při léčbě infekcí způsobených multirezistentními bakteriemi. Cílem práce bylo potvrdit non-inferioritu testování baktericidie bujónovou diluční metodou dle CLSI M21-A Guidelines (čas do výsledku 48, 72 hodin) s modifikovanými metodami testování na základě turbidimetrie (čas do výsledku 6, 8, 24 hodin) a barvení resazurinem (čas do výsledku 8, 24 hodin).

Materiál a metodika: Byla testována čtyři antibiotika gentamicin, amikacin, piperacilin/tazobaktam a meropenem s 30 kmeny *Escherichia coli* izolovaných z hemokultur 29 pacientů hospitalizovaných na různých odděleních FN Hradec Králové. Pro testování baktericidního titru lidského krevního séra byla použita séra (n = 76) deseti hematologických pacientů IV. Interní kliniky FN Hradec Králové. Krev pacientů byla odebrána před a v průběhu prvního a třetího dne antibiotické terapie febrilní neutropenie. Pro testování byl použit referenční kmen *Escherichia coli* ATCC 25922.

Výsledky: Testování baktericidie antibiotik vykázalo non-inferiorní výsledky v testování po 24 hodinách. Všechny modifikace, které byly odečítány dříve, neměly dostatečnou shodu s CLSI. Pro testování modifikace s měřením turbidimetrie byly non-inferiorní výsledky u spektrofotometru při použití vlnové délky 405 nm a nejvyšší oboustranné *p*-hodnoty, když hraniční změna turbidance byla < 30 % změny. Při testování baktericidie séra byly non-inferiorní výsledky získány také až při testování za 24 hodin a nebyly závislé na použité vlnové délce (srovnatelné výsledky oboustranné *p*-hodnoty byly při použití vlnové délky 405 nm i 620 nm).

Metoda barvení resazurinem byla non-inferiorní v navržené modifikaci při odečtu barvení po 8 hodinách inkubace a následné subkultivaci obsahu negativních jamek mikrotitrační destičky. Srovnatelné výsledky testování jsou tedy k dispozici také po 24 hodinách testování.

Závěr: Navržené modifikace testování baktericidie s použitím turbidimetrie a barvení rezazurinem poskytovaly po 24 hodinách inkubace výsledky srovnatelné s referenční metodou CLSI a tím zkrátily čas potřebný k jejich dosažení o 24 až 48 hod v porovnání s touto standardní metodikou.

K získání validních výsledků je třeba nejenom pečlivá laboratorní práce s dodržением všech zásad správné laboratorní praxe, ale také správné načasování odběrů séra pacienta a jeho bezchybný odběr, uchování a transport. Nezbytná je i intenzivní spolupráce laboratoře s klinickými pracovníky.

Stále diskutovanou otázkou však zůstává hraniční hodnota baktericidního titru séra, která by měla spolehlivě predikovat klinický účinek léčby pacienta. Zdá se, že závěry starších prací s obecnými doporučeními pro dostatečný sérový baktericidní titr bude třeba přehodnotit a individualizovat za použití farmakokinetických a farmakodynamických principů. Pro potvrzení těchto předpokladů budou ale nezbytné další laboratorní a klinické studie.

6 SUMMARY

Background: The method of serum bactericidal assay represents an alternative possibility of optimization of anti-infectious therapy and administration of antibiotics. It mirrors the real activity of one or more administered antibiotics in the complex system of the antibacterial effect of patient's serum. The paper aimed to confirm non-inferiority of bactericidal testing using the broth dilution method according to CLSI M21-A Guidelines (time to results 48, 72 hours) in comparison with modified methods of testing on the basis of turbidimetry (time to results 6, 8, 24 hours) and resazurin color (time to results 8, 24 hours).

Methods: Four antibiotics were tested: gentamicin, amikacin, piperacillin/tazobactam and meropenem with 30 *Escherichia coli* strains isolated from blood cultures of 29 patients hospitalised in different wards, University Hospital in Hradec Kralove. Human blood sera (n = 76) from ten hematological patients (4th Department of Clinical Medicine, University Hospital, Hradec Kralove) were tested to establish bactericidal titer. Patients' blood was withdrawn prior to and in the course of the first and third day of antibiotic therapy of febrile neutropenia. Testing employed the reference strain *Escherichia coli* ATCC 25922.

Results: A comparison with the standard CSLI showed that the results of bactericidal testing of antibiotics did not differ at the statistically significant level (non-inferior) in 24-hour modification of the methods used. All results of the modification tests before 24 hours were statistically different from CLSI method. The results of the modified turbidimetric method were non-inferior with the use of the wavelength of 405 nm; the best two-tailed *p*-value was achieved at the break-point < 30% of the change of turbidance. Comparison of the results of serum bactericidal activity showed no dependence on the wavelength used (405 nm versus 620 nm) and provided comparable two-tailed *p*-value after 24-hour incubation.

The modified method using resazurin color was also statistically non-inferior from CSLI provided that color was read after 8-hour incubation and added subculture of contents of negative wells. So the results were available after 24 hours.

In the case of reading after 6 and 8 hours of incubation, the results of both proposed serum bactericidal testing methods exerted statistically significant differences from the standard CLSI.

Conclusion: The proposed modifications, which use turbidimetry and resazurin color for testing of bactericidal activity of serum after 24 hours of incubation yielded results comparable with the CLSI method and thus shortened the time necessary for their achievement by 24 to 48 hours in comparison with the standard methodology according to CLSI.

Moreover, a careful laboratory work keeping all the principles of good laboratory practice is also necessary to obtain valid results. The same is true for correct timing of patient serum collection, flawless collection, storage and transport. Close cooperation of the laboratory workers with clinicians is also necessary as well.

However, the value of serum bactericidal titer, which reliably predicts the clinical effect of patient treatment, remains an issue under discussion. It seems that the conclusions of earlier papers about general recommendations for sufficient serum bactericidal titer will need to be reconsidered and individualized using pharmacokinetic and pharmacodynamic principles. Further laboratory and clinical studies will be necessary to confirm these assumptions.

7 ÚVOD DO PROBLEMATIKY

7.1 TERAPIE INFEKČNÍCH ONEMOCNĚNÍ ANTIBIOTIKY

Antibiotika jsou léčivé látky, které způsobují smrt nebo inhibici růstu a množení bakterií. Rezistence bakterií na antibiotika je celosvětový problém, který vzniká z důvodu neomezeného a neracionálního používání antibiotik. Abychom tento problém překonali, je třeba používat antibiotika obezřetně a jednou z možností je důsledná racionalizace a optimalizace používání antibiotik.

Účinnost antibiotik závisí na mnoha faktorech: cestě podání, lokalizaci infekce, přítomnosti alergie, interakcí a interferujících látek, koncentraci antibiotika v těle, vlastnostech patogena, jeho citlivosti nebo rezistenci na podávané antibiotikum. Účinnost antibiotika je popisována termínem potence a projevuje se ve svém účinku jako bakteriostatická nebo baktericidní. Výsledek je dán řadou faktorů, včetně velikosti dávky a způsobu dávkování. V současné době studie poukazují na to, že konvenční dávkování antibiotik nedosahuje dostatečně účinných hladin ke zvládnutí infekce zvláště u kriticky nemocných vzhledem k vysoké variabilitě farmakokinetiky a také vzhledem k pozměněné farmakodynamice, vzniku a vývoji rezistence bakterií na antibiotika (Parker, Sime a Roberts 2015). Léčba antibiotiky a dosažení příznivého efektu je proto obtížnější a je doporučována individualizace dávkování.

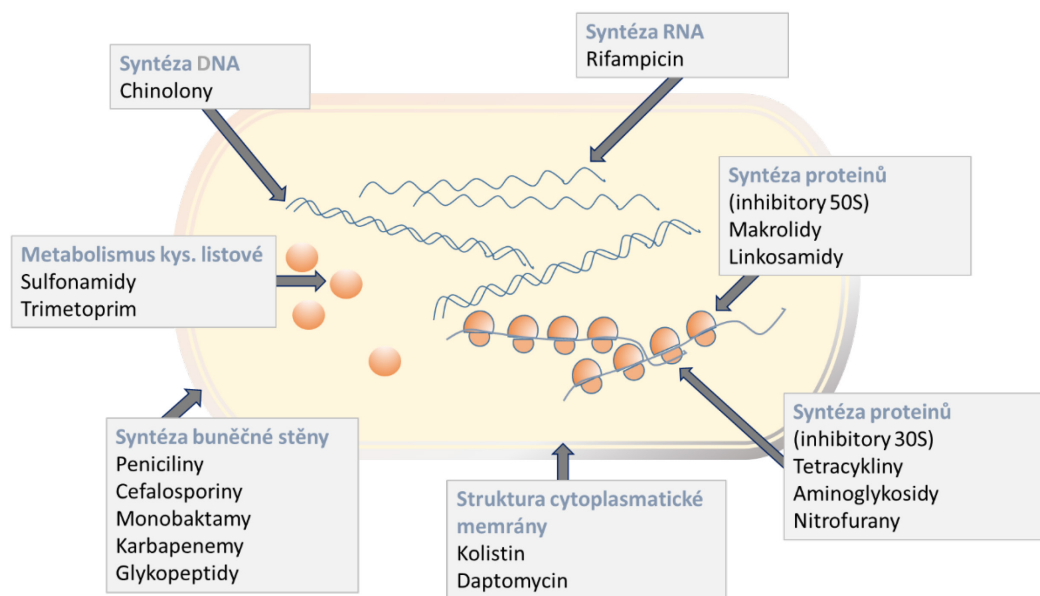
Poslední dobou se objevuje zvýšená prevalence multirezistentních bakterií (MDR, multi drug resistant, XDR, extensive drug resistant). Jedná se především o enterobakterie (*Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Enterobacter* spp.), nefermentující gram-negativní tyčky (*Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, *Burkholderia* spp.), ale také o gram-positivní bakterie – převážně o rezistentní enterokoky nebo stafylokoky: např. VRE, vankomycin rezistentní *Enterococcus faecium*, MRSA, methicilin rezistentní *Staphylococcus aureus* (Orsi, Falcone and Venditti 2011, Mohamed *et al.* 2019). Tyto bakterie způsobují obtížně léčitelné infekce především spojené s pobytem ve zdravotnickém zařízení (HAI, hospital acquired infection). Objevily se informace, že část multirezistentních původců jsou potomky MDR nebo XDR klonů, šířících se celosvětově po zdravotnických zařízeních. Například Oliver *et al.* v roce 2015 upozornili na MDR/XDR globální klony *Pseudomonas*

aeruginosa, k nejrizikovějším patří ST235, ST111, ST175. Rozšíření těchto klonů je celosvětové a léčba infekcí jimi způsobených je velmi obtížná vzhledem k multirezistenci (Oliver *et al.* 2015).

Optimalizace podávání antibiotika vychází ze znalosti jeho mechanismu účinku (farmakodynamika, PD) a jeho osudu v těle, včetně jeho distribuce v různých kompartmentech (farmakokinetika, PK).

7.1.1 Farmakodynamika antibiotik

Usmrcení bakterií antibiotiky je komplexní mnohaúrovňový proces, který je nastartován navázáním antibiotika na cílové vazebné místo bakterie, přehled mechanismů účinku a cílových míst viz Obr. 1.



Obrázek 1 Schematické zobrazení cílových míst a mechanismu účinku antibiotik na bakteriální buňku (přepřacováno volně podle Beneš 2018)

Dosažením cíle antibiotika způsobí **poruchu základních buněčných procesů**, alteraci metabolismu. Metabolická dysregulace způsobující zacyklení metabolických procesů je častým mechanismem antibiotické letality. Např. navázání beta-laktamových antibiotik na penicilin-vázající protein způsobí narušení buněčné stěny bakterií a poté zacyklení nefunkční syntézy a degradace, které vyčerpávají buněčné zdroje, způsobí zvýšenou spotřebu kyslíku, zvýšenou produkci reaktivních forem kyslíku a snížení obsahu intracelulárního ATP (Yang,

Bening a Collins 2017). Většina baktericidních antibiotik indukuje několik genů odpovědných za translační stres. Vzhledem k tomu, že rostoucí bakteriální buňka vydává více než 50 % své energie na podporu požadavků proteinové translace, translační stres ještě více potencuje metabolický stres bakterie.

Indukcí stresového metabolismu buňky začíná sekundární fáze letálního účinku antibiotik. Stresová odpověď bakterie pomáhá bakterii se adaptovat měnícím se podmínkám prostředí. Tato odpověď byla poprvé popsána jako reakce na hladovění a znamená změnu systému ukládání energie buňky z adenosinfosfátu do guanosinfosfátu (pppGpp guanosinpentafosfátu, ppGpp guanosintetrafosfátu). Tyto molekuly patří mezi tzv. alarmony stringentní odpovědi, což jsou signální molekuly kontrolující expresi bakteriálních genů umožňující přežití při buněčném stresu (např. při hladovění nebo uvnitř hostitelské buňky). Prolongovaná stresová odpověď bakteriální buňky indukovaná expozicí antibiotiku je předpokladem postantibiotického efektu, při kterém je bakteriální růst inhibován, přestože koncentrace antibiotika poklesly k subinhibičním koncentracím (Abel Zur Wiesch *et al.* 2015).

Některé **změny zevního prostředí**, které předchází působení antibiotik, mohou bakterii ochránit před jejich letálním účinkem tím, že indukují stresovou odpověď bakteriální buňky. Například expozice bakterie peroxidu vodíku iniciuje buněčnou stresovou odpověď jako reakci na oxidativní stres. Také nutriční nedostatek a hladovění bakteriální buňky může indukovat fenotypově tolerantní perzistující buňky aktivací (p)ppGpp stringentní odpovědi. Účinnost antibiotik také klesá v nepřítomnosti kyslíku, naopak hyperbarický kyslík může letální účinek potencovat. Pravděpodobným mechanismem je účast kyslíku v aerobní respiraci buňky jako terminálního akceptoru elektronu pro syntézu ATP, kdy vytváří toxické reaktivní formy kyslíku (Yang, Bening a Collins 2017).

Mezi PD faktory ovlivňující účinek antibiotik patří citlivost nebo rezistence jednotlivé bakterie a populace bakterií vyjádřená laboratorní hodnotou minimální inhibiční koncentrací (MIC). Fenotypovou ochranu před letálním účinkem podporuje **heterogenita populace**: rozdílná exprese lékových efluxních pump, náhodné vytvoření perzistentních buněk, ATP deplece nebo také morfologická diferenciaci a efekt inokula. Také některé vnitrodruhové a mezidruhové mechanismy (quorum sensing, signalizace a kooperativní mutualismus) mohou přinášet dokonce kolektivní ochranu proti antibiotikům (Yang, Bening a Collins 2017). Mezi předpokládané příčiny efektu inokula, kdy baktericidie závisí na iniciální denzitě

bakteriálního inokula, patří bakteriální komunikace závislá na velikosti a denzitě inokula, přítomnost enzymů degradující antibiotika a variabilita metabolického stavu bakterií ve velkém inokulu. Mezi další příčiny patří také nízká afinita antibiotika k cílovému místu a vyčerpání vazebných možností volného aktivního antibiotika, které není schopno v tak velkém inokulu obsadit dostatečné množství vazebných míst, aby způsobilo smrt všech bakterií denzního inokula (Abel Zur Wiesch *et al.* 2015).

Tolerance antibiotik může být vzácným důvodem selhání antibiotické terapie. Tolerance je definována jako situace, kdy je minimální baktericidní koncentrace 32x větší než MIC. Tak může dojít k situaci, kdy je potřebná baktericidní koncentrace vyšší než koncentrace dosažitelná v séru. Příklad infekce způsobené bakterií *Staphylococcus aureus* tolerantní k linezolidu popsali Cunha, Nausheen a Schoch v roce 2010.

Účinek antibiotik je dnes studován v přísně definovaných laboratorních podmínkách. Antibiotika ale účinkují v komplexním dynamickém prostředí tvořeném nutriční variabilitou, heterogenitou mikrobů a mnoha dalšími externími stresory. Působení antibiotik může být také odlišné v prostředí exponovaném dalšími léčivými přípravky (tzv. multi-drug effect). Také předchozí expozice jednomu antibiotiku i v subterapeutických dávkách může měnit účinek dalšího antibiotika. Například tím, že indukuje fyziologickou stresovou odpověď, která bakterii chrání před usmrcením, nebo indukci geneticky kódované rezistence k antibiotikům rozdílných skupin (Yang, Bening a Collins 2017). Tyto multifaktoriální procesy nejsou v současné době zatím kvalitně popsány a k hodnocení letálního účinku antibiotik v kontextu přirozeného extracelulárního prostředí jsou potřebné další výzkumy.

7.1.2 Farmakokinetika antibiotik

Výsledný účinek antibiotika a tedy i klinický efekt může být modifikován farmakokinetikou léčiva. Ta líčí osud léku od momentu podání pacientovi, popisuje procesy, které vedou k výsledným koncentracím v plazmě, tkáních, dalších tělních tekutinách, metabolismus, možné interakce a v neposlední řadě také jeho eliminaci z těla. PK je významně ovlivněna základními charakteristikami antibiotika dané jeho chemickou strukturou: lipofilitou nebo hydrofilitou, hlavní eliminační cestou, velikostí distribučního objemu, vazbou na bílkoviny, prostupností léčiva do jednotlivých tkání, intracelulární prostupností (Jindrák, Hedlová a Urbášková 2014).

Z hlediska nastavení optimální dávky antibiotika jsou nejdůležitější PK parametry **distribuční objem** (Vd) a **clearance** (Cl). Distribuční objem je objem krve, který by byl potřeba, aby v něm dané množství látky dosahovalo stejné koncentrace, jaké dosahuje v krvi. Čím je Vd vyšší, tím více se daná látka distribuuje do tkání a také: čím větší Vd, tím je koncentrace v krvi po stejné dávce nižší. Tato veličina je potřebná ke stanovení úvodní nasycovací dávky antibiotika. Clearance znamená rychlost eliminace léčiva z krve (plazmy), zahrnuje eliminaci všemi orgány (střevo, játra, ledviny, plíce). Znalost této veličiny slouží k určení velikosti udržovací dávky a dávkovacího intervalu.

Mezi PK faktory, které mohou ovlivnit výslednou koncentraci antibiotika v cílové tkáni, patří: stav sliznice ovlivňující rezorpci perorálního léku, hmotnost pacienta, závažnost infekce, přítomnost sepse, změna koncentrace sérových proteinů, cílové místo infekce, faktory ovlivňující clearance léku (stav renálních a hepatálních funkcí, zavedení některé z forem hemodialýzy, metabolizace léčiva, lékové interakce) a také stav imunitního systému. U časných fází sepse dochází k redistribuci tekutin do třetího prostoru, masivní substituci tekutinami. Převážně hydrofilní antibiotika jsou redistribuována spolu s tekutinami a dochází k poklesu koncentrace v krevním oběhu. K dosažení dostatečných hladin je proto vhodné podávat dostatečnou počáteční nasycovací dávku.

U kriticky nemocných dochází k významným změnám farmakokinetických parametrů včetně distribučního objemu a clearance. Obecně platí, že hydrofilní antibiotika s nízkou vazbou na proteiny jsou obvykle primárně eliminována ledvinami a že clearance antibiotika významně vzroste, jakmile jsou zahájeny arteficiální eliminační techniky. Při terapii kriticky nemocných se obvykle k zajištění dostatečné hladiny antibiotika v úvodní fázi léčby používá agresivní dávkování. To může zahrnovat podání úvodní nasycovací dávky (loading-dose) z důvodu rychlého dosažení terapeutické hladiny, kompenzace zvýšeného distribučního objemu a redukce inokula patogena. Agresivní dávkování se obvykle používá bez ohledu na zhoršené orgánové funkce (Ulldemolins *et al.* 2014).

Pro většinu antibiotik PK data v průběhu prolongované intermitentní arteficiální renální eliminace nejsou k dispozici, proto je dávkování problematické. Pro beta-laktamová antibiotika jsou data dávkování při kontinuální renální eliminaci (CRRT) limitovaná. Malé hydrofilní molekuly beta-laktamů jsou v průběhu CRRT obvykle vylučovány ve zvýšené míře, výsledná variabilita hladin je však závislá na mnoha faktorech: typu, nastavení a intenzitě

CRRT, na mnoha faktorech pacienta včetně kolísající hladiny antibiotika a jeho vazby na bílkoviny (Jamal *et al.* 2015). Pokud je to možné, je vhodné použít terapeutické monitorování léčiv (TDM).

Vazba antibiotik na proteiny může být ovlivněna snížením sérových proteinů, jehož dominantní složkou je albumin. Sérový albumin je tradičním parametrem malnutrice. I když se chronický nedostatek bílkovin a katabolismus projeví až v případě, že se připojí další stres (trauma, infekce nebo sepse) nebo malnutrice dosáhne hranice závažného stupně. Proto hypoalbuminémie svědčí spíše o zvýšení extracelulární tekutiny, ke kterému dochází při otocích, kolísání stavu hydratace nebo infekce (Zadák 2017).

Antibiotika se v krvi nacházejí ve dvou formách: **formě volné**, která je aktivní a schopná účinku, a **formě vázané na plazmatické bílkoviny**. Lipofilní látky mají vyšší tendenci vázat se na plazmatické bílkoviny než látky hydrofilní. Vazba vzniká rychle a je reverzibilní. Jedná se o depotní systém, který na jedné straně snižuje intenzitu účinku léčiva, avšak na straně druhé prodlužuje jeho trvání. Jako jedna z hlavních je vnímána vazba na plazmatický albumin. Každá albuminová molekula má minimálně šest vazebných míst. Dvě z nich mají velmi těsnou vazbu k volným mastným kyselinám, jedno pro bilirubin a dvě hlavní vazebná místa pro kyselá farmaka označovaná jako „site I“ a „site II“. Především pro zásaditá léčiva je hlavním vazebným proteinem α_1 kyselý glykoprotein (Vašířová 2017). Výsledný účinek antibiotika je způsoben aktivní, volnou formou antimikrobní látky. Změny koncentrace krevních bílkovin mohou změnit koncentraci volného a vázaného léčiva, a tak významně ovlivnit účinek antibiotika i jeho případnou toxicitu.

7.1.3 Farmakokinetické a farmakodynamické principy (PK/PD)

Klinický účinek antibiotik je podmíněn komplexem interakcí mezi hostitelem, mikroorganismem a antibiotikem. PK/PD analýza umožňuje lékařům stanovit optimální dávkovací schéma s cílem maximalizace účinku a minimalizace nežádoucích účinků a vzniku rezistence. Jsou rozlišovány tři základní PK/PD indexy, které predikují antibiotickou účinnost v závislosti na průběhu koncentrace antibiotika vzhledem k MIC původce infekce: **čas**, po který zůstává volná frakce antibiotika nad hodnotou MIC původce ($t > MIC$), poměr nejvyšší **koncentrace** (c_{max}) antibiotika vůči hodnotě MIC původce (c_{max}/MIC), poměr velikosti **plochy pod křivkou** za 24 hodin vůči MIC původce (AUC_{0-24}/MIC). Rozdělení antibiotik podle jednotlivých PK/PD indexů zobrazuje Tab. 1.

Tabulka 1 Rozdělení a charakteristika antibiotik podle jednotlivých PK/PD indexů (podle Jindrák, Hedlová a Urbášková 2014)

Rozdělení antibiotik podle PK/PD	Účinek závislý na čase	$t > MIC$
	Čas, po který zůstává volná frakce antibiotika nad hodnotou MIC původce Beta-laktamy, klindamycin, linezolid	
	Účinek závislý na koncentraci	c_{max}/MIC
	Poměr maximální koncentrace antibiotika vůči hodnotě MIC původce Aminoglykosidy, metronidazol, kolistin, (chinolony)	
	Účinek závislý na koncentraci v čase	AUC_{0-24}/MIC
	Poměr velikosti plochy pod křivkou za 24 hodin vůči MIC původce Glykopeptidy, chinolony, tetracykliny	

U antibiotik, jejichž účinek je **závislý na koncentraci**, je velmi důležitá vysoká nárazová dávka, které zaručí, že c_{max} převyší alespoň 8-10x MIC. Po dosažení c_{max} hladina antibiotika klesá pod MIC a na bakterie působí **postantibiotický efekt** (PAE) antibiotika po časově ohraničené období, přestože již nedosahuje účinné hladiny. Tento efekt je pozorován především u gram-negativních bakterií, u gram-pozitivních kmenů je nevýznamný (Jindrák, Hedlová a Urbášková 2014). Dosažení optimální c_{max} je dáno aktuálním distribučním objemem antibiotika, jehož hodnoty se mohou v průběhu léčby měnit. Vzhledem k PAE a výhodnému poklesu k nízkým netoxickým koncentracím antibiotika na konci dávkovacího intervalu je možné např. aminoglykosidy podávat v režimu jednou denně.

Maximální účinek antibiotik **závislých na čase** je dosažen dlouhodobým udržením jejich koncentrace nad MIC. U nemocných v intenzivní péči se doporučuje, aby $t > MIC$ dosahoval 100 % (Jindrák, Hedlová a Urbášková 2014). Proto se antibiotika podávají v několika rozdělených dávkách v krátkých časových intervalech (např. podávání oxacilinu po 4-6 hodinách). V poslední době je také velmi diskutovaná problematika prodlužování nebo dokonce kontinuální podávání infúze (po dobu 24 hodin), která může $t > MIC$ významně ovlivnit (Beneš 2018). Pro použití prolongovaných a kontinuálních infúzí je vždy důležité zkontrolovat inkompatibilitu a interakce současně podávaných léčiv a minerálů a také stabilitu roztoku antibiotika po celé období podávání.

Účinkem **závislým na koncentraci a čase** je charakterizován např. vankomycin. Hlavním sledovaným parametrem je **plocha pod křivkou** koncentrací v plazmě (AUC, Area Under the Curve). Jde o matematický parametr, který lze vypočítat programy terapeutického monitorování léčiv (např. MW Pharm) a poté porovnat s ideální AUC pro dané antibiotikum a danou bakterii (např. doporučená AUC_{0-24}/MIC pro vankomycin ≥ 400). V klinické praxi se běžně nepoužívá a nahrazuje se doporučeným terapeutickým rozmezím koncentrací v krvi v průběhu podávání. Pro vankomycin je stanoveno doporučené terapeutické rozmezí pro minimální koncentraci před podáním: c_{min} 10-15 mg/l, 20 mg/l pro hluboké a závažné infekce (Kacířová 2015). Udržování sérových hladin ve stanoveném terapeutickém rozmezí by mělo vést k dostatečné AUC, tedy maximálnímu klinickému účinku za minimalizace toxicity antibiotika.

7.2 IMUNITNÍ SYSTÉM A ANTIBIOTIKA

Úspěšná léčba bakteriálních infekcí je vždy výsledkem spolupráce antibiotik a imunitního systému. Obranná zánětlivá odpověď je dynamický proces a je výsledkem interakce konkrétního jedince na konkrétní mikroorganismus v kontextu zdraví nebo nemoci člověka a stupně virulence mikroba. Cílem by mělo být udržení fyziologických funkcí tělních systémů. Teoreticky by měla být reakce imunitního systému úměrná velikosti bakteriální nálože. Ačkoliv by antibiotika měla snížením množství bakterií snižovat stimulaci imunitní odpovědi, situace je daleko složitější (Ankomah a Levin 2014).

7.2.1 Antibakteriální imunita

Bakterie jsou rozpoznány imunitním systémem na základě charakteristických molekulových vzorů, které jsou souborně označovány jako MAMP (Microbe Associated Molecular Patterns). Pokud tyto molekuly pochází z patogenního mikroorganismu, jsou obecně nazývány PAMP (Pathogen Associated Molecular Patterns). Mezi tyto molekulové vzory patří složky bakteriálního těla, ale také toxiny a enzymy produkované bakteriemi jako faktory patogenity (Tab. 2).

Tabulka 2 Příklady PAMP – molekulových vzorů spojených s patogeny, které jsou schopny indukovat lidskou obrannou imunitní odpověď (upraveno podle Krejsek, Andrýs a Krčmová 2016, Takeuchi a Akira 2010)

PAMP molekulové vzory spojené s patogeny	Složky buněčné stěny: <ul style="list-style-type: none"> Lipopolysacharidy, peptidoglykany, kyselina lipoteichoová, lipoproteiny, lipoglykany
	Složky bakteriálního pouzdra: <ul style="list-style-type: none"> Polysacharidy, kyselina hyaluronová, proteiny
	Složky orgánů pohybu a adheze: <ul style="list-style-type: none"> Flagelin, proteiny fimbrií, proteiny pilli
	Nukleové kyseliny: <ul style="list-style-type: none"> Ds-DNA, ss-DNA, RNA
	Bakteriální toxiny a enzymy: <ul style="list-style-type: none"> Hemolyziny, enterotoxiny, streptolysin O, leukocidin, toxin toxického šoku, kolagenáza
	Složky biofilmu: <ul style="list-style-type: none"> Stavební složky biofilmu, quorum sensing

Pokud jsou tyto molekuly rozpoznány lidskými receptorovými strukturami PRR (Pattern Recognition Receptors), dochází k rozvoji obranné zánětlivé reakce. Tyto receptory jsou součástí **buněk vrozené imunity** (dendritických buněk, makrofágů), které vyčkávají v tkáních a orgánech. Na jejich membráně jsou umístěny PRR receptory rodiny TLR (Toll-Like Receptors): např. TLR-2 rozpoznávající složky gram-pozitivních bakterií, poriny a lipoproteiny gram-negativních bakterií, TLR-4 identifikující lipopolysacharidy bakterií, TLR-6 pro lipoproteiny patogenních bakterií a také receptory CLR (C-type Lectin Receptor) identifikující sacharidové molekuly bakterií (Krejsek, Andrýs a Krčmová 2016). Po navázání bakteriálních molekul dochází k aktivaci nitrobuněčných reakcí a zánětu.

V tělních tekutinách jsou přítomné také solubilní PRR, např. CRP (C-reaktivní protein) nebo manózu vázající lektin (MBL). Okamžitě reagující složkou humorální imunity je **komplementový systém**. Ten je důležitý především v počáteční a amplifikační fázi obranného zánětu, ale je také účinnou efektorovou složkou vytvořením MAC (Membrane Attack Complex), který má schopnost lyzovat pronikající bakteriální buňku. Tato počáteční fáze zánětu je spojena s **tvorbou prozánětlivých cytokinů** (např. IL-1, IL-6, interferonu γ , TNF α) produkovaných převážně dendritickými a NK (Natural Killer) buňkami, které se

nacházejí v různých tělních systémech. Cytokiny jsou pluripotentní proteiny, které v zánětem postižených tkáních regulují buněčnou smrt, zvyšují cévní permeabilitu a chemotaxi imunitních buněk, indukují tvorbu proteinů akutní fáze (Takeuchi a Akira 2010).

V této fázi obranného zánětu hrají významnou roli i **makrofágy**, které mají také schopnost fagocytovat a usmrcovat bakterie. Avšak zásadní efektorovou funkci v protibakteriální obraně zastávají **neutrofilní granulocyty**, které pronikají do tkání, fagocytují a usmrcují bakterie. Jejich klíčové postavení potvrzuje i fakt, že stavy spojené s neutropenií nebo defekty funkce neutrofilních granulocytů jsou spojeny s velkým rizikem rozvoje těžkých bakteriálních infekcí.

Specifická imunita nastupuje až s odstupem několika dnů od začátku aktivace obranného zánětu. Buňky specifické imunity (T a B lymfocyty) jsou aktivovány rozpoznáním bakteriálního antigenu v kontextu s molekulami HLA systému, které jim nabízejí antigen prezentující buňky na svém povrchu. Aktivace T-lymfocytů vede ke klonální expanzi mnoha subtypů, které mají významnou roli v regulaci imunitní odpovědi a také se účastní boje proti intracelulárním parazitům (např. mykobakteriím). Aktivace B-lymfocytů vede k tvorbě protilátek. V první fázi subset B1 lymfocytů produkuje protilátky třídy IgM s typickou polyreaktivitou a nízkou afinitou k antigenu. Postupně B-lymfocyty začínají vytvářet protilátky IgG a IgA, které mají vysokou antigenní afinitu. Protilátky IgG také pronikají z cévního řečiště do tkání, neutralizují bakteriální toxiny, účastní se opsonizace fagocytózy a aktivace komplementu (Krejsek, Andrýs a Krčmová 2016).

Pokud obranný zánět dosáhne klinické hranice, je viditelná přítomnost klinických symptomů infekce (*tumor, calor, dolor, functio laesa*). Tyto makroskopické symptomy jsou odrazem zvýšené vaskulární permeability, která způsobuje únik sérových komponent a extravazaci imunitních buněk (Takeuchi a Akira 2010). Poškození tkání je většinou brzy reparováno a obranný zánět je ukončen. Avšak nastávají situace, kdy obranná reakce nestačí nebo je naopak přehnaně vystupňovaná do zánětu poškozujícího. V těchto případech je vhodné zvážit podání antibiotika a pomoci tak imunitnímu systému vypořádat se s infekcí.

V určitých případech může dojít k přechodu z obranného zánětu do zánětu poškozujícího. Modelovou situací je **bakteriální sepse**, která zůstává i v éře antibiotik závažným lékařským problémem. Sepse je způsobena deregulovanou reakcí hostitele (na jedné straně vysokou

neregulovanou aktivitou zánětu, na druhé straně utlumením imunitních reakcí tzv. imunitní paralýzou). Sepse může vzniknout přechodem z lokálního zánětu: např. z plic, močového měchýře nebo měkkých tkání. Po průniku bakterií do dalších systémů může imunitní systém po masivním rozpoznání molekul PAMP reagovat přehnaně tzv. „cytokinovou bouří“, která může dalšími deregulovanými kroky vést k poškozující obranné reakci a v konečném důsledku i ke smrti nemocného.

7.2.2 Antibiotika v imunitní reakci

Cílem úspěšné antibiotické léčby je maximalizovat pravděpodobnost vyléčení, minimalizovat toxické a jiné nežádoucí účinky antibiotika a minimalizovat vznik rezistence v průběhu terapie (Ankomah a Levin 2014). Beta-laktamová antibiotika svým účinkem na inhibici bakteriální stěny způsobí lýzu bakteriální buňky a uvolnění velkého množství komponent bakteriální buňky (lipopolysacharidy, kyselina teichoová, kyselina lipoteichoová, bakteriální DNA, RNA a další). Tato akce je po masivní identifikaci molekul PAMP složkami nespecifické imunity provázena bouřlivou prozánětlivou reakcí imunitního systému (Tauber a Nau 2008). Tato reakce může být závažná zvláště při razantní léčbě onemocnění provázené vysokou bakteriální náloží (meningitida, seps). Taková zánětlivá bouře po začátku podávání beta-laktamových antibiotik může zvyšovat mortalitu a následky onemocnění (Nau a Eiffert 2005). Naopak baktericidní účinek antibiotik, který není provázen lýzou buněčné stěny bakterií, nezpůsobí takové uvolnění prozánětlivých složek imunitní reakce a pravděpodobně může zlepšit výsledek léčby závažných infekčních onemocnění. Takové vlastnosti vykazuje např. klindamycin, rifampicin nebo aminoglykosidy. Fluorochinolony (např. trovafloxacin) vykazují nižší prozánětlivý účinek, způsobený zpožděním uvolnění složek bakteriální stěny (Nau *et al.* 1997).

7.2.3 Imunomodulační účinek antibiotik

Některá antibiotika vykazují kromě baktericidního nebo bakteriostatického účinku také nepřímý imunomodulační účinek. Protizánětlivé vlastnosti makrolidových antibiotik u chronických zánětlivých onemocnění jsou známy více jak 15 let. Makrolidy výrazně ovlivňují uvolnění cytokinů jako IL-8 a TNF α a také dalších mediátorů zánětu (např. oxid dusnatý NO). Jsou navíc schopny inhibovat chemotaxi leukocytů supresí syntézy endogenního chemotaktického faktoru a také interakce bakterií a epitelálních buněk. Molekulární

mechanismus účinku makrolidů na funkci neutrofilních granulocytů není přesně znám, předpokládá se inhibiční účinek na degranulaci (Tauber a Nau 2008). Příznivá imunomodulační aktivita makrolidů je klinicky využívána u chronických respiračních onemocnění převážně v léčbě chronické panbronchiolity a cystické fibrózy. Dlouhodobá terapie azitromycinem nebo klaritromycinem redukuje aktivitu nemoci, frekvenci exacerbací a zlepšuje plicní funkce. Byl také popisován efekt makrolidů na strukturu a funkci bakteriálního biofilmu pravděpodobně cestou inhibice syntézy polysacharidů, které tvoří hlavní extracelulární složku biofilmu (Altenburg *et al.* 2011).

Také tetracykliny mají několik nadstandardních vlastností, které doplňují jejich antibakteriální účinek. Doxycyklin inhibuje aktivitu kolagenázy neutrofilů a redukuje adhezi leukocytů. Současné studie naznačují imunomodulační a neuroprotektivní účinek tetracyklinů (převážně minocyklinu) u neurodegenerativních onemocnění např. roztroušené sklerózy a amyotrofické laterální sklerózy. Předpokládá se, že příznivý účinek u těchto onemocnění je způsoben částečnou inhibicí aktivace mikroglíí současně se snížením prozánětlivých molekul IL-1 β , TNF α a NO (Tauber a Nau 2008).

Imunosupresivní účinek je také znám u antibiotika rifampicin, jehož principem je pravděpodobně suprese aktivity T-lymfocytů a aktivace receptorů pro glukokortikoidy (Tauber a Nau 2008).

7.2.4 Antibakteriální komponenty krevního séra

Již v 80. letech bylo zjištěno, že při testování baktericidie *in vitro* k usmrcení bakterií nejsou třeba krevní elementy. Melching a Vas v roce 1971 ve své práci sledovali účinek hyperimunního králičího séra ve směsi se sérem z křečka jako zdroje komplementu na kmen *Escherichia coli*. Po začátku expozice jako první byla po 5 minutách zasažena syntéza RNA, po 15 minutách syntéza DNA. Po 25-30 minutách se projevila vážnoucí inkorporace lipidů do membrán a porucha permeability. Postižení syntézy proteinů se projevilo nejpozději, až po 30 minutách. Tyto reakce nebyly vyjádřeny, pokud byl zdroj komplementu inaktivován teplem (termolabilní komponenta), pouze docházelo ke shlukování bakterií účinkem protilátek (termostabilní komponenta). Citlivost ke složkám séra byla snížena v případě použití vysoce nutričního média, které pravděpodobně umožnilo bakteriím předcházet nebo lépe reparovat změny v bakteriální buňce způsobené sérovými působky (Melching a Vas 1971, Inglis, Radziwon a Maniero 2008).

Sérový komplement je systém série rozpuštěných proteinů, jehož cílem je lyzovat bakteriální buňku. Existuje několik cest aktivace komplementu: klasická cesta, alternativní a lektinová cesta. Každá cesta je kaskádou proteáz a má odlišný způsob iniciace kaskády: alternativní a lektinová cesta funguje bez spolupráce získané imunity na základě aktivace PAMP. Naopak klasická cesta aktivace komplementu je spuštěna přítomností protilátek navázaných na povrch buněčných stěn bakterií nebo biomembrán eukaryotických buněk. Tato cesta je tedy spojením mezi vrozenou a získanou imunitou. Všechny cesty aktivace komplementu však vedou ke stejnému cíli – sestavení MAC (Membrane Attack Complex), komplexu proteinů, které způsobí lýzu bakterie (Inglis, Radziwon a Maniero 2008).

Gram-negativní bakterie (např. rod *Neisseria*) jsou díky odlišné struktuře buněčné stěny na působení komplementu citlivější než gram-pozitivní bakterie. Mnohem odolnější jsou také jaderné metabolicky aktivní buňky. V tomto případě je nezbytný pro lýzu bakterie účinek několika set až tisíců MAC (Krejsek, Andrýs a Krčmová 2016).

Kvůli teplotní labilitě proteinů komplementu, je třeba zpracovávat sérum na ledu, ihned po rozmrazení a naředění, nikdy opětovně nemrazit. Použití komplementu v reakcích může být sníženo antikomplementárním faktorem jiným než teplo, také nepřítomností iontů Mg^{2+} , Ca^{2-} (Inglis, Radziwon a Maniero 2008). Antikomplementární faktory interferují s aktivitou nebo funkcí komplementu, (např. cirkulující imunokomplexy, některé součásti povrchu lidských buněk), přirozené sérové regulační molekuly. *In vivo* mají složky komplementu krátký biologický poločas, který mnohdy bývá řádově jen minuty, poté jsou inaktivovány a rozloženy.

V séru jsou přítomny regulační molekuly na většině stupňů komplementové kaskády. Porucha regulace komplementu na některém stupni může způsobit zvýšené až neřízené spouštění kaskády nebo naopak neúčinnost komplementového systému. Takové poruchy mohou potom vést k chronickému poškození tělních systému složkami komplementu. Porucha aktivace komplementu, některé ze složek systému nebo vyčerpání systému způsobuje sníženou odolnost k převážně bakteriálním infekcím.

7.3 MOŽNOSTI TESTOVÁNÍ ÚČINKU ANTIBIOTIKA

V průběhu antibiotické léčby pacienta může nastat situace, kdy přestože jsou v rámci optimalizace léčby infekce a podávání antibiotik dodržena všechna doporučená pravidla, nenastane pozitivní účinek antibiotika. V tomto případě je v první řadě nezbytné potvrdit, že původce infekce je bakteriální, že podávané antibiotikum má vhodné a dostatečné spektrum účinku i dostatečný průnik do místa infekce. Vzhledem k mnoha dalším proměnným v konečném účinku je v určitých případech možné blíže sledovat některé parametry:

- Sérové nebo tkáňové hladiny antibiotika
- Účinek séra nebo dalších tělních tekutin na mikroorganismy

7.3.1 Testování hladin antibiotik

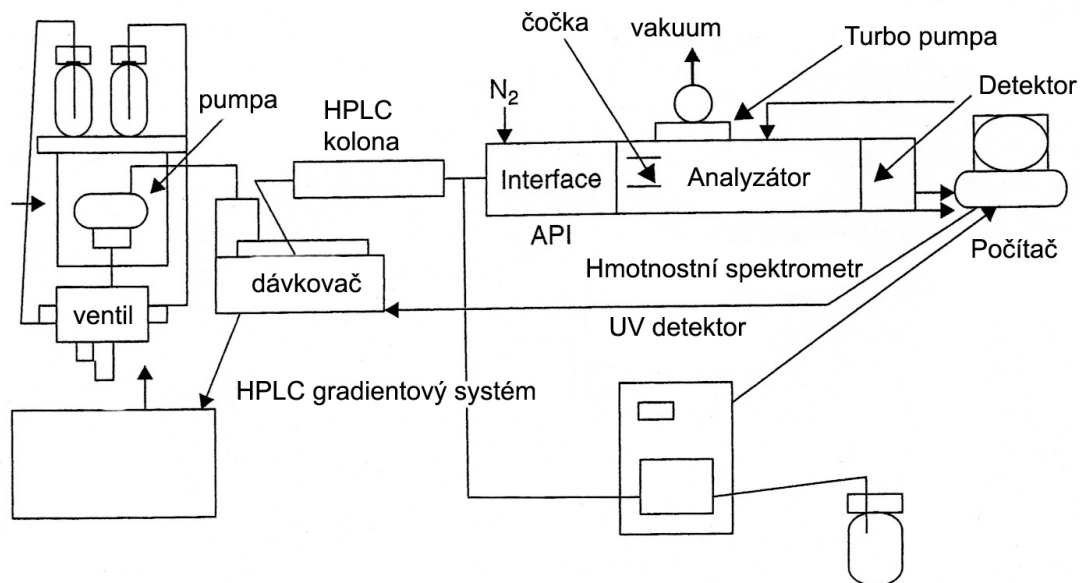
Koncentrace antibiotika může být stanovena biochemickými nebo mikrobiologickými metodami. Nejčastější testovanou tekutinou je krevní sérum. Mezi biochemické metody patří metody imunoanalytické (fluorescenční polarizační imunoanalýza, radioimunoanalýza), které se provádějí na automatických analyzátoch. Metody separační zahrnují kapalinovou chromatografii s detekcí UV nebo s detekcí na hmotnostním spektrometru (HPLC-MS).

Imunoanalýza FPIA (kompetitivní fluorescenční imunoanalýza) je nejčastější metoda ke stanovení hladin základních antibiotik. Krevní séra jsou zpracovávána v automatických systémech (např. Roche Integra), takže výsledky mohou být k dispozici do 1 hodiny od přijetí materiálu do laboratoře. V případě velmi vysokých hladin je vždy nutné ověřit správnost odběru. Závažnou chybou, která může ovlivnit výsledek, je odběr krve z cévního katetru, kam předtím bylo antibiotikum aplikováno. Mezi nejčastěji takto měřená antibiotika patří vankomycin, amikacin, gentamicin.

Pro ostatní antibiotika se většinou automatické systémy nepoužívají a stanovení koncentrace je proto mnohem složitější, pracnější a časově náročnější. Při kvantitativní analýze antibiotik separačními metodami je třeba před vlastní separací analytů na koloně provést úpravu vzorků za účelem odstranění balastních složek séra. Jedním z postupů je precipitace bílkovin séra organickým rozpouštědlem (acetonitrilem, metanolem). Supernatant získaný po centrifugaci vzorků se pak podrobí analýze na kapalinovém chromatografu. Analýza se skládá z několika kroků:

1. **Precipitace** sloučením séra s acetonitrilem (nebo metanolem) se provádí z důvodu oddělení sérových bílkovin, tedy přípravy séra k extrakci antibiotika z roztoku. Velké množství sérových bílkovin by totiž kompetitivně obsadilo vazebná místa v další extrakční fázi a způsobilo falešně negativní výsledek. Precipitací se uvolní antibiotika z vazby na sérové bílkoviny.
2. Dalším krokem je **centrifugace** séra z důvodu oddělení precipitovaných bílkovin od roztoku.
3. Ze supernatantu získáme antibiotika z roztoku extrakcí, která se provádí několika způsoby. **Extrakce kapalina-kapalina** se provádí v alkalickém prostředí pufru, kde kapalnou fází je supernatant séra a etylacetát. Třepáním antibiotikum přechází do tekutého organického rozpouštědla, které se po centrifugaci oddělí od směsi a použije do dalšího kroku. Druhou metodou je **extrakce na pevné fázi**, SPE (solid phase extraction), ve které se používá kolona se sorbentem k zachycení antibiotika. Tato kolona se poté promývá z důvodu odmytí balastu, poté finálně promyje rozpouštědlem, které antibiotikum uvolní z vazby na pevné fázi a vymyje do roztoku organického rozpouštědla. V současné době se stala SPE metodou volby pro tekuté vzorky: má lepší selektivitu, specifitu a reprodukovatelnost, menší spotřeba organických rozpouštědel, kratší a jednodušší přípravu vzorku (Aga *et al.* 2016).
4. Posledním krokem je **stanovení množství extrahovaného antibiotika**, a to nejčastěji metodou HPLC (high performance liquid chromatography, kapalinová chromatografie). V této metodě se používají různé detektory: detektor diodového pole (spektrofotometr), fluorescenční detektor nebo hmotnostní spektrometr (mass spectrometry, MS). Ke vzorku séra se před přípravou (extrakcí) přidává analog antibiotika značený izotopem. Účelem je korekce efektu matrice, ztráty během extrakce a přístrojové variability.

V praxi jsou metody HPLC s UV detekcí postupně nahrazovány **kapalinovou chromatografií spojenou s hmotnostní detekcí na hmotnostním spektrometru - HPLC-MS** (Obr. 2). Tato metoda je však pro většinu laboratoří nedostupná, možnost stanovení je bohužel prozatím centralizována do velkých laboratoří. Ačkoliv je imunoanalýza levnější, vykazuje vyšší stupeň zkřížené reaktivity strukturálně podobných složek a může detekovat strukturálně podobné aktivní i neaktivní metabolity antibiotika (Aga *et al.* 2016).

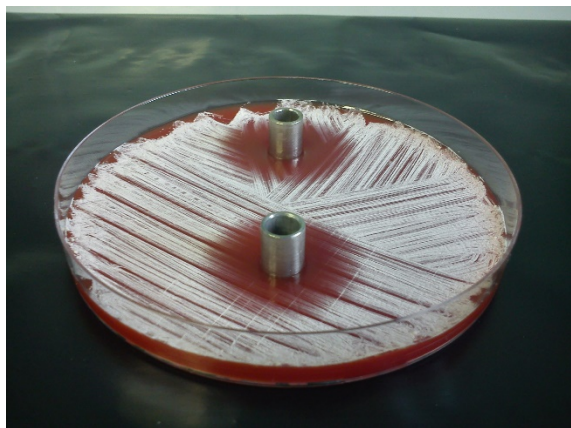


Obrázek 2 Schéma systému kapalinové chromatografie spojené s hmotnostním spektrometrem (McMaster 2005)

Pro zjištění tkáňových koncentrací antibiotika je nutné získat tkáňovou tekutinu. K tomuto účelu se používají **mikrodialyzační sondy**. Tyto drobné kanyly se zavedou do tkání. Poté je sonda proplachována dialyzačním roztokem, do kterého z tkání přecházejí antibiotika. K analýze se zasílá celá sonda, která obsahuje cca 10-20 μl tekutiny.

Pokud není v lokální laboratoři k dispozici biochemický test, je možno použít **mikrobiologickou metodu stanovení hladin antibiotik**, která je propracována ve dvou modifikacích, z nichž starší se nazývá **radiální agarová difúze**. Agarová půda je naočkována referenčním bakteriálním kmenem, který je dobře citlivý na dané antibiotikum. Na agarovou půdu jsou umístěny papírové disky nasycené zkoumaným antibiotikem v různých ředěních a několika disky nasycenými sérem pacienta. Agarové půdy s disky jsou inkubovány 18-24 (48) hodin v teplotě a prostředí vhodném pro daný referenční kmen. Po inkubaci jsou změřeny zóny inhibice růstu, vytvořena kalibrační křivka ze známých koncentrací antibiotika. Někdy se místo papírových disků mohou používat sterilní kovové cylindry (Obr. 3) o průměru stejném jako papírový disk, které se položí na agar, nebo se antibiotika a sérum naočkují do otvorů v agaru připravených průrazníkem. Podle velikosti inhibiční zóny, která se vytvořila okolo

disku se sérem, je výsledná koncentrace antibiotika zjištěna z grafu (vypočtena). Ve srovnání s ostatními nemikrobiologickými metodami je tato metoda levnější a k jejímu provedení není zapotřebí speciální vybavení, uváděná chyba 10-20 % (Urbášková 1985). Je vhodné, aby test prováděla zkušená osoba za dodržení standardních podmínek. Kritickými body jsou: tloušťka agaru, nutriční hodnoty agaru a obsah iontů, koncentrace bakteriálního inokula, inkubační teplota, délka inkubace, příprava vzorku pacienta (Dafale *et al.* 2016).



Obrázek 3 **Modifikace radiální agarové difúze (cylindr-test, cup-test)**, vyšetření séra pacienta léčeného kotrimoxazolem, kmen *Nocardia farcinica*, izolovaný z abscesu pacienta, inkubace na KA 72 hodin při 35 ± 2 °C (foto autorka)

Druhá, novější varianta je analogií stanovení MIC nebo baktericidie **diluční mikrometodou pro mikrotitrační destičky**. Sérum pacienta, které obsahuje antibiotikum, je inokulováno definovanou suspenzí referenčního kmene bakterie o známé MIC. Koncentrace antibiotik je vypočítána podílem MIC a dilučního faktoru séra, v kterém je zřejmá inhibice růstu bakterie. Fridlund *et al.* v roce 2016 testovali 88 sér pacientů léčených beta-laktamovými antibiotiky na jednotce intenzivní péče. Výsledky srovnávali s hladinou antibiotik stanovenou LC-MS. Zjistili korelaci vyšetřených hladin cefotaximu (90 %), meropenemu (100 %) a piperacilinu (87 %). Tuto inovaci mikrobiologického stanovení hladiny antibiotika lze provést v běžné mikrobiologické laboratoři bez větších nároků na vybavení (Fridlund, Woksepp a Schön 2016).

Biochemické metody stanoví v převážné většině celkovou koncentraci antibiotika, protože na začátku analýzy dochází různými metodami k vyvázání antibiotika z vazby na proteiny. Výsledná hodnota tedy ve většině případů neukazuje opravdovou koncentraci aktivní frakce, která není navázaná na bílkoviny krevní plazmy (Adámek 2008). Tato skutečnost není významná pro léky s nízkou vazebností na bílkoviny (např. 5%). Může to být ale důležité u

antibiotik, které mají schopnost více se vázat na proteiny. V případě 50% vazby antibiotika na proteiny (např. u vankomycinu) je výsledná sérová hladina o 50 % vyšší než koncentrace aktivní volné složky. V případě vankomycinu je tento fakt nevýznamný, neboť terapeutické rozmezí je stanoveno z klinických studií, zaměřených na maximální účinnost a minimalizaci toxicity. Významné by to mohlo být, pokud bychom porovnávali sérovou hladinu antibiotika k MIC bakterie. Vzhledem neznámé vazebnosti bílkovin v prostředí testování MIC by mohlo dojít k významným diskrepancím.

Stanovení volné složky je biochemickým metodami možné, vyžaduje ale pracnější a dražší analytický postup a v běžné laboratorní praxi není využíváno. Jednou z metod je použití vysoce propustné ultrafiltrace, jinou metodou je vysoce účinná chromatografie HPLC/MS (High Performance Liquid Chromatography-Mass Spectrometry). Vedle těchto přímých metod stanovení volné frakce byly publikovány práce (např. pro teikoplanin) snažící se vytvořit matematické modely pro výpočet volné frakce z celkové hladiny farmaka a z hladiny albuminu v plazmě (Ramos-Martín 2014). Volné biologicky účinné frakce lze také vypočítat podle literárních dat o vazebnosti jednotlivých látek (Tab. 3). Stanovení volných frakcí má význam u léčiv s úzkým terapeutickým rozmezím, nebezpečnými nežádoucími účinky a velkou vazbou na bílkoviny krevní plazmy (Suchánková 2017). To je významné zvláště u stavů, kde dochází ke změnám koncentrace proteinů v plazmě. Např. u starší populace je vlivem malnutrice, malabsorbce, snížení funkční kapacity jater, polymorbidity a dalších faktorů častější hypoalbuminémie. Snížením hladiny albuminu v plazmě se snižuje vazba některých farmak na albumin. Při chronických zánětech, infekcích a nádorech se naopak zvyšuje hladina alfa-1-antitrypsinu, který rovněž váže více než sto farmak, a tím naopak jejich biologickou dostupnost snižuje (Adámek 2008).

Další limitací měření koncentrací antibiotik přístrojovými technikami je fakt, že naměřená hodnota nemusí reprezentovat reálnou biologickou aktivitu antibiotika nebo směsi antibiotik, jejichž společné působení může působit na mikroorganismus synergicky nebo naopak antagonisticky.

Tabulka 3 **Přehled vazebnosti antibiotik na bílkoviny krevní plasmy** (podle Jindrák, Hedlová a Urbášková 2014, Grayson 2010)

Antibiotikum	Vazba na proteiny	Antibiotikum	Vazba na proteiny
Penicilin G	50 %	Gentamicin	< 10 %
Oxacilin	92-96 %	Amikacin	< 10 %
Ampicilin	20 %	Ciprofloxacín	20-40 %
Amoxicilin	20 %	Vankomycin	50-60 %
Piperacilin	30 %	Linezolid	30 %
Cefotaxim	70 %	Klaritromycin	70 %
Ceftriaxon	90 %	Azitromycin	20-50 %
Ceftazidim	20 %	Klindamycin	95 %
Meropenem	2 %	Kolistin	neznámá
Imipenem	20 %	Sulfimetoxazol	60-70 %

Jedním z přístupů personalizované medicíny je využití **terapeutického monitorování léčiv** (TDM). Tato metoda využívá analýzu hladin léčiv v séru následovanou interpretací klinickým farmakologem nebo farmaceutem. Cílem terapeutického monitorování léčiv je optimalizovat expozici antibiotiky, maximalizovat klinický výsledek léčby, minimalizovat nežádoucí účinky a také vznik antibiotické rezistence. Výsledná interpretace měřených parametrů přímo ovlivňuje předepisování léčiv.

Základem TDM je existence bližšího vztahu mezi farmakologickým účinkem léčiva a jeho sérovou hladinou spíše než jeho dávkou (Kacířová 2015). Pro použití metody je nezbytné měření sérových koncentrací antibiotik. Důvodem použití TDM je kontrola spolupráce pacienta, nedostatečný účinek léčiv nebo projevy toxicity. Mezi rizikové skupiny pacientů, pro které je TDM vhodné, patří novorozenci, staří lidé, pacienti s poruchou eliminačních orgánů, pacienti s genetickými dispozicemi k rychlé nebo naopak pomalé metabolizaci léčiv a také ti, kterým jsou podávány léčiva s rizikovými interakcemi.

Správná interpretace naměřených hladin antibiotik vyžaduje znalost parametrů pacienta a populační farmakokinetické parametry antibiotika. Údaje o pacientovi (věk, váha, renální parametry, čas a délka podání léčiva, čas odběru sérových hladin, případně další parametry) jsou nezbytnou součástí informací na správně a úplně vyplněném průvodním listu k TDM.

Populační farmakokinetické parametry jsou zahrnuty v TDM počítačových programech využívající Bayesovský algoritmus. V ČR je nejčastěji využíván program MW Pharm. Tento program umožní na základě jedné naměřené sérové hladiny stanovit optimální dávku a dávkovací interval. Aplikace TDM vyžadují značné zkušenosti a znalosti farmakokinetických principů.

Vyšetření hladin je vhodné u antibiotik s úzkým terapeutickým indexem a špatnou prediktabilitou sérových hladin (vankomycin, aminoglykosidy) v případech, kdy se projevuje velká variabilita ve farmakokinetice. Špatná prediktabilita lékových hladin je způsobená velkou variabilitou distribuce a eliminace léku mezi pacienty. Pacienti s normální clearance kreatininu mají sérový poločas ($T_{1/2}$) gentamicinu 0,4-7,6 hodin, přičemž se předpokládá, že prodloužení $T_{1/2}$ je způsoben kumulací antibiotika v hlubokých tkáních. Také akumulace aminoglykosidů v ledvinách a vnitřním uchu zvyšuje riziko toxicity. Pečlivé měření sérových hladin s úpravou dávek léčiva může zabránit nebo alespoň redukovat toxicitu antibiotika (Grayson 2010).

V současné době existuje velká variabilita TDM doporučení mezi institucemi: týká se jak výběru pacientů, tak doporučení k odběru vzorků pro měření sérových hladin, jejich načasování, výběr metod stanovení a PK/PD cílů, jakož i optimalizace dávkování antibiotik (Wong 2014). Tradiční pohled na TDM jen jako na metodu snižující toxicitu je ale překonaný. Nyní je hlavním cílem zlepšení klinických výsledků léčby (Parker, Sime a Roberts 2015).

Vzhledem k širokému terapeutickému rozmezí ostatních tříd antibiotik (peniciliny, cefalosporiny, sulfonamidy, chinolony a makrolidy) není stanovení sérových hladin v klinické praxi běžně používáno. Stanovení hladin těchto antibiotik ale může být přínosné u pacientů s poškozenými eliminačními funkcemi (renální nebo jaterní selhávání, renální selhání) a kriticky nemocných.

7.3.2 Testování účinku tělních tekutin na mikroorganismy

Testování sérových hladin antibiotik biochemickými metodami přesně kvantifikuje koncentraci léčiva, ale neříká nic o aktuální koncentraci aktivní složky nebo složek, ani o baktericidní aktivitě krve. V některých případech je nezbytné podávání kombinací antibiotik z důvodu rozšíření antimikrobiálního spektra, snížení dávky z důvodu toxicity, snížení

pravděpodobnosti vývoje rezistence v průběhu antibiotické terapie. Tato současně podávaná antibiotika a také ostatní léčiva mohou spolu interagovat s pozitivním nebo negativním výsledkem. Z těchto důvodů byly vytvořeny metodiky, které stanoví konkrétní účinek komplexu všech aktivních antibakteriálních složek přítomných v séru nebo jiné tělní tekutině (Tab. 4).

Tabulka 4 Postup testování vlivu tělních tekutin na mikroorganismy

Postup testování účinku séra	Sérum k testování je odebráno pacientovi s antibiotickou terapií ve vhodných intervalech v průběhu dávkovacího intervalu pacienta.
	Kultivace předpokládaného bakteriálního původce infekčního onemocnění (kmen izolovaný z relevantního klinického vzorku pacienta, nejčastěji hemokultury), event. referenční kmen.
	Příprava séra v jeho postupném logaritmickém ředění (log 2).
	Inokulace bakteriálního původce do naředěného séra.
	Inkubace bakteriálního původce s naředěným sérem.
	Detekce vlivu séra na růst a množení bakteriálního původce: <ul style="list-style-type: none"> - vyšetření baktericidie séra vyočkováním dle CLSI - test viability buněk - turbidimetrie

7.3.2.1 Baktericidie tělních tekutin

Již v roce 1947 byla Schlichterem a Mac Leanem popsána metodika stanovení sérového inhibičního titru (SIT) pro vedení antibiotické léčby závažných bakteriálních infekcí (např. subakutní infekční endokarditidy penicilinem). Stanovení SIT bylo modifikováno v roce 1952 Fisherem z John Hopkins Hospital jako metoda pro stanovení antibakteriálního potenciálu séra během terapie akutních infekcí. Změna vedla ke stanovení baktericidního „end pointu“ a tento test byl nazván **sérový baktericidní test** – Serum Bactericidal Test, jehož cílem je stanovení sérového baktericidního titru - SBT (Schwalbe, Steele-Moore a Goodwinet 2007).

V té době byly testy používány pro řadu klinických situací, ale při vedení antibakteriální terapie sváděly boj s velice rozšířeným stanovováním MIC (minimální inhibiční koncentrace) bakteriálních patogenů. Stále více bylo poukazováno na velký vliv technických faktorů na výsledek stanovení SBT a nutnost standardizace testování. Proto CLSI tuto metodiku

standardizovala v roce 1991 a doplnila v roce 1999 (Barry *et al.* 1999) Tato standardizace srovnala mezilaboratorní rozdíly, které dříve vedly k špatné reprodukovatelnosti a obtížné interpretovatelnosti testu.

Test SBT je variací bujónové diluční metody. Cílem testování je stanovit, zda tekutina (nejčastěji krevní sérum) pacientů s antibiotickou léčbou má schopnost bakterie usmrtit (redukovat vstupní inokulum o 99,9 %). Vedlejším cílem je (semi)kvantifikace baktericidního účinku, reprezentována testováním séra v jeho postupném logaritmickém ředění (log 2) s vhodným diluentem (Mueller-Hintonův bujón, králičí nebo lidské sérum).

Testování SBT je vhodné pro aerobní méně náročné mikroorganismy, které dobře rostou v Mueller-Hintonově bujónu při 24 hodinové inkubaci. Pro testování je používán předpokládaný původce infekčního onemocnění, tedy kmen izolovaný z relevantního klinického vzorku pacienta, nejčastěji hemokultury. Vzhledem k podmínkám testu jsou nejčastěji testovány stafylokoky, enterobakterie nebo enterokoky.

Testování SBT je obdobou stanovení MBC (minimální baktericidní koncentrace) antibiotika, kdy se analogickými laboratorními metodami stanovuje nejnižší koncentrace antibiotika, která má schopnost usmrtit bakteriální kmen. Nejnižší koncentrace antibiotika, která růst bakteriálního kmene inhibuje, se nazývá MIC (minimální inhibiční koncentrace antibiotika). Testování MIC je běžnou součástí stanovování kvantitativní citlivosti bakterií izolovaných z klinických materiálů (hemokultury, hnisu, likvoru a dalších).

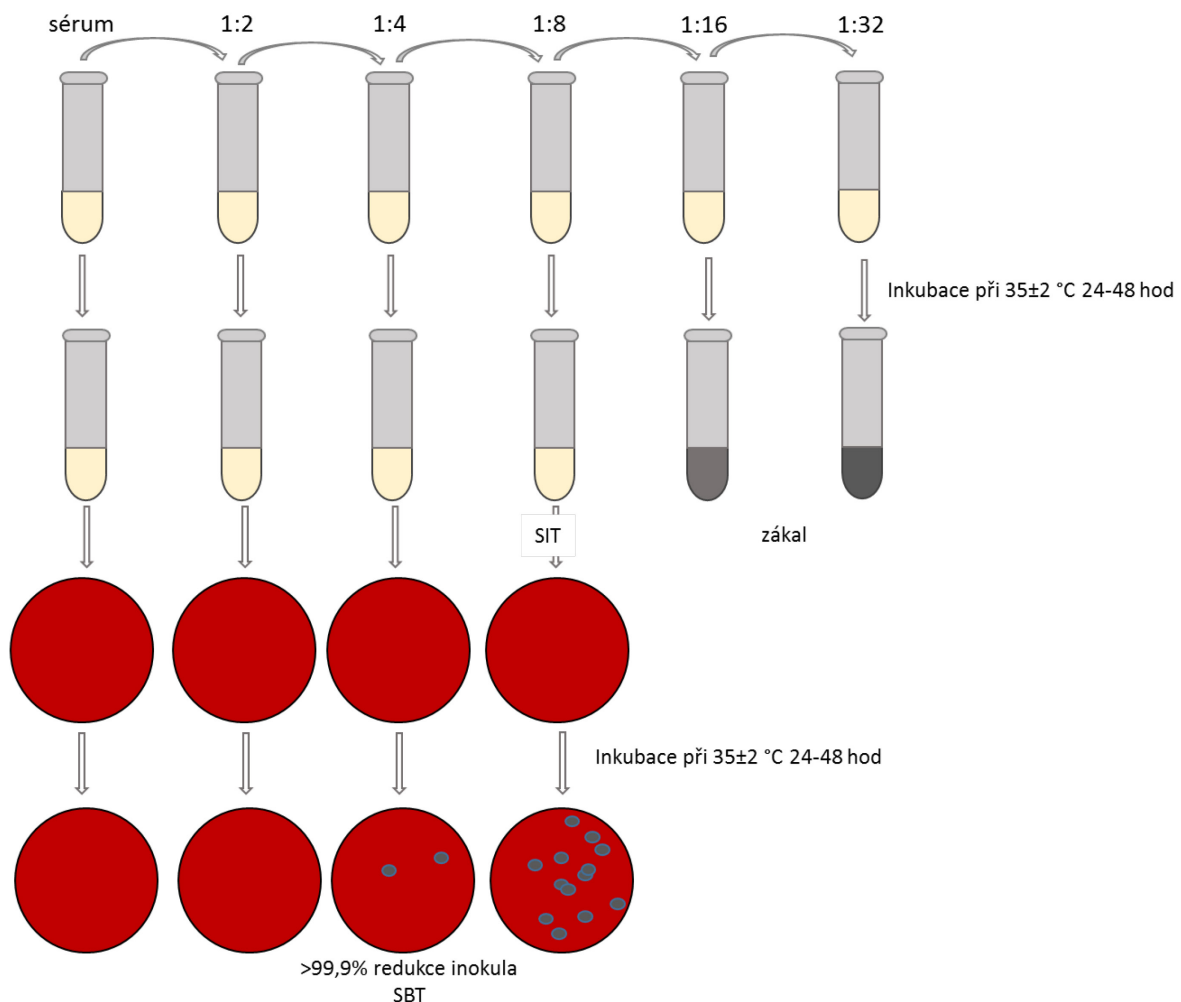
SBT (také MBC) může být stanoveno:

- **Makrodiluční metodou** ve zklumávkách, kdy je testováno 1-2 ml séra v každé testovací zkumavce.
- **Mikrodiluční metodou** se 100 µl séra v jamce mikrotitrační destičky.

Nejčastější tekutinou, která je testována je krevní sérum, což je část krve po oddělení krevního koagula. Tato část krve na rozdíl od krevní plazmy neobsahuje trombocyty ani žádné krevní buňky a je vhodná k vizuálnímu hodnocení zákalu. Testovat je možné ale i jiné tekutiny, které jsou čiré a nejsou infikované (např. likvor, kloubní tekutinu, ascites a další).

Sérum k testování je odebráno pacientovi s antibiotickou terapií ve vhodných intervalech v průběhu dávkovacího intervalu pacienta. Načasování odběrů závisí na druhu podávaného

antibiotika (nebo více antibiotik). Nejčastěji se doporučují odběry séra: na začátku dávkovacího intervalu po ukončení podávání antibiotika, kdy je v krvi maximální koncentrace antibiotika a předpokládán nejvyšší účinek antibiotika (peak concentration, c_{max}). Tento odběr by měl být proveden 30 minut po ukončení intravenózní infúze, 60 minut po intramuskulárním podání, 90 minut po užití antibiotika *per os*. Další sérum má být odebráno na konci dávkovacího intervalu, kdy by koncentrace antibiotika měla být nejnižší (trough concentration, c_{min}). Problematické je však načasování odběrů v případě, že jsou podávány dvě a více antibiotik v odlišnou denní dobu. Ve své práci Schwalbe doporučuje odběr séra 60 minut po podání druhého antibiotika (Schwalbe, Steele-Moore a Goodwinet 2007). Schématické znázornění provedení SBT je možno vidět na Obr. 4.



Obrázek 4 Schématické zobrazení testování baktericidie séra (zkratky: SIT - sérum Inhibiční titr, SBT – sérum baktericidní titr)

V testu byla používána různá média k ředění séra, ale pro dobře rostoucí kmeny nevyžadující speciální podmínky je nejvíce užívaný Mueller-Hinton bujon obohacený ionty Ca^{2+} a Mg^{2+} . Další možností je použití ultrafiltrátu pacientova séra. Tento proces zbaví séra antibiotik a reakce probíhá v prostředí nejvíce podobném skutečnosti. Pro většinu laboratoří je ale proces ultrafiltrace nepraktický, ne-li neproveditelný. Dále je také možné použití poolovaného séra. To se získává z komerčních zdrojů nebo od dárců (např. séra s procházející expirací z krevní banky). U poolovaného séra ale není standardizovaná kvalita jako u všech ostatních součástí reakce a navíc musí být stanovena antibakteriální aktivita a přítomnost beta-laktamázové aktivity, která by mohla inaktivovat některá antibiotika. Kontrola antibakteriální aktivity se provádí kápnutím 20 μl séra na papírový disk, který je umístěn na agar s naočkovaným referenčním kmenem *Bacillus subtilis* ATCC6633. Nepřítomnost aktivity se po inkubaci projeví růstem bacila až k papírovému disku (Schwalbe, Steele-Moore a Goodwinet 2007). Základní termíny spojené s testováním baktericidie jsou uvedené v Tab. 5.

Tabulka 5 Pojmy spojené s testováním baktericidie

Termíny spojené s testováním baktericidie	MIC (Minimal Inhibitory Concentration):
	nejnižší koncentrace antibiotika, která inhibuje růst. Je stanovena vizuálně po standardní inkubační periodě (obvykle 18-24 hodin)
	MBC (Minimal Bactericidal Concentration):
	nejnižší koncentrace antibiotika, která způsobí nejméně 3 log 10 redukci počtu přeživších buněk (ve srovnání s iniciální preinkubační denzitou inokula) za 20-24 hodin
	SIT (Serum Inhibitory Titer):
	nejvyšší ředění (neboli titr) séra pacienta dostávajícího antibakteriální léčbu, která viditelně inhibuje růst mikroorganismu po 20-24 hodinách
SBT (Serum Bactericidal Titer):	
nejvyšší ředění (titr) vzorku séra pacienta dostávajícího antibakteriální terapii, která způsobí 3 log 10 redukci počtu přeživších buněk (ve srovnání s iniciální denzitou inokula) za 20-24 hodin	

Po zjištění SIT a SBT je možné stanovit také další parametry léčby antibiotiky: **area-under-the-bactericidal-titre-curve** (plocha pod křivkou baktericidních titrů, AUC/SBT) a **serum bactericidal rate** (SBT-rate). Tyto parametry popisují rychlost, velikost a trvání baktericidní aktivity (Barry *et al.* 1999).

Mezi nejvýznamnější indikace použití testu patří endokarditida, osteomyelitida nebo infekce imunokompromitovaných pacientů. Nejčastěji se testují antibiotika: beta-laktamy, aminoglykosidy, někdy také fluorchinolony nebo glykopeptidy (Schwalbe, Steele-Moore a Goodwinet 2007). Léčba se považuje za adekvátní, pokud se baktericidní účinek prokáže v ředění séra 1:8 až 1:16, u endokarditid 1:32 (Urbášková 1985). Sculier a Klastersky zjistili, že SBT >1:8 u non-neutropenických pacientů a SBT >1:16 u granulocytopenických pacientů dobře koreloval při léčbě gram-negativní bakteremie s dobrým klinickým účinkem u 98 % (respektive 87 %) pacientů. V této studii bylo SBT testováno druhý den terapie různými antibiotiky včetně kombinací a testování hodnoceno jako jednoduše proveditelné, zvláště pokud byl izolován dobře rostoucí patogen a pokud pacient dostává kombinaci antibiotik (Sculier a Klastersky 1984).

7.3.2.2 *Testy viability buněk*

Tyto metody jsou založeny na měření aktivity, která je spojena s životaschopností buněk. Měří některý aspekt obecného metabolismu nebo enzymatické aktivity. Pro detekci účinku antibiotik je možné tyto testy využít jako variantu detekce inokula v konečné fázi vyšetření baktericidie tekutin. Jejich výhodou je, že jsou vhodné pro mikrometody a k detekci a kvantifikaci výsledného signálu lze použít přístroje typu spektrofotometr nebo detektor fluorescenčního záření.

Všechny tyto metody vyžadují inkubaci reagentu s populací buněk, aby byl substrát konvertován na barevný nebo fluorescenční produkt, který může být detekován. Pokud buňky zemřou, rychle ztrácejí schopnost měnit substrát na produkt. Trochu odlišná je pouze analýza ATP, při které po přidání reagentu dochází ihned k ruptuře buněk, takže nepotřebuje inkubační periodu. Testy se v současné době používají například k měření vlivu látek na proliferaci buněk, testování cytotoxického účinku nebo také jako vnitřní kontrola jiných metod využívajících buňky nebo buněčné kultury (např. testy měření vazby na receptory a různé transdukční procesy, monitorování funkce organel).

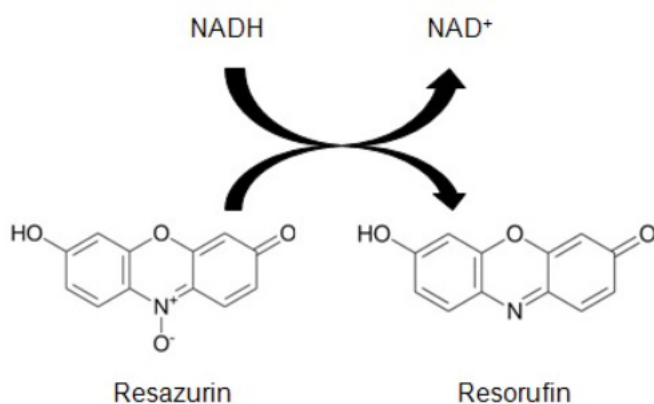
První metodou je kolorimetrická analýza využívající **redukci tetrazolu** jako detektoru viability buněk. Ze sloučenin tetrazolu se nejčastěji se používá **MTT** (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenyltetrazolium bromid), který má pozitivní naboj a dobře proniká do eukaryotických buněk. Viabilní buňky s aktivním metabolismem mění žlutý tetrazol na fialový formazan, většinou přijetím elektronu z buněčného NADH^+ , který se mění na NAD^+ . MTT analýza se proto často používá k měření mitochondriální aktivity. Pokud buňky zemřou, ztrácejí schopnost tetrazol konvertovat. Formazan se v případě MTT analýzy kumuluje jako nerozpustný precipitát uvnitř buněk blízko buněčného povrchu a také v kultivačním médiu. Před finální analýzou je třeba formazan rozpustit a poté je detekován spektrofotometricky při vlnové délce 570 nm.

Síla signálu je závislá na koncentraci MTT, délce inkubační periody a počtu viabilních buněk a jejich metabolické aktivitě. Délka inkubační periody je limitována vzhledem k cytotoxickému prostředí detekčních reagens, proto je také MTT analýza koncipována jako finální. Pro populaci buněk v log fázi růstu je množství produkovaného formazanu úměrné počtu metabolicky aktivních životaschopných buněk a vykazuje lineární závislost odpovědi (Riss *et al.* 2004).

Nově byly k analýze vyvinuty sloučeniny tetrazolia, konvertující se v přítomnosti viabilních buněk na formazan, který je rozpustný přímo v kultivačním médiu. Mezi tetrazoliové sloučeniny této kategorie patří: **MTS** (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-karboxymethoxyfenyl)-2-(4-sulfofenyl)-2H-tetrazolium), **XTT** (2,3-bis-(2-methoxy-4-nitro-5-sulfofenyl)-2H-tetrazolium-5-karboxanilid), **WST** (water-soluble tetrazolium salts). Negativní náboj těchto reagens způsobuje solubilitu výsledného formazanu, ale bohužel také limituje jejich průnik do buněk. Proto se v testu kombinují s akceptory elektronů, jako jsou fenazine-metyl-sulfát (PMS) nebo fenazine-etyl-sulfát (PES). Tyto sloučeniny do buněk pronikají a poté se vrací v redukovaném stavu na povrch buněk, kde konvertují tetrazol na solubilní formazan (Riss *et al.* 2016).

Životaschopnost bakterií v roztoku detekují také testy využívající **redukci barviva resazurinu**, což je redoxní indikátor, který dobře proniká do buněk. Resazurin po rozpuštění ve fyziologickém roztoku tvoří tmavě modrou tekutinu a může být přidán přímo do kultivačního média. Viabilní buňky s aktivním metabolismem redukují modrý resazurin za vzniku produktu

resorufinu, který je růžový a má schopnost fluorescence. Schéma chemické reakce redukce rezazurinu je možno vidět na Obr. 5.



Obrázek 5 Schéma chemické reakce redukce rezazurinu (Riss et al. 2016).

Přidávání dodatečného akceptoru elektronu není u rezazurinu třeba, i když může zrychlit reakci. Množství rezorufinu je úměrné množství viabilních buněk a vzniklý fluorescenční signál je možné kvantifikovat za použití fluorometru s 560 nm excitačním a 590 nm emisním filtrem. Resorufin je možné detekovat také změnou absorbance, ačkoliv tento postup není příliš používán, protože detekce fluorescence je více senzitivní. Odečet výsledku reakce může být také pouze kvalitativní, protože změna je dobře viditelná i pouhým okem. Analýza používající redukci rezazurinu je mírně citlivější než metody používající redukci tetrazolu a v současné době je upřednostňována (Riss et al. 2016).

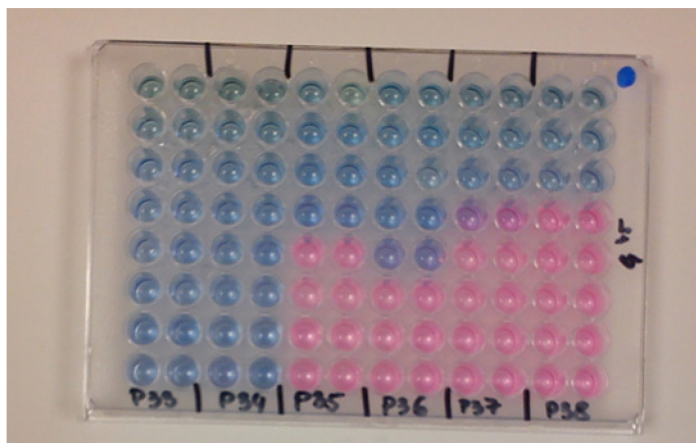
Mezi nevýhody testů s rezazurinem patří možnost fluorescenční interference s dalšími testovanými složkami a možný přímý cytotoxický účinek na buňku. Tento účinek byl na buněčných kulturách (HepG2 – buněčná kultura buněk lidského karcinomu jater) pozorován již po 4 hodinách a je pravděpodobně způsobený interferencí barviva s normální funkcí buněk nejspíše deplecí redukovaných forem nukleotidů (Riss et al. 2004).

Obecnou nevýhodou obou testů (s tetrazoliem i rezazurinem) je nutnost inkubace substrátu s testovanými buňkami při vhodné teplotě (37°C) po určitou dobu. Tato inkubace může zvýšit možnost vzniku artefaktů při reakci s dalšími složkami reakce, představuje také manipulaci navíc, což zvyšuje možnost chyb a prodlužuje testování, a není vhodná pro automatické systémy.

Resazurin je široce používán jako bioanalyzátor životaschopnosti buněk a cytotoxicity látek již téměř 50 let v různých biologických a environmentálních systémech. Poprvé byl použit v roce 1929 výzkumníky Peschem a Simertem ke zjištění kvasinkové kontaminace mléka (Rampersad 2012). Od té doby byl použit také na dalších typech buněk včetně bakterií, plísní, prvoků, buněčných kultur savčích i rybích buněk. Obecně je používán k monitorování zdraví buňky, apoptózy, funkce a kontroly buněčného cyklu, toxikologického řízení environmentálních rizik cytotoxicity, testování citlivosti na antimikrobiální látky (Rampersad 2012).

Resazurin byl extenzivně používán v biomedicínských výzkumech, které testují citlivost velkého množství patogenů k antimikrobiálním látkám, včetně klinicky významných kvasinek a vláknitých hub (včetně *Aspergillus* spp., *Candida* spp.). Výsledky vykazovaly silnou kompatibilitu s referenčními metodami CLSI (Yamaguchi *et al.* 2002). S dobrým výsledkem byl použit také v lékovém skríningu používajícím bakteriální patogeny - *Mycobacterium* spp., *Staphylococcus* spp., *Enterococcus* spp., *Pseudomonas* spp. (Yajko *et al.* 1995, Reis *et al.* 2004). Použití resazurinu v testování baktericidie antibiotik kmene *Escherichia coli* ATCC 25922 je možno vidět na Obr. 6.

Optimální pH testování by mělo být v rozhraní 7,0-7,4, kultivační médium musí mít pufovací kapacitu. Optimální inkubační teplota je 37°C a destičky by měly být zajištěny proti odpařování. Teplota by měla být stálá, stejná v celém rozsahu mikrotitrační destičky. Resazurin je fotosenzitivní, proto celá inkubace by měla probíhat v temnu. Negativní a pozitivní kontrola by měly být koncipovány tak, aby zjistily interakce, které mohou vytvářet artefakty a způsobit falešné reakce. Je také doporučeno, aby kultivační médium bylo chemicky definováno a aby end-point reakce zastihl buňky v exponenciální fázi růstu. Blednutí růžové barvy (zeslabení fluorescence) může být způsobené tvorbou bezbarvého dihydroresorufinu při příliš prolongované inkubaci. Použití fetálního bovinního séra nebo bovinního sérového albuminu může také zeslabovat reakci. K falešné reakci může také dojít při mikrobiální kontaminaci a vést k falešně pozitivním výsledkům. Je proto nutné pracovat za aseptických podmínek (Rampersad 2012).



Obrázek 6 *Testování baktericidie antibiotik za použití resazurinu, kultivace Escherichia coli ATCC 25922, inkubace 36±2 °C 24 hodin v běžné atmosféře, modré zbarvení signalizuje negativní růst, růžové zbarvení pozitivní růst (foto autorka)*

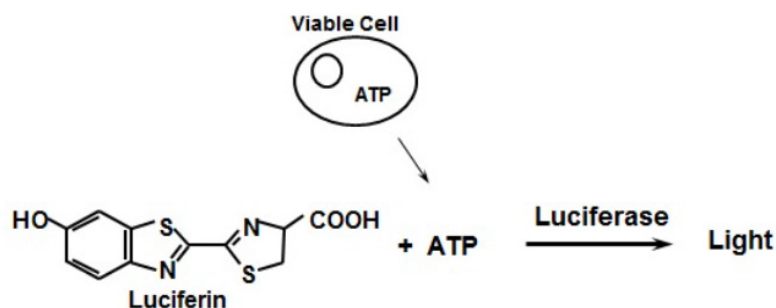
Potenciálním nedostatkem těchto metabolických analýz je, že nerozlišují mezi aktivně se dělícími buňkami a těmi, které jsou živé, ale nečinné, což může vést k nadhodnocení výsledného počtu buněk. Dalším potenciálním rizikem může být, že výsledný snížený počet viabilních buněk je chybně interpretován jako cytotoxický efekt, přestože se může jednat o suboptimální podmínky testování. Výsledky testování mohou být ovlivněny množstvím faktorů: kultivační médium a jeho součásti, pufrovací kapacita, pH, hustota buněk, vypařování, edge-effect mikrotitrační destičky, inkubační teplota, chemické interakce komponent média, složek testování, dávkování a čas expozice, stability složek reakce po dobu testování, dostupnost přístrojů (spektrofotometr, fluorometr, luminometr), reprodukovatelnost a opakovatelnost pokusů, celkové náklady, toxicita pro pracovníka a prostředí (Rampersad 2012).

Pokud je třeba testovat opravdu jen dělící se buňky, je možné použít **test buněčné proliferace za použití nukleotidových analogů**. Jako specifický marker proliferace je vybrána syntéza DNA za použití značených nukleotidových analogů. Kvantifikace značené DNA je radioizotopová a jedná se o terminální test (Rampersad 2012).

Dalším testem viability buněk je **analýza proteázové aktivity**, kdy je používán proteázový substrát **GF-AFC** (glycylfenylalanyl-aminofluorokumarin). Tato látka je selektivní pro proteázy, přítomné pouze v živých buňkách. Substrát proniká do cytoplazmy buněk, kde je cytoplazmatickou aminopeptidázou konvertován na aminofluorokumarin, jenž generuje fluorescenční signál úměrný počtu viabilních buněk. Výhodou tohoto testu je jen malá

cytotoxicita substrátu a po vyhodnocení testu zůstávají buňky nadále životaschopné k dalšímu testování. I když analýza vyžaduje inkubaci, je výrazně kratší než u předchozích dvou testů: 0,5-1 hodiny (Riss *et al.* 2004).

Nejčastější metodou testování viability buněk je **analýza ATP**, což je uznávaný marker životaschopnosti buněk. Jakmile buňka ztratí integritu, rychle ztratí také schopnost syntetizovat ATP, přičemž endogenní ATPázy rychle rozloží zbylý ATP z cytoplasmy. K detekci signálu je využíván luciferin a luciferáza světlušek. Při tvorbě luciferin-adenylátového komplexu dochází k uvolnění pyrofosfátu a za přítomnosti kyslíku k uvolnění světla, jehož intenzita je závislá na množství výchozího ATP (Obr. 7).



Obrázek 7 Schéma analýzy ATP (Riss *et al.* 2016)

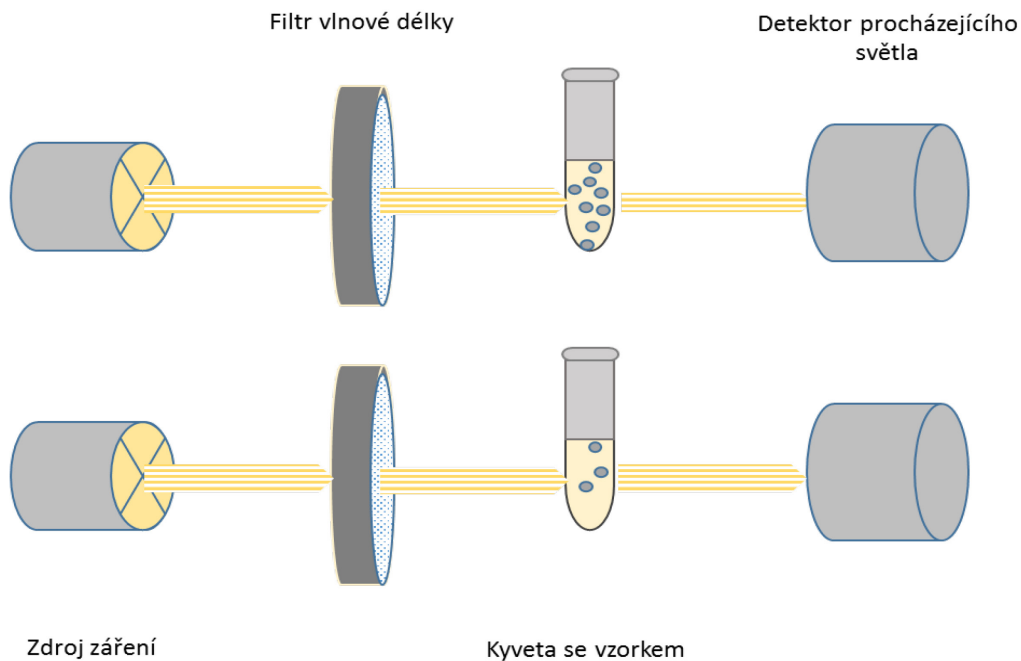
Novou metodou je **real-time assay** pro viabilní buňky, který využívá luciferázu z mořských krevet a malé molekuly pro-substrátu. Viabilní buňky s aktivním metabolismem redukovávají pro-substrát na substrát a ten reaguje s luciferázou za vzniku luminiscenčního signálu. Tato analýza může být koncipována pro kontinuální odečítání nebo jako konečná analýza. Pro kontinuální odečítání může být luminiscenční signál měřen opakovaně v průběhu delší časové periody: tedy v reálném čase. Složky reakce jsou velmi dobře tolerovány. Tento typ analýzy je často kombinován s jinými testy viability buněk (Riss *et al.* 2016).

Existuje tedy velké množství testů detekujících životaschopnosti buněk, každý z nich má své výhody a nevýhody. Detekce ATP je nejvíce senzitivní metoda, je složena jen z několika kroků, je nejrychlejší, má nejmenší interference. Zatímco redukce tetrazolu nebo resazurinu jsou levnější alternativou, které mohou také dosáhnout adekvátních výsledků závislých na designu experimentu. Složky detekce proteázové aktivity jsou nejméně cytotoxické, a proto je tato metoda vhodná k doplnění ostatních analýz jako nezávislý nebo konfirmační test.

V současné době nejnovější možnost real-time assay nabízí sledování viability buněk v reálném čase a možnost kombinování této metody s ostatními analýzami (Riss *et al.* 2004).

7.3.2.3 Turbidimetrie

Turbidimetrické a nefelometrické postupy jsou běžné analytické metody, které se používají v klinické biochemii zejména ke stanovení velké skupiny bílkovin. Turbidimetrie je optická metoda založená na měření procházejícího světla zeslabeného rozptylem a pohlcením na částicích a patří do velké skupiny metod měřících stupeň zákalu – turbidity. Absorpce záření při průchodu nehomogenním prostředím, tj. koloidním roztokem nebo roztokem s jemnou sraženinou, se měří absorpčními fotometry a spektrofotometry. Měření se provádí v přímém směru v ose světelného paprsku (Štern 2006). Princip metody je schematicky zobrazen na Obr. 8.



Obrázek 8 Schematické znázornění turbidimetrie (volně podle Štern 2006).

Fotometrická citlivost je závislá na vlnové délce a na koncentraci zkoumané látky. Specifické proteiny se často stanovují při nejkratší vlnové délce dosažitelné standardním spektrofotometrem (např. 340 nm blízké UV oblasti). Do UV oblasti již nelze postupovat, protože se začnou projevovat nespecifické absorpce nezreagovaných bílkovin, které mohou zkreslit výsledek reakce. Největší citlivosti turbidimetrických reakcí je dosahováno modrým

světlem (435-480 nm). Vztah mezi absorbancí a koncentrací částic je pro malé částice obvykle lineární, což ale nemusí platit pro imunochemické reakce. Lineární vztah se může měnit na nelineární změnou vlnové délky záření. Hemolýza a ikterus nemají při turbidimetrii tak velký rušivý vliv jako při nefelometrii (Štern 2006).

Intenzita prošlého světla (I_0) je menší než intenzita světla dopadajícího (I) na zkoumaný vzorek. Toto zeslabení popisuje veličina **transmitance** (T , $T = I/I_0$). Nabývá hodnot 0 (veškeré záření pohlceno) až 1 (veškeré záření propuštěno, při zkoumání fluorescenčních látek dokonce > 1). Záporným dekadickým logaritmem transmitance je veličina **absorbance (A)** a vyjadřuje schopnost látky pohlcovat elektromagnetické záření určité vlnové délky. Ve zředěných disperzních roztocích je přechod mezi absorpční fotometrií a turbidimetrií neostrý a měřená veličina se nazývá **turbidance (T)**.

Turbiditu lze měřit na jakémkoli fotometru za předpokladu, že suspenze je bezbarvá. Při zákalových metodách je třeba pečlivě sledovat různé proměnné hodnoty (poměr činidel, způsob míchání, potřepávání), hodnota blanku by měla být $< 0,25 A$. Při stanovení je největším problémem donutit měřenou složku, aby vytvořila difúzní jemně rozptýlené částice o vhodné velikosti. Většina analyzátorů střední cenové kategorie má fotometrickou citlivost $\geq 0,02 mA$ a reprodukovatelnost cca 5 %. Tyto spektrofotometry by neměly být používány tam, kde je třeba velká přesnost měření (Štern 2006). Bakterie v průběhu množení vytváří v tekutém vzorku zákal, turbidimetrie využívá měření změny intenzity zákalu média v závislosti na čase. Používá se k měření celkového počtu mikroorganismů a je závislá na velikosti počátečního inokula.

7.3.2.4 Time-kill assay

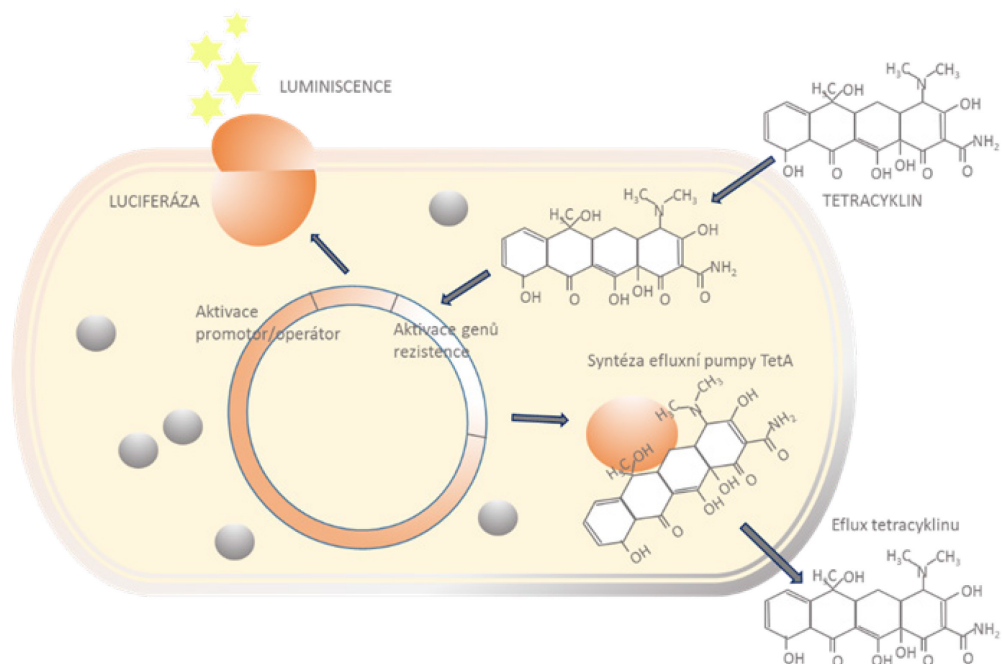
Je metoda požívaná k objasnění dynamiky interakcí mezi antibiotikem a bakteriálním kmenem, která může rozlišit účinek antibiotika závislý na čase nebo na koncentraci. Pro bakterie je tato metoda standardizovaná v dokumentu CLSI M-26A z roku 1999. K testování je třeba 3 zkumavky s bakteriální suspenzí v množství 5×10^5 CFU/ml. První a druhá zkumavka obsahuje zkoumanou látku v různých koncentracích ($0,25 \times MIC$, $1 \times MIC$). Třetí zkumavka je koncipována jako pozitivní kontrola růstu. Zkumavky jsou inkubovány po dobu 0, 4, 6, 8, 10, 12 a 24 hodin. Ve stanovené časy jsou zkumavky vyočkovávány na agary a po inkubaci spočítán počet narostlých kolonií. Je hodnocen baktericidní efekt (90% pokles počtu CFU za 6 hodin nebo 99,9% za 24 hodin).

Tato metoda může ukázat intenzitu účinku antibiotika nebo kombinace antibiotik na bakteriální kmen, testuje faktickou aktivitu antimikrobiálních složek (Balouiri, Sadiki, a Ibsouda 2016). Vzhledem k tomu, že ke každému testu je potřeba větší množství testované tekutiny (3-10 ml), lze tuto bioanalýzu využít v omezené míře např. pro tekutiny, které je možné odebrat pacientovi v dostatečném množství (kloubní tekutina, peritoneální dialyzát, tekutina z abscesu).

7.3.2.5 Další metody

Mezi perspektivy měření účinku antibiotik patří metody používající **nanotechnologie**. Navázání antimikrobiální látky na cílové místo vede ke stresu bakteriální membrány. Nová technologie používající nanoelektromechanické konzole působí jako senzor povrchového stresu bakteriální buňky. Tato metoda byla vyvinuta pro měření koncentrace aktivní formy antibiotik. Nanomechanické senzory měří účinek antibiotik i ve velmi nízkých koncentracích. Prvními měřenými antibiotiky byly vankomycin a oritavancin a prozatím je tato metoda pouze ve výzkumném stadiu (Ndieyira *et al.* 2014).

V jiné analýze jsou používány **bioreportéry**, geneticky upravené živé buňky schopné produkce detekovatelného signálu, jakmile detekují cílovou látku. Bioreportéry jsou vytvořeny genovou technologií a typicky obsahují plasmid s dvěma genetickými složkami: gen pro jeden nebo více proteinů specifických pro detekci (biosenzor) a promotorové nebo operátorové místo operonu pro produkci signálu, který je umístěn v blízkosti genu pro sensorový protein. Bioreportérové mikroorganismy pro detekci rezidua antibiotik jsou vytvořeny rekombinantní DNA metodou přemístěním genů rezistence a jejich spojením s geny pro produkci signálního proteinu (Obr. 9).



Obrázek 9 Schéma bioreportéru k měření koncentrace tetracyklinu za použití genu pro efluxní pumpu TetR, po navázání tetracyklinu dojde k aktivaci a transkripci genu s následnou syntézou efluxní pumpy, současně dojde k aktivaci reportérového genu a následné syntéze luciferázy, výsledkem je eflux tetracyklinu z buňky a produkce lumiscence (podle Aga et al. 2016)

Bioreportérové mechanismy nacházejí své místo v environmentálním výzkumu k detekci aktivních forem antibiotik, jejich reziduí a metabolitů. Výhodou této metodiky je, že není třeba složitá extrakce a koncentrování antibiotik. Bioreportéry jsou také využívány v environmentální detekci těžkých kovů nebo organických sloučenin (Aga et al. 2016).

8 CÍLE DISERTAČNÍ PRÁCE

Základním cílem bylo získání validních výsledků účinku antibiotika v tělních tekutinách v kratším čase, než umožňuje standardní metodika dle CLSI (Barry *et al.* 1999), kdy jsou výsledky k dispozici nejdříve za 48-72 hodin od začátku laboratorního testování (72-96 hodin od odběru klinického materiálu). Byly navrženy dvě modifikace standardní metodiky CLSI s cílem zkrácení doby testování:

1. Modifikace měření turbidimetrie (čas do výsledku 6, 8, 24, 48 hodin)
2. Modifikace použití barvení resazurinem (čas do výsledku 8, 24, 48 hodin)

Cílem testování a statistického zpracování bylo potvrdit nebo vyloučit shodu testování baktericidie tekutin (SBT - serum bactericidal testing) dle CLSI M21-A Guidelines (Barry *et al.* 1999) s modifikovanými metodami testování pomocí turbidimetrie a barvení resazurinem.

Za nulovou byla zvolena hypotéza, že se referenční metoda CLSI neliší od ostatních metod. Pro signifikantní výsledky byl stanoven 5% (0,05) interval spolehlivosti. Tedy nulovou hypotézu lze zamítnout v případě, že významnost $< 0,05$.

9 METODIKA

Práce byla rozdělena na dvě části podle typu vyšetřovaných tekutin. Pro testování baktericidie byly použity dva různé druhy substrátů: tekutá média s vybranými antibiotiky v různých koncentracích (testování baktericidie antibiotik) a krevní séra pacientů s probíhající antibiotickou terapií (testování baktericidie séra). Příprava destiček tak byla mírně odlišná podle testovaného materiálu.

TESTOVÁNÍ BAKTERICIDIE ANTIBIOTIK KMENY *ESCHERICHIA COLI* Z HEMOKULTIVACÍ

9.1 MATERIÁL A PŘÍSTROJE

Sterilní mikrotitrační destičky s 96 jamkami, v 8 řádcích a 12 sloupcích o vnějších rozměrech 86 x 128 mm (VWR Tissue culture plates, USA), mikrotitrační pipeta, bakteriologické kličky, kryobanky (Itest, CZ)

Resazurin sodium salt (Alamar Blue – Sigma-Aldrich, USA), CAMHB - cation adjusted Mueller Hinton Broth (Sigma Aldrich, USA), játrový bujon (Trios, CZ), meropenemum trihydricum (Meropenem KABI 1 g, INJ/INF PLV SOL, Fresenius Kabi, CZ), piperacillinum natricum et tazobactamum natricum (Piperacillin/tazobactam KABI 4 g/0,5 g, INF PLV SOL, Fresenius Kabi, CZ), gentamicini sulfas (Gentamicin LEK, 40 mg/2 ml, INJ/INF SOL, LEK Pharmaceuticals, Slovinsko), amikacini disulfas (Amikacin Medopharm, 500 mg/2 ml INJ/INF SOL, Medochemie, Kypr), krevní agar (Trios, CZ), *aqua pro injectione* (BBraun, CZ).

Referenční kmen *Escherichia coli* ATCC 25922 (*E.coli*), klinické izoláty *E. coli* (n = 29) z hemokultur izolované v letech 2015-2017 a uchovávané v kryobankách (Itest, CZ) v mrazicím boxu při $-70\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$.

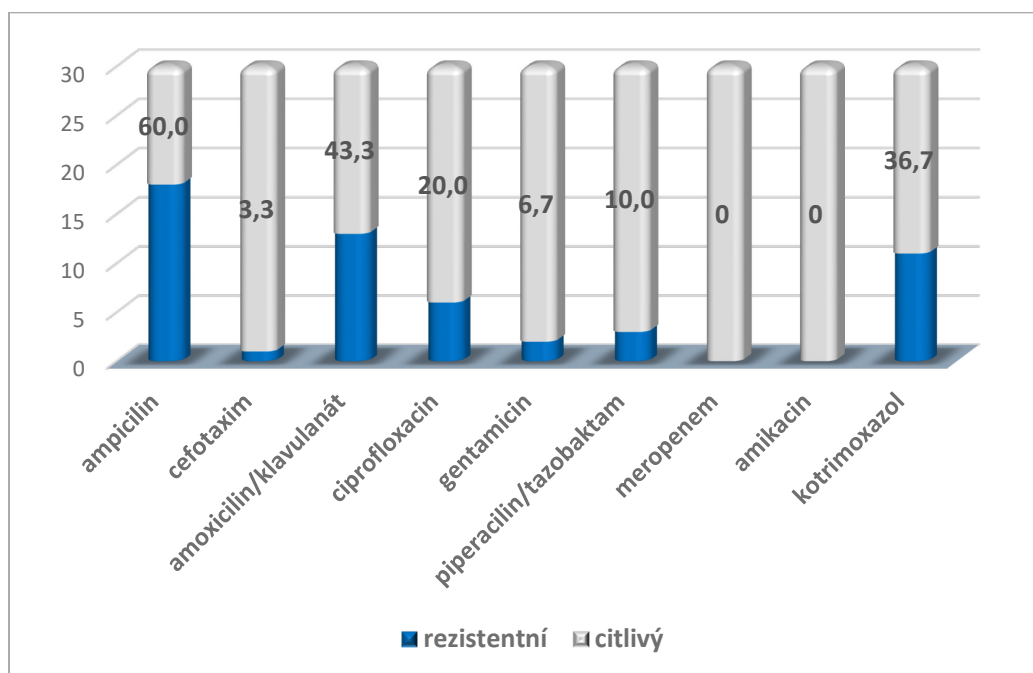
Denzitometr (Densi-La-Meter[®], Erba Lachema, CZ), spektrofotometr (Thermo Scientific[™] Multiskan[™] FC Microplate Photometer)

9.2 PRACOVNÍ POSTUP

9.2.1 Soubor bakteriálních kmenů

K testování byly použity bakteriální kmeny *Escherichia coli* izolované z hemokultur pacientů Fakultní nemocnice Hradec Králové, 12 žen a 17 mužů, průměrného věku 66,8 roku (min 0, max 91, medián 74 let). Pacienti byly hospitalizováni v interních oborech (51,7 %), jednotkách intenzivní péče (27,6 %), pediatrii (10,3 %), chirurgii (10,3 %). Hemokultury byly kultivovány na Ústavu klinické mikrobiologie Fakultní nemocnice Hradec Králové, kmeny byly sbírány konsekutivně v dubnu, květnu a červnu v letech 2015, 2016 a 2017 do celkového počtu 29. Citlivost kmenů byla stanovena diskovou difuzní metodou nebo diluční mikrometodou za použití interpretačních kritérií EUCAST (EUCAST 2019).

Základní charakteristika citlivosti testovacích kmenů k antibiotikům možno vidět na Obr. 10. Jeden kmen produkoval širokospektrou beta-laktamázu ESBL.



Obrázek 10 **Přehled rezistence kmenů *E. coli* testovacího souboru k antibiotikům** (čísla v grafu ukazují % rezistence, citlivost kmenů byla stanovena diskovou difuzní metodou nebo diluční mikrometodou za použití interpretačních kritérií EUCAST)

Jako kontrolní kmen byl použit referenční kmen *E. coli* ATCC 25922. Všechny izoláty i referenční kmen byly uchovány zamražením v kryobankách v mrazicím boxe při $-70\text{ °C} \pm 5\text{ °C}$, před použitím byly revitalizovány vyočkováním na krevní agar (KA) a 1x přeočkovány.

9.2.2 Příprava zásobního roztoku antibiotik

Po rekonstituci antibiotika v *aqua pro injectione* byl připraven do zkumavek základní roztok antibiotik přidáním CAMHB (cation adjusted Mueller Hinton Broth): amikacin v koncentraci 32 mg/l, gentamicin v koncentraci 32 mg/l, piperacilin/tazobaktam v koncentraci 128 mg/l piperacilinu, meropenem v koncentraci 8 mg/l.

9.2.3 Příprava mikrotitračních destiček

- Do všech jamek řady A mikrotitrační destičky bylo napipetováno 100 μ l CAMHB.
- Do řady B bylo inokulováno 100 μ l základního roztoku daného antibiotika následovně: B1-3 gentamicin, B4-6 amikacin, B7-9 piperacilin/tazobaktam, B10-12 meropenem. Z jamek A obsahující antibiotika bylo přeneseno 100 μ l do jamky B, po promíchání do C a tak dále až do jamky H, ze které bylo 100 μ l tekutiny po promíchání odstraněno. Schéma mikrotitrační destičky viz Obr. 11 a Obr. 12. Pro každý kmen byly připraveny 2 destičky (A, B). Celkem 62 destiček pro 31 kmenů, z toho 29 kmenů *E. coli* z hemokultur, 2x referenční kmen *E. coli* ATCC 25922 (1x testován jako kontrola v pokusu 16/5 2016, 1x testován jako kontrola v pokusu 6/6 2016).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	CAMHB	CAMHB	CAMHB	CAMHB	CAMHB	CAMHB	CAMHB	CAMHB	CAMHB	CAMHB	CAMHB	CAMHB
B	16	16	16	16	16	16	64	64	64	4	4	4
C	8	8	8	8	8	8	32	32	32	2	2	2
D	4	4	4	4	4	4	16	16	16	1	1	1
E	2	2	2	2	2	2	8	8	8	0,5	0,5	0,5
F	1	1	1	1	1	1	4	4	4	0,25	0,25	0,25
G	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	2	2	2	0,125	0,125	0,125
H	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	1	1	1	0,06	0,06	0,06
	GEN	GEN	GEN	AMI	AMI	AMI	PPT	PPT	PPT	MER	MER	MER

Obrázek 11 Schéma připravené mikrotitrační destičky 16. 5. 2017 (koncentrace v jamkách v mg/l.)
Zkratky: CAMHB cation adjusted Mueller Hinton Broth, GEN gentamicin, AMI amikacin, PPT piperacilin/tazobaktam, MER meropenem

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	CAMHB	CAMHB	CAMHB	CAMHB	CAMHB	CAMHB	CAMHB	CAMHB	CAMHB	CAMHB	CAMHB	CAMHB
B	8	8	8	16	16	16	64	64	64	1	1	1
C	4	4	4	8	8	8	32	32	32	0,5	0,5	0,5
D	2	2	2	4	4	4	16	16	16	0,25	0,25	0,25
E	1	1	1	2	2	2	8	8	8	0,125	0,125	0,125
F	0,5	0,5	0,5	1	1	1	4	4	4	0,06	0,06	0,06
G	0,25	0,25	0,25	0,5	0,5	0,5	2	2	2	0,03	0,03	0,03
H	0,125	0,125	0,125	0,25	0,25	0,25	1	1	1	0,015	0,015	0,015
	GEN	GEN	GEN	AMI	AMI	AMI	PPT	PPT	PPT	MER	MER	MER

Obrázek 12 Schéma připravené mikrotitrační destičky 6. 6. 2017 (koncentrace v jamkách v mg/l)
Zkratky: CAMHB cation adjusted Mueller Hinton Broth, GEN gentamicin, AMI amikacin, PPT piperacilin/tazobaktam, MER meropenem

9.2.4 Příprava bakteriálního inokula

Byly připraveny suspenze bakteriálního inokula z referenčního kmene *E. coli* ATCC 25 922 (destičky ESCO15, ESCO31) a klinických izolátů *E. coli* (n = 29). Suspenze kmenů byla připravena v CAMHB z 5-10 kolonií narostlých po 16-24 hodinách inkubace na KA, denzita inokula odpovídala 0,5 stupnice podle McFarlanda a byla zkontrolována denzitometrem.

9.2.5 Inokulace suspenze kmenů

Mechanickým inokulátorem („ježkem“) byla provedena inokulace mikrotitrační destičky ve všech jamkách kromě jamek A1-A6, které sloužily jako negativní kontrola (Obr. 13). Přeneseno bylo 1.5 µL suspenze bakteriálního inokula.

Každý kmen byl testován na dvou destičkách (A, B). Byla provedena kontrola čistoty inokula vyočkováním sterilní 10 µl bakteriologickou kličkou na krevní agar, inokulum bylo rozočkováno křížovým roztěrem.

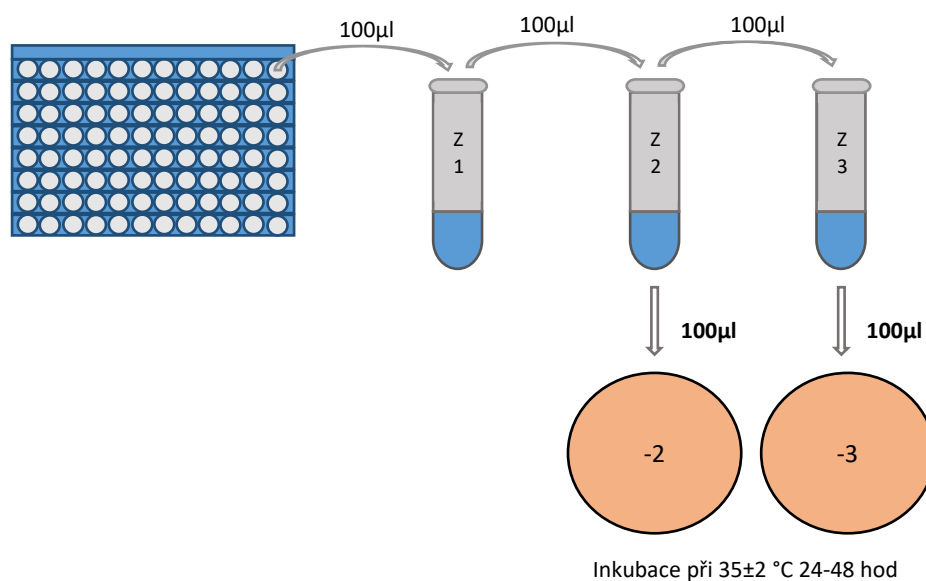
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	NEG KO	NEG KO	NEG KO	NEG KO	NEG KO	NEG KO	POZ KO	POZ KO	POZ KO	POZ KO	POZ KO	POZ KO
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												
	GEN	GEN	GEN	AMI	AMI	AMI	PPT	PPT	PPT	MER	MER	MER

Obrázek 13 Schéma inokulované mikrotitrační destičky (šedě označené jamky s inokulovanou suspenzí kmene) Zkratky: NEG KO negativní kontrola, POZ KO pozitivní kontrola, GEN gentamicin, AMI amikacin, PPT piperacilin/tazobaktam, MER meropenem.

9.2.6 Kontrola velikosti a čistoty inokula

Pro každý kmen byly připraveny tři zkumavky s 0,9 ml fyziologického roztoku, označeny Z1, Z2, Z3 a dva KA označené číslem kmene a ředěním -2 nebo -3. Z jamky A12 destičky B bylo přeneseno 100 µl suspenze do zkumavky Z1, poté je přeneseno 100 µl ze zkumavky Z1 do Z2, ze Z2 do Z3. Ze zkumavek Z2 bylo vyočkovááno 100 µl suspenze na krevní agar KA-2, ze zkumavky Z3 na krevní agar KA-3. Sterilní bakteriologickou kličkou byla tekutina rozetřena po celém krevním agaru. Agary byly dále inkubovány 24 a 48 hodin v termostatu při 35 ± 2 °C.

Po 18-24 hod a 48 hodinách inkubace bylo provedeno zjištění počtu CFU na krevním agaru Z-2 a Z-3. Hodnoty byly zaznamenány do tabulky. Jednotlivé kroky kontroly finálního inokula je možno vidět na Obr. 14.



Obrázek 14 Schéma kontroly finálního inokula

Z hodnot počtu CFU na krevním agaru Z-2 a Z-3 byl pro každý kmen proveden výpočet hodnoty finálního inokula v počtu CFU/ml. Hodnoty finálního inokula byly zaznamenány do tabulky. Cílová hodnota byla stanovena 5×10^5 CFU/ml (rozpětí 1×10^5 - 1×10^6 CFU/ml) dle CLSI M21-A 1999.

Z velikosti finálního inokula byl stanoven letální end-point ($\geq 99,9$ % finálního inokula), provedena korelace s rejection value podle tabulek CLSI M21-A, která redukuje chyby testování: velikost inokula, jednoduché vs. dvojité testování, chyby pipetování a obsahuje Poissonovu distribuci odpovědí vzorků (Barry *et al.* 1999).

9.2.7 Inkubace destiček

Všechny naočkované mikrotitrační destičky byly přikryty víčkem, rozděleny do skupiny A a B. Skupina A byla určena pro modifikaci měření turbidimetrie a pro klasickou metodu dle CLSI, skupina B byla určena pro modifikaci s použitím barvení resazurinem. Všechny destičky byly inkubovány v termostatu v běžné atmosféře při 35 ± 2 °C.

9.2.8 Stanovení MIC a MBC (skupina inokulovaných destiček A)

9.2.8.1 Turbidimetrie

Každá mikrotitrační destička skupiny A byla měřena ve spektrofotometru při vlnové délce 405 nm a 620 nm v čase inkubace 2 hodiny, 4 hodiny, 6 hodin, 8 hodin a 24 hodin. Před každým měřením byly destičky ve spektrofotometru krátce protřepány ($t = 5$ s). Výsledky turbidance byly zaznamenány do tabulky.

V programu Microsoft Excel 2013 bylo provedeno zpracování vývoje absorbance. Pro každý kmen *E. coli* v každém ředění antibiotika v čase 2, 4, 6, 8, 24 hodin pro vlnovou délku 405 nm a 620nm:

- byl stanoven průměr turbidance (T_b) ze tří sloupců stejného ředění stejného antibiotika
- byla stanovena změna turbidance T_b (ΔT_b v procentech) od počáteční turbidance T_b (měřené po 2 hodinách inkubace)
- byly stanoveny 3 sety výsledků, kdy
 - Jamka hodnocena jako pozitivní, pokud $\Delta T_b \geq 20$ %.
 - Jamka hodnocena jako pozitivní, pokud $\Delta T_b \geq 25$ %.

- Jamka hodnocena jako pozitivní, pokud $\Delta T_b \geq 30\%$.

Jako kontrola růstu kmene a správnosti proběhlého pokusu byla vyhodnocena absorbance pozitivních a negativních jamek.

9.2.8.2 Stanovení baktericidie dle CLSI

Po inkubaci a měření turbidance v čase 24 hodin byla u každé destičky v každém sloupci ředění antibiotik zjištěna první jamka v řadě ředění ATB, která nemá viditelný růst (stanovena MIC minimální inhibiční koncentrace). Všechny jamky bez viditelného růstu každého antibiotika byly vyočkovány na krevní agar ke zjištění MBC₂₄ CLSI (minimální baktericidní koncentrace po 24 hodinách): mikropipetou bylo přeneseno 100 μ l suspenze na krevní agar označený číslem kmene a umístěním vyočkované jamky.

Všechny agary byly vloženy do termostatu a inkubovány v běžné atmosféře při 35 ± 2 °C 24 a 48 hodin. Po inkubaci byl odečten počet narostlých CFU, zaznamenán do tabulky.

Pro každý sloupec ředění antibiotika byla stanovena **MBC₂₄ CLSI** minimální baktericidní koncentrace:

- počet CFU narostlých na krevním agaru po vyočkování byl porovnán se stanovenými end-points jednotlivých kmenů *E. coli* (viz kap. 3.5).
- poté byla určena **MBC₂₄ CLSI**, což je nejmenší ředění antibiotika, ze kterého po vyočkování vyrostl \leq CFU než byl stanovený letální end-point pro daný kmen (za stanovenou dobu bylo usmrceno $\geq 99,9\%$ finálního inokula).

9.2.9 Modifikace barvení resazurinem (skupina inokulovaných destiček B)

Skupina naočkovanych mikrotitračních destiček B byla určena k testování modifikací barvení resazurinem. Destičky byly inkubovány v běžné atmosféře při 35 ± 2 °C a v čase inkubace 7 hodin bylo do každé jamky přidáno 9 μ l resazurinu (Alamar Blue, Sigma-Aldrich). Po 1 hodině inkubace byla provedena kontrola změny barvy jamek z modré (negativní růst) na růžovou (pozitivní růst), k hodnocení změny barvy nejsou použity žádné zobrazovací techniky („pouhým okem“).

Pro každý kmen bylo do tabulky zaznamenáno nejmenší ředění séra s negativním růstem každého antibiotika (modré zbarvení), označeno jako **MIC₈ resazurin** (minimální inhibiční koncentrace po 8 hodinách).

První sloupec každého antibiotika byl určen ke stanovení baktericidie: všechny jamky s modrým zabarvením (předpokládaný negativní růst) byly vyočkovány na krevní agar ke zjištění **MBC8 resazurin** (minimální baktericidní koncentrace po 8 hodinách): mikropipetou bylo přeneseno 100 μ l suspenze na krevní agar označený číslem kmene a umístěním vyočkové jamky a testovanou metodou. Všechny agary byly vloženy do termostatu a inkubovány v běžné atmosféře při 35 ± 2 °C 24 a 48 hodin. Po inkubaci byl odečten počet narostlých CFU, zaznamenán do tabulky.

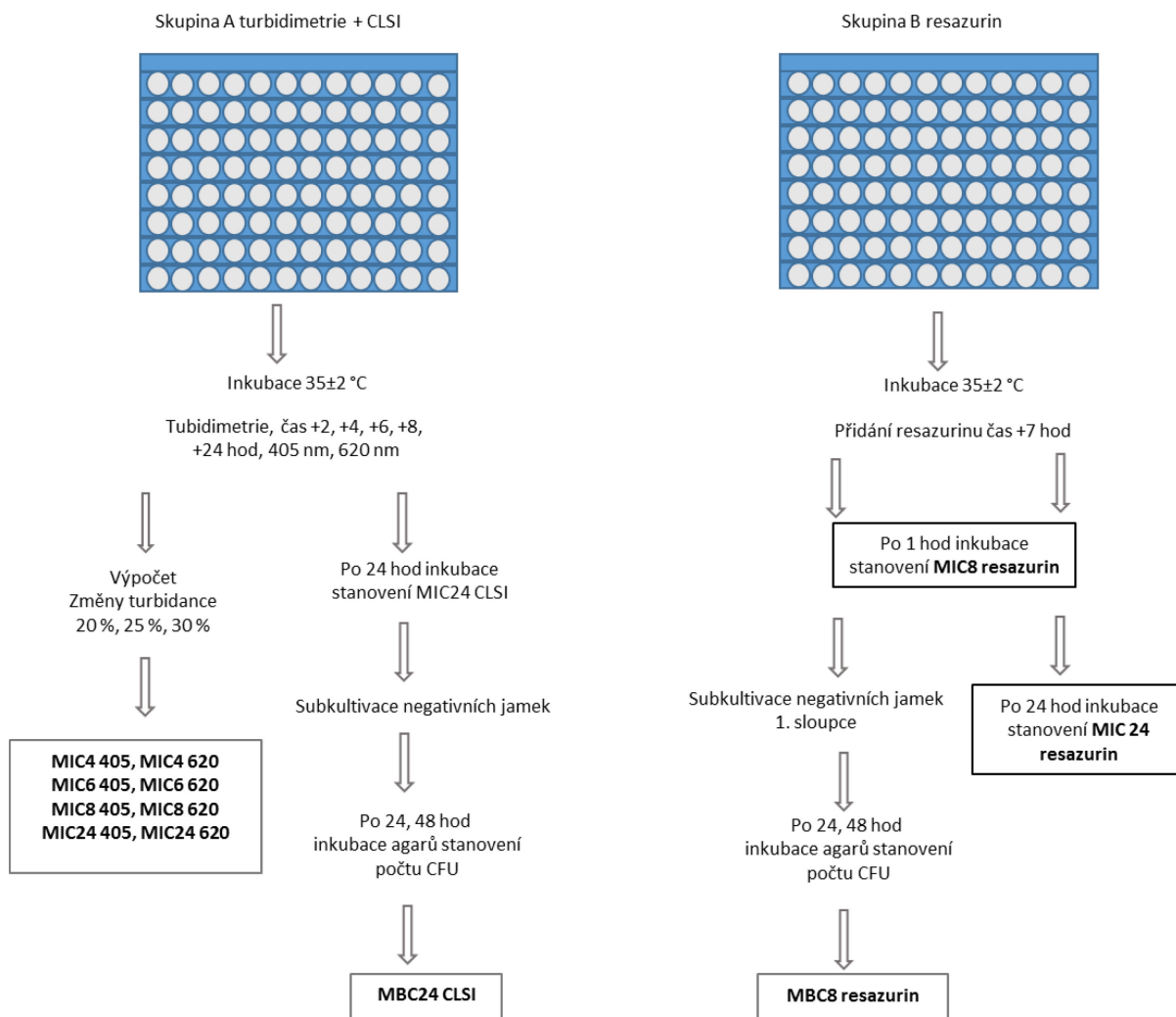
Pro každé antibiotikum byla stanovena **MBC8 resazurin**:

- počet CFU narostlých na krevním agaru po vyočkování byl porovnán se stanovenými end-points jednotlivých kmenů *E. coli*.
- poté byla určena **MBC8 resazurin**, definována jako nejmenší ředění antibiotika, ze kterého po vyočkování vyrostl \leq CFU než byl stanovený letální end-point pro daný kmen (za stanovenou dobu bylo usmrceno $\geq 99,9$ % finálního inokula).

Po vyočkování prvních sloupců byly všechny destičky skupiny B opět přikryty víčkem a spolu s naočkovanými krevními agary byly vloženy do termostatu, kde byly inkubovány v běžné atmosféře při 35 ± 2 °C.

Po 18-24 hodinách inkubace byl proveden odečet **MIC24 resazurin** (minimální inhibiční koncentrace po 24 hodinách), definovaný jako nejmenší koncentrace antibiotika s negativním růstem (modré zbarvení). Stejným způsobem jako MBC8 byla vyhotovena **MBC24 resazurin**.

Postup práce s inokulovanými destičkami je schématicky zobrazen na Obr. 15.



Obrázek 15 Schématické zobrazení postupu práce s inokulovanými destičkami

9.3 STATISTICKÉ ZPRACOVÁNÍ

Za použití programu Microsoft EXCEL byly vypočítány 20%, 25% a 30% odchylky turbidance. Výsledky baktericidie antibiotik byly označeny jako \log_2 ředění výchozí koncentrace antibiotika (1., 2., 3., 4., 5., 6., 7., 8.). Za standardní byly zvoleny výsledky dle metodiky baktericidie CLSI24. Přehled statistických skupin viz Tab. 6.

Tabulka 6 Přehled statistických skupin, v tabulce označeny tečkou

	TURBIDIMETRIE						RESAZURIN			CLSI
	405 nm			620 nm			8 hod	8 hod + subkultiva- ce	24 hod	stan- dard
	6 hod	8 hod	24 hod	6 hod	8 hod	24 hod				
30% změna	•	•	•	•	•	•				
25% změna	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•
20% změna	•	•	•	•	•	•				

Byly porovnány odchylky výsledků jednotlivých testovaných modifikací od standardního testování SBT dle CLSI (porovnány páry výsledků). Odchylka výsledku je definována jako odlišný výsledek testování modifikace v počtu jamek (ředění log₂) od CLSI. Pozitivní odchylka ředění značí vyšší a negativní nižší ředění log₂ než je standardní výsledek dle CLSI. Pro statistické hodnocení byl použit Wilcoxon Signed Ranks Test, k potvrzení správnosti výsledků ještě párový Studentův t-test.

Nulová hypotéza byla definována tak, že se referenční metoda CLSI neliší od ostatních metod. Non-inferiorita byla potvrzena, pokud výsledky oboustranné *p*-hodnoty $\geq 0,05$. Statistické vyhodnocení bylo provedeno pomocí software Microsoft Excel 2013 (Microsoft, USA), MedCalc 9.5.2.0 (MedCalc, Belgium) a SPSS plus v. 26.0 (IBM SPSS Statistics for Windows, version 26.0. Armonk, NY: IBM Corp.).

TESTOVÁNÍ BAKTERICIDIE SÉRA

9.4 MATERIÁL A PŘÍSTROJE

Sterilní mikrotitrační destičky s 96 jamkami, v 8 řádcích a 12 sloupcích o vnějších rozměrech 86 x 128 mm (VWR Tissue culture plates, USA), mikrotitrační pipeta, bakteriologické kličky, kryobanky (Itest, CZ)

Resazurin sodium salt (Alamar Blue – Sigma-Aldrich, USA), CAMHB - cation adjusted Mueller Hinton Broth (Sigma-Aldrich, USA), játrový bujón (Trios, CZ), piperacillinum natricum et tazobactamum natricum (Piperacillin/tazobactam KABI 4 g / 0,5 g, INF PLV SOL, Fresenius Kabi, CZ), gentamicini sulfas (Gentamicin LEK, 40mg/2ml, INJ/INF SOL, LEK Pharmaceuticals, Slovinsko), krevní agar (Trios, CZ), *aqua pro injectione* (BBraun, CZ).

Referenční kmen *E. coli* ATCC 25922, uchovaný v kryobankách (Itest, CZ) v mrazicím boxu při $-70^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$.

Denzitometr (Densi-La-Meter[®], Erba Lachema, CZ), spektrofotometr (Thermo Scientific[™] Multiskan[™] FC Microplate Photometer)

9.5 PRACOVNÍ POSTUP

9.5.1 Soubor pacientů, odběr, transport a uchování sér

Pro testování baktericidie byla použita séra deseti pacientů (6 žen, 4 mužů) IV. Interní kliniky Fakultní nemocnice Hradec Králové, věkového průměru 49,2 let (min 22 let, max 66 let, medián 48,5 roku). Séra byla odebrána z důvodu stanovení hladiny beta-laktamových antibiotik v rámci terapie febrilní neutropenie při léčbě hematologického onemocnění v letech 2012-2013. Antibiotikum piperacilin/tazobaktam (PPT) bylo podáváno v dávce 4,5 g v prodloužené infúzi trvající 3 hodiny v intervalu po 8 hodinách, celková délka terapie se řídila klinickým stavem pacienta. Charakteristiku souboru pacientů je možno vidět v Tab. 7.

Testování bylo povoleno Etickou komisí České lékařské komory v Hradci Králové č. 201807 S23P.

Tabulka 7 Základní charakteristika souboru pacientů

pacient	pohlaví	věk	kultivace	podávané antibiotikum	základní diagnóza
1	žena	45	negativní	PPT, CIP, COT, AMI	myelom
2	žena	65	<i>E.coli</i> moč	PPT, CLA, COT, AMI	Burkittův lymfom
3	žena	61	negativní	PPT, CIP	akutní monoblastická/monocytická leukemie
4	žena	64	negativní	PPT	B lymfom
5	žena	66	negativní	PPT, CIP	akutní myeloblastická leukemie
6	muž	22	negativní	PPT, CIP	akutní monoblastická/monocytická leukemie
7	žena	52	negativní	PPT, CIP	akutní myeloblastická leukemie
8	muž	34	negativní	PPT, CIP	akutní myeloblastická leukemie
9	muž	40	negativní	PPT, CIP, COT	akutní myeloblastická leukemie
10	muž	43	<i>P.aeruginosa</i> rána	PPT	B lymfom

Zkratky: AMI amikacin, CIP ciprofloxacin, CLA clarithromycin, COT trimethoprim-sulfamethoxazole, E. coli – Escherichia coli, PPT piperacilin-tazobaktam, P. aeruginosa – Pseudomonas aeruginosa.

První krev byla pacientům odebrána před začátkem podávání PPT, další vzorky krve za 3, 6 a 8 hodin po prvním podání PPT. Druhá série čtyř krevních vzorků byla odebrána v průběhu třetího dne terapie PPT: před podáním první denní dávky PPT, dále po 3, 6 a 8 hodinách. Dávka a čas podání PPT, čas odběru krve, dávka a doba podání současně podávaných jiných antibiotik byly zaznamenány do tabulky.

Po odběru byla krev vyšetřena na Ústavu klinické biochemie a diagnostiky Fakultní nemocnice Hradec Králové, kde proběhla separace séra. Sérum bylo poté stabilizováno přidáním 1 molárního MES pufru (2-(N-Morfolino)etansulfonic acid hydrát, Sigma-Aldrich) v poměru 1:1. Sérové koncentrace byly stanoveny metodou HPLC-MS (kapalinovou chromatografií spojenou s hmotnostní spektrometrií). Po odběru ke zpracování ke stanovení hladiny antibiotika byla séra uložena do mrazicího boxu na $-70\text{ °C} \pm 5\text{ °C}$.

Tato zbylá séra byla poskytnuta k testování baktericidie, před vyšetřením byla rozmražena na pokojovou teplotu. Séra označena číslem pacienta P01 až P10, pořadím odběru 1-8. Přehled vyšetřených sér je možno vidět v tabulce 8, tři séra byla plně využita pro stanovení koncentrace antibiotika a pro vyšetření baktericidie již nebyla k dispozici.

Tabulka 8 *Přehled časování odběrů krve (vyšetřená séra jsou v tabulce označena tečkou)*

Pacient	1. den podávání antibiotika				3. den podávání antibiotika			
	Před podáním	Po 3 hod	Po 6 hod	Po 8 hod	Před podáním	Po 3 hod	Po 6 hod	Po 8 hod
1	•	•	•	•	•	•	•	•
2	•	•	•	•	•	•	•	•
3	•	•	•	•	•	•	•	•
4	•	•	•	•	•	•	•	•
5	•	•	•		•	•	•	•
6	•	•	•	•	•	•	•	
7	•	•	•	•	•	•	•	•
8	•	•	•	•	•	•	•	•
9	•	•	•	•	•	•	•	•
10		•	•	•	•	•	•	•

9.5.2 Příprava zásobního roztoku antibiotik

Pro kontrolu metody byla použita antibiotika gentamicin a piperacilin/tazobaktam, před testováním byly připraveny zásobní roztoky: po rekonstituci antibiotika v *aqua pro injectione* byl připraven do zkumavek základní roztok antibiotik přidáním CAMHB (cation adjusted Mueller Hinton Broth), gentamicin v koncentraci 8 mg/l, piperacilin/tazobaktam v koncentraci 32 mg/l piperacilinu.

9.5.3 Příprava mikrotitračních destiček

- Do jamek A bylo napipetováno 100 µl patientského séra, do jamky B bylo napipetováno 100 µl patientského séra a současně 100 µl CAMHB (cation adjusted Mueller Hinton Broth). Výsledná ředění 1:1 v jamce A, 1:2 v jamce B.
- Každé sérum bylo testováno ve dvou sloupcích ve dvou mikrotitračních destičkách (celkem čtyřikrát), viz Obr. 16.
- Místo posledních dvou sér poslední mikrotitrační destičky bylo napipetováno
 - do jamek A a B 100 µl CAMHB pro pozitivní a negativní kontrolu

- do jamek C 100 μ l základního roztoku antibiotik: gentamicinu, piperacilin/tazobaktamu pro kontrolu metodiky.
- Do všech ostatních jamek mikrotitračních destiček bylo napipetováno 100 μ l CAMHB.
- Z jamek obsahující ředění séra 1:2 (A nebo B) bylo přeneseno 100 μ l do další jamky, po promíchání 100 μ l do další a tak dále, až z poslední jamky ve sloupci (řada H) je 100 μ l tekutiny po promíchání odstraněno. Schéma mikrotitrační destičky viz Obr. 16.
- Ředění kontrolních antibiotik bylo provedeno stejným způsobem od jamek C k H.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	sérum	sérum	sérum	sérum	sérum	sérum	sérum	sérum	POZ	POZ	NEG	NEG
B	1:2	1:2	1:2	1:2	1:2	1:2	1:2	1:2	POZ	POZ	NEG	NEG
C	1:4	1:4	1:4	1:4	1:4	1:4	1:4	1:4	16	16	4	4
D	1:8	1:8	1:8	1:8	1:8	1:8	1:8	1:8	8	8	2	2
E	1:16	1:16	1:16	1:16	1:16	1:16	1:16	1:16	4	4	1	1
F	1:32	1:32	1:32	1:32	1:32	1:32	1:32	1:32	2	2	0,5	0,5
G	1:64	1:64	1:64	1:64	1:64	1:64	1:64	1:64	1	1	0,25	0,25
H	1:128	1:128	1:128	1:128	1:128	1:128	1:128	1:128	0,5	0,5	0,125	0,125
	Sérum1	Sérum1	Sérum2	Sérum2	Sérum3	Sérum3	Sérum4	Sérum4	PPT	PPT	GEN	GEN
									[mg/l]	[mg/l]	[mg/l]	[mg/l]

Obrázek 16 **Schéma připravené mikrotitrační destičky** (poměry v tabulce označují ředění séra, koncentrace antibiotik je jednotkách mg/l) Zkratky: GEN gentamicin, NEG negativní kontrola, POZ pozitivní kontrola, PPT piperacilin/tazobaktam

9.5.4 Příprava bakteriálního inokula

Referenční kmen *E. coli* ATCC 25922 uchovaný zamražením v kryobance v mrazicím boxe při $-70\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$ byl před použitím revitalizován vyočkováním na krevní agar, před použitím 1x přeočkován. Suspenze byla připravena dotykem 5-10 kolonií narostlých po 16-24 hodinách inkubace na krevním agaru a přenesením do CAMHB pokojové teploty ve zkumavce, denzita inokula 0,5 McFarlanda byla kontrolována denzitometrem.

9.5.5 Inokulace suspenze kmene

Mechanickým inokulátorem („ježkem“) byla provedena inokulace všech jamek mikrotitrační destičky (1,5 μ l) kromě jamek negativní kontroly. Poté byla provedena kontrola čistoty inokula vyočkováním sterilní 10 μ l bakteriologickou kličkou na krevní agar, inokulum bylo rozočkováno křížovým roztěrem.

9.5.6 Kontrola velikosti inokula

Pro kmen byly připraveny tři zkumavky s 0,9 ml fyziologického roztoku, označeny Z1, Z2, Z3 a dva krevní agary označené číslem kmene a ředěním 2 nebo 3.

Z jamky A9 poslední destičky (pozitivní kontrola) bylo přeneseno 100 μ l suspenze do zkumavky Z1, poté bylo přeneseno 100 μ l ze zkumavky Z1 do Z2, ze Z2 do Z3. Ze zkumavek Z2 bylo vyočkováno 100 μ l suspenze na krevní agar KA2, ze zkumavky Z3 na krevní agar KA3. Sterilní bakteriologickou kličkou byla tekutina rozetřena po celém krevním agaru. Krevní agary byly dále inkubovány 24 a 48 hodin v termostatu při 35 ± 2 °C.

Po 18-24 hod a 48 hodinách inkubace bylo provedeno zjištění počtu CFU na krevním agaru Z2 a Z3. Hodnoty jsou zaznamenány do tabulky. Jednotlivé kroky kontroly finálního inokula je možno vidět na Obr. 14.

Z hodnot počtu CFU na krevním agaru Z2 a Z3 byl proveden výpočet hodnoty finálního inokula v počtu CFU/ml. Cílová hodnota byla stanovena 5×10^5 CFU/ml (rozpětí 1×10^5 - 1×10^6 CFU/ml).

Z velikosti finálního inokula byl stanoven letální end-point ($\geq 99,9$ % finálního inokula), provedena korelace s rejection value podle tabulek CLSI, který redukuje chyby testování: velikost inokula, jednoduché vs. dvojité testování, chyby pipetování a obsahuje Poissonovu distribuci odpovědí vzorků - například pro finální inokulum 6×10^5 CFU/ml je letální end-point 29 CFU (Barry *et al.* 1999).

9.5.7 Inkubace destiček

Všechny naočkované mikrotitrační destičky byly přikryty víčkem, rozděleny do skupiny A a B. Skupina A byla určena pro turbidimetrii a pro klasickou metodu dle CLSI, skupina B pro modifikaci s použitím barvení resazurinem. Všechny destičky byly vloženy do termostatu, kde byly inkubovány v běžné atmosféře při 35 °C \pm 2 °C.

9.5.8 Stanovení MIC a MBC (skupina inokulovaných destiček A)

9.5.8.1 Turbidimetrie

Každá mikrotitrační destička skupiny A byla měřena ve spektrofotometru při vlnové délce 405 nm a 620 nm v čase inkubace 2 hodiny 4 hodiny, 6 hodin, 8 hodin a 24 hodin od inokulace. Před každým měřením byly destičky ve spektrofotometru krátce protřepány ($t = 5$ s). Výsledky turbidance (T_b) byly zaznamenány do tabulky.

V programu Microsoft Excel 2013 bylo provedeno zpracování vývoje turbidance. Pro každé sérum v každém ředění v čase 2, 4, 6, 8, 24 hodin pro vlnovou délku 405 nm a 620 nm:

- byl stanoven průměr Tb ze sloupců stejného ředění séra, pozitivní kontroly (POZK), negativní kontroly (NEGK), kontrolních antibiotik piperacilin/tazobaktam a gentamicin.
- byla stanovena změna Tb (Δ Tb) v procentech od počáteční turbidance Ab (měřené po 2 hodinách inkubace).
- byly stanoveny tři sety výsledků, kdy
 - Jamka hodnocena jako pozitivní, pokud Δ Tb \geq 20 %.
 - Jamka hodnocena jako pozitivní, pokud Δ Tb \geq 25 %.
 - Jamka hodnocena jako pozitivní, pokud Δ Tb \geq 30 %.

Jako **MIC4 405**, **MIC4 620** (po 4 hod inkubace), **MIC6 405**, **MIC6 620** (po 6 hod inkubace), **MIC8 405**, **MIC8 620** (po 8 hod inkubace), **MIC24 405**, **MIC24 620** (po 24 hod inkubace) bylo hodnoceno největší ředění séra, které nevykazovalo pozitivní růst v daném čase při měření příslušnou vlnovou délkou. Přehled stanovených veličin viz Tab. 6.

9.5.8.2 Stanovení baktericidie dle CLSI

Po 24 hodinové inkubaci byla stanovena MIC (minimální inhibiční koncentrace) u každého vzorku séra. MIC byla definována jako první jamka v řadě ředění séra nebo antibiotika, ve které nebyl viditelný růst. Následně ze všech jamek bez viditelného růstu bylo vyočkováno mikropipetou 100 μ l suspenze na krevní agar ke stanovení **MBC24 CLSI** (minimální baktericidní koncentrace) po 24 hodinách podle metodiky CLSI. Jednotlivé krevní agary byly označeny číslem séra pacienta (P01-10), pořadím odběru séra (1-8) a polohou příslušné jamky, která zároveň určuje také ředění séra (např. D2).

Všechny agary byly inkubovány v běžné atmosféře při 35 ± 2 °C, po 24 a 48 hodinách byl odečten počet narostlých CFU a zaznamenán do tabulky.

Pro každý sloupec ředění séra je stanovena MBC (minimální baktericidní koncentrace):

- počet CFU narostlých na krevním agaru po vyočkování je porovnán se stanoveným end-point testovaného kmene *E. coli*.

- je určena **MBC24 CLSI** jako největší ředění séra, ze kterého byl po vyočkování počet CFU menší nebo roven letálnímu end-pointu pro daný kmen, tj. bylo usmrceno $\geq 99,9$ % finálního inokula.
- jako kontrola metody byla stanovena MIC24 CLSI, MBC24 CLSI pro antibiotika piperacilin/tazobaktam a gentamicin, která byla umístěna v poslední mikrotitrační destičce. Porovnány s referenčními hodnotami (Barry *et al.* 1999).

9.5.9 Stanovení MIC a MBC modifikací resazurinem (skupina inokulovaných destiček B)

V čase inkubace 7 hodin bylo do každé jamky destiček skupiny B přidáno 9 μ l resazurinu (Alamar Blue, Sigma-Aldrich). Po 1 hodině inkubace byla provedena kontrola změny barvy z modré (negativní růst) na růžovou (pozitivní růst), hodnocení barevné změny bylo provedeno vizuálně.

Pro každý kmen bylo do tabulky zaznamenáno největší ředění séra s negativním růstem (modré zbarvení), označeno jako **MIC8 resazurin** (minimální inhibiční koncentrace po 8 hodinách).

První sloupec každého séra byl určen ke stanovení baktericidie: všechny jamky s modrým zbarvením (předpokládaný negativní růst) byly vyočkovány na krevní agar ke zjištění MBC8 resazurin (minimální baktericidní koncentrace po 8 hodinách). Mikropipetou bylo přeneseno 100 μ l suspenze na krevní agar označený číslem séra, dále umístěním vyočkované jamky (např. A3) a testovanou metodou. Všechny agary byly vloženy do termostatu a inkubovány v běžné atmosféře při 35 ± 2 °C 24 a 48 hodin. Po inkubaci byl odečten počet narostlých CFU, zaznamenán do tabulky.

Pro každé sérum byla stanovena **MBC8 resazurin**, definována jako největší ředění séra, ze kterého po vyočkování vyrostl \leq CFU než byl stanovený letální end-point pro daný kmen (za stanovenou dobu bylo usmrceno $\geq 99,9$ % finálního inokula).

Po vyočkování prvních sloupců byly všechny destičky skupiny B opět přikryty víčkem a spolu s naočkovanými krevními agary byly vloženy do termostatu, kde byly inkubovány v běžné atmosféře při 35 ± 2 °C.

Po 18-24 hodinách inkubace byl proveden odečet **MIC24 resazurin** (minimální inhibiční koncentrace po 24 hodinách), definovaný jako největší ředění séra s negativním růstem (modré zbarvení).

Jako kontrola růstu kmene a správnosti proběhlého pokusu byla vyhodnocena absorbance pozitivních a negativních jamek a MIC, MBC24 CLSI pro gentamicin a piperacilin/tazobaktam.

Postup práce s inokulovanými destičkami je schématicky zobrazen na Obr. 15.

9.6 STATISTICKÉ ZPRACOVÁNÍ

Za použití programu Microsoft EXCEL byly vypočítány 20%, 25% a 30% odchylky turbidance (ΔT_b). Za standardní byly zvoleny výsledky dle metodiky baktericidie CLSI24. Statisticky byly vyhodnoceny odchylky výsledků modifikací od standardní metodiky, statistické skupiny jsou totožné jako v testování různých kmenů *E. coli* (viz kapitola 9.3, Tab. 6).

Byly porovnány odchylky výsledků jednotlivých testovaných modifikací od standardního testování SBT dle CLSI (porovnány páry výsledků). Odchylka výsledku je definována jako odlišný výsledek testování modifikace v počtu jamek (ředění \log_2) od CLSI. Pozitivní odchylka ředění značí vyšší a negativní nižší ředění \log_2 než je standardní výsledek dle CLSI. Pro statistické hodnocení byl použit Wilcoxon Signed Ranks Test, k potvrzení správnosti výsledků ještě párový Studentův t-test. Nulová hypotéza byla definována tak, že se referenční metoda CLSI neliší od ostatních metod. Non-inferiorita byla potvrzena, pokud výsledky oboustranné p -hodnoty $\geq 0,05$. Statistické vyhodnocení bylo provedeno pomocí software Microsoft Excel 2013 (Microsoft, USA), MedCalc 9.5.2.0 (MedCalc, Belgium) a SPSS plus v. 26.0 (IBM SPSS Statistics for Windows, version 26.0. Armonk, NY: IBM Corp.).

10 VÝSLEDKY

10.1 VÝSLEDKY TESTOVÁNÍ BAKTERICIDIE ANTIBIOTIK KMENY *ESCHERICHIA COLI* Z HEMOKULTIVACÍ

K testování baktericidie antibiotik bylo použito 29 kmenů *E. coli* od 29 pacientů Fakultní nemocnice Hradec Králové izolované z hemokultivací v letech 2015-2017 a referenčního kmene *E. coli* ATCC 25 922.

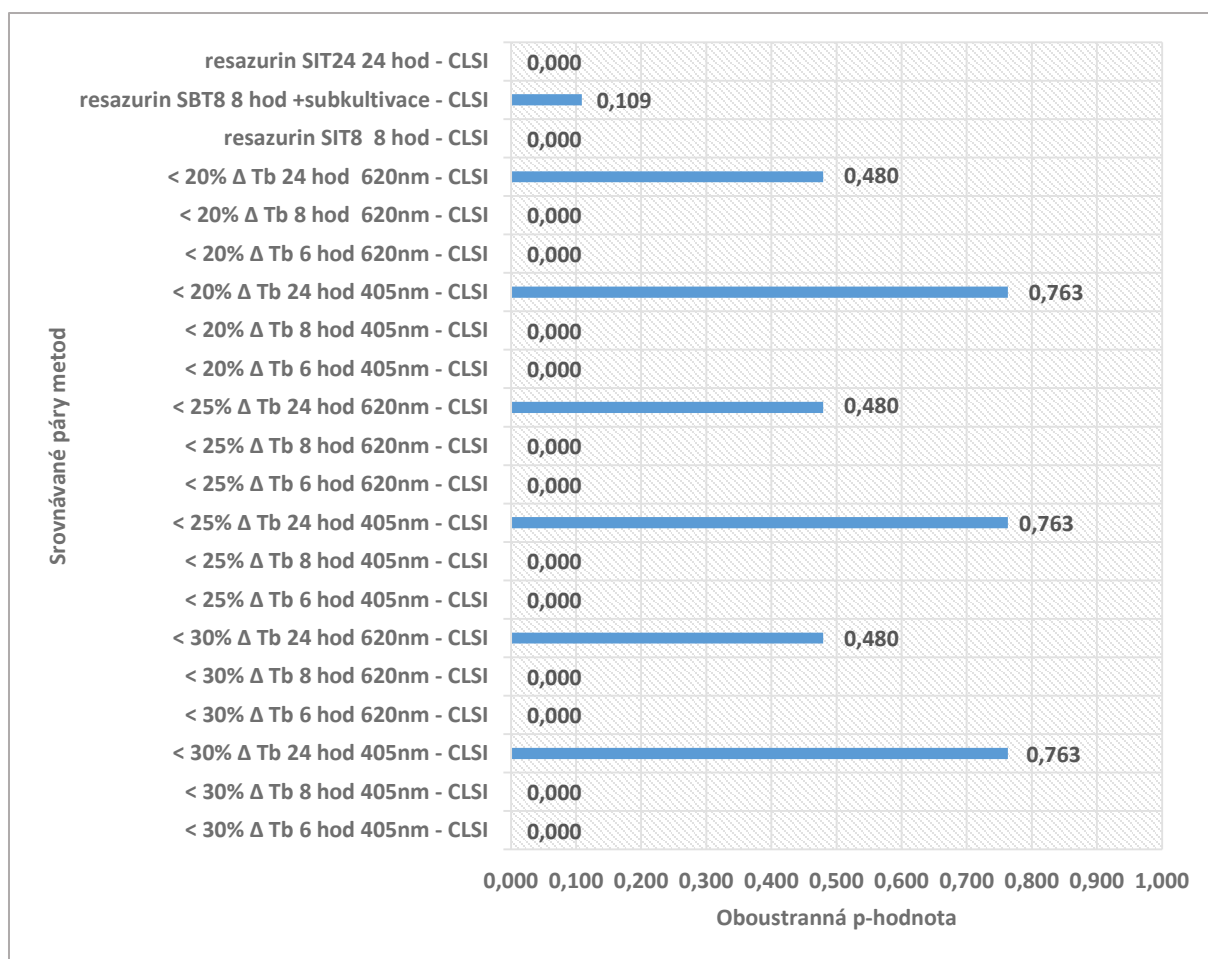
Výsledky testování baktericidie standardní metody dle CLSI a ostatních modifikací zpracovaných jednotlivými statistickými testy jsou zobrazeny v následujících tabulkách a grafech. Výsledky srovnání testování baktericidie antibiotika **amikacinu** při použití Studentova párového t-testu, respektive Wilcoxon Signed Ranks Testu viz Tab. 9 a Graf 1.

Tabulka 9 Statistické zpracování testování amikacinu, srovnání standardní metody vyšetření baktericidie dle CLSI a ostatních modifikací užitím párového Studentova t-testu (Paired Samples Test, zkratka PST) – červená čísla, Wilcoxon Signed Ranks Testu – modrá čísla (zkratka WSRT), statisticky významná non-inferiorita pro $p > 0,05$ označena tučně

Páry	Porovnávané metody	Párové rozdíly					p-hodnota oboustr. (PST)	p-hodnota oboustr. (WSRT)
		Průměr	Směrodatná odchylka	Stand. chyba průměru	95% Interval spolehlivosti			
					Dolní	Horní		
Pár 1	CLSI – 30% ΔTb 6 hod. 405 nm	-1,7742	1,4308	0,2570	-2,2990	-1,2494	0,000	0,000
Pár 2	CLSI – 30% ΔTb 8 hod. 405 nm	-1,0000	0,8563	0,1538	-1,3141	-0,6859	0,000	0,000
Pár 3	CLSI – 30% ΔTb 24 hod. 405 nm	0,0000	0,7303	0,1312	-0,2679	0,2679	1,000	0,763
Pár 4	CLSI – 30% ΔTb 6 hod. 620 nm	-1,6452	1,3552	0,2434	-2,1423	-1,1481	0,000	0,000
Pár 5	CLSI – 30% ΔTb 8 hod. 620 nm	-0,9355	0,8139	0,1462	-1,2340	-0,6370	0,000	0,000
Pár 6	CLSI – 30% ΔTb 24 hod. 620 nm	0,0645	0,5122	0,0920	-0,1234	0,2524	0,489	0,480
Pár 7	CLSI – 25% ΔTb 6 hod. 405 nm	-1,7097	1,4421	0,2590	-2,2386	-1,1807	0,000	0,000
Pár 8	CLSI – 25% ΔTb 8 hod. 405 nm	-1,0000	0,8563	0,1538	-1,3141	-0,6859	0,000	0,000
Pár 9	CLSI – 25% ΔTb 24 hod. 405 nm	0,0000	0,7303	0,1312	-0,2679	0,2679	1,000	0,763
Pár 10	CLSI – 25% ΔTb 6 hod. 620 nm	-1,6129	1,3084	0,2350	-2,0928	-1,1330	0,000	0,000

Pár 11	CLSI – 25% ΔTb 8 hod. 620 nm	-0,9032	0,8309	0,1492	-1,2080	-0,5985	0,000	0,000
Pár 12	CLSI – 25% ΔTb 24 hod. 620 nm	0,0645	0,5122	0,0920	-0,1234	0,2524	0,489	0,480
Pár 13	CLSI – 20% ΔTb 6 hod. 405 nm	-1,6129	1,2564	0,2257	-2,0737	-1,1521	0,000	0,000
Pár 14	CLSI – 20% ΔTb 8 hod. 405 nm	-0,9677	0,8750	0,1572	-1,2887	-0,6468	0,000	0,000
Pár 15	CLSI – 20% ΔTb 24 hod. 405 nm	0,0000	0,7303	0,1312	-0,2679	0,2679	1,000	0,763
Pár 16	CLSI – 20% ΔTb 6 hod. 620 nm	-1,5484	1,2607	0,2264	-2,0108	-1,0860	0,000	0,000
Pár 17	CLSI – 20% ΔTb 8 hod. 620 nm	-0,8710	0,8462	0,1520	-1,1814	-0,5606	0,000	0,000
Pár 18	CLSI – 20% ΔTb 24 hod. 620 nm	0,0645	0,5122	0,0920	-0,1234	0,2524	0,489	0,480
Pár 19	CLSI – resazurin 8 hod.	-0,9355	0,8139	0,1462	-1,2340	-0,6370	0,000	0,000
Pár 20	CLSI – resazurin 8 hod. + subkultivace	-0,2300	0,7600	0,1400	-0,5100	0,0500	0,109	0,109
Pár 21	CLSI – resazurin 24 hod.	-0,5484	0,7229	0,1298	-0,8135	-0,2832	0,000	0,001

Při srovnání modifikací metod poskytuje nejlepší výsledky použití turbidimetrie za 24 hodin při určení SIT v posledním ředění, které vykazuje změnu turbidity < 20 %. Obě použité vlnové délky (405 nm i 620 nm) vydávaly statisticky non-inferiorní výsledky, i když vlnová délka 405 nm měla vyšší hodnotu oboustranného p (0,763 proti 0,480 při vlnové délce 620 nm).



Graf 1 Grafické znázornění výsledků oboustranných p-hodnot testování amikacinu, srovnání standardní metody vyšetření baktericidie séra dle CLSI a ostatních modifikací pomocí Wilcoxon Signed Ranks Testu (grafická osa x: oboustranná p-hodnota, statisticky významná non-inferiorita > 0,05)

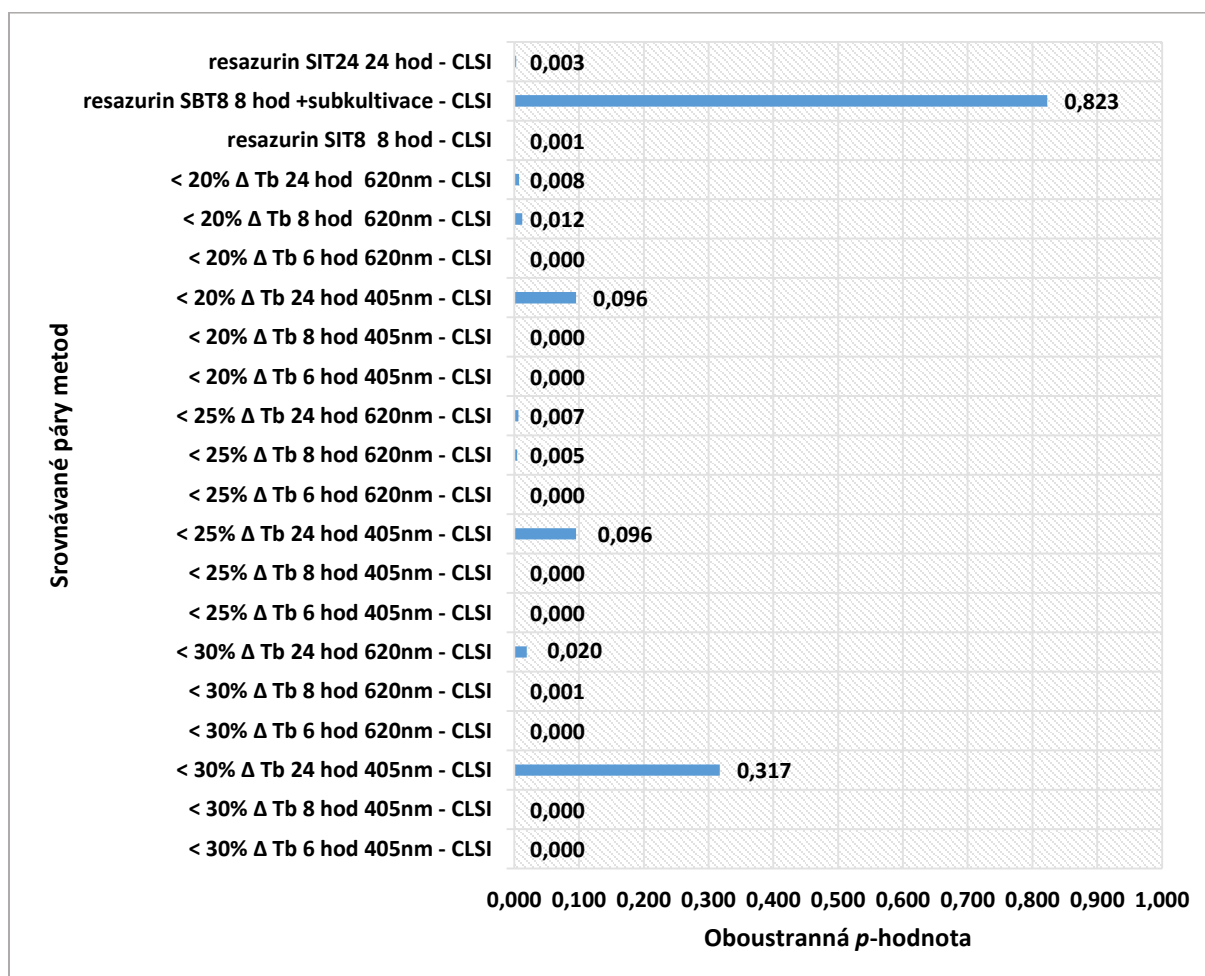
Zkratky: ΔTb - změna turbidance, SIT sérum inibiční titr, SBT sérum bactericidní titr, CLSI - The Clinical & Laboratory Standards Institute.

Srovnání testování antibiotika **gentamicinu** všech modifikací se standardní metodou CLSI oběma statistickými metodami viz Tab. 10 a Graf 2.

Tabulka 10 Statistické zpracování testování gentamicinu, srovnání standardní metody vyšetření baktericidie dle CLSI a ostatních modifikací užitím párového Studentova t-testu (Paired Samples Test, zkratka PST) – červená čísla, Wilcoxon Signed Ranks Testu – modrá čísla (zkratka WSRT), statisticky významná non-inferiorita pro $p > 0,05$ označena tučně

Páry	Porovnávané metody	Párové rozdíly					p -hodnota oboustr. (PST)	p -hodnota oboustr. (WSRT)
		Průměr	Směrodatná odchylka	Stand. chyba průměru	95% Interval spolehlivosti			
					Dolní	Horní		
Pár 1	CLSI – 30% Δ Tb 6 hod. 405 nm	-0,7667	0,7279	0,1329	-1,0385	-0,4949	0,000	0,000
Pár 2	CLSI – 30% Δ Tb 8 hod. 405 nm	-0,6000	0,6215	0,1135	-0,8321	-0,3679	0,000	0,000
Pár 3	CLSI – 30% Δ Tb 24 hod. 405 nm	0,1000	0,5477	0,1000	-0,1045	0,3045	0,326	0,317
Pár 4	CLSI – 30% Δ Tb 6 hod. 620 nm	-0,7333	0,7849	0,1433	-1,0264	-0,4402	0,000	0,000
Pár 5	CLSI – 30% Δ Tb 8 hod. 620 nm	-0,5333	0,6814	0,1244	-0,7878	-0,2789	0,000	0,001
Pár 6	CLSI – 30% Δ Tb 24 hod. 620 nm	0,2333	0,5040	0,0920	0,0451	0,4215	0,017	0,020
Pár 7	CLSI – 25% Δ Tb 6 hod. 405 nm	-0,7333	0,7397	0,1350	-1,0095	-0,4571	0,000	0,000
Pár 8	CLSI – 25% Δ Tb 8 hod. 405 nm	-0,5667	0,6261	0,1143	-0,8004	-0,3329	0,000	0,000
Pár 9	CLSI – 25% Δ Tb 24 hod. 405 nm	0,1667	0,5307	0,0969	-0,0315	0,3648	0,096	0,096
Pár 10	CLSI – 25% Δ Tb 6 hod. 620 nm	-0,7000	0,7944	0,1450	-0,9966	-0,4034	0,000	0,000
Pár 11	CLSI – 25% Δ Tb 8 hod. 620 nm	-0,4333	0,7279	0,1329	-0,7051	-0,1615	0,003	0,005
Pár 12	CLSI – 25% Δ Tb 24 hod. 620 nm	0,3000	0,5350	0,0977	0,1002	0,4998	0,005	0,007
Pár 13	CLSI – 20% Δ Tb 6 hod. 405 nm	-0,7333	0,7397	0,1350	-1,0095	-0,4571	0,000	0,000
Pár 14	CLSI – 20% Δ Tb 8 hod. 405 nm	-0,5333	0,6288	0,1148	-0,7681	-0,2985	0,000	0,000
Pár 15	CLSI – 20% Δ Tb 24 hod. 405 nm	0,1667	0,5307	0,0969	-0,0315	0,3648	0,096	0,096
Pár 16	CLSI – 20% Δ Tb 6 hod. 620 nm	-0,7000	0,7497	0,1369	-0,9799	-0,4201	0,000	0,000
Pár 17	CLSI – 20% Δ Tb 8 hod. 620 nm	-0,3333	0,6609	0,1207	-0,5801	-0,0866	0,010	0,0012
Pár 18	CLSI – 20% Δ Tb 24 hod. 620 nm	0,3667	0,7184	0,1312	0,0984	0,6349	0,009	0,008
Pár 19	CLSI – resazurin 8 hod.	-0,6333	0,7649	0,1396	-0,9189	-0,3477	0,000	0,001

Pár 20	CLSI – resazurin 8 hod. + subkultivace	0,0300	0,8000	0,1400	0,3200	0,2600	0,823	0,822
Pár 21	CLSI – resazurin 24 hod.	-0,4333	0,6789	0,1240	-0,6868	-0,1798	0,002	0,003



Graf 2 Grafické znázornění výsledků oboustranných p-hodnot testování gentamicinu, srovnání standardní metody vyšetření baktericidie séra dle CLSI a ostatních modifikací Wilcoxon Signed Ranks Testu. Grafická osa x: oboustranná p-hodnota, statisticky významná non-inferiorita > 0,05

Zkratky: ΔTb - změna turbidance, SIT sérum inhibiční titr, SBT sérum bactericidní titr, CLSI - The Clinical & Laboratory Standards Institute

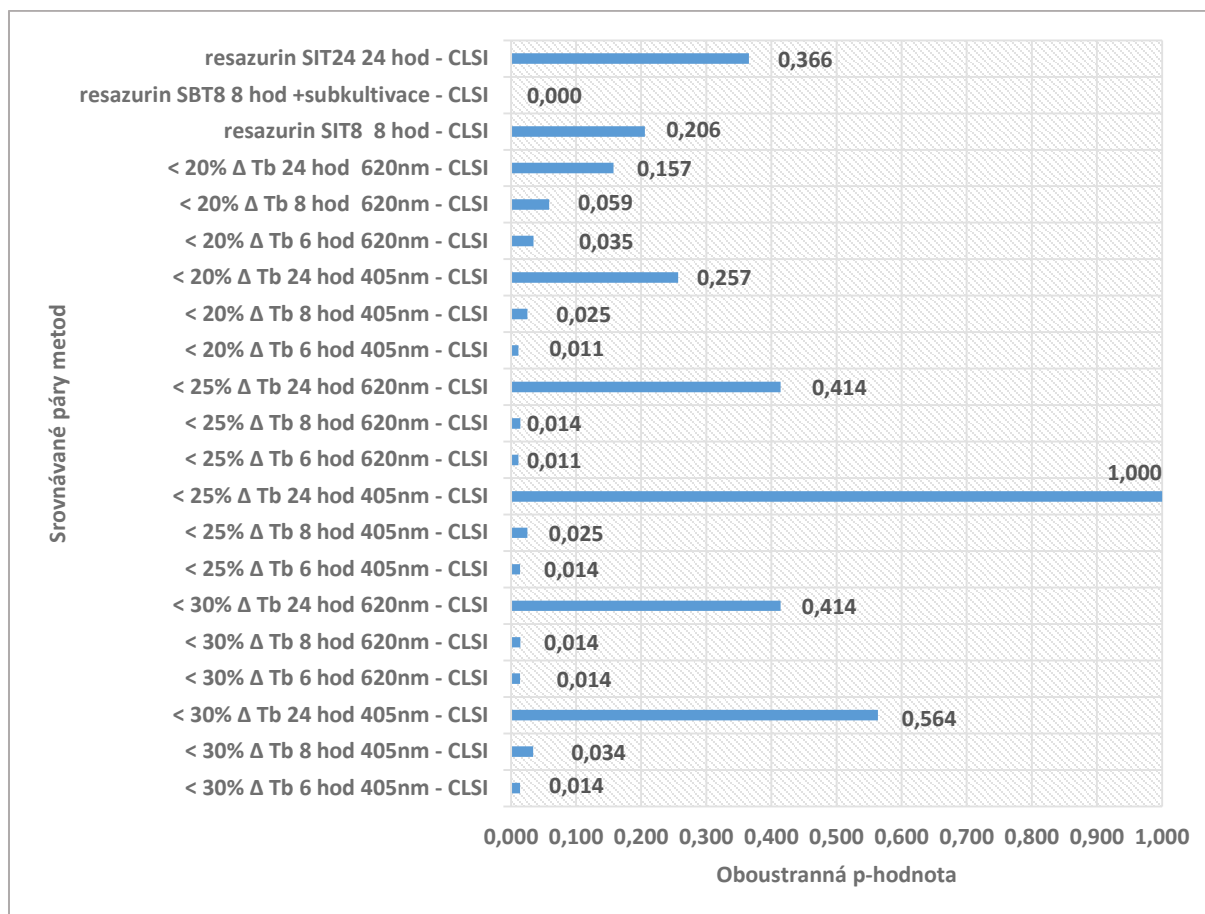
Při testování baktericidie gentamicinu vykazovala nejlepší výsledky modifikace s využitím barvení resazurinem za 8 hodin a určením baktericidního titru po subkultivaci negativních jamek mikrotitrační destičky (oboustranná p-hodnota 0,823). Tubidimetrické testování vydávalo statisticky non-inferiorní výsledky pouze při měření za 24 hodin při užití vlnové délky 405 nm, nejlepší při použití hranice změny turbidity < 30 % (oboustranná p-hodnota 0,317).

Následující Tab. 11 a Graf 3 zobrazuje statistické zpracování a oboustranné p -hodnoty srovnání testování baktericidie **meropenemu** dle CSLI a ostatních modifikací oběma statistickými metodami (párovým Studentovým t -testem, Wilcoxon Signed Ranks Testem).

Tabulka 11 Statistické zpracování testování meropenemu, srovnání standardní metody vyšetření baktericidie séra dle CSLI a ostatních modifikací užitím párového t -testu (Paired Samples Test, zkratka PST) – červená čísla, Wilcoxon Signed Ranks Testu – modrá čísla (zkratka WSRT), statisticky významná non-inferiorita pro $p > 0,05$ označena tučně

Páry	Porovnávané metody	Párové rozdíly					p -hodnota oboustr. (PST)	p -hodnota oboustr. (WSRT)
		Průměr	Směrodatná odchylka	Stand. chyba průměru	95% Interval spolehlivosti			
					Dolní	Horní		
Pár 1	CLSI – 30% Δ Tb 6 hod. 405 nm	-0,2903	0,5884	0,1057	-0,5062	-0,0745	0,010	0,014
Pár 2	CLSI – 30% Δ Tb 8 hod. 405 nm	-0,1935	0,4774	0,0858	-0,3687	-0,0184	0,031	0,034
Pár 3	CLSI – 30% Δ Tb 24 hod. 405 nm	-0,0323	0,3145	0,0565	-0,1476	0,0831	0,572	0,564
Pár 4	CLSI – 30% Δ Tb 6 hod. 620 nm	-0,2903	0,5884	0,1057	-0,5062	-0,0745	0,010	0,014
Pár 5	CLSI – 30% Δ Tb 8 hod. 620 nm	-0,1935	0,4016	0,0721	-0,3409	-0,0462	0,012	0,014
Pár 6	CLSI – 30% Δ Tb 24 hod. 620 nm	0,0645	0,4424	0,0795	-0,0977	0,2268	0,423	0,414
Pár 7	CLSI – 25% Δ Tb 6 hod. 405 nm	-0,2903	0,5884	0,1057	-0,5062	-0,0745	0,010	0,014
Pár 8	CLSI – 25% Δ Tb 8 hod. 405 nm	-0,1613	0,3739	0,0672	-0,2984	-0,0242	0,023	0,025
Pár 9	CLSI – 25% Δ Tb 24 hod. 405 nm	0,0000	0,3651	0,0656	-0,1339	0,1339	1,000	1,000
Pár 10	CLSI – 25% Δ Tb 6 hod. 620 nm	-0,2581	0,5143	0,0924	-0,4467	-0,0694	0,009	0,011
Pár 11	CLSI – 25% Δ Tb 8 hod. 620 nm	-0,1935	0,4016	0,0721	-0,3409	-0,0462	0,012	0,014
Pár 12	CLSI – 25% Δ Tb 24 hod. 620 nm	0,0645	0,4424	0,0795	-0,0977	0,2268	0,423	0,414
Pár 13	CLSI – 20% Δ Tb 6 hod. 405 nm	-0,2581	0,5143	0,0924	-0,4467	-0,0694	0,009	0,011
Pár 14	CLSI – 20% Δ Tb 8 hod. 405 nm	-0,1613	0,3739	0,0672	-0,2984	-0,0242	0,023	0,025
Pár 15	CLSI – 20% Δ Tb 24 hod. 405 nm	0,0968	0,4729	0,0849	-0,0767	0,2702	0,264	0,257
Pár 16	CLSI – 20% Δ Tb 6 hod. 620 nm	-0,2258	0,5603	0,1006	-0,4313	-0,0203	0,032	0,035
Pár 17	CLSI – 20% Δ Tb 8 hod. 620 nm	-0,1613	0,4544	0,0816	-0,3280	0,0054	0,057	0,059

Pár 18	CLSI – 20% Δ Tb 24 hod. 620 nm	0,1290	0,4995	0,0897	-0,0542	0,3122	0,161	0,157
Pár 19	CLSI – rezazurin 8 hod.	0,1290	0,5623	0,1010	-0,0772	0,3353	0,211	0,206
Pár 20	CLSI – rezazurin 8 hod. + subkultivace	0,7100	0,6400	0,1200	0,4700	0,9500	0,000	0,000
Pár 21	CLSI – rezazurin 24 hod.	0,0968	0,5975	0,1073	-0,1224	0,3159	0,374	0,366



Graf 3 Grafické znázornění výsledků oboustranných p-hodnot testování **meropenemu**, srovnání standardní metody vyšetření baktericidie séra dle CLSI a ostatních modifikací Wilcoxon Signed Ranks Testu.

Zkratky: Δ Tb - změna turbidance, SIT sérum inhibiční titr, SBT sérum bactericidní titr, CLSI - The Clinical & Laboratory Standards Institute

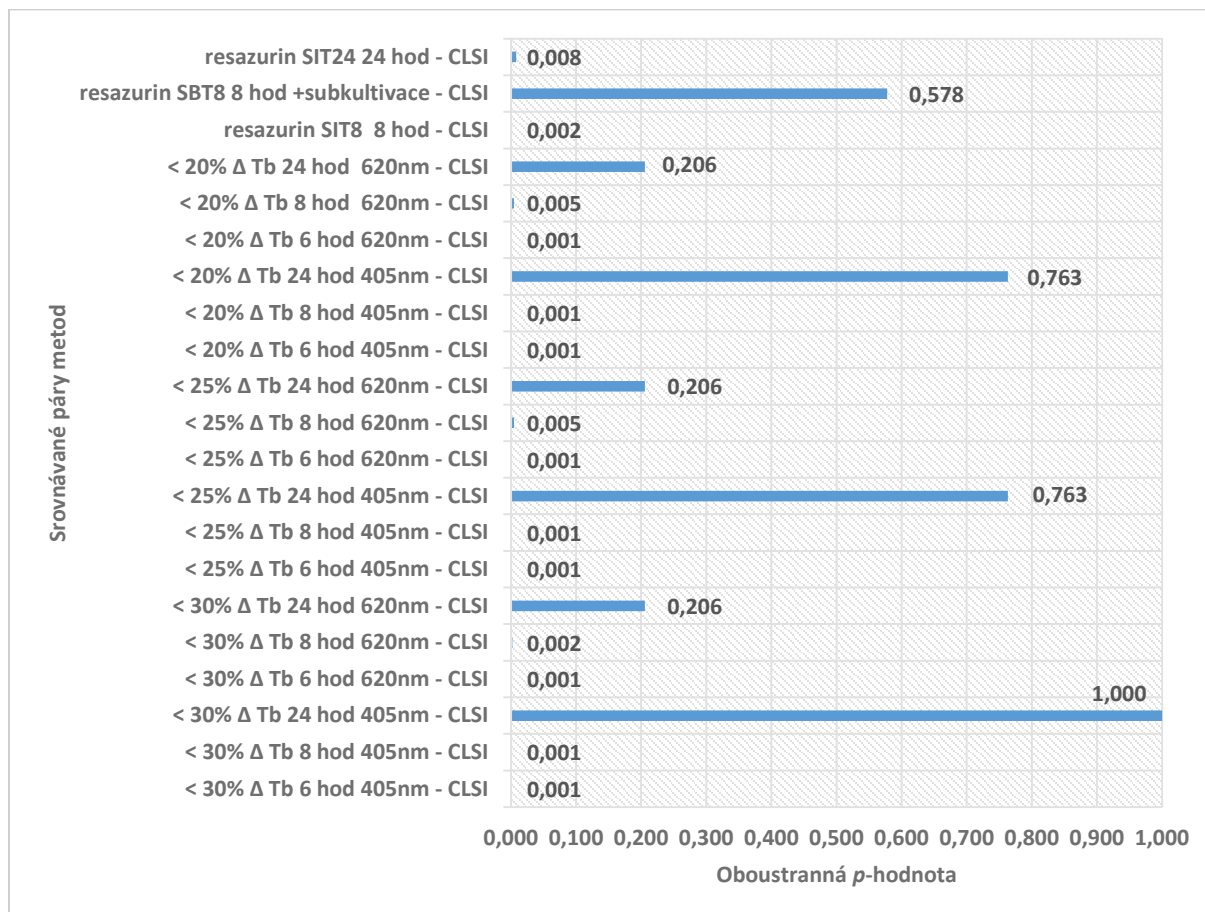
V testování baktericidie meropenemu byla dosažena nejvyšší shoda s CLSI v turbidimetrické modifikaci při měření turbidity za 24 hodin vlnovou délkou 405 nm (oboustranná p-hodnota 1,000). Zajímavým výsledkem bylo také potvrzení non-inferiorita modifikace rezazurinu za 8 i za 24 hodin (oboustranná p-hodnota 0,206, respektive 0,366).

Posledním testovaným antibiotikem byl **piperacilin/tazobaktam**. Následující Tab. 12 a Graf 4 zobrazuje statistické výsledky srovnání metody CLSI s testovanými metodikami.

Tabulka 12 Statistické zpracování testování piperacilin/tazobaktamu, srovnání standardní metody vyšetření baktericidie séra dle CLSI a ostatních modifikací užitím párového t-testu (Paired Samples Test, zkratka PST) – červená čísla, Wilcoxon Signed Ranks Testu – modrá čísla (zkratka WSRT), statisticky významná non-inferiorita pro $p > 0,05$ označena tučně

Páry	Porovnávané metody	Párové rozdíly					p-hodnota oboustr. (PST)	p-hodnota oboustr. (WSRT)
		Průměr	Směrodatná odchylka	Stand. chyba průměru	95% interval spolehlivosti			
					Dolní	Horní		
Pár 1	CLSI – 30% ΔTb 6 hod. 405 nm	-0,7097	1,0706	0,1923	-1,1024	-0,3170	0,001	0,001
Pár 2	CLSI – 30% ΔTb 8 hod. 405 nm	-0,5484	0,7229	0,1298	-0,8135	-0,2832	0,000	0,001
Pár 3	CLSI – 30% ΔTb 24 hod. 405 nm	0,0000	0,5774	0,1037	-0,2118	0,2118	1,000	1,000
Pár 4	CLSI – 30% ΔTb 6 hod. 620 nm	-0,6774	1,1072	0,1989	-1,0835	-0,2713	0,002	0,001
Pár 5	CLSI – 30% ΔTb 8 hod. 620 nm	-0,4839	0,7244	0,1301	-0,7496	-0,2182	0,001	0,002
Pár 6	CLSI – 30% ΔTb 24 hod. 620 nm	0,1290	0,5623	0,1010	-0,0772	0,3353	0,211	0,206
Pár 7	CLSI – 25% ΔTb 6 hod. 405 nm	-0,6774	0,9447	0,1697	-1,0239	-0,3309	0,000	0,001
Pár 8	CLSI – 25% ΔTb 8 hod. 405 nm	-0,5484	0,7229	0,1298	-0,8135	-0,2832	0,000	0,001
Pár 9	CLSI – 25% ΔTb 24 hod. 405 nm	0,0323	0,6046	0,1086	-0,1895	0,2540	0,768	0,763
Pár 10	CLSI – 25% ΔTb 6 hod. 620 nm	-0,6774	1,1072	0,1989	-1,0835	-0,2713	0,002	0,001
Pár 11	CLSI – 25% ΔTb 8 hod. 620 nm	-0,4516	0,7676	0,1379	-0,7332	-0,1700	0,003	0,005
Pár 12	CLSI – 25% ΔTb 24 hod. 620 nm	0,1290	0,5623	0,1010	-0,0772	0,3353	0,211	0,206
Pár 13	CLSI – 20% ΔTb 6 hod. 405 nm	-0,6774	0,9447	0,1697	-1,0239	-0,3309	0,000	0,001
Pár 14	CLSI – 20% ΔTb 8 hod. 405 nm	-0,5161	0,6768	0,1216	-0,7644	-0,2679	0,000	0,001
Pár 15	CLSI – 20% ΔTb 24 hod. 405 nm	0,0323	0,6046	0,1086	-0,1895	0,2540	0,768	0,763
Pár 16	CLSI – 20% ΔTb 6 hod. 620 nm	-0,6129	0,8823	0,1585	-0,9365	-0,2893	0,001	0,001
Pár 17	CLSI – 20% ΔTb 8 hod. 620 nm	-0,4516	0,7676	0,1379	-0,7332	-0,1700	0,003	0,005

Pár 18	CLSI – 20% ΔTb 24 hod. 620 nm	0,1290	0,5623	0,1010	-0,0772	0,3353	0,211	0,206
Pár 19	CLSI – rezazurin 8 hod.	-0,5484	0,7676	0,1379	-0,8300	-0,2668	0,000	0,002
Pár 20	CLSI – rezazurin 8 hod. + subkultivace	-0,1300	1,7100	0,3100	-0,7600	0,5000	0,677	0,578
Pár 21	CLSI – rezazurin 24 hod.	-0,3871	0,7154	0,1285	-0,6495	-0,1247	0,005	0,008



Graf 4 Grafické znázornění výsledků oboustranných p-hodnot testování piperacilin/tazobaktamu, srovnání standardní metody vyšetření baktericidie séra dle CLSI a ostatních modifikací Wilcoxon Signed Ranks Testu

Zkratky: ΔTb - změna turbidance, SIT sérum inhibiční titr, SBT sérum bactericidní titr, CLSI - The Clinical & Laboratory Standards Institute

V testování baktericidie piperacilin-tazobaktamu vykazovala nejvyšší shodu modifikace měření turbidimetrie za 24 hodin za použití vlnové délky 405 nm a hraniční hodnoty < 30 % změna turbidity (oboustranná p-hodnota 1,000). Jako non-inferiorní se ukázaly také turbidimetrické metody při použití všech hraničních hodnot (< 20 %, < 25 % i < 30 %) i obou

vlnových délek. Vyšší hodnoty oboustranného p mělo ale měření za použití vlnové délky 405 nm.

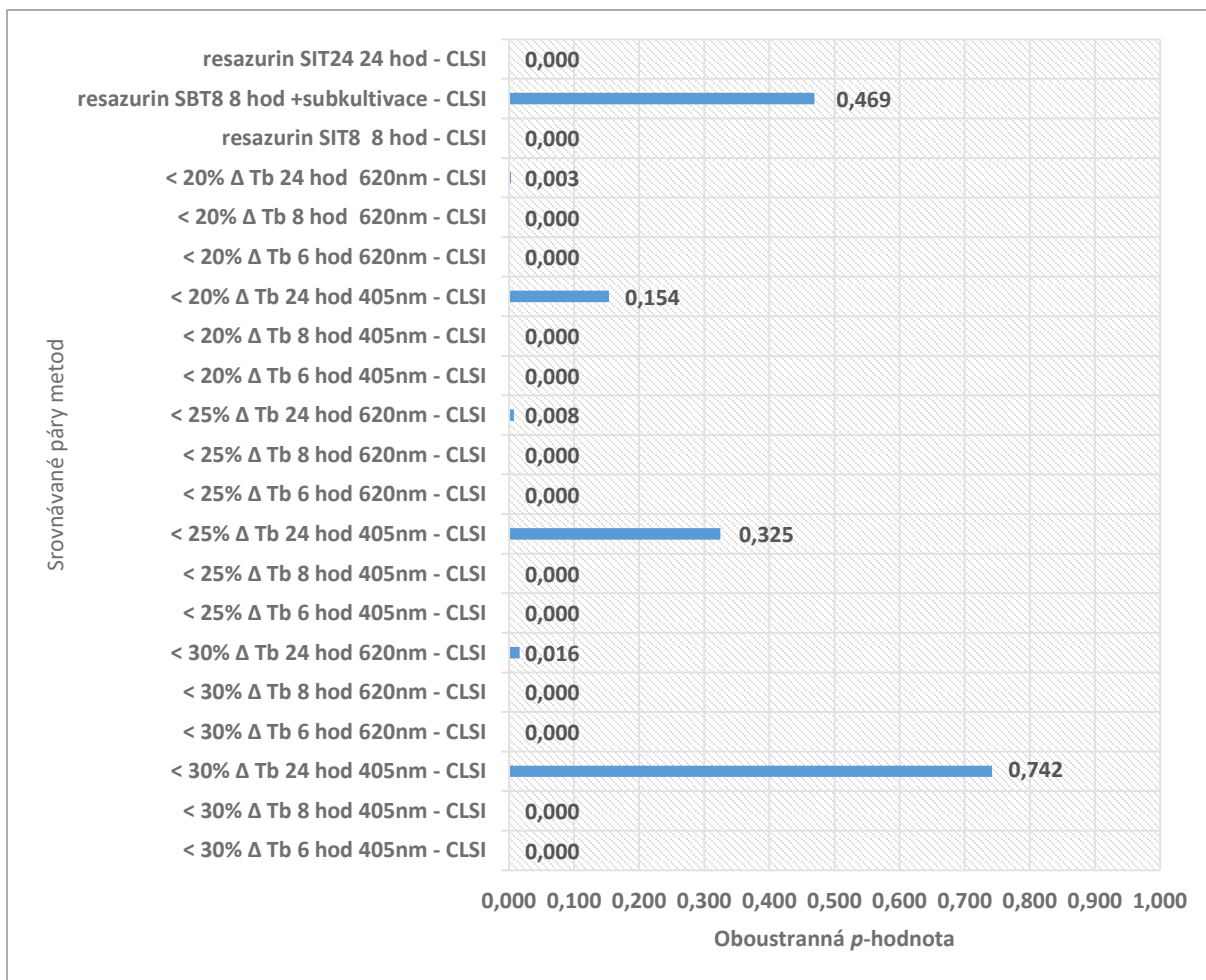
Souhrnný přehled statistických výsledků oboustranných p -hodnot srovnání non-inferiority modifikací s metodikou CLSI pro všechna testovaná antibiotika současně viz následující Tab. 13 a Graf 5.

Tabulka 13 Statistické zpracování testování všech antibiotik, srovnání standardní metody vyšetření baktericidie séra dle CLSI a ostatních modifikací užitím párového t-testu (Paired Samples Test, zkratka PST) – červená čísla, Wilcoxon Signed Ranks Testu – modrá čísla (zkratka WSRT), statisticky významná non-inferiorita pro $p > 0,05$ označena tučně

Páry	Porovnávané metody	Párové rozdíly					p -hodnota oboustr. (PST)	p -hodnota oboustr. (WSRT)
		Průměr	Směrodatná odchylka	Stand. chyba průměru	95% Interval spolehlivosti			
					Dolní	Horní		
Pár 1	CLSI – 30% Δ Tb 6 hod. 405 nm	-0,8952	1,1392	0,1023	-1,0977	-0,6927	0,000	0,000
Pár 2	CLSI – 30% Δ Tb 8 hod. 405 nm	-0,5968	0,7427	0,0667	-0,7288	-0,4648	0,000	0,000
Pár 3	CLSI – 30% Δ Tb 24 hod. 405 nm	0,0081	0,5630	0,0506	-0,0920	0,1081	0,874	0,742
Pár 4	CLSI – 30% Δ Tb 6 hod. 620 nm	-0,8468	1,1120	0,0999	-1,0444	-0,6491	0,000	0,000
Pár 5	CLSI – 30% Δ Tb 8 hod. 620 nm	-0,5484	0,7253	0,0651	-0,6773	-0,4195	0,000	0,000
Pár 6	CLSI – 30% Δ Tb 24 hod. 620 nm	0,1129	0,5134	0,0461	0,0216	0,2042	0,016	0,016
Pár 7	CLSI – 25% Δ Tb 6 hod. 405 nm	-0,8629	1,1068	0,0994	-1,0596	-0,6662	0,000	0,000
Pár 8	CLSI – 25% Δ Tb 8 hod. 405 nm	-0,5806	0,7336	0,0659	-0,7110	-0,4502	0,000	0,000
Pár 9	CLSI – 25% Δ Tb 24 hod. 405 nm	0,0403	0,5759	0,0517	-0,0621	0,1427	0,437	0,325
Pár 10	CLSI – 25% Δ Tb 6 hod. 620 nm	-0,8226	1,0899	0,0979	-1,0163	-0,6288	0,000	0,000
Pár 11	CLSI – 25% Δ Tb 8 hod. 620 nm	-0,5081	0,7489	0,0673	-0,6412	-0,3749	0,000	0,000
Pár 12	CLSI – 25% Δ Tb 24 hod. 620 nm	0,1290	0,5253	0,0472	0,0357	0,2224	0,007	0,008
Pár 13	CLSI – 20% Δ Tb 6 hod. 405 nm	-0,8306	1,0259	0,0921	-1,0130	-0,6483	0,000	0,000
Pár 14	CLSI – 20% Δ Tb 8 hod. 405 nm	-0,5565	0,7247	0,0651	-0,6853	-0,4276	0,000	0,000

Pár 15	CLSI – 20% ΔTb 24 hod. 405 nm	0,0645	0,5946	0,0534	-0,0412	0,1702	0,229	0,154
Pár 16	CLSI – 20% ΔTb 6 hod. 620 nm	-0,7823	1,0166	0,0913	-0,9630	-0,6015	0,000	0,000
Pár 17	CLSI – 20% ΔTb 8 hod. 620 nm	-0,4758	0,7594	0,0682	-0,6108	-0,3408	0,000	0,000
Pár 18	CLSI – 20% ΔTb 24 hod. 620 nm	0,1613	0,5897	0,0530	0,0565	0,2661	0,003	0,003
Pár 19	CLSI – resazurin 8 hod.	-0,5081	0,8313	0,0746	-0,6558	-0,3603	0,000	0,000
Pár 20	CLSI – resazurin 8 hod. + subkultivace	-0,2300	0,7600	0,1400	0,5100	0,0500	0,423	0,469
Pár 21	CLSI – resazurin 24 hod.	-0,3226	0,7162	0,0643	-0,4499	-0,1953	0,000	0,000

Po statistickém zpracování výsledků shody testování modifikací vyšetření baktericidie všech antibiotik vykazovala nejlepší shodu a non-inferioritu turbidimetrická metoda při měření za 24 hodin za použití vlnové délky 405 nm. Nejvyšší oboustranná *p*-hodnota 0,742 patřila hraniční hodnotě SIT < 30% změny turbidity. Z modifikací barvení resazurinem vychází nejlépe barvení za 8 hodin inkubace a poté stanovení baktericidie vyočkováním a subkultivací, kdy výsledky jsou k dispozici za 24 hodin.



Graf 5 Grafické znázornění výsledků oboustranných p-hodnot testování všech antibiotik srovnání standardní metody vyšetření baktericidie séra dle CLSI a ostatních modifikací Wilcoxon Signed Ranks Testu, na ose x vyznačena hodnota oboustranné p-hodnoty, statisticky signifikantní non-inferiorita $p > 0,05$

Zkratky: ΔTb - změna turbidance, SIT sérum inhibiční titr, SBT sérum baktericidní titr, CLSI - The Clinical & Laboratory Standards Institute

10.2 VÝSLEDKY TESTOVÁNÍ BAKTERICIDIE SÉRA

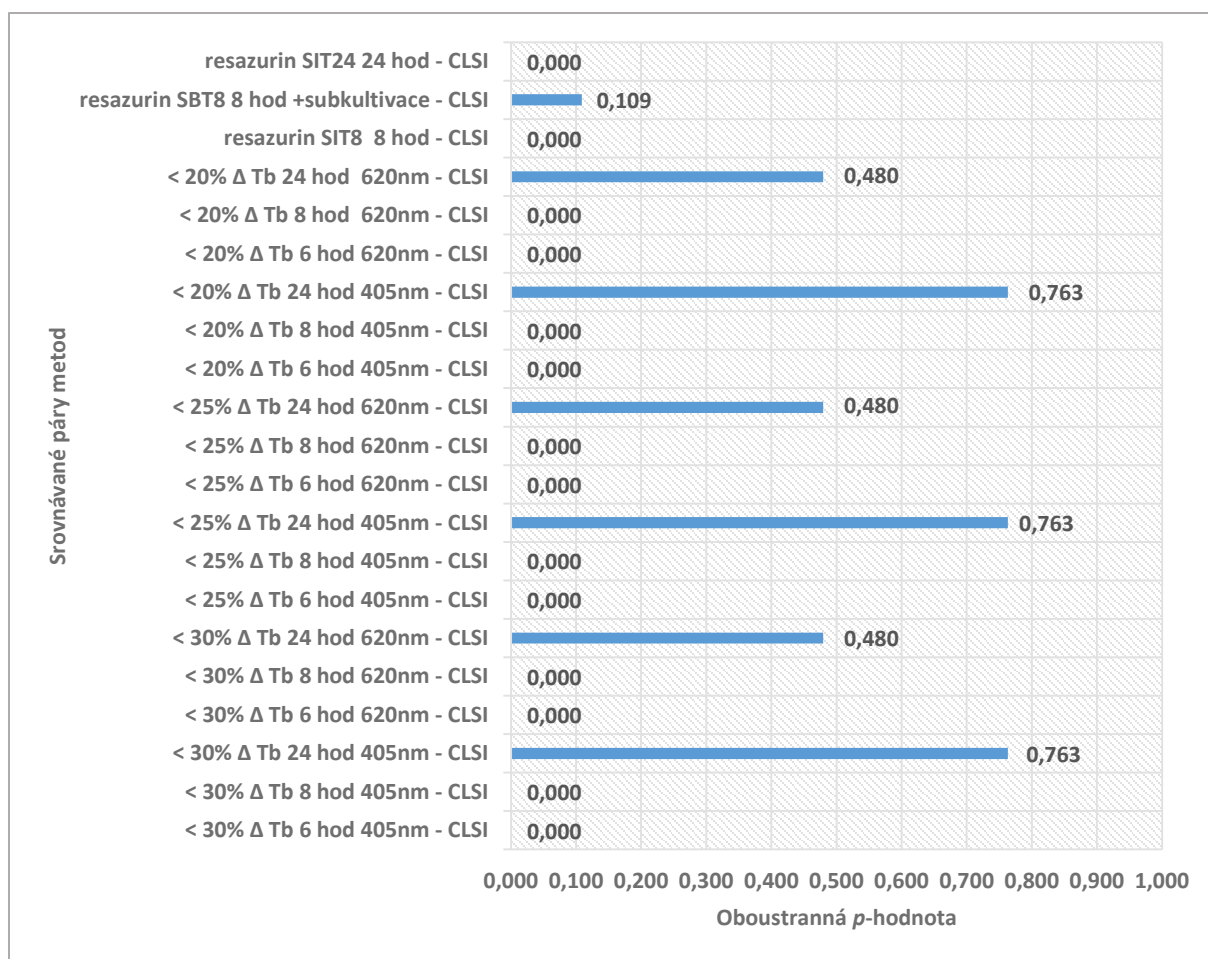
Celkem bylo otestováno 76 sér pacientů léčených piperacilinem/tazobaktamem a dalšími antibiotiky (viz Tab. 8). Srovnání testování baktericidie séra standardní metodou dle CLSI a ostatních modifikací zpracovaných jednotlivými statistickými testy je zobrazeno v následujících tabulkách. V Tab. 14 jsou uvedeny statistické výsledky srovnání při použití párového Studentova t-testu (PST) a Wilcoxon Signed Ranks Testu (WSRT). Přehledně graficky jsou oboustranné p -hodnoty viz Graf 6.

Tabulka 14 Výsledky statistického zpracování srovnání standardní metody vyšetření baktericidie séra dle CLSI a ostatních modifikací užitím Studentova párového t-testu (Paired Samples Test, zkratka PST) – červená čísla, Wilcoxon Signed Ranks Testu – modrá čísla (zkratka WSRT), tučně zobrazeny p -hodnoty se statisticky významnou non-inferiorností (oboustranné $p > 0,05$)

Páry	Porovnávané metody	Párové rozdíly					p -hodnota oboustr. (PST)	p -hodnota oboustr. (WSRT)
		Průměr	Směrodatná odchylka	Stand. chyba průměru	95% Interval spolehlivosti			
					Dolní	Horní		
Pár 1	CLSI – 30% Δ Tb 6 hod. 405 nm	-0,5000	0,7394	0,0848	-0,6690	-0,3310	0,000	0,000
Pár 2	CLSI – 30% Δ Tb 8 hod. 405 nm	-0,3158	0,6969	0,0799	-0,4750	-0,1566	0,000	0,000
Pár 3	CLSI – 30% Δ Tb 24 hod. 405 nm	-0,0658	0,6992	0,0802	-0,2256	0,0940	0,415	0,410
Pár 4	CLSI – 30% Δ Tb 6 hod. 620 nm	-0,3158	0,7341	0,0842	-0,4835	-0,1480	0,000	0,001
Pár 5	CLSI – 30% Δ Tb 8 hod. 620 nm	-0,2632	0,6607	0,0758	-0,4141	-0,1122	0,001	0,001
Pár 6	CLSI – 30% Δ Tb 24 hod. 620 nm	-0,0263	0,7298	0,0837	-0,1931	0,1405	0,754	0,758
Pár 7	CLSI – 25% Δ Tb 6 hod. 405 nm	-0,4342	0,7888	0,0905	-0,6145	-0,2540	0,000	0,000
Pár 8	CLSI – 25% Δ Tb 8 hod. 405 nm	-0,2895	0,6893	0,0791	-0,4470	-0,1320	0,000	0,001
Pár 9	CLSI – 25% Δ Tb 24 hod. 405 nm	-0,0526	0,7098	0,0814	-0,2148	0,1096	0,520	0,514
Pár 10	CLSI – 25% Δ Tb 6 hod. 620 nm	-0,2632	0,7549	0,0866	-0,4357	-0,0907	0,003	0,004
Pár 11	CLSI – 25% Δ Tb 8 hod. 620 nm	-0,1842	0,6675	0,0766	-0,3368	-0,0317	0,019	0,000
Pár 12	CLSI – 25% Δ Tb 24 hod. 620 nm	-0,1053	0,6649	0,0763	-0,2572	0,0467	0,172	0,168
Pár 13	CLSI – 20% Δ Tb 6 hod. 405 nm	-0,4342	0,7888	0,0905	-0,6145	-0,2540	0,000	0,000

Pár 14	CLSI – 20% ΔTb 8 hod. 405 nm	-0,2632	0,6806	0,0781	-0,4187	-0,1076	0,001	0,002
Pár 15	CLSI – 20% ΔTb 24 hod. 405 nm	-0,0526	0,7098	0,0814	-0,2148	0,1096	0,520	0,514
Pár 16	CLSI – 20% ΔTb 6 hod. 620 nm	-0,2105	0,7885	0,0904	-0,3907	-0,0303	0,023	0,023
Pár 17	CLSI – 20% ΔTb 8 hod. 620 nm	-0,1579	0,6743	0,0774	-0,3120	-0,0038	0,045	0,045
Pár 18	CLSI – 20% ΔTb 24 hod. 620 nm	-0,1053	0,6649	0,0763	-0,2572	0,0467	0,172	0,168
Pár 19	CLSI – resazurin 8 hod.	-0,2368	0,6505	0,0746	-0,3855	-0,0882	0,002	0,002
Pár 20	CLSI – resazurin 8 hod. + subkultivace	0,0789	0,0789	0,0642	-0,0490	0,2069	0,223	0,221
Pár 21	CLSI – resazurin 24. hod	0,1842	0,1842	0,0668	0,0512	0,3172	0,007	0,008

Jako non-inferiorní s nejvyšší oboustrannou p -hodnotou byly shledány modifikace s použitím turbidimetrie měřením při vlnové délce 620 nm s break-pointem < 30 % ΔTb v čase inkubace 24 hodin (oboustranná $p = 0,758$), při vlnové délce 405 nm s hraniční hodnotou < 20% nebo < 25% ΔTb v čase inkubace 24 hodin (oboustranná $p = 0,514$ obě). Také modifikace barvení resazurinem se statisticky neliší od referenční metody CLSI v modifikaci barvení po 8 hodinách inkubace se subkultivací přímou inokulací negativních jamek na agary s konečným výsledkem v čase 24 hodin (oboustranná $p = 0,221$).



Graf 6 Grafické znázornění hodnocení statistické významnosti srovnáním výsledků při užití Wilcoxon Signed Ranks Testu, na ose x vyznačena hodnota oboustranné p-hodnoty, statisticky signifikantní non-inferiorita oboustranné $p > 0,05$

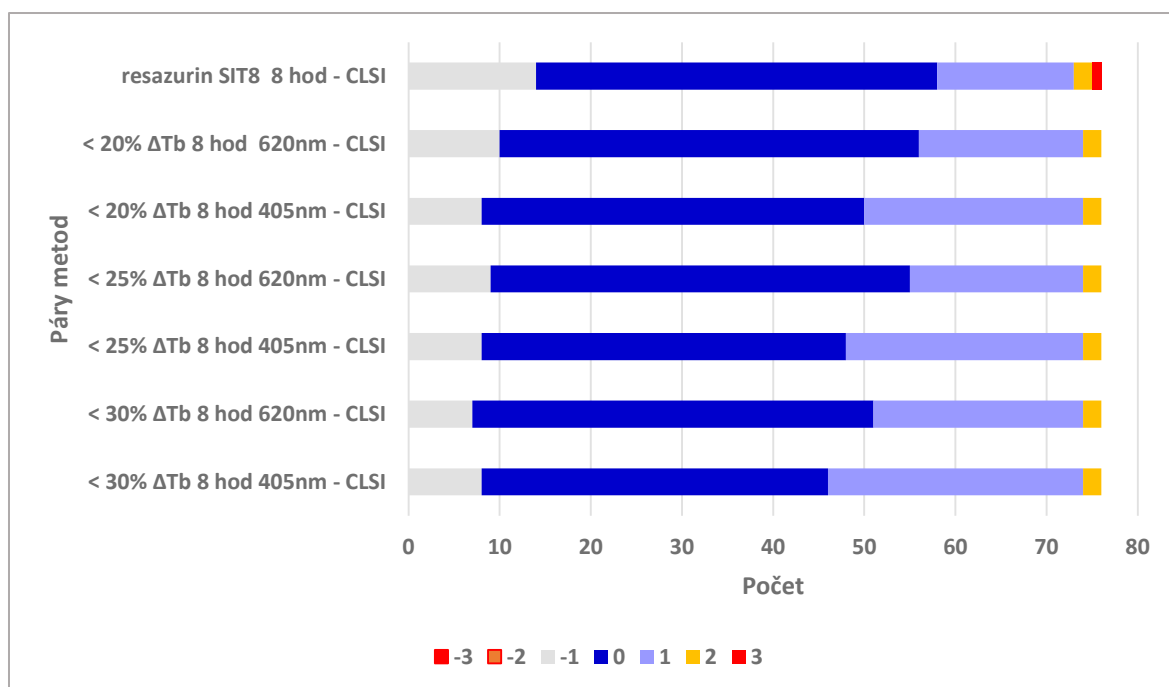
Zkratky: ΔTb - změna turbidance, SIT sérum inhibiční titr, SBT sérum baktericidní titr, CLSI - The Clinical & Laboratory Standards Institute

Variabilitu odchylek výsledků testování všech metod po 8 a 24 hodinách od standardní metody CLSI viz Tab. 15. Jednotlivé barevné kategorie značí odchylku v ředění séra log₂ od metody CLSI (0 = shoda s SBT, -1, +1 odchylka o ± 1 ředění log₂, -2, +2 odchylka o ± 2 ředění log₂, -3, +3 odchylka o ± 3 ředění log₂). Největší rozptyl výsledků testování byl zaznamenán u metodiky barvení resazurinem po 8 hodinách inkubace (min -1 ředění log₂, max +3 ředění log₂).

Tabulka 15 Rozložení odchylek výsledků modifikací od standardního vyšetření baktericidie dle CLSI, čísla v tabulce ozačují odchylku log₂ výsledků ředění séra (0 = v souladu s CLSI, -1, 1 = odchylka ± 1 ředění log₂, -2, 2 = odchylka ± 2 ředění séra log₂, -3, 3 = odchylka ± 3 ředění séra log₂, záporná čísla značí výsledek v nižším ředění než standard, kladná čísla značí výsledek modifikace ve vyšším ředění než standard CLSI)

30% změna turbidance	6 hod. 405 nm	8 hod. 405 nm	24 hod. 405 nm	6 hod. 620 nm	8 hod. 620 nm	24 hod. 620 nm
min	-1	-1	-2	-1	-1	-2
max	2	2	2	2	2	2
průměr	0,5	0,5	0	0,5	0,5	0
medián	0	0	0	0	0	0
25% změna turbidance						
25% změna turbidance	6 hod. 405 nm	8 hod. 405 nm	24 hod. 405 nm	6 hod. 620 nm	8 hod. 620 nm	24 hod. 620 nm
min	-2	-1	-2	-1	-1	-1
max	2	2	2	2	2	2
průměr	0	0,5	0	0,5	0,5	0,5
medián	0	0	0	0	0	0
20% změna turbidance						
20% změna turbidance	6 hod. 405 nm	8 hod. 405 nm	24 hod. 405 nm	6 hod. 620 nm	8 hod. 620 nm	24 hod. 620 nm
min	-2	-1	-2	-1	-1	-1
max	2	2	2	2	2	2
průměr	0	0,5	0	0,5	0,5	0,5
medián	0	0	0	0	0	0
resazurin						
resazurin	8 hod.	8 hod. + subkul-tivace	24 hod.			
min	-1	-1	-2			
max	3	2	1			
průměr	1	0,5	-0,5			
medián	0	0	0			

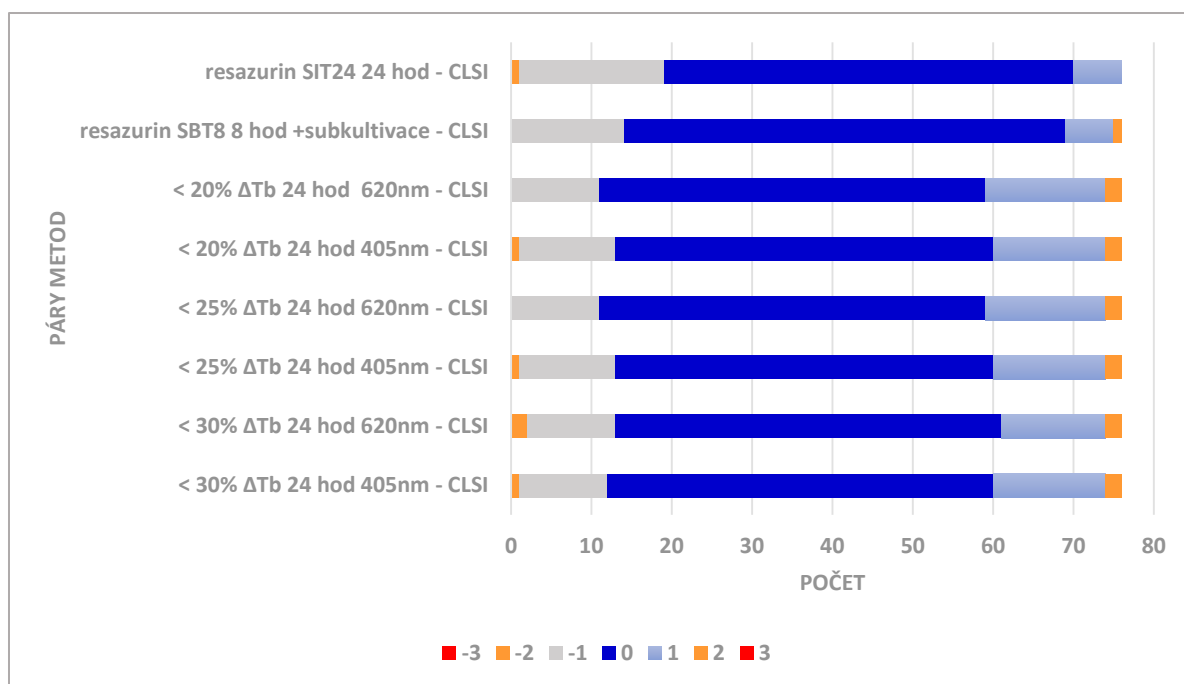
Podrobnější rozbor rozložení odchylek výsledků jednotlivých modifikací od standardní metodiky CLSI viz Graf 7 a Graf 8.



Graf 7 Rozložení odchylek testování modifikací od výsledku CLSI po 8 hodinách inkubace, barevné kategorie ukazují odchylku log₂ v ředění séra (0 = v souladu s CLSI, -1, 1 = odchylka ± 1 ředění log₂, -2, 2 = odchylka ± 2 ředění séra log₂, -3, 3 = odchylka ± 3 ředění séra log₂)

Zkratky: ΔTb - změna turbidance, SIT sérum inhibiční titr, CLSI - The Clinical & Laboratory Standards Institute)

Výsledky všech metod využívajících turbidimetrii osmihodinové inkubaci vykazují shodu pouze 56,4 % (min 50,5 %, max 60,5 %) a jsou statisticky odlišné (oboustranná $p = 0,000-0,045$). Avšak pokud přijmeme odchylku jednoho ředění jako přijatelnou, je shoda metod turbidimetrie po 8 hodinách 97,2 %. Metoda barvením resazurinem po 8 hodinách vykazuje úplnou shodu 57,9 %, při přijetí shody 1 ředění jako přijatelné odchylky je shoda 96,1 %. Tato metoda ale měla po 8 hodinách v 3,9 % neakceptovatelný rozptyl až +3 ředění, kdy by titer SBT byl falešně vysoký, shoda s CLSI není statisticky potvrzená (oboustranná $p = 0,02$).



Graf 8 Rozložení odchylek testování modifikací od výsledku CLSI po 24 hodinách inkubace, barevné kategorie ukazují odchylku log₂ v ředění séra (0 = v souladu s CLSI, -1, 1 = odchylka ± 1 ředění log₂, -2, 2 = odchylka ± 2 ředění séra log₂, -3, 3 = odchylka ± 3 ředění séra log₂)

Zkratky: ΔTb - změna turbidance, SIT sérum inhibiční titr, SBT sérum baktericidní titr, CLSI - The Clinical & Laboratory Standards Institute)

Po 24 hodinách inkubace vykazovala modifikace s měřením turbidimetrie v průměru 62,7% úplnou shodu (min 61,8%, max 63,2%), při přijatelné odchylce jednoho ředění séra 96,3%. Tato metoda vyšla jako statisticky non-inferiorní v podmínkách měření při vlnové délce 620 nm s hraniční hodnotou < 30 % ΔTb (oboustranná $p = 0,758$), při vlnové délce 405 nm s hraniční hodnotou < 20 % nebo < 25 % ΔTb (oboustranná $p = 0,514$ pro obě hodnoty).

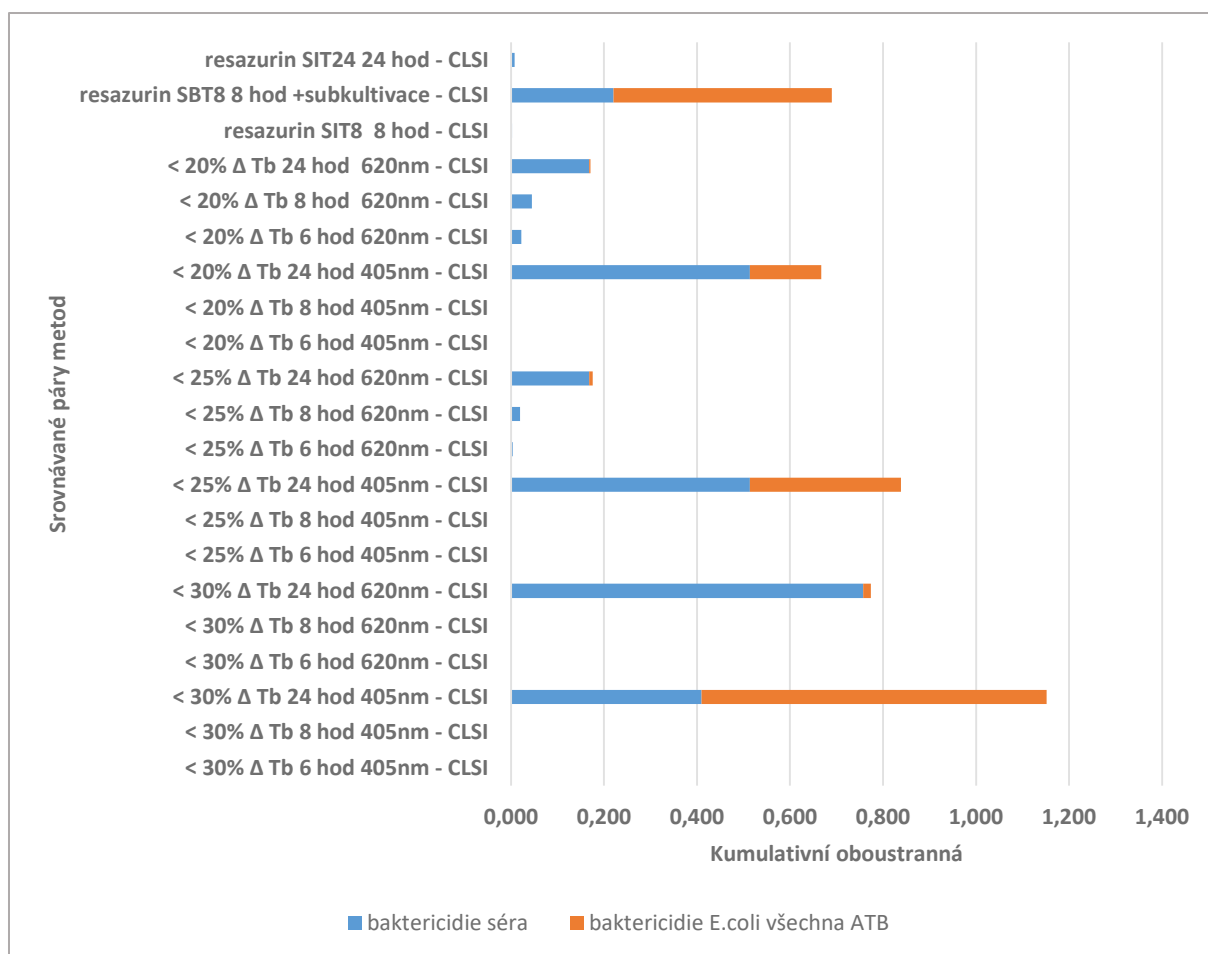
Testování SBT za použití turbidimetrie je statisticky non-inferiorní s CLSI pouze při měření po 24 hodinách, přestože jsou výsledky shody obdobné po 8 i 24 hodinách (úplná shoda po 24 hod 62,7 %, s odchylkou jednoho ředění 96,1 %, úplná shoda po 8 hodinách 56,4 %, odchylka jednoho ředění 97,2 %).

10.3 CELKOVÉ VÝSLEDKY

V následující Tab. 16 a Grafu 9 jsou uvedeny souhrnné výsledky srovnání testování jednotlivých modifikací s metodikou CLSI za užití Wilcoxon Signed Ranks Testu.

čTabulka 16 Souhrnné výsledky srovnání testování modifikací a CLSI metod (čísla v tabulce označují oboustrannou p-hodnotu při zpracování Wilcoxon Signed Ranks Testem, statisticky významná noninferiorita metod při výsledku oboustranné p-hodnoty > 0,05 tučně červeně zvýrazněny)

Provnávané páry metod		Bakteridie séra	Všechna ATB	Amikacin	Gentamicin	Meropenem	Piperacilin tazobaktam
Pár 1	CLSI – 30% ΔTb 6 hod. 405 nm	0,000	0,000	0,000	0,000	0,014	0,001
Pár 2	CLSI – 30% ΔTb 8 hod. 405 nm	0,000	0,000	0,000	0,000	0,034	0,001
Pár 3	CLSI – 30% ΔTb 24 hod 405 nm	0,410	0,742	0,763	0,317	0,564	1,000
Pár 4	CLSI – 30% ΔTb 6 hod. 620 nm	0,001	0,000	0,000	0,000	0,014	0,001
Pár 5	CLSI – 30% ΔTb 8 hod. 620 nm	0,001	0,000	0,000	0,001	0,014	0,002
Pár 6	CLSI – 30% ΔTb 24 hod 620 nm	0,758	0,016	0,480	0,020	0,414	0,206
Pár 7	CLSI – 25% ΔTb 6 hod. 405 nm	0,000	0,000	0,000	0,000	0,014	0,001
Pár 8	CLSI – 25% ΔTb 8 hod. 405 nm	0,001	0,000	0,000	0,000	0,025	0,001
Pár 9	CLSI – 25% ΔTb 24 hod 405 nm	0,514	0,325	0,763	0,096	1,000	0,763
Pár 10	CLSI – 25% ΔTb 6 hod. 620 nm	0,004	0,000	0,000	0,000	0,011	0,001
Pár 11	CLSI – 25% ΔTb 8 hod. 620 nm	0,020	0,000	0,000	0,005	0,014	0,005
Pár 12	CLSI – 25% ΔTb 24 hod 620 nm	0,168	0,008	0,480	0,007	0,414	0,206
Pár 13	CLSI – 20% ΔTb 6 hod. 405 nm	0,000	0,000	0,000	0,000	0,011	0,001
Pár 14	CLSI – 20% ΔTb 8 hod. 405 nm	0,002	0,000	0,000	0,000	0,025	0,001
Pár 15	CLSI – 20% ΔTb 24 hod 405 nm	0,514	0,154	0,763	0,096	0,257	0,763
Pár 16	CLSI – 20% ΔTb 6 hod. 620 nm	0,023	0,000	0,000	0,000	0,035	0,001
Pár 17	CLSI – 20% ΔTb 8 hod. 620 nm	0,045	0,000	0,000	0,012	0,059	0,005
Pár 18	CLSI – 20% ΔTb 24 hod 620 nm	0,168	0,003	0,480	0,008	0,157	0,206
Pár 19	CLSI –resazurin 8 hod.	0,002	0,000	0,000	0,001	0,206	0,002
Pár 20	CLSI –resazurin 8 hod. + subkultivace	0,221	0,469	0,109	0,822	0,000	0,578
Pár 21	CLSI –resazurin 24 hod.	0,008	0,000	0,001	0,003	0,366	0,005



Graf 9 Grafické znázornění kumulativní oboustranné p-hodnoty při užití Wilcoxon Signed Ranks Testu, na ose x kumulativní oboustranná p-hodnota, která je definována jako součet oboustranných p-hodnot baktericidie séra a všech antibiotik, statisticky signifikantní non-inferiorita jednotlivých oboustranných $p > 0,05$

Zkratky: ΔTb - změna turbidance, SIT sérum inhibiční titr, SBT sérum baktericidní titr, CLSI - The Clinical & Laboratory Standards Institute)

Při srovnávání obou druhů testování se ozřejmily některé rozdíly: testování baktericidie antibiotik vykázalo non-inferiorní výsledky až v testování po 24 hodinách. Všechny modifikace, které byly odečítány dříve, neměly dostatečnou shodu s CLSI. Pro testování modifikace s měřením turbidimetrie byly non-inferiorní výsledky při použití vlnové délky spektrofotometru 405 nm, nejvyšší oboustranné p-hodnoty při použití hraniční změny < 30% změny turbidance.

Naopak při testování baktericidie séra nebyl velký rozdíl v použité vlnové délky (srovnatelné výsledky oboustranné p-hodnoty byly při použití vlnové délky 405 nm i 620 nm také až při testování za 24 hodin inkubace. Pouze modifikace měření turbidimetrie 620 nm < 20 %

změny turbidance vykazovala vyšší oboustrannou p -hodnotou 0,045 při měření po 8 hodinách inkubace, jež ale nedosáhla non-inferiority ($> 0,05$).

Metoda barvení resazurinem podala v navržené modifikaci konzistentní výsledky v testování MBC i SBT. Výsledky vykazovaly non-inferioritu pouze při barvení po 8 hodinách a následné subkultivaci negativních jamek mikrotitrační destičky. Výsledky odečtu jsou tak k dispozici také po 24 hodinách testování.

11 DISKUZE

Testování sérových koncentrací antibiotika je nejčastěji užívanou metodou k laboratornímu ověření účinnosti antibiotické terapie. Jednou z limitací těchto testování je, že sice precizně kvantifikuje koncentraci léčiva, ta však nemusí reprezentovat jeho reálnou biologickou aktivitu v séru. Druhou nevýhodou je, že v převážné většině je stanovena celková koncentrace antibiotika bez ohledu na to, že část antibiotika je vázána na sérové proteiny. Na začátku analýzy totiž dochází různými metodami k vyvázání antibiotika z proteinové vazby. Výsledná hodnota tak ve většině případů neukazuje opravdovou koncentraci aktivní frakce, která není navázaná na bílkoviny krevní plazmy, ale celkovou koncentraci antibiotika (Adámek 2008).

Pro testování skutečné antimikrobiální aktivity se jeví jako výhodnější testování SBT, které v neředěném séru pacienta reprezentuje výsledek společného působení acelulárních složek přirozené imunity a antibiotik. Při testování séra v ředící řadě, kdy je sérum ředěno bujonem, se složky přirozené imunity oslabují a pozitivní výsledek je způsoben převážně účinkem antibiotik. Výsledek SBT je úměrný koncentraci aktivní složky antibiotika. Čím vyšší koncentrace, tím je SBT prokázán ve vyšším ředění séra.

V kontextu, kdy lze SBT využít s různým cílem v různých klinických situacích, je omezujícím faktorem rutinního použití čas do výsledku testování. Výsledek SBT je při standardním testování znám až za mnoho dní: první den proběhne odběr séra, druhý den je provedena inokulace, třetí den vyhodnocení sérum inibiční titr, čtvrtý a pátý den vyhodnocení SBT. Faktor času není tak závažný u dlouhodobě léčených pacientů (např. při léčbě osteomyelitidy nebo infekční endokarditidy). Pro využití u pacientů s akutními infekcemi však hraje čas zásadní roli. Do první linie volby v terapii kriticky nemocných pacientů patří beta-laktamová antibiotika vzhledem k širokému antimikrobiálnímu spektru a nízké toxicitě, zvláště pokud je podezření na infekci gram-negativními bakteriemi. Při léčbě akutních infekcí není účinnost antibiotika jednoduché zhodnotit, klinická odpověď je obvykle hodnotitelná až po 48 hodinách terapie (Gonçalves-Pereira a Póvoa 2011).

Při použití testovaných modifikací pro **turbidimetrické měření** SBT by bylo možné vydat výsledky srovnatelné s CLSI již druhý den testování, tedy po 24 hodinách inkubace. Výhodou turbidimetrie je, že je vhodná pro mikrometody a k detekci a kvantifikaci výsledného signálu lze použít přístroje typu spektrofotometr, který je běžnou součástí mikrobiologické laboratoře. Z našich výsledků vyplývá, že přestože pro testy baktericidie antibiotik je vhodnější využít vlnovou délku 405 nm, testovat SBT je možné jak vlnovou délkou 405 nm, tak použít 620 nm. Naopak se jako výhodnější zdá vlnová délka 620 nm, která může vydat předběžné výsledky již po 8 hodinách inkubace při použití hraniční hodnoty změny turbidance 20 % od základní hodnoty.

Měření turbidity je však možné pouze za předpokladu, že suspenze (sérum) je bezbarvá a hodnota blanku je $< 0,25$ turbidance (Štern 2006), problematické by tedy pravděpodobně bylo testování chylozních nebo hemolytických krevních sér. Při všech zákalových metodách je také důležitá homogenita vzorku. Je tedy potřeba, aby suspenze byla tvořena difúzní jemně rozptýlenými částicemi. Proto je důležité míchání nebo potřepávání před měřením. V našem pokusu byly používány spektrofotometry bez inkubátoru, proto před každým měřením bylo nutné mikrotitrační destičky vyjmout z inkubátoru, protřepat před měřením, stanovit turbidance a poté opět vložit do inkubátoru. Pro rutinní testování SBT modifikací měřením turbidimetrie by bylo vhodnější užít spektrofotometr s inkubátorem nebo vyjímat z inkubátoru a měřit co nejméně: po 2 hodinách inkubace (stanovení základní hodnoty turbidance), po poté až po 8 hodinách inkubace (pro předběžné výsledky) a 24 hodinách inkubace pro konečné výsledky.

Modifikace použití resazurinu se ukázala pro testování baktericidie antibiotik v navrženém schématu jako nevhodná metoda, oboustranné p -hodnoty se ukázaly jako non-inferiorní pouze u meropenemu (oboustranná $p = 0,366$). Naopak metodika měření turbidance vykazovala u většiny antibiotik non-inferioritu při měření po 24 hodinách, vyšší oboustranné p -hodnoty byly dosaženy při použití vlnové délky spektrofotometru 405 nm. Nejnižší shodu ve všech testováních vykazoval gentamicin (kumulativní oboustranné p -hodnoty byly pouze 0,565). Vyšší shodu dosáhl piperacilin/tazobaktam (součet všech oboustranných p -hodnot 3,173), meropenem (3,649), amikacin (3,728).

Metoda SBT barvení resazurinem v čase 24 hodin měla úplnou shodu 69,7 % v obou modifikacích (s/bez subkultivace), respektive 98,7 % při použití akceptovatelné odchylky

jednoho ředění. Přestože je vyočkování negativních jamek na agary po 8 hodinách inkubace pracnější a finančně náročnější, pouze tato modifikace SBT s resazurinem byla statisticky non-inferiorní od CLSI (oboustranné $p = 0,221$). Ačkoliv je resazurin v současné době používán v mnoha komerčních testech stanovení citlivosti bakterií i mykotických organismů, v našem testování baktericidie antibiotik nebyla potvrzena dostatečná shoda s baktericidii dle CLSI u žádného z antibiotik. Možnou příčinou, proč použití barvení resazurinem nemělo dobré výsledky, byla nestálost barvy v podmínkách krevního séra nebo CA-MHB. Vzhledem k faktu, že resazurin může mít cytotoxický účinek na buňky, pravděpodobně způsobený interferencí barviva s fyziologickou funkcí buněk (Riss *et al.* 2004), jsme zvolili variantu přidání resazurinu po 7 hodinách inkubace do všech jamek. Mikrotitrační destičku jsme poté vrátili do termostatu a další odečet barevné změny proběhl za 24 hodin od inokulace destičky, tedy za 17 hodin po přidání resazurinu. Projevila se tak nevýhoda barvení resazurinem, kdy se po čase resazurin v redukované podobě (růžový resorufin při pozitivním růstu) může měnit na bezbarvý dihydroresorufin (Rampersad 2012). Růžová barva tak po několika hodinách inkubace v termostatu vybledla a hranice barevné změny už nebyla tak jasně zřetelná. Podle literatury mohou zeslabovat reakci také některé složky séra (Goegan, Johnson and Vincent 1995). Pravděpodobně by se dalo metodicky tomuto fenoménu vyvarovat, pokud by se resazurin přidával do reakce až po 23 hodinách inkubace a odečet by probíhal následně po 1 hodině společné reakce.

K obecným nevýhodám testování SBT patří nezbytnost bezchybné preanalytické fáze (z důvodu minimalizace inaktivace antibiotika během odběru a transportu) a také precizní laboratorní práce při maximálním dodržování standardizované metodologie. Výsledek SBT závisí tak nejen na vnitřní aktivitě antibiotika a mikroorganismu, ale také na podmínkách skladování, zpracování a testování. Získané výsledky se mohou odlišovat v závislosti na velikosti inokula, růstové fázi inokula, výběru média, objemu bujony, přesnosti sběru patientských vzorků (Schwalbe, Steele-Moore a Goodwinet 2007). Proto je vhodná blízká spolupráce s klinickými lékaři tak, aby testování bylo dobře naplánováno a proběhl tak kvalitní a vysoce individuální odběr séra léčených pacientů, načasovaný v závislosti na položené otázce.

Pro testování je používán předpokládaný původce infekčního onemocnění, tedy kmen izolovaný z relevantního klinického vzorku pacienta, nejčastěji hemokultury. Limitací SBT je,

že testovat lze pouze méně náročné mikroorganismy, které dobře rostou v Mueller-Hintonově bujónu při 24 hodinové inkubaci. Vzhledem k podmínkám testu jsou nejčastěji testovány stafylokoky, enterobakterie nebo enterokoky. Kmen pacienta vstupující do reakce zamražen ve vhodném médiu, před použitím revitalizován a 3x subkultivován k zajištění optimálního růstového a metabolického stavu. Pacientův kmen však může být již poškozen probíhající antibiotickou terapií, proto je nutné použít nutričně bohaté médium pro rekonstrukci fitness bakterie. V souboru pacientů, jejichž séra byla použita k testování SBT, byla pozitivní hemokultura pouze v jednom případě, a to *Enterococcus faecalis*. Proto byla pro naše testování vybrána dobře rostoucí bakterie *E. coli* (kmeny z invazivních onemocnění izolované z hemokultivací a referenční kmen). Důvodem výběru této bakterie jako reprezentanta enterobakterií byly dobré růstové vlastnosti (generační doba 20-30 minut), schopnost růstu v běžné atmosféře a současně fakt, že *E. coli* je častým původcem invazivních infekcí provázených bakterémií, zvláště u pacientů s febrilní neutropenií. V recentním systematickém přehledu pacientů s febrilní neutropenií byly gram-negativní původci z pozitivních hemokultur izolováni ve 25-74 % a *E. coli* byla nejčastěji izolovaným patogenem (Trecarichi a Tumbarello 2014).

Variabilita SBT výsledků je minimalizována dodržováním standardizované metodologie. Výsledky sice více odrážejí situaci při lidské infekci, pokud je k testování použito lidské sérum, ale přítomnost komplementu a dalších složek přirozené imunity v séru může negativně ovlivnit přežívání mikroorganismů v testu SBT (Schwalbe, Steele-Moore a Goodwinet 2007). Pro obdobné testování: sérum baktericidní test protilátek (serum bactericidal antibody assay - SBA), který se používá k ověření imunogenicity vakcín, například očkovací látky proti infekcím, je naopak přítomnost komplementu nezbytnou součástí. Tento test měří schopnost protilátek indukovaných vakcínou zabít danou bakterii (např. *Neisseria meningitidis*). Tento test vyžaduje aktivní komplement, buď z testovaného krevního séra nebo přidání exogenního komplementu - lidského nebo králičího (Mcintosh 2015). Pro SBT se však kromě lidského séra spíše používají jiná média: pro dobře rostoucí kmeny nevyžadující speciální podmínky je nejvíce užíván Mueller-Hinton bujón obohacený ionty Ca^{2+} a Mg^{2+} (CAMHB). Toto médium bylo použito i v našem testování. Obsah iontů dosahuje hodnot obdobných fyziologickému rozmezí v lidském séru, bujón má stejnou osmolalitu a pH jako lidské sérum. Pro antibiotika s nízkou vazebností na bílkoviny je možné použít CAMHB

samotný. Výhodou tohoto média je skutečnost, že může být po krátké přípravě k dispozici pro laboratorní testování. Pouze pro antibiotika s vysokou vazebností na proteiny (např. ceftriaxon) je doporučeno přidat k CAMHB ještě lidské sérum v poměru 1:1 (Schwalbe, Steele-Moore a Goodwinet 2007). Příprava patientského séra jako diluentu v SBT je ale časově náročná, pracná, vyžaduje odběry krve navíc, ultrafiltraci séra k odstranění antibiotik a test přítomnosti beta-laktamázy. Určité výhody z důvodu menší variability složení přináší poolování séra od mnoha pacientů, které snižuje variabilitu jednotlivých sér. Pro technickou a časovou náročnost jsme sérum jako diluent ředění patientského séra v testech SBT nepoužívali.

Pro interpretaci výsledků SBT je možné vyčíst obecné doporučení: v maximální koncentraci (odběr po podání antibiotika) $SBT > 16$ znamená, že baktericidní aktivita by měla trvat $> 4x$ déle než je sérový poločas daného antibiotika (Schwalbe, Steele-Moore a Goodwinet 2007). SBT tak nepredikuje přesně a opakovatelně účinnost terapie, ale může dokumentovat, zda jsou přítomny terapeutické koncentrace, které dosahují baktericidní aktivity.

Pokud je testování SBT negativní a je vyloučena chyba v preanalytické nebo analytické fázi, antibiotikum nebo antibiotika pravděpodobně nedosahují dostatečné aktivity schopné zabít infekční agens. Nízká subinhibiční koncentrace aktivní formy antibiotika může nastat z mnoha příčin: adjustované clearance antibiotika, úniku antibiotika do velkého distribučního prostoru, antagonistickému působení dalších antibiotik, jiných současně podávaných léčiv nebo některých složek séra – nutrice, minerálů (Yang, Bening a Collins 2017, Asín-Prieto, Rodríguez-Gascón a Islan 2015). Příklad této situace popsali v kazuistické práci Schwartz s kolektivem. Jednalo se o testování SBT pacienta s infekční endokarditidou, která byla způsobena vankomycin-rezistentním enterokokem. Pacient byl léčen daptomycinem, na který byl patogen citlivý *in vitro*. Při nedostatečném klinickém účinku byla vyšetřena SBT s negativním výsledkem. Autoři předpokládají, že tento fakt byl způsoben nedostatečnou hladinou volného aktivního daptomycinu v séru vzhledem k jeho vysoké afinitě k sérovým proteinům (Schwartz, Ngo a Guglielmo 2008).

SBT byl historicky nejvíce používán při kontrole terapie závažných infekcí vyžadujících dlouhodobou antibiotickou léčbu (endokarditida, osteomyelitida) a pro tyto indikaci je považován za dostatečný $SBT > 1:32$ (Standiford a Tatem 1986). Dále byl SBT testován u imunokompromitovaných pacientů s intenzivní antibiotickou terapií (Martino, Venditti a

Valente 1985). Z tohoto důvodu testoval SBT také Sculier, který zjistil, že SBT >1:8 u non-neutropenických pacientů a SBT >1:16 u granulocytopenických pacientů dobře koreloval při léčbě gram-negativní bakteremie s dobrým klinickým účinkem u 98 % (respektive 87 %) pacientů. V této studii byl SBT testován druhý den terapie různými antibiotiky včetně kombinací a testování hodnoceno jako jednoduše proveditelné, zvláště pokud byl izolován dobře rostoucí patogen (Sculier a Klastersky 1984).

SBT je tedy používán v případech, kdy má pacient dobře definovanou infekci a dobře rostoucí etiologické agens, je léčen antibiotikem nebo antibiotiky, ale účinek terapie není dostatečný, pomalý nebo žádný. V průběhu antiinfekční terapie nemocných je možné vytipovat několik dalších situací, kdy je vhodné zamyslet se nad možností použití SBT. V těchto situacích je třeba správně definovat cíl, potřebu a požadavek na laboratorní testování.

První situací je, když pacient má infekční onemocnění způsobené známou bakterií se známou citlivostí na antibiotika, ale je léčen z různých důvodů kombinací antibiotik a není známo vzájemné působení kombinace. Pro některé skupiny antibiotik je podávání v kombinaci přínosné, mezi tyto výhodné kombinace patří synergie beta-laktamových antibiotik a aminoglykosidů při léčbě některých gram-positivních infekcí, např. infekční endokarditidy způsobené enterokoky (Beneš 2018). Některé kombinace antibiotik působí synergicky standardně, a proto byly vytvořeny trvalé páry hromadně vyráběných léčiv (trimetoprim + sulfimetoxazol, ampicilin + sulbaktam, amoxicilin + kyselina klavulanová). Většina dalších používaných kombinací takto dobře popsána ale není a výsledek působení kombinace antibiotik je spíše vlastností konkrétního bakteriálního kmene. Laboratorní metody testování účinnosti kombinace antibiotik se v praxi rutinně nepoužívají: interpretace výsledků není snadná a testování *in vitro* nemůže jednoduše předpovědět klinický efekt kombinace antibiotik. V případě podávání kombinací antibiotik může SBT ozřejmit konkrétní působení kombinace antibiotik v průběhu dávkovacího intervalu, kdy se odlišně mění koncentrace každého antibiotika v závislosti na podání, distribuci a clearance.

Laishram ve své práci představil kombinovanou metodiku stanovení sérových koncentrací jednotlivých antibiotik a SBT, jejímž cílem bylo pokusit se ozřejmit interakci mezi antibiotiky podávanými v kombinaci. Tato metoda vyžaduje stanovení koncentrace volného antibiotika a SBT v séru po deaktivaci komplementu. Výsledný výpočet je interpretován jako synergie ($\leq 0,25$), aditivní efekt (0,25–4) nebo antagonismus (≥ 4). Po klinické účely by mohlo mít

význam při vyhodnocení výhody podávání kombinace antibiotik proti monoterapii . V praxi se zatím rutinně nevyužívá (Laishram *et al.* 2017).

Robinson s kolektivem použil tuto metodu vyšetření synergie sérovou dilucí u pacientů s endokarditidou nebo osteomyelitidou, kteří byli léčeni kombinací antibiotik. Výsledky srovnával s těmi, které byly dosaženy metodou checkerboard a time kill assay. Zjistili, že kombinovaná metoda SBT/sérové koncentrace predikuje aditivní efekt 2x častěji než obě další metody, ale v určení synergie je horší než time-kill assay. Tato studie byla laboratorní a výsledky léčení pacientů nebyly sledovány (Robinson, Bartlett a Mazens 1985).

Druhým důvodem stanovení SBT by mohly být případy terapie infekce způsobené multirezistentním až panrezistentním původcem. V této situaci existuje vysoká pravděpodobnost selhání antibiotické terapie. Z důvodu nedostatku účinných antibiotik je pacient léčen vysokými dávkami několika antibiotik, které mají nejvyšší pravděpodobnost účinku (jsou popsány jako doporučené v kontrolovaných studiích nebo jednotlivých kazuistikách). Laboratorní testování sérových koncentrací antibiotik může pomoci z důvodu zjištění, zda bylo dosaženo dostatečných cílových koncentrací (aminoglykosidy) a PK/PD cílů (beta-laktamy, kolistin, vankomycin). I v případě multirezistentních kmenů by hodnota byla porovnána s MIC původce. Pokud není testování sérových koncentrací antibiotik k dispozici nebo panuje nejistota ohledně působení kombinace antibiotik, je možné testovat SBT.

Gomez testoval SBT pacientů s infekcemi způsobenými bakterií *Klebsiella pneumoniae* produkující KPC. Tito pacienti byli léčeni polymyxinem B v kombinaci s dalšími antibiotiky (s doripenemem, tigecyklinem nebo s rifampicinem a doripenemem). U všech pacientů byla SBT séra po celý dávkovací interval $\geq 1:4$ i při testování kmene *Klebsiella pneumoniae* se sníženou citlivostí k podávaným antibiotikům. Prokázal baktericidní aktivitu séra s kombinací antibiotik i po 12 hodinách po podání polymyxinu B (Gomez *et al.* 2011). A to přestože účinek polymyxinu samotného je podle Purnarase baktericidní v koncentraci 4x MIC a v synergii s tigecyklinem v koncentraci 1-2x MIC po dobu 4-8 hodin (při užití metodiky time-kill assay (Pournaras *et al.* 2011). Gomez také zjistil, že kombinace polymyxinu B s rifampicinem a doripenemem má v séru baktericidní aktivitu, i když byl původce na každé z antibiotik zvláště rezistentní (Gomez *et al.* 2011).

Podobně jako jsou sérové koncentrace a aktivita antibiotik rozdílná, tak pravděpodobně neexistuje jednoduché a správné doporučení a cílové SBT pro všechna antibiotika a všechny klinické situace. Většina publikací o SBT je datována do doby před extenzivním vývojem znalosti PK/PD principů antibiotické terapie. V práci Gomeze *et al.* (2011), ve které byl sledován klinický výsledek léčby, byli dva ze tří pacientů úspěšně vyléčeni, přestože SBT byl v určitou dobu dávkovacího intervalu pouze 1:4.

Podle mého názoru by teoreticky mělo mít SBT různé cílové hodnoty podle PK/PD podávaných antibiotik. Dávkování založené na PK/PD zajišťuje pacient-specifickou (PK) a patogen-specifickou (PD) terapii, která má potenciál být bezpečnější pro pacienta a proti původci infekční nemoci nejvíce účinná. Většina prací na toto téma udává pro beta-laktamy t/MIC 40-50 % dávkovacího intervalu. Jako MIC se užívá laboratorní hodnota MIC reálného původce nebo hraniční koncentrace předpokládaného původce infekce. Pokud je použit hlavní PK/PD parametr 24hod AUC/MIC , za nejúčinnější jsou považovány hodnoty ≥ 25 pro méně závažné infekce, ≥ 100 pro závažné infekce nebo imunosuprimované pacienty (Jacobs 2001).

Pokud bychom vycházeli z PK/PD principů, tak například SBT antibiotik ze skupiny vykazující PK/PD index t/MIC nebo AUC/MIC by měl dosahovat dostatečných hodnot v průběhu celého dávkovacího intervalu. Pro antibiotika s PK/PD indexem c_{max}/MIC by SBT na začátku dávkovacího intervalu po ukončení podávání antibiotika měl dosahovat dostatečně vysokých hodnot nad stanovenou hranici např. 1:4 dle Gomeze *et al.* (2011), což je čtyřnásobná baktericidní aktivita, než je v daných podmínkách pro bakteriální kmen třeba.

Pro SBT antibiotik ze skupiny vykazující PK/PD index AUC/MIC (např. vankomycin, teikoplanin, linkosamidy, chinolony) by mohl být cílovým parametrem dosažení dostatečné AUC/SBT - plochy pod křivkou baktericidních titrů (Dan *et al.* 1994, Barry *et al.* 1999). Tak, jako parametr AUC/MIC , také $AUC(SBT)$ je hodnota, kterou lze vypočítat farmakologickým programem, vyžadujícím ale mnoho vstupních parametrů. Pro rutinní testování SBT v mikrobiologické laboratoři je pravděpodobně spíše výhodná dostatečná SBT v době před podáním antibiotika (SBT_{min}).

Při stanovování SBT u pacientů, kteří jsou léčeni antibiotiky s PK/PD parametrem c_{max}/MIC (např. aminoglykosidy), by teoreticky jako jediný parametr mohl být stanoven SBT_{max} (tedy

odběr séra 30 minut po podání antibiotika). Toto SBT by měla dosahovat dostatečných hodnot ($>1:8$), což bylo analogické k cílovému parametru těchto antibiotik $8-10 \times c_{\max}/MIC$. Unikátní vlastnost těchto antibiotik, kterou je postantibiotický účinek, nelze metodou SBT nijak podchytit. Pro potvrzení domněnek o SBT založeném na PK/PD principech je však potřeba dalších laboratorních a klinických studií.

12 ZÁVĚR

Testování baktericidní vlastnosti séra představuje alternativní možnost optimalizace léčby pacienta antibiotiky. Tato metoda byla dříve využívána většinou pro testování antibiotické léčby pacientů s dlouhodobými infekcemi. V současné době se pro toto testování jeví jako vhodní další kandidáti: pacienti s akutní infekcí s nestandardními parametry farmakokinetiky (změněný distribuční objem, vazebnost nebo clearance antibiotika), pacienti léčení kombinací antibiotik, pacienti léčení pro infekci multirezistentními nebo panrezistentními bakteriemi. Pro tyto účely jsou však výsledky testování SBT při použití konvenčních metod k dispozici až po kriticky dlouhé době.

Cílem práce tak bylo nalézt modifikaci v současnosti používané standardizované metodiky, která poskytne validní výsledky účinku antibiotika v tělních tekutinách v čase kratším než za 48-72 hodin od začátku laboratorního testování (72-96 hodin od odběru klinického materiálu). Pro testování byly navrženy dvě modifikace: měření turbidimetrie a barvení resazurinem.

Byla testována čtyři antibiotika gentamicin, amikacin, piperacilin/tazobaktam a meropenem s 30 kmeny *E. coli* izolovaných z hemokultur pacientů Fakultní nemocnice Hradec Králové a 76 sér pacientů léčených antibiotiky z důvodu febrilní neutropenie s referenčním kmenem *E. coli* ATCC 25922.

Testování baktericidie antibiotik vykázalo non-inferiorní výsledky v testování po 24 hodinách. Všechny modifikace, které byly odečítány dříve, neměly dostatečnou shodu s CLSI. Pro testování modifikace s měřením turbidimetrie byly dosaženy non-inferiorní výsledky při použití vlnové délky spektrofotometru 405 nm, které odpovídaly nejvyšší oboustranné *p*-hodnotě při použití hraniční změny < 30% změny turbidance. Testování baktericidie séra nebylo závislé na použité vlnové délce a srovnatelné výsledky oboustranné *p*-hodnoty byly podobné při použití vlnové délky 405nm i 620nm, a to také až při testování po 24 hodin inkubace. Metoda barvení resazurinem byla non-inferiorní v navržené modifikaci při barvení po 8 hodinách inkubace a následné subkultivaci z negativních jamek mikrotitrační destičky a jejich následné inkubaci. Výsledky odečtu jsou k dispozici také po 24 hodinách testování. Obě výsledné non-inferiorní modifikace tak představují alternativu kratší než standardní metodika dle CLSI.

K získání validních výsledků je ale třeba nejen pečlivá laboratorní práce s dodržáním všech zásad správné laboratorní praxe a také kvalitní preanalytická část. Pro správné načasování odběrů séra pacienta, jeho bezchybný odběr, uchování a transport je nezbytná intenzivní spolupráce laboratoře s klinickými pracovníky.

Stále diskutovanou otázkou však zůstává samotná hodnota SBT, která spolehlivě predikuje klinický účinek léčby pacienta. Zdá se, že závěry starších prací s obecnými doporučeními pro odpovídající SBT, bude třeba přehodnotit a individualizovat za použití PK/PD principů. Pro potvrzení těchto předpokladů budou ale nezbytné další laboratorní a klinické studie.

13 SEZNAM LITERATURY

1. Abel zur Wiesch P., Abel S., Gkotzis S., Ocampo P., Engelstadter J., Hinkley T., Magnus C., Waldor M. K., Udekwu K., Cohen T. Classic reaction kinetics can explain complex patterns of antibiotic action, *Sci Transl Med*, 2015; 7(287):287-98. DOI: 10.1126/scitranslmed.aaa8760.
2. Adámek T., Paluch Z., Alušík Š. Bílkoviny krevní plazmy ve stáří a volné frakce léčiv, *Čes Ger Rev*, 2008; 6(4):257-262.
3. Aga D. S., Lenczewski M., Snow D., Muurinen J., Sallach J. B., Wallace J. S. Challenges in the measurement of antibiotics and in evaluating their impact in agroecosystems: a critical review, *J Environ Qual*, 2016; 407-418. DOI: 10.2134/jeq2015.07.0393.
4. Altenburg J., de Graaff C. S., van der Werf T. S., Boersma W. G. Immunomodulatory effects of macrolide antibiotics – Part. 2: Advantages and Disadvantages of long-term, low-dose macrolide therapy, *Respiration* 2011; 81:75-87. DOI: 10.1159/000320320.
5. Ankomah P., Levin B. R. Exploring the collaboration between antibiotics and immune response in the treatment of acute, self-limiting infection, *Proc Natl Acad Sci USA*, 2014; 111(23):8331-8. DOI: 10.1073/pnas.1400352111.
6. Asín-Prieto E., Rodríguez-Gascón A., Islan A. Application of the pharmacokinetics/pharmacodynamic (PK/PD) analysis of antimicrobial agents. *J Infect Chemother*, 2015 May;21(5):319-29. DOI: 10.1016/j.jiac.2015.02.001.
7. Balouiri M., Sadiki M., Ibsouda S. K. Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity, *J Pharm Anal*, 2015; 6:71-79. DOI: 10.1016/j.jpha.2015.11.005.
8. Barry A. L., Craig W. A., Nadler H., Reller L. B., Sanders C. C., Swenson J. M. Methodology for the Serum Bactericidal Test, Approved Guideline M21-A, 19(17) Replaces M21-T 12(19), 1999, NCCLS, Wayne, ISBN 1-56238-383-3.
9. Beneš J., Antibiotika systematika, vlastnosti, použití, 2018, Grada, Praha, ISBN 978-80-271-0636-3.
10. Cunha B. A., Nausheen S., Schoch P. Persistent meticillin-sensitive *Staphylococcus aureus* (MSSA) bacteremia due to a linezolid „tolerant“ strain, *Heart Lung*, 2010; 39(2):173-5. DOI: 10.1016/j.hrtlng.2009.06.005.

11. Dafale N. A., Semwal U. P., Rajput R. K., Singh G. N. Selection of appropriate analytical tools to determine the potency and bioactivity of antibiotics and antibiotics resistance, *J Pharm Anal*, 2016; 6:207-213. DOI: 10.1016/j.jpha.2016.05.006.
12. Dan M., Poch F., Quassem C., Kitzes R. Comparative serum bactericidal activities of three doses of ciprofloxacin administered intravenously, *Antimicrob Agents Chemother*, 1994; 38(4):837-841.
13. EUCAST, European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters Version 9.0, valid from 2019-01-01, http://www.eucast.org/clinical_breakpoints/.
14. Fridlund J., Woksepp H., Schön T. A microbiological method for determining serum levels of broad spectrum β -lactam antibiotics in critically ill patients, *J Microbiol Methods*, 2016; 129:23-27. DOI: 10.1016/j.mimet.2016.07.020.
15. Goegan P., Johnson G., Vincent R. Effects of serum protein and colloid on the Alamar Blue assay in cell cultures, *Toxicol In Vitro*, 1995; 9:257–266.
16. Gomez E., Sanchez M., Gul Z., Urban C., Mariano N., Eng R. H., Huang D. B., Chiang T. Polymyxin combination therapy and the use of serum bactericidal titers in the management of KPC-Producing *Klebsiella pneumoniae* infections: a report of 3 cases, *Case Rep Med*, Volume 2011; 2011:659-769. DOI: 10.1155/2011/659769.
17. Gonçalves-Pereira J., Póvoa P. Antibiotics in critically ill patients: a systematic review of the pharmacokinetics of β -lactams, *Crit Care*, 2011; 15(5):206. DOI: 10.1186/cc10441.
18. Grayson M. L., Crowe S. M., Mc Carthy J., Mills J., Mouton J. W., Norrby S. R., Paterson D. I., Pfaller M. A. Kucers' The use of antibiotics, Sixth edition, 2010, Edward Arnold Publishers Ltd., London, ISBN 78 0 340 927 670.
19. Inglis E. J., Radziwon K. A., Maniero G. D. The serum complement system: a simplified laboratory exercise to measure the activity of an important component of the immune system, *Adv Physiol Educ*, 2008; 32, 317-321. DOI: 10.1152/advan.00061.2007.
20. Jacobs M. R. Optimisation of antimicrobial therapy using pharmacokinetic and pharmacodynamic parameters, *Clin Microbiol Infect*, 2001; 7(11):589-96.
21. Jacobs S., Vrioni G, Neou E, Dendrinou J, Dimitroulia E, Poulou A, Tsakris A. Activity of tigecycline alone and in combination with colistin and meropenem against *Klebsiella*

- pneumoniae* carbapenemase (KPC)-producing Enterobacteriaceae strains by time-kill assay, *Int J Antimicrob Agents*. 2011 Mar;37(3):244-7. DOI: 10.1016/j.ijantimicag.2010.10.031.
22. Jamal J. A., Mueller B. A., Choi G. Y., Lipman J., Roberts J. A. How we can ensure effective antibiotic dosing critically ill patients receive different types of renal replacement therapy? *Diagn Microbiol Infect Dis*, 2015; 82(1):92-103. DOI: 10.1016/j.diagmicrobio.2015.01.013.
23. Jindrák V., Hedlová D., Urbášková P. Antibiotická politika a prevence infekcí v nemocnici, 2014; Mladá fronta, Praha, ISBN: 978-80-204-2815-8.
24. Kacířová I., Grundmann M. TDM antibiotik v klinické praxi, *Kardiol Rev Int Med*, 2015; 17(1): 57-64.
25. Krejsek J., Andrýs C., Krčmová I. Imunologie člověka, Garamon, 2016; ISBN:978-80-472-74-4.
26. Laishram S., Pragasam A. K., Bakthavatchalam Y. D., Veeraraghavan B. An update on technical, interpretative and clinical relevance of antimicrobial synergy testing methodologies. *Indian J Med Microbiol* 2017; 35:445-68. DOI: 10.4103/ijmm.IJMM_17_189.
27. Macintosh E. D., Broker M., Wassil J., Welsch J. A., Borrow R. Serum bactericidal antibody assays – The role of complement in infection and immunity, *Vaccine*, 2015; 33(36):4414-21.
28. Martino P., Venditti M., Valente B. Serum bactericidal activity as a therapeutic guide in severely granulocytopenic patients with gram-negative septicemia, *Eur J Cancer Clin Oncol*, 1985, 21(4): 439–445, 1985.
29. McMaster, M. C. LC/MS A Practical User's Guide, 2005, USA, Wiley & Sons, ISBN 13 978 –0-471-65531-2.
30. Melching L., Vas S. I. Effects of serum components on gram-negative bacteria during bactericidal reactions, *Infect Immun*, 1971; 107-115.
31. Mohamed A., Ghebreyesus T. A., Chen J., Davies D. S., So A. D. *et al.* No Time to Wait: Securing the future from drug-resistant infections, Report to the Secretary-General of the United Nations, 2019, <https://www.who.int/antimicrobial-resistance/interagency-coordination-group/final-report/en/>.

32. Nau R., Eiffert H. Minimizing the release of proinflammatory and toxic bacterial product within the host: promising approach to improve outcome in life-threatening infection, *FEMS Immunol Med Microbiol* 2005; 44:1-16. DOI: 10.1016/j.femsim.2005.01.001.
33. Nau R., Zysk G., Schmidt H., Fischer F. R., Stringaris A. K., Stuertz K., Bruck W. Trovafloxacin delays the antibiotic-induced inflammatory response in experimental pneumococcal meningitis, *J Antimicrob Chemother*, 1997; 39:781-788.
34. Ndieyira J. W., Kappeler N., Logan S., Cooper M. A., Abell C., McKendry R. A., Aeppli G. Surface-stress sensors for rapid and ultrasensitive detection of active free drugs in human serum, *Nat Nanotechnol*, 2014; 9:225–232. DOI: 10.1038/nnano.2014.33.
35. Oliver A., Mulet X., Lopez-Causapé C., Juan C. The increasing threat of *Pseudomonas aeruginosa* high-risc clones, *Drug Resist Updat*, 2015; 21-22:41-59. DOI: 10.1016/j.drup.2015.08.002.
36. Orsi G. B., Falcone M., Venditti M. Surveillance and management of multidrug-resistant microorganisms, *Expert Rev Anti Infect Ther*, 2011;9(8):653-679. DOI: 10.1586/eri.11.77.
37. Parker S. L., Sime F. B., Roberts J. A. Optimizing dosing of antibiotics in critically ill patients, *Curr Opin Infect Dis*, 2015, 28(6):497-504. DOI: 10.1097/QCO.0000000000000206.
38. Ramos-Martín V., Paulus S., Siner S., Scott E., Padmore K., Newland P., Drew R. J., Felton T. W., Docobo-Pérez F., Pizer B., Peak F., Peak M., Turner M. A., Beresford M. W., Hope W. W. Population Pharmacokinetics of Teicoplanin in Children, *Antimicrob Agents Chemother*, 2014; 58(11): 6920–6927. DOI: 10.1128/AAC.03685-14.
39. Rampersad S. N. Multiple applications of alamar blue as an indicator of metabolic function and cellular health in cell viability bioassay, *Sensors*, 2012; 12:12347-12360. DOI: 10.3390/s120912347.
40. Reis R. S., Neves I. Jr, Lourenço S. L., Fonseca L. S., Lourenço M. C. Comparison of flow cytometric and Alamar Blue tests with the proportional method for testing susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* to rifampin and isoniazid, *J Clin Microbiol*, 2004 May; 42(5):2247-8. DOI:10.1128/jcm.42.5.2247-2248.2004.
41. Riss T. L., Moravec R. A., Niles A. L., Duellman S., Benink H. A., Worzella T. J., Minor L. Cell Viability Assays, Assay Guidance Manual [Internet]. Eli Lilly & Company and the

- National Center for Advancing Translational Sciences; 2004 [updated 2016 Jul 1], <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23805433>, staženo 1. 2. 2018
42. Robinson A., Barlet R. S., Mazens M. F. Antimicrobial synergy testing based on antibiotic levels, minimal bactericidal concentration, and serum bactericidal activity. *Am J Clin Pathol*, 1985 Sep;84(3):328-33.
 43. Sculier J. P., Klastersky J. Significance of serum bactericidal activity in gram-negative bacillary bacteremia in patients with and without granulocytopenia, *Am J Med*, 1984; 76(3):429–435. DOI: 10.1016/0002-9343(84)90662-4.
 44. Schwalbe R., Steele-Moore L., Goodwinet A. C. Antimicrobial Susceptibility Testing Protocols, CRC Press, 2007, ISBN: 978-08-247-4100-6.
 45. Schwartz B., Ngo P. D., Guglielmo B. J. Daptomycin treatment failure for vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* infective endocarditis: impact of protein binding? *Ann Pharmacother*, 2008, 42(2):289–290. DOI: 10.1345/aph.IK548.
 46. Standiford H. C., Tatem B. A. Technical aspects and clinical correlations of the serum bactericidal test. *Eur J Clin Microbiol*, 1985; 5:79-87.
 47. Suchánková H., Matušková Z., Vanduchová A. Terapeutické monitorování beta-laktamových antibiotik, *Klin mikrobiol inf lek*, 2017;23(1):4-9.
 48. Štern P. Současné možnosti turbidimetrie a nefelometrie, *Klin Biochem Metab*, 14 (35), 2006; 3:146-151.
 49. Takeuchi O., Akira S. Pattern recognition receptors and inflammation, *Cell*, 2010; 140:805-820. DOI: 10.1016/j.cell.2010.01.022.
 50. Tauber S. C., Nau R. Immunomodulatory Properties of Antibiotics, *Curr Mol Pharmacol*, 2008; 1:68-79. PMID: 20021425.
 51. Treçarichi EM, Tumbarello M. Antimicrobial-resistant Gram-negative bacteria in febrile neutropenic patients with cancer: current epidemiology and clinical impact. *Curr Opin Infect Dis* 2014; 27:200-10. DOI: 10.1097/QCO.0000000000000038.
 52. Uldemollins M., Vaquer S., Llauro-Serra M., Pontes C., Calvo G., Soy D., Martín-Loeches I. Beta-lactam dosing in critically ill patients with septic shock and continuous renal replacement therapy. *Crit Care* 2014; 18(3):227. DOI: 10.1186/cc13938.
 53. Urbášková P., Hausnerová S., Chloupecký V., Lochmanová J., Výmola F., Zahradnický J. Vyšetření pro antimikrobiální terapii, 1985; Avicenum, Praha.

54. Vašířová Z. Faktory ovlivňující biologickou dostupnost léčiv, *Klin farmakol farm*, 2017; 27(3):299-302.
55. Yajko D. M., Madej J. J., Lancaster M. V., Sanders C. A., Cawthon V. L., Gee B., Babst A., Hadely W. K., Colorimetric method for determining MIC of antimicrobial agents for *Mycobacterium tuberculosis*, *J Clin Microbiol*, 1995; 33:2324-2327.
56. Yamaguchi H., Uchida K., Nagino K., Matsunaga T. Usefulness of a colorimetric method for testing antifungal drug susceptibilities of *Aspergillus* species to voriconazole, *J Infect Chemother*, 2002, 8(4):374-7. DOI:10.1007/s10156-002-0201-y.
57. Yang J. S., Bening S. C., Collins J. J. Antibiotic efficacy – context matters, *Curr Opin Microbiol*, 2017; 38:73-80. DOI: 10.1016/j.mib.2017.09.002.
58. Zadák Z., Havel E. Intenzivní medicína na principech vnitřního lékařství 2, doplněné a přepracované vydání, Grada Publishing, 2017; ISBN 978-80-271-0282-2.

14 SEZNAM OBRÁZKŮ, TABULEK A GRAFŮ

Obrázek 1 Schematické zobrazení cílových míst a mechanismu účinku antibiotik na bakteriální buňku (volně podle Beneš 2018)

Obrázek 2 Schéma systému kapalinové chromatografie spojené s hmotnostním spektrometrem (McMaster 2005)

Obrázek 3 Modifikace radiální agarová difúze (cylindr-test, cup-test), vyšetření séra pacienta léčeného kotrimoxazolem, kmen *Nocardia farcinica*, izolovaný z abscesu pacienta, inkubace 72 hodin při 35±2 °C (foto autor).

Obrázek 4 Schématické zobrazení testování baktericidie séra (zkratky: SIT - sérum Inhibiční titr, SBT – sérum baktericidní titr)

Obrázek 5 Schéma chemické reakce redukce resazurinu (Riss *et al.* 2016).

Obrázek 6 Testování baktericidie antibiotik za použití resazurinu. Kultivace *E. coli* ATCC 25922, inkubace 36±2°C 24 hodin v běžné atmosféře. Modré zbarvení signalizuje negativní růst, růžové zbarvení pozitivní růst (foto autor).

Obrázek 7 Schéma analýzy ATP (Riss *et al.* 2016).

Obrázek 8 Schematické znázornění turbidimetrie (volně podle Štern 2006).

Obrázek 9 Schéma bioreportéru k měření koncentrace tetracyklinu za použití genu pro efluxní pumpu *TetR*. Po navázání tetracyklinu dojde k aktivaci a transkripci genu s následnou syntézou efluxní pumpy. Současně dojde k aktivaci reportérového genu a následné syntéze luciferázy. Výsledkem je eflux tetracyklinu z buňky a produkce lumiscence (podle Aga *et al.* 2016).

Obrázek 10 Graf přehledu citlivosti kmenů *E. coli* testovacího souboru

Obrázek 11 Schéma připravené mikrotitrační destičky 16. 5. 2017, koncentrace v jamkách v mg/l. Zkratky: CAMHB cation adjusted Mueller Hinton Broth, GEN gentamicin, AMI amikacin, PPT piperacilin/tazobaktam, MER meropenem.

Obrázek 12 Schéma připravené mikrotitrační destičky 6. 6. 2017, koncentrace v jamkách v mg/l. Zkratky: CAMHB cation adjusted Mueller Hinton Broth, GEN gentamicin, AMI amikacin, PPT piperacilin/tazobaktam, MER meropenem.

Obrázek 13 Schéma inokulované mikrotitrační destičky, šedě označené jamky s inokulovanou suspenzí kmene Zkratky: NEG KO negativní kontrola, POZ KO pozitivní kontrola, GEN gentamicin, AMI amikacin, PPT piperacilin/tazobaktam, MER meropenem.

Obrázek 14 Schéma kontroly finálního inokula

Obrázek 15 Schématické zobrazení postupu práce s inokulovanými destičkami.

Obrázek 16 Schéma připravené mikrotitrační destičky, poměry v tabulce označují ředění séra, koncentrace antibiotik je jednotkách mg/l. Zkratky: GEN gentamicin, NEG negativní kontrola, POZ pozitivní kontrola, PPT piperacilin/tazobaktam.

Tabulka 1 Rozdělení a charakteristika antibiotik podle jednotlivých PK/PD indexů (podle Jindrák, Hedlová a Urbášková 2014)

Tabulka 2 Příklady PAMP – molekulových vzorů spojených s patogeny, které jsou schopny indukovat lidskou obrannou imunitní odpověď. (upraveno podle Krejsek, Andrýs a Krčmová 2016, Takeuchi a Akira 2010)

Tabulka 3 Přehled vazebnosti antibiotik na bílkoviny krevní plasmy (Jindrák, Hedlová a Urbášková 2014, Grayson 2010)

Tabulka 4 Postup testování vlivu tělních tekutin na mikroorganismy

Tabulka 5 Pojmy spojené s testováním baktericidie

Tabulka 6 Přehled statistických skupin, v tabulce označeny tečkou.

Tabulka 7 Základní charakteristika souboru pacientů.

Tabulka 8 Přehled časování odběrů krve. Vyšetřená séra jsou v tabulce označena tečkou.

Tabulka 9 Statistické zpracování testování **amikacinu**, srovnání standardní metody vyšetření baktericidie dle CLSI a ostatních modifikací užitím párového Studentova *t*-testu (Paired Samples Test, zkratka PST) – červená čísla, Wilcoxon Signed Ranks Testu – modrá čísla (zkratka WSRT), statisticky významná non-inferiorita pro $p > 0,05$ označena tučně.

Tabulka 10 Statistické zpracování testování **gentamicinu**, srovnání standardní metody vyšetření baktericidie dle CLSI a ostatních modifikací užitím párového Studentova *t*-testu (Paired Samples Test, zkratka PST) – červená čísla, Wilcoxon Signed Ranks Testu – modrá čísla (zkratka WSRT), statisticky významná non-inferiorita pro $p > 0,05$ označena tučně.

Tabulka 11 Statistické zpracování testování **meropenemu**, srovnání standardní metody vyšetření baktericidie séra dle CLSI a ostatních modifikací užitím párového *t*-testu (Paired Samples Test, zkratka PST) – červená čísla, Wilcoxon Signed Ranks Testu – modrá čísla (zkratka WSRT), statisticky významná non-inferiorita pro $p > 0,05$ označena tučně.

Tabulka 12 Statistické zpracování testování **piperacilin/tazobaktamu**, srovnání standardní metody vyšetření baktericidie séra dle CLSI a ostatních modifikací užitím párového *t*-testu (Paired Samples Test, zkratka PST) – červená čísla, Wilcoxon Signed Ranks Testu – modrá čísla (zkratka WSRT), statisticky významná non-inferiorita pro $p > 0,05$ označena tučně.

Tabulka 13 Statistické zpracování testování **všech antibiotik**, srovnání standardní metody vyšetření baktericidie séra dle CLSI a ostatních modifikací užitím párového *t*-testu (Paired Samples Test, zkratka PST) – červená čísla, Wilcoxon Signed Ranks Testu – modrá čísla (zkratka WSRT), statisticky významná non-inferiorita pro $p > 0,05$ označena tučně.

Tabulka 14 Výsledky statistického zpracování užitím Studentova párového *t*-testu, srovnání standardní metody vyšetření baktericidie séra dle CLSI a ostatních modifikací užitím párového *t*-testu (Paired Samples Test, zkratka PST) – červená čísla, Wilcoxon Signed Ranks Testu – modrá čísla (zkratka WSRT), tučně zobrazeny *p*-hodnoty se statisticky významnou non-inferioritou (oboustranné $p > 0,05$).

Tabulka 15 Rozložení odchylek výsledků modifikací od standardního vyšetření baktericidie dle CLSI, čísla v tabulce označují odchylku \log_2 výsledků ředění séra (0 = v souladu s CLSI, -1, 1 = odchylka ± 1 ředění \log_2 , -2, 2 = odchylka ± 2 ředění séra \log_2 , -3, 3 = odchylka ± 3 ředění séra \log_2 , záporná čísla značí výsledek v nižším ředění než standard, kladná čísla značí výsledek modifikace ve vyšším ředění než standard CLSI).

Tabulka 16 Souhrnné výsledky srovnání testování modifikací a CLSI metod. Čísla v tabulce označují oboustrannou *p*-hodnotu při zpracování Wilcoxon Signed Ranks Testem (statisticky významná noninferiorita metod při výsledku oboustranné *p*-hodnoty $> 0,05$ tučně červeně zvýrazněny).

Graf 1 Grafické znázornění výsledků oboustranných *p*-hodnot testování **amikacinu**, srovnání standardní metody vyšetření baktericidie séra dle CLSI a ostatních modifikací pomocí Wilcoxon Signed Ranks Testu. Grafická osa x: oboustranná *p*-hodnota, statisticky významná non-inferiorita $> 0,05$.

Graf 2 Grafické znázornění výsledků oboustranných *p*-hodnot testování **gentamicinu**, srovnání standardní metody vyšetření baktericidie séra dle CLSI a ostatních modifikací Wilcoxon Signed Ranks Testu. Grafická osa x: oboustranná *p*-hodnota, statisticky významná non-inferiorita $> 0,05$.

Graf 3 Grafické znázornění výsledků oboustranných p -hodnot testování **meropenemu**, srovnání standardní metody vyšetření baktericidie séra dle CLSI a ostatních modifikací Wilcoxon Signed Ranks Testu.

Graf 4 Grafické znázornění výsledků oboustranných p -hodnot testování **piperacilin/tazobaktamu**, srovnání standardní metody vyšetření baktericidie séra dle CLSI a ostatních modifikací Wilcoxon Signed Ranks Testu.

Graf 5 Grafické znázornění výsledků oboustranných p -hodnot testování **všech antibiotik** srovnání standardní metody vyšetření baktericidie séra dle CLSI a ostatních modifikací Wilcoxon Signed Ranks Testu, na ose x vyznačena hodnota oboustranné p -hodnoty, statisticky signifikantní non-inferiorita $p > 0,05$.

Graf 6 Grafické znázornění hodnocení statistické významnosti srovnáním výsledků při užití Wilcoxon Signed Ranks Testu, na ose x vyznačena hodnota oboustranné p -hodnoty, statisticky signifikantní non-inferiorita oboustranné $p > 0,05$.

Graf 7 Rozložení odchylek testování modifikací od výsledku CLSI po 8 hodinách inkubace, barevné kategorie ukazují odchylku \log_2 v ředění séra (0 = v souladu s CLSI, -1, 1 = odchylka ± 1 ředění \log_2 , -2, 2 = odchylka ± 2 ředění séra \log_2 , -3, 3 = odchylka ± 3 ředění séra \log_2).

Graf 8 Rozložení odchylek testování modifikací od výsledku CLSI po 24 hodinách inkubace, barevné kategorie ukazují odchylku \log_2 v ředění séra (0 = v souladu s CLSI, -1, 1 = odchylka ± 1 ředění \log_2 , -2, 2 = odchylka ± 2 ředění séra \log_2 , -3, 3 = odchylka ± 3 ředění séra \log_2).

Graf 9 Grafické znázornění kumulativní oboustranné p -hodnoty při užití Wilcoxon Signed Ranks Testu, na ose x kumulativní oboustranná p -hodnota, která je definována jako součet oboustranných p -hodnot baktericidie séra a všech antibiotik, statisticky signifikantní non-inferiorita jednotlivých oboustranných $p > 0,05$.