

**UNIVERZITA OBRANY V BRNĚ**  
**Fakulta vojenského zdravotnictví**  
**Třebešská 1575**  
**500 01 Hradec Králové**

## **OPONENTSKÝ POSUDEK DISERTAČNÍ PRÁCE**

Student: **Mgr. Markéta Benková**

Název disertační práce: **Testování antimikrobiální účinnosti nově syntetizovaných látek**

Posudek zpracoval: **RNDr. Irena Hanovcová, CSc.**

Disertační práce Mgr. Markéty Benkové shrnuje výsledky in vitro testování antimikrobní aktivity nově syntetizovaných látek na bázi kvarterních amoniových solí (KAS). Vzhledem k současné situaci, kdy dochází k výraznému rozvoji rezistence u řady klinicky významných mikrobů nejen vůči antimikrobním lékům, ale i dezinfekčním prostředkům, je hledání nových účinných dezinfekčních látek vysoce aktuální téma.

Stanovené cíle práce

1. zavést vhodnou metodu ke sledování antimikrobní aktivity in vitro,
2. otestovat antimikrobní účinek nově syntetizovaných látek na bázi KAS vůči klinickým kmenům bakterií a hub,
3. ověření jejich cytotoxicity vůči savčím buňkám a ekotoxicity a
4. vytvoření a otestování vhodných směsí z testovaných látek s širokým spektrem účinku odpovídající schválenému zadání disertační práce.

K testování účinnosti 18 řad nově syntetizovaných sloučenin na bázi KAS s různě dlouhými alkylovými řetězci s 12, 14 a 16 C autorka vhodně zvolila standardní kvantitativní mikrodiluční bujónovou metodu dle normy CLSI a výsledky porovnávala s aktivitou benzalkoniových solí se stejně dlouhými alkylovými řetězci, které jsou aktivní složkou komerčního přípravku Ajatin. Celkem bylo testováno 55 sloučenin vůči 3 druhům G+ a 7 druhům G- bakterií. Byly použity klinické izoláty druhů s různým stupněm rezistence k ATB a 1 sbírkový kmen. Antifungální aktivita vůči 4 druhům kvasinek a 4 druhům vláknitých hub byla testována během stáže na zahraničním pracovišti jamkovou agarovou metodou. U všech testovaných látek byla rovněž stanovena cytotoxicita vůči savčím buňkám na TK ovariálních buněk křečička čínského. Na základě vyhodnocení účinnosti jednotlivých analogů KAS vůči jednotlivým druhům bakterií a hub vybrala autorka kandidátní látky vhodné pro další použití a otestovala i jejich ekotoxicitu s použitím zelené sladkovodní řasy.

Na základě analýzy 16 kandidátních analogů KAS s nejvyšší antimikrobní aktivitou pak autorka vybrala 7 nejvhodnějších sloučenin, z nichž vytvořila 4 směsi pokrývající celé spektrum testovaných patogenů. Kromě vyhodnocení účinku na aerobní bakterie a houby, vzala v potaz i

účinek vůči anaerobům a obalenému viru, tyto informace získala od spoluautorů společného výzkumného projektu, což je v práci řádně uvedeno. Při výběru byla zohledněna i cytotoxicita látek. Tyto směsi pak byly in vitro testovány ve 2 pracovních koncentracích (1% a 0,1% vodný roztok) spolu s odpovídajícími koncentracemi Ajatinu a kontrolou vůči vybraným patogenům – 2 druhům rezistentních G+ bakterií (MRSA + VRE), 2 druhům rezistentních G- bakterií (ESBL+ *K. pneumoniae* a MDR *P. aeruginosa*), 2 kvasinkám (*C. krusei* a *C. neoformans*), 2 anaerobům (*C. difficile* a *A. fumigatus*) a viru VZV. Dále byl u těchto směsí proveden test kožní dráždivosti. Bylo prokázáno, že navržené směsi jsou i v koncentraci 0,1% nejméně stejně dobře účinné vůči testovaným mikroorganismům jako Ajatin, v případě VZV byla účinnost některých směsí i vyšší, i když nedosáhla účinnosti požadované pro virucidní prostředky. U tří směsí byl výsledek testu kožní dráždivost podstatně lepší než u Ajatinu.

Na základě výsledků účinnosti byla sloučenina s pracovním označením 17-C<sub>14</sub> patentována jako dezinfekční prostředek a směs, která ji obsahuje, zapsána jako užitečný vzor.

Autorka zmiňuje i možnost využít látky s vysokou toxicitou pro zelené řasy k jejich likvidaci tam, kde jsou nechtěné.

Lze tedy zkonstatovat, že autorka úspěšně splnila všechny zadané cíle a prokázala schopnost samostatné vědecké práce.

Předložená disertační práce je pečlivě zpracovaná a vyhovuje formálním požadavkům stanoveným vnitřními předpisy co se týká rozsahu i řazení jednotlivých částí. V části věnované vlastní experimentální činnosti autorka oproti obvykle samostatně uváděným kapitolám „Výsledky“ a „Diskuse“ tyto sloučila do jedné kapitoly, což vzhledem k rozsáhlosti experimentů přispělo dle mého mínění k přehlednosti hodnocení výsledků. Použité metodiky jsou podrobně popsány a výsledky jsou vhodně shrnuty a zdokumentovány v 11 tabulkách a 14 obrázcích, které zahrnují i grafy. Jako příloha je uvedeno 5 reprintů publikací, které vznikly na základě řešené tematiky. Jedna publikace je prvoautorská, zbytek jsou spoluautorské, všechny vyšly v impaktovaných časopisech. Kromě těchto vložených publikací je Mgr. M. Benková autorkou a spoluautorkou dalších 5 publikací v impaktovaných časopisech, které vznikly v rámci disertační práce a spoluautorkou 16 dalších vědeckých publikací vzniklých mimo rámec disertační práce.

K práci mám několik drobných připomínek a doplňujících dotazů.

U tabulek s výsledky, které se vzhledem k svému rozsahu nevešly celé na jednu stránku, bych doporučila pro lepší orientaci čtenáře zopakovat hlavičku tabulky s popisy jednotlivých sloupců na každé další stránce.

Při uvádění MIC, MBC je vhodnější místo aritmetického průměru z paralelních stanovení uvést buď rozmezí zjištěných MIC, MBC nebo hodnotu převažující MIC, MBC.

V kap. 2.6 Testování antimikrobiální aktivity je pouze uvedeno, že metody jsou popsány v přehledovém článku, škoda, že jej autorka nezařadila do příloh.

U zmíněných Českých technických norem, podle nichž byla stanovena baktericidní a fungicidní aktivita směsí, chybí celý název normy a nejsou uvedeny v přehledu použité literatury.

U použitých klinických rezistentních kmenů by bylo vhodné uvést, ke kterým antibiotikům/antimykotikům byly rezistentní, je známo, že v některých případech existuje souvislost mezi rezistencí k antimikrobním látkám a k určitým dezinfekčním prostředkům.

Dotazy:

1. Proč byly pro testování antibakteriální a antifungální aktivity testovaných látek zvoleny různé metody? Pozorovala jste nějaký rozdíl v reproducibilitě stanovení u těchto 2 metod?
2. Proč byla připravena pracovní suspenze patogenů někdy ve vodě a jindy ve fyziologickém roztoku.
3. Proč byly výchozí kultury bakterií při testování samostatných sloučenin a směsí kultivovány na rozdílných agarových půdách?
4. Co Vás vedlo k zařazení *Y. bercovieri* do testování? Bylo určeno druhové zařazení u vankomycin rezistentního enterokoka?
5. Jak si vysvětlujete účinnost směsí vůči MDR pseudomonádě, když jednotlivé složky nebyly účinné ani v nejvyšší použité koncentraci?

Závěrem mohu zkonstatovat, že předložená disertační práce splňuje požadavky na ni kladené a **doporučuji ji k obhajobě.**

Datum: ..8.6.2020.....

Podpis oponenta: RNDr. Irena Hanovcová, CSc.