

UNIVERZITA KARLOVA

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra biologických a lékařských věd



**STUDIUM INTERAKCE NOVĚ SYNTETIZOVANÝCH
SLOUČENIN S BAKTERIÁLNÍM AGENS**

RIGORÓZNÍ PRÁCE

Konzultant rigorózní práce: RNDr. Klára Konečná, Ph.D.

Hradec Králové, 2016

Mgr. Tereza Petlánová

„Prohlašuji, že tato rigorózní práce je mým původním autorským dílem. Veškeré myšlenky, data a zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou řádně uvedeny v seznamu literatury. Práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.“

V Hradci Králové, dne

Mgr. Tereza Petlánová

Ráda bych tímto poděkovala konzultantce rigorózní práce paní RNDr. Kláře Konečné, Ph.D. za pomoc a cenné rady, kterými přispěla k vypracování této rigorózní práce. Velké poděkování patří paní laborantce Idě Dufkové za pomoc při práci v mikrobiologické laboratoři. Dále bych chtěla poděkovat panu PharmDr.Mgr. Martinovi Krátkému, Ph.D. a paní prof. RNDr. Jarmile Vinšové, CSc. za poskytnutí chemických sloučenin a pomoc s tvorbou chemické nomenklatury.

Obsah

1. ÚVOD	12
1.1. Zadání- cíl rigorózní práce	14
2. TEORETICKÁ ČÁST.....	15
2.1. Charakteristika modelových bakteriálních kmenů využitých pro testování antimikrobní aktivity.....	15
2.1.1. <i>Staphylococcus aureus</i>	15
2.1.2. Methicilin-rezistentní <i>Staphylococcus aureus</i>	17
2.1.3. <i>Staphylococcus epidermidis</i>	18
2.1.4. <i>Enterococcus</i> sp.....	19
2.1.5. <i>Escherichia coli</i>	20
2.1.6. <i>Klebsiella pneumoniae</i>	22
2.1.7. <i>Klebsiella pneumoniae</i> ESBL pozitivní	23
2.1.8. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	24
2.2. Metody testování citlivosti bakterií v systému <i>in vitro</i>	25
2.2.1. Agarová difúzní metoda, diskový difúzní test	25
2.2.2. Gradientová difúzní metoda, E-test.....	26
2.2.3. Agarová diluční metoda	27
2.2.4. Bujónová diluční metoda	27
2.2.5. Automatizované systémy	29
2.3. Antibiotika.....	31
2.3.1. Beta-laktamová antibiotika	32
2.3.1.1. Penicilinová antibiotika.....	33
2.3.1.2. Cefalosporinová antibiotika	35
2.3.1.3. Monobaktamy.....	37
2.3.1.4. Karbapenemy	38
2.3.2. Další antibiotika inhibující syntézu bakteriální stěny	38
2.3.2.1. Glykopeptidová antibiotika	38

2.3.2.2. Bacitracin	39
2.3.3. Antibiotika způsobující poškození buněčné membrány.....	39
2.3.4. Antibiotika inhibující proteosyntézu	39
2.3.4.1. Tetracyklinová antibiotika.....	39
2.3.4.2. Amfenikoly.....	40
2.3.4.3. Makrolidová antibiotika	41
2.3.4.4. Antibiotika příbuzná makrolidům	42
2.3.4.5. Aminoglykosidová antibiotika	43
2.3.5. Antibiotika inhibující syntézu kyseliny listové.....	44
2.3.5.1. Sulfonamidy a trimetoprim	44
2.3.6. Antibiotika inhibující syntézu nukleových kyselin	45
2.3.6.1. Chinolony	45
2.3.6.2. Nitroimidazolová chemoterapeutika	47
2.3.6.3. Nitrofurany	47
2.3.6.4. Ansamyciny.....	48
2.4. Rezistence.....	49
2.4.1. Primární rezistence	50
2.4.2. Sekundární rezistence.....	50
2.5. Mechanismy rezistence mikroorganismů k antibiotickým látkám.....	51
2.5.1. Genetické mechanismy rezistence.....	51
2.5.1.1. Mutace	51
2.5.1.2. Vznik nové DNA-přenos genů	52
2.5.2. Biochemické mechanismy rezistence.....	53
2.5.2.1. Inaktivace nebo modifikace antibiotika	54
2.5.2.2. Modifikace cílového místa pro vazbu antibiotik.....	54
2.5.2.3. Efluxní pumpy	55
2.5.2.4. Snížená permeabilita vnější bakteriální membrány.....	55

2.6. Mechanismy rezistence u jednotlivých skupin antibiotik	57
2.6.1. Beta-laktamová antibiotika	57
2.6.2. Tetracykliny	57
2.6.3. Chloramfenikol.....	57
2.6.4. Aminoglykosidy	58
2.6.5. Chinolony	58
2.6.6. Makrolidy	58
2.6.7. Vankomycin	58
2.6.8. Sulfonamidy	59
2.7. Bakteriální biofilm	59
2.7.1. Komunikace bakterií pomocí <i>quorum sensing</i>	60
2.8. Mechanismy rezistence u bakterií tvořících biofilm	61
2.8.1. Vrozené faktory rezistence biofilmu	62
2.8.1.1. Matrix biofilmu	62
2.8.1.2. Metabolické změny v aktivitě bakterií tvořících biofilm	63
2.8.1.3. Perzistentní buňky	63
2.8.1.4. Oxidativní stres	63
2.8.1.5. <i>Quorum sensing</i>	63
2.8.1.6. Heterogenita	64
2.8.2. Získané faktory rezistence bakterií biofilmu.....	64
2.9. Metody testování citlivosti u biofilm-formujících mikroorganismů.....	65
2.9.1. Uzavřené modely.....	65
2.9.1.1. Calgary biofilm device, MBEC assay	67
2.9.2. Otevřené modely	69
2.9.2.1. CDC biofilmový reaktor.....	71
2.9.2.2. Drip flow reactor	72
2.9.2.3. Rotating disk reaktor	73

2.9.3. Mikrokosmosy.....	74
2.9.4. <i>Ex vivo</i> modely	74
2.9.5. <i>In vivo</i> savčí modely.....	75
3.EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	76
3.1. Použitý materiál.....	76
3.2.Modelové kmeny bakterií.....	77
3.3.Koncentrace testované látky.....	77
3.4.Skupiny testovaných látek.....	77
3.5. Metodika.....	78
3.5.1. Příprava suspenzí testovacích modelových kmenů bakterií.....	78
3.5.2. Příprava dvojkové ředící řady testované látky	78
3.5.3.Pipetování do 96 jamkové mikrotitrační destičky.....	80
3.5.4. Vyhodnocení- odečet minimální inhibiční koncentrace.....	81
3.6. Testované látky s potenciální antimikrobiální aktivitou	82
3.7. Výsledky.....	95
4.DISKUZE.....	113
5.ZÁVĚR.....	120
6. SEZNAM OBRÁZKŮ A TABULEK.....	121
7.SEZNAM LITERATURY	124

Abstrakt

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Studijní obor: Farmacie

Kandidát: Mgr. Tereza Petlánová

Konzultant: RNDr. Klára Konečná, Ph.D.

Název rigorózní práce: Studium interakce nově syntetizovaných sloučenin s bakteriálním agens.

Cíl práce: Cílem této práce bylo zhodnocení antibiotické aktivity látek připravených Katedrou anorganické a organické chemie, Farmaceutické fakulty Univerzity Karlovy v Hradci Králové.

Metody: Látky byly testovány pomocí mikrodiluční bujónové metody na osmi kmenech bakterií: *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus aureus* methicilin rezistentní, *Staphylococcus epidermidis*, *Enterococcus* sp., *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella pneumoniae* ESBL pozitivní a *Pseudomonas aeruginosa*.

Výsledky: Látky byly rozděleny do pěti skupin podle společných strukturálních rysů. Nejúčinnější byla skupina salicylanilidových derivátů, kde vykazovalo antibakteriální účinek všech 28 testovaných látek této skupiny.

Závěry: Z celkového počtu 73 testovaných látek byl pozorován antibakteriální účinek u 50 z nich. Nejcitlivějšími kmeny byly *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus aureus* methicilin rezistentní, *Enterococcus* sp. a *Staphylococcus epidermidis*. Naopak žádná z testovaných látek nevykazovala účinnost k modelovému kmenu *Pseudomonas aeruginosa*.

Klíčová slova: Minimální inhibiční koncentrace, mikrodiluční bujónová metoda, antibiotika, biofilm, rezistence.

Abstract

Charles University

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Study program: Pharmacy

Candidate: Mgr. Tereza Petlánová

Consultant: RNDr. Klára Konečná, Ph.D.

Title of thesis: Study of the interaction of newly synthesized compounds with bacterial agents.

Background: The aim of this thesis was to test antibiotic activity of substances produced by the Department of Inorganic and Organic Chemistry, Faculty of Pharmacy of Charles University in Hradec Králové.

Methods: Substances were tested by using microdilution broth method on eight strains of bacteria: *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus aureus* methicilin resistant, *Staphylococcus epidermidis*, *Enterococcus* sp., *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella pneumoniae* ESBL positive and *Pseudomonas aeruginosa*.

Results: Substances were divided into five groups according to associated structural features. The most effective was the group of salicylanilid derivates. In this group, the bacterial effect of all 28 tested substances were shown.

Conclusion: The antibacterial effect was demonstrated in 50 from the total number of 73 tested compounds. The most susceptible strains were *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus aureus* methicilin resistant, *Enterococcus* sp. and *Staphylococcus epidermidis*. On the contrary, none of the tested compounds showed efficacy to the model strain *Pseudomonas aeruginosa*.

Key words: Minimal inhibitory concentration, microdilution broth method, antibiotics, biofilm, resistance.

Seznam použitých zkratk

ASTM	<u>A</u> merican <u>S</u> ociety for <u>T</u> esting and <u>M</u> aterials, Americká společnost pro testování a materiály
ARIS	<u>A</u> utomatic <u>R</u> eading and <u>I</u> ncubation <u>S</u> ystem, Automatický čtecí a inkubační systém
BBC	<u>b</u> iofilm <u>b</u> actericidal <u>c</u> oncentration, baktericidní koncentrace v biofilmu
BPC	<u>b</u> iofilm <u>p</u> revention <u>c</u> oncentration, minimální koncentrace vedoucí k prevenci tvorby biofilmu
CA-MRSA	<u>C</u> ommunity-associated <u>m</u> ethicillin <u>r</u> esistant <u>S</u> taphylococcus <u>a</u> ureus, komunitní methicilin rezistentní kmeny <i>Staphylococcus aureus</i>
CFU	<u>c</u> olony <u>f</u> orming <u>u</u> nit, kolonii tvořící jednotka
CLSI	<u>C</u> linical and <u>L</u> aboratory <u>S</u> tandards <u>I</u> nstitute, Institut pro klinické a laboratorní standardy
DMSO	<u>d</u> imethyl <u>s</u> ulf <u>o</u> xid
DNA	<u>d</u> eoxyribo <u>n</u> ucleic <u>a</u> cid, deoxyribonukleová kyselina
EAEC	<u>e</u> ntero <u>a</u> dherent <u>E</u> . <u>c</u> oli, enteroadherentní <i>E.coli</i>
EC	<u>E</u> scherichia <u>c</u> oli
EF	<u>E</u> nterococcus sp.
EHEC	<u>e</u> ntero <u>h</u> aemorrhagic <u>E</u> . <u>c</u> oli, enterohemoragická <i>E.coli</i>
EIEC	<u>e</u> ntero <u>i</u> nvasive <u>E</u> . <u>c</u> oli, enteroinvazivní <i>E.coli</i>
EPEC	<u>e</u> ntero <u>p</u> athogenic <u>E</u> . <u>c</u> oli, enteropatogenní <i>E.coli</i>
ESBL	<u>e</u> xtended-spectrum <u>b</u> - <u>l</u> actamases, beta-laktamázy širokého spektra
ETEC	<u>e</u> ntero <u>t</u> oxigenic <u>E</u> . <u>c</u> oli, enterotoxická <i>E.coli</i>
EUCAST	<u>E</u> uropean <u>C</u> ommitee on <u>A</u> ntimicrobial <u>S</u> usceptibility <u>T</u> esting, Evropská komise pro testování antimikrobiální citlivosti
FDA	<u>F</u> ood and <u>D</u> rug <u>A</u> dministration, Úřad pro kontrolu potravin a léčiv
G ⁻	gram <u>n</u> egativní
G ⁺	gram <u>p</u> ozitivní
IC	<u>i</u> nhibitory <u>c</u> oncentration, inhibiční koncentrace
KP	<u>K</u> lebsiella <u>p</u> neumoniae
KP ESBL	<u>K</u> lebsiella <u>p</u> neumoniae <u>e</u> xtended <u>s</u> pectrum <u>b</u> eta- <u>l</u> actamase, <i>Klebsiella pneumoniae</i> produkující širokospektré beta-laktamázy

MBEC	<u>m</u> inimal <u>b</u> iofilm <u>e</u> radication <u>c</u> oncentration, minimální koncentrace vedoucí k eradikaci biofilmu
MBIC	<u>m</u> inimal <u>b</u> iofilm <u>i</u> nhibitory <u>c</u> oncentration, minimální inhibiční koncentrace v biofilmu
MDR	<u>m</u> ulti- <u>d</u> rug <u>r</u> esistance, mnohočetná léková rezistence
MFS	<u>m</u> ajor <u>f</u> acilitator <u>s</u> uperfamily, nadrodina hlavních zprostředkovatelů
MHB	<u>M</u> uller- <u>H</u> inton <u>b</u> roth, Muller-Hintonův bujón
MIC	<u>m</u> inimal <u>i</u> nhibitory <u>c</u> oncentration, minimální inhibiční koncentrace
mRNA	<u>m</u> essenger <u>r</u> ibonucleic <u>a</u> cid, mediátorová ribonukleová kyselina
MRSA	<u>m</u> ethicillin <u>r</u> esistant <i>Staphylococcus aureus</i> , methicilin rezistentní <i>Staphylococcus aureus</i>
OD	<u>o</u> ptical <u>d</u> ensity, optická denzita
OMPs	<u>o</u> uter <u>m</u> embrane <u>p</u> roteins, vnější membránové proteiny
PA	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
PBPs	<u>p</u> enicillin <u>b</u> inding <u>p</u> roteins, penicilin-vázající proteiny
PBP2a	<u>p</u> enicillin <u>b</u> inding <u>p</u> rotein <u>2</u> a, penicilin-vázající protein 2a
PRSP	<u>p</u> enicillin <u>r</u> esistant <i>Streptococcus pneumoniae</i> , penicilin rezistentní <i>Streptococcus pneumoniae</i>
QS	<u>q</u> uorum <u>s</u> ensing
RNA	<u>r</u> ibonucleic <u>a</u> cid, ribonukleová kyselina
rRNA	<u>r</u> ibosomal <u>r</u> ibonucleic <u>a</u> cid, ribozomální ribonukleová kyselina
SA	<i>Staphylococcus aureus</i>
SE	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
tRNA	<u>t</u> ransfer <u>r</u> ibonucleic <u>a</u> cid, transferová ribonukleová kyselina
USA	<u>U</u> nited <u>S</u> tates of <u>A</u> merica, Spojené státy americké
VISA	<u>v</u> ankomycin <u>i</u> ntermediate-resistant <i>Staphylococcus aureus</i> , vankomycin intermediálně-rezistentní <i>Staphylococcus aureus</i>
VRSA	<u>v</u> ankomycin <u>r</u> esistant <i>Staphylococcus aureus</i> , vankomycin rezistentní <i>Staphylococcus aureus</i>
WHO	<u>W</u> orld <u>h</u> ealth <u>o</u> rganisation, Světová zdravotnická organizace
23S rRNA	<u>23</u> <u>s</u> vedberg <u>r</u> ibosomal <u>r</u> ibonucleic <u>a</u> cid, 23 svedbergerova jednotka ribozomální ribonukleové kyseliny

1. ÚVOD

K velmi závažným nežádoucím jevům pojícím se s používáním antibiotik patří vznik a šíření bakteriální rezistence, která je stále větším celosvětovým problémem. Rostoucí rezistence bakterií vůči dostupným antibiotikům využívaným v klinické praxi se v posledních letech řadí mezi nejzávažnější medicínské problémy, jelikož se počet rezistentních bakteriálních kmenů neustále zvyšuje a doposud známá antibiotika již nejsou na bakteriální kmeny účinná. Rezistence může vznikat na základě různých mechanismů, které jsou podrobněji probírány v teoretické části této rigorózní práce.

Vznik rezistence na antibiotika je přirozený jev, ke kterému dochází při používání antibiotik. Velice důležité je rezistenci co nejvíce předcházet. Hlavním spouštěčem vzniku rezistence je právě nadměrná spotřeba dosud známých antibiotik, a to především jejich nadužívání, ale i nesprávné nebo nedostatečné používání.

Nové mechanismy rezistence se objevují a následně šíří po celém světě, čímž ohrožují dostupné možnosti léčby běžných infekčních chorob, což má za následek zvýšený počet úmrtí v důsledku infekčních onemocnění, případně invaliditu jednotlivců, u nichž by donedávna léčba mohla být účinná ^[1].

Boj proti rezistenci vůči antibiotikům je také jednou z hlavních priorit WHO (World health organisation, Světová zdravotnická organizace). Cílem je zajistit, aby léčba bakteriálních infekcí probíhala za použití bezpečných a účinných léků a aby nedocházelo k jejich zneužívání. Mezi další hlavní cíle WHO patří optimalizace používání antimikrobiálních léků, snížení výskytu infekcí, posílení dozoru nad užíváním antibiotik, podpoření výzkumu nových antimikrobních léčiv, také zvýšení povědomí lidí o správném užívání antimikrobních látek a pochopení problému antimikrobiální rezistence ^[2].

Za účelem dosažení cíle týkajícího se minimalizace dopadů rezistence, je zapotřebí více komplexní, multidisciplinární úsilí, včetně lepšího pochopení epidemiologie a patogenity mikroorganismů, uvážlivé používání antimikrobiálních látek a účinná opatření pro kontrolu infekcí v nemocnicích ^[3].

Účelem této rigorózní práce bylo vyhodnotit potenciální účinnost pěti skupin chemických látek syntetizovaných na Katedře anorganické a organické chemie, Farmaceutické fakulty v Hradci Králové. Tyto látky byly testovány pomocí mikrodiluční bujónové metody, tedy v podmínkách *in vitro*. Pomocí této metody je možno určit minimální inhibiční koncentraci látek. Tento metodický přístup je při testování antibiotické aktivity

nových látek považován za standard. K testování bylo použito celkem 8 modelových bakteriálních kmenů (*Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus aureus* methicilin rezistentní, *Staphylococcus epidermidis*, *Enterococcus* sp., *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* a *Pseudomonas aeruginosa*).

Z výše zmíněného vyplývá, že objevem nových antibakteriálních látek a jejich následným zavedením do klinické praxe by se mohla bakteriální rezistence snížit a poklesla by morbidita i mortalita populace. Naším testováním jsme k hledání těchto nových látek přispěli.

1.1. Zadání - cíl rigorózní práce

- Teoretická část - rešerše odborné literatury.
- Experimentální část - práce v mikrobiologické laboratoři, vlastní experimenty, vypracování postupů při vyhodnocování minimální inhibiční koncentrace u testovaných látek.
- Výsledky - zpracování a vyhodnocení výsledků, jejich interpretace.
- Diskuze - s využitím teoretických a praktických znalostí dané problematiky.
- Závěr - shrnutí výsledků.

2. TEORETICKÁ ČÁST

2.1. Charakteristika modelových bakteriálních kmenů využitých pro testování antimikrobní aktivity

2.1.1. *Staphylococcus aureus*

Do rodu *Staphylococcus* je v současné době zařazeno již okolo 40 bakteriálních druhů a poddruhů, z nichž pouze některé mají klinický význam v současné medicíně. Z hlediska patogenity je pro člověka nejnebezpečnější *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, či *Staphylococcus saprophyticus*. Citlivost vůči kandidátním antimikrobním látkám prvních dvou zmíněných druhů byla testována i v této rigorózní práci ^[4].

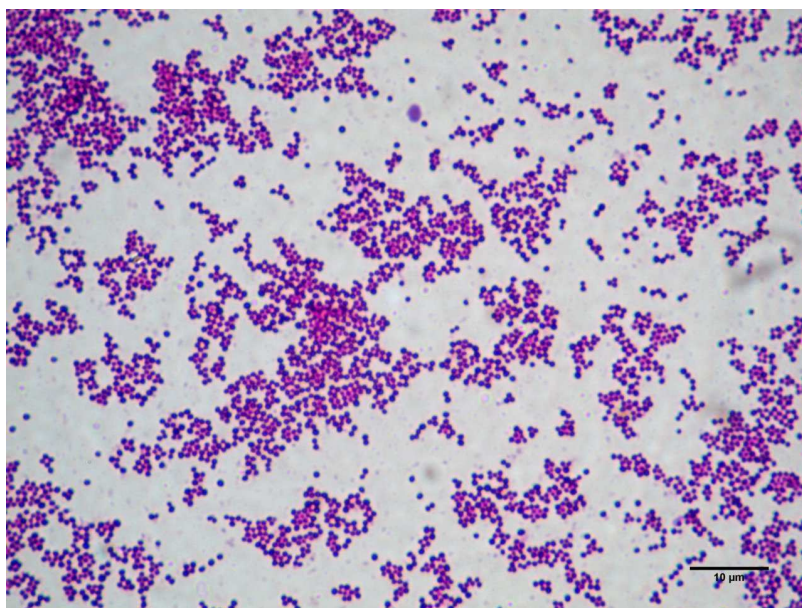
Bakterie *Staphylococcus epidermidis* vyvolává nejčastěji infekce spojené s lékařskými implantáty, jako jsou periferní nebo cévní katetry. Tento mikroorganismus hraje také významnou roli při infekcích jako je bakteriémie, často také kontaminuje kontaktní čočky, či osidluje močové cévky. S vysokou frekvencí také kolonizuje epitelové buňky kůže a je považován za jednu z hlavních příčin infekcí kůže ^[5].

Stafylokoky patří mezi komenzální mikroorganismy, kteří povětšinou asymptomaticky osídlují kůži a sliznice lidí. Tato skupina G⁺ (grampozitivních) koků může produkovat řadu enzymů a toxinů, které jsou významným faktorem jejich virulence a stojí za patogenezi širší škály infekčních nemocí. Více než 30% kmenů je schopno produkovat několik různých lipáz, které jsou schopny hydrolyzovat lipidy a zajistit tak přežití stafylokoků v mazových oblastech lidského těla. *Staphylococcus aureus* také produkuje termostabilní nukleázu, která má schopnost hydrolyzovat DNA (deoxyribonucleic acid, deoxyribonukleová kyselina) ^[6].

Obecně jsou stafylokoky do značné míry rezistentní k nepříznivým vlivům okolí. Odolávají vyšším koncentracím chloridu sodného, velmi dobře snášejí zahřátí na 55°C po dobu 30 minut, případně při vysychání vydrží až několik týdnů. Právě tyto vlastnosti umožňují přechodné či rezidentní osídlení některých kožních oblastí ^[4].

Staphylococcus aureus je G⁺ kok seskupený do hloučků (viz. Obrázek 1). Je to růstově nenáročný kok, který dostal druhové jméno podle charakteristicky oranžově zbarvených kolonií. Za tímto zbarvením stojí produkce karotenového pigmentu, který ale není nástrojem virulence, a ne všechny kmeny tento pigment tvoří. Takže lze izolovat a pozorovat i kmeny s bílými či šedavými koloniemi ^[7].

Tento bakteriální druh produkuje řadu toxinů. Mimo jiné jde o hemolyziny, z nichž s ohledem na virulenci je nejvýznamnější toxický hemolyzin alfa, který porušuje buněčnou membránu eukaryotních buněk. Dalším významným toxinem je exfoliatin, jenž způsobuje epidermolýzu, či toxin způsobující syndrom toxického šoku, jenž je spojený s horečkou a dalšími orgánovými postiženími. Pro úplnost, stafylokoky jsou také schopny produkovat různé typy enterotoxinů. Každý kmen však nemusí produkovat všechny zmíněné toxiny, záleží především na přítomnosti určitých genů, a proto se přítomnost jednotlivých toxinů u jednotlivých kmenů liší [7].



Obrázek 1: G^+ koky bakterie *Staphylococcus aureus*, zvětšení 1000x, Gramovo barvení.

převzato z: <http://cit.vfu.cz/alimentarni-onemocneni/xsa/xsa01.html> [8]

Staphylococcus aureus je nejčastějším průvodcem kožních onemocnění, jako je impetigo, akné, panaricium, mastitida či infekce ran. Z orgánových onemocnění může být příčinou plicních infekcí-zápalu plic, infekcí mozku-meningitidy, infekce kostí-osteomyelitidy či infekce srdce-endokarditidy [9].

Před více než padesáti lety se brzy po zavedení prvního antibiotika penicilinu začaly objevovat kmeny, které produkovaly penicilinázu. Dnes tento enzym produkuje celá řada kmenů, proto bylo nutné vytvořit peniciliny, které by byly k peniciláze rezistentní. Jedním z příkladů je methicilin či oxacilin. Postupně ale vznikaly i kmeny rezistentní k methicilinu-MRSA (methicillin resistant *Staphylococcus aureus*, methicilin rezistentní *Staphylococcus aureus*), nebo i k výhodnějšímu oxacilinu. Celkově byly stafylokoky dlouho citlivé k vankomycinu, ale v posledních letech byl zjištěn určitý typ rezistence i zde, tyto kmeny jsou

nazývány VISA (vankomycin intermediate-resistant *Staphylococcus aureus*, vankomycin intermediálně-rezistentní *Staphylococcus aureus*), které vykazují rezistenci vůči všem glykopeptidům a i vysoce rezistentní kmeny VRSA (vankomycin resistant *Staphylococcus aureus*, vankomycin rezistentní *Staphylococcus aureus*). Toto jsou příklady veliké hrozby selhávání antibakteriální terapie v současnosti ^[7].

2.1.2. Methicilin-rezistentní *Staphylococcus aureus*

V současné době je většina kmenů stafylokoků rezistentních na penicilin. Za posledních několik desetiletí neustále stoupá počet infekcí způsobených tímto bakteriálním kmenem a nárůst infekcí byl zaznamenán zejména u kmenů odolných vůči antibiotikům. V poslední době se stále častěji setkáváme s kmeny jako je zejména MRSA a také vankomycin rezistentními kmeny ^[10]. U kmenů MRSA je velkým problémem rezistence vůči methicilinu. Za rezistenci je zodpovědný gen *mecA*, který kóduje enzym PBP2a (penicillin binding protein 2a, penicilin-vázající protein 2a) ^[11]. Nyní není tak velkým problémem, že by kmeny MRSA byly více virulentní než běžné kmeny, ale největším problémem a hrozbou je multirezistence, a proto terapie onemocnění vyvolaných těmito kmeny je dosti náročná ^[7].

Methicilin-rezistentní *Staphylococcus aureus* je bakterie, která je schopna vyvolat infekce v různých částech těla. Nejčastěji způsobuje mírné infekce kůže, jako jsou vředy, ale může také způsobovat vážnější kožní infekce nebo infikovat chirurgické rány, krevní oběh, plíce nebo močové cesty. MRSA infekce jsou běžné mezi lidmi, kteří mají oslabený imunitní systém a jsou v nemocnicích, domovech důchodců, a dalších zdravotnických zařízeních. Infekce se může objevit kolem operačních ran nebo invazivních prostředků, jako jsou cévky či další implantáty ^[12].

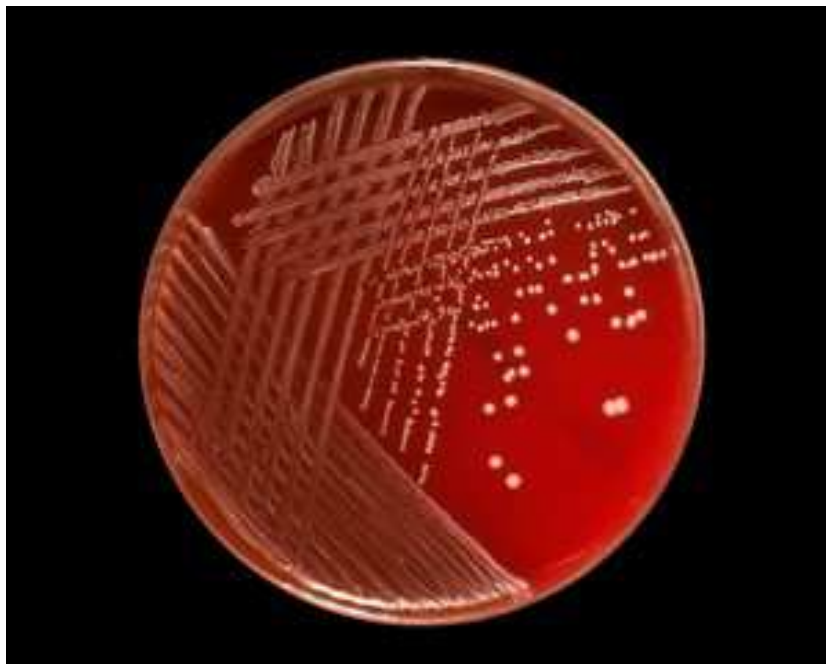
Znepokojující zprávou je, že MRSA infekce se objevují i u zdravých lidí, kteří nebyli hospitalizováni. Tento typ MRSA infekcí se nazývá CA-MRSA (Community-Associated methicillin resistant *Staphylococcus aureus*, komunitní methicilin rezistentní kmeny *Staphylococcus aureus*). CA-MRSA kožní infekce byly zjištěny u určité skupiny obyvatel, kteří mají více kožního kontaktu s jinými osobami. Příkladem mohou být týmoví sportovci, vězni, ale i děti v mateřských školách ^[12].

Například ke gentamycinu jsou rezistentní téměř všechny kmeny MRSA. Současně k erythromycinu a klindamycinu je rezistentních více než 96% kmenů. V současné době jsou kmeny MRSA velice rezistentní i k další antibiotické terapii, což představuje mnohem větší problém, než byl dosud ^[7].

2.1.3. *Staphylococcus epidermidis*

Staphylococcus epidermidis se vyskytuje u člověka zejména na kůži obličeje, na končetinách nebo na sliznici nosohltanu. Jedná se o typického oportunního patogena, který napadá zejména oslabený organismus, jako jsou pacienti s těžkými popáleninami, po těžkých úrazech, chirurgických zákrocích nebo imunokompromitovaní pacienti. V posledních letech velmi přibývá infekcí způsobených tímto patogenem. Důležitým faktorem, který zvyšuje pravděpodobnost infekce je přítomnost cizího tělesa, jako jsou různé katetry, cévní náhrady, umělé srdeční chlopně a další. Stafylokokové buňky mají velmi dobrou adherenci právě k těmto zmíněným cizím tělesům. Mohou také chronicky zaplavovat organismus a způsobit sepse, endokarditidy, meningitidy nebo infekce močových cest. Všechna tato onemocnění způsobená bakterií *Staphylococcus epidermidis* jsou většinou získána v prostředí nemocnic ^[4]. Kolonie bakterie *Staphylococcus epidermidis* jsou zobrazeny na následujícím Obrázku 2.

S.epidermidis na rozdíl od *S.aureus* neprodukuje tak významné množství enzymů a toxinů. Neprodukuje klasické enterotoxiny, exfoliatiny, koagulázu, hemolysin nebo termostabilní nukleázu jako tomu je u *S.aureus* ^[4].



Obrázek 2: Kolonie *Staphylococcus epidermidis* na agaru s ovčí krví, kultivace po dobu 24 hodin v aerobní atmosféře při 37°C.

převzato z:

<http://www.bacteriainphotos.com/bacteria%20under%20microscope/staphylococcus%20epidermidis%20microscopy.html#> ^[13]

Stafylokoky jsou běžnými bakteriálními kolonizátory kůže a sliznic člověka či jiných savců. *S. epidermidis* je zejména jeden z nejčastěji izolovaných druhů z lidského epitelu. Kolonizuje převážně na axilách, hlavě a nosních dírkách. Analýza genomu *S. epidermidis* ukázala, že druh je dobře vybaven geny, které poskytují ochranu před drsnými podmínkami vyskytujícími se v jeho přirozeném prostředí. Příkladem může být schopnost vyrovnat se s extrémními koncentracemi solí a osmotického tlaku ^[14].

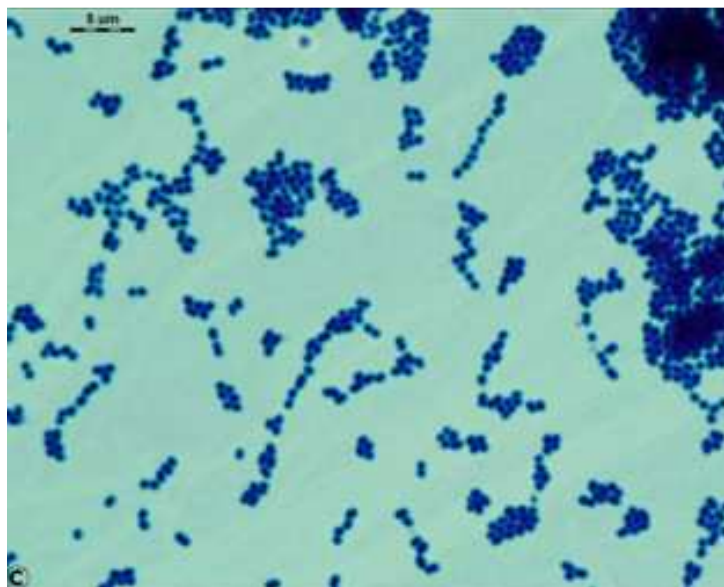
S. epidermidis patří do skupiny koaguláza-negativních stafylokoků, které narozdíl od koaguláza-pozitivních stafylokoků, jako je *S. aureus*, nejsou producenty enzymu zvaného koaguláza ^[14].

2.1.4. *Enterococcus* sp.

Zástupci rodu *Enterococcus* jsou G⁺, fakultativně anaerobní koky, které jsou morfologicky podobné streptokokům při barvení podle Grama (viz. Obrázek 3). Normální stanoviště těchto mikroorganismů je v gastrointestinálním traktu lidí a jiných savců, i když mohou být izolovány z ústní části hltnu, ženského pohlavního ústrojí a kůže. V poslední době bylo popsáno 36 druhů enterokoků, nicméně pouze 26 druhů z celkového počtu je spojováno s lidskými infekcemi ^[3]. *Enterococcus faecalis* je nejčastější lidský patogen, ale *Enterococcus faecium* je stále více převládajícím patogenem u infekcí získaných v nemocničním prostředí. Přirozeně se tyto koky vyskytují v tlustém střevě, kde jsou součástí běžné střevní mikroflóry ^[7]. Všechny ostatní enterokokové druhy společně tvoří méně než 5% enterokokových infekcí. Tyto jiné druhy spojené s lidskými infekcemi zahrnují *Enterococcus gallinarum*, *Enterococcus casseliflavus*, *Enterococcus avium*, *Enterococcus cecorum*, *Enterococcus durans*, *Enterococcus hirae*, *Enterococcus malodoratus*, *Enterococcus mundtii*, *Enterococcus pseudoavium* a *Enterococcus raffinosus* ^[15].

Bakterie *Enterococcus faecalis* a *Enterococcus faecium* jsou schopny přežít i 30 minut při 60°C ^[4]. Mají sníženou citlivost k antibiotikům (k penicilinům i aminoglykosidům). Výskyt rezistence k vankomycinu obou druhů je u nás zatím nízká. Ačkoli jsou enterokoky součástí normální střevní flóry, tak zejména v posledních letech se stávají důležitými nozokomiálními patogeny, vůči kterým je třeba bojovat. Kmeny získávající odolnost vůči antimikrobiálním látkám jsou více na vzestupu, což představuje významný léčebný a epidemiologický problém ^[3].

Zástupci rodu *Enterococcus* se od rodu *Staphylococcus* liší zejména svou kultivační nenáročností, rezistencí k vysokému pH, schopností růstu v hypertonickém roztoku, či růstu při nízké teplotě ^[4].



Obrázek 3: G⁺ koky bakterie *Enterococcus faecalis*, zvětšení 1000x-mikroskopický snímek, barveno dle Grama.

převzato z: <http://www.bacteriainphotos.com/Enterococcus%20faecalis%20light%20microscopy.html> ^[16]

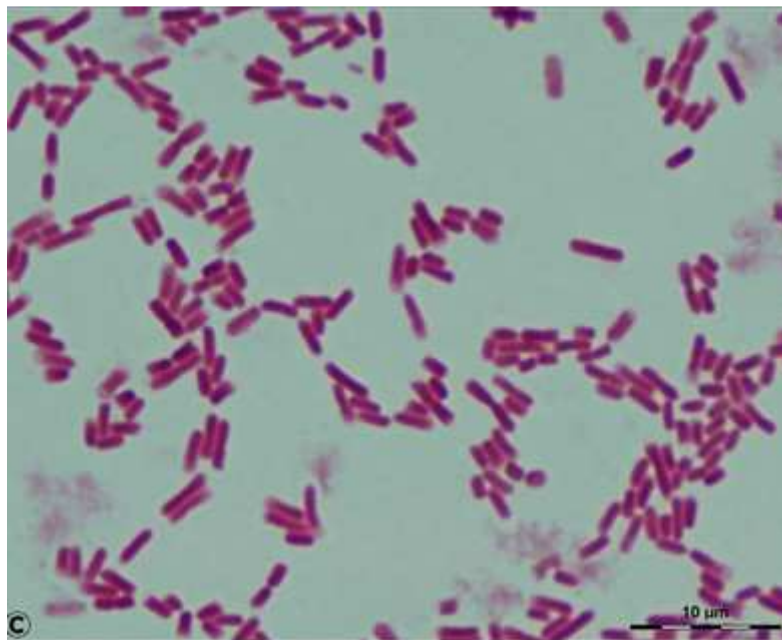
Mezi nejběžnější projevy enterokokových infekcí patří infekce močových cest a bakteriémie. Endokarditida je nejzávažnější infekce způsobená enterokoky, i když zaujímá pouze asi 3% z celkového počtu enterokokových infekcí ^[17]. Enterokoky se také podílejí na infekcích v nitrobršni a pánevní krajině, v ranách a infekcích měkkých tkání, ale v těchto případech jsou často součástí smíšené infekce vyvolané jak aerobními, tak i anaerobními bakteriemi. Mnohem méně častá je enterokoková meningitida, osteomyelitida a septická artritida ^[15].

2.1.5. *Escherichia coli*

Bylo popsáno již několik desítek druhů bakterie rodu *Escherichia*, z nichž nejvýznamnější a nejčastěji se vyskytující zejména v tlustém střevě savců je *Escherichia coli* (*E.coli*). Mezi nověji charakterizované druhy patří *E. fergusonii*, *E. hermannii*, *E. vulneris* a další. *E.coli* se fekálním znečištěním může dostávat do vody, kde přežívá i řadu týdnů. Slouží tak jako nejběžnější indikátor fekální kontaminace pitné vody. Za určitých podmínek přijímá plasmidy nesoucí geny metabolické, geny rezistence a geny pro produkci toxinů ^[7].

E.coli (viz.Obrázek 4) je bakterie, která se běžně vyskytuje ve střevech člověka a jiných teplokrevných živočichů. Zatímco většina kmenů je neškodných, některé mohou způsobit závažné onemocnění. *E.coli* je obvykle přenášena prostřednictvím konzumace kontaminované vody nebo potravin, jako jsou nedostatečně tepelně upravené masné výrobky a syrové mléko. K příznakům intestinální infekce pak patří křeče v břiše a průjem, který může být až krvavý. Může se také objevit horečka a zvracení. Většina pacientů se vyléčí do 10 dnů, ale v některých případech se může onemocnění stát až život ohrožující ^[18].

E. coli vyvolává dva základní typy onemocnění a to extraintestinální a intestinální. K extraintestinálnímu typu patří zejména zánět močových cest, septická onemocnění, infekce ran či různé hnisavé procesy ^[4].



Obrázek 4: *Escherichia coli*, zvětšeno 1000x, preparát barven dle Grama.

převzato z: <http://www.bacteriainphotos.com/Escherichia%20coli%20light%20microscopy.html> ^[19]

Kmeny, které získají schopnost produkce přídatných faktorů virulence, jsou pak původci průjemových onemocnění. Podle projevů virulence je dělíme na několik typů. Prvním z nich je ETEC (enterotoxigenic *E.coli*, enterotoxická *E.coli*), která je průvodcem cestovatelských průjmů produkující dva toxiny, termolabilní a termostabilní. Infekce ETEC kmeny se manifestuje vodnatými průjmy, které nejsou doprovázeny horečkou. Dalším typem je EPEC (enteropathogenic *E.coli*, enteropatogenní *E.coli*), která způsobuje zejména průjmy u novorozenců, které se často manifestují příměsí krve, a rovněž jako předchozí zmíněné kmeny

nejsou většinou doprovázeny horečkou. EIEC (enteroinvasive *E.coli*, enteroinvazivní *E.coli*) způsobuje onemocnění podobné úplavici, kdy je ve stolici často přítomna krev a hlen. EAEC (enteroadherent *E.coli*, enteroadherentní *E.coli*) způsobuje mírnou formu infekce. V neposlední řadě je nutné zmínit EHEC (enterohaemorrhagic *E.coli*, enterohemoragická *E.coli*), která může vyvolat až hemoragickou kolitidu, z níž se může vyvinout hemoragicko-uremický syndrom ohrožující život pacienta. Zdrojem infekce bývá nedostatečně propečené maso, saláty, ale i voda ^[7].

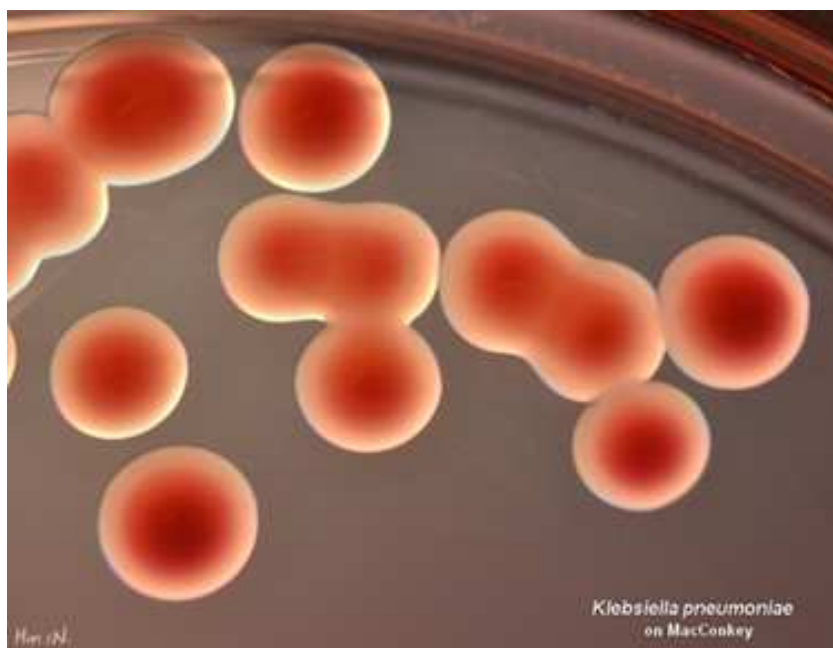
E.coli je primárně citlivá na většinu antibiotik, výjimkou je benzylpenicilin. Přenesená rezistence vzniká zejména u nemocničních kmenů. Léčba extraintestinálních forem je řešena antibiotiky, u forem intestinálních je nutné dbát ještě na dostatečnou hydrataci organismu ^[4].

2.1.6. *Klebsiella pneumoniae*

Významným rysem tohoto mikroba je, že nemá bičíky, je přirozeně rezistentní k ampicilinu a tvoří mohutné polysacharidové pouzdro. Toto pouzdro je také jedním z faktorů virulence, k nimž dále patří několik nefimbriových adhezínů, několik typů fimbrií, termostabilní a termolabilní enterotoxin, bílkoviny vázající železo, tzv. siderofory a lipopolysacharid. U člověka se klebsiely vyskytují zejména ve stolici a jsou druhými nejčastějšími průvodci infekcí močových cest. Dále způsobují gastroenteritidy, meningitidy u novorozenců a sepse ^[7]. Kolonie bakterie *Klebsiella pneumoniae* jsou vyobrazeny na následujícím Obrázku 5.

Jedná se o oportunního patogena, který může způsobovat řadu závažných onemocnění, jako je zápal plic, septikémie, infekce močových cest a infekce měkkých tkání. Typicky, infekce způsobené bakteriemi *Klebsiella pneumoniae* jsou nozokomiální a vyskytují se zejména u osob se sníženou imunitou nebo hospitalizovaných pacientů. Řadí se mezi nejdůležitější nozokomiální patogeny, kde jejich podíl v rámci všech získaných nemocničních nákaz tvoří 5 až 7% ^[20].

Klebsiella pneumoniae se rozlišuje na sérotypy podle polysacharidového antigenu obsaženého v pouzdře. K dnešní době je popisováno 77 sérotypů. Mezi jednotlivými kmeny je četná variabilita ve virulenci, kdy klíčovým faktorem virulence je již dříve zmíněné pouzdro ^[4].



Obrázek 5: Kolonie bakterie *Klebsiella pneumoniae*, kultivace na MacConkey agaru při teplotě 37°C po dobu 24 hodin. Jde o laktóza-pozitivní bakterie, tedy nárůst probíhá v růžových koloniích.

převzato z: <http://www.bacteriainphotos.com/klebsiella-pneumoniae-colonies.html> ^[21]

2.1.7. *Klebsiella pneumoniae* ESBL pozitivní

Počet kmenů bakterie *Klebsiella pneumoniae* produkujících širokospektré beta-laktamázy se v posledních letech výrazně navyšuje. Tyto enzymy způsobují hydrolýzu beta-laktamového kruhu beta-laktamových antibiotik a dochází tak k jejich následné inaktivaci. Tímto způsobem vzniká rezistence na všechny peniciliny, cefalosporiny, včetně sulbaktamu a jejich kombinací, také k monobaktámům jako je aztreonam ^[22].

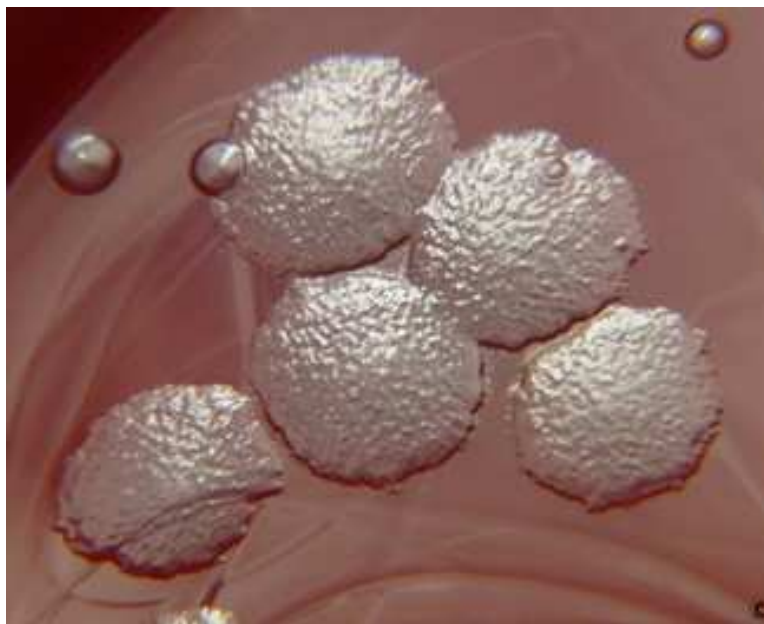
K.pneumoniae ESBL (extended-spectrum b-lactamases, beta-laktamázy širokého spektra) kmeny byly prvně zaznamenány v roce 1983 v Německu a od té doby dochází k celosvětovému nárůstu v jejich výskytu ^[22].

Infekce způsobené multirezistentními G⁻ (gramnegativními) patogeny, které produkují ESBL, byly zaznamenány s rostoucí frekvencí na jednotkách intenzivní péče a jsou spojeny s významnou morbiditou a mortalitou ^[23].

Produkce širokospektrých beta-laktamáz některými mikroorganismy byla popsána již okolo roku 1980 a byla zjištěna u široké palety G⁻ bakterií. *Klebsiella pneumoniae* je nejčastější druh, který má schopnost ESBL produkovat ^{[24] [25]}.

2.1.8. *Pseudomonas aeruginosa*

Jedná se o bakteriální druh vyskytující se v odpadních vodách, půdě, stolici domácích zvířat i lidí. Kolonizuje hlavně sliznice respiračního traktu a močových cest. Vytváří kulově lesklé kolonie (viz.Obrázek 6) a převážná většina kmenů tvoří pigmenty, a to modrozelený pyocyanin a žlutozelený fluorescein. U zdravého člověka může dojít ke kolonizaci tímto patogenem, ale nedochází ke vzniku infekčního onemocnění. Podmínkami vzniku onemocnění jsou například rozsáhlé popáleniny, maligní procesy jako je leukémie, podávání imunosupresiv, cytostatik, kortikoidů či dlouhodobé podávání antibiotik. V případě následné terapie je nutné rozlišit bezvýznamnou a krátkodobou kolonizaci od infekce [4].



Obrázek 6: Kolonie *Pseudomonas aeruginosa* na krevním agaru. Kultivace probíhala po dobu 48 hodin v aerobním prostředí při 37°C. Malé, hladké kolonie zobrazují bakterie *Enterococcus faecalis*.

převzato z: <http://www.bacteriainphotos.com/pseudomonas%20aeruginosa%20colonies.html> [26]

Pseudomonas aeruginosa je jednou z nejčastějších bakterií způsobujících pneumonie jako nejčastější infekce u pacientů na jednotkách intenzivní péče. Je to onemocnění spojené s vysokou mortalitou, zejména v posledních letech, kdy se zvyšuje přítomnost multirezistentních kmenů zejména na již zmiňovaných jednotkách intenzivní péče [27].

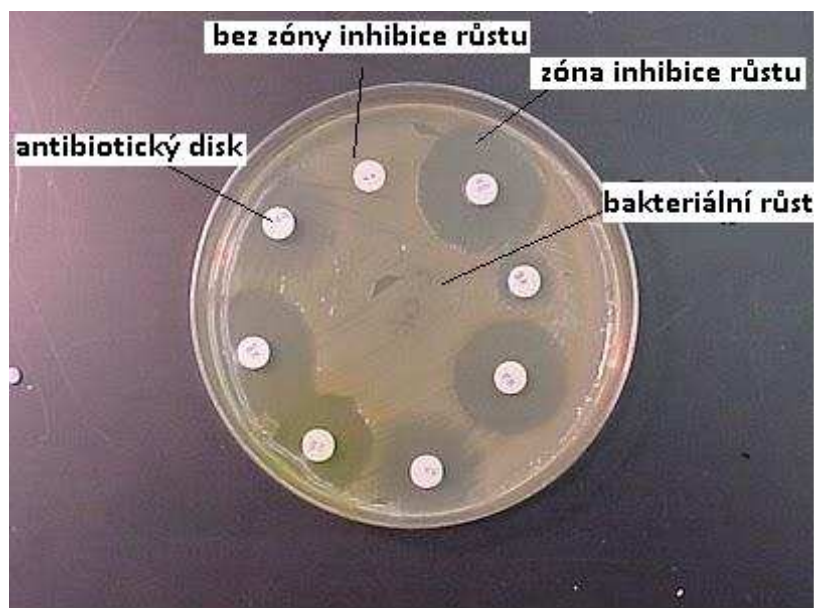
Infekce vyvolané tímto bakteriálním agens mohou zahrnovat různé části těla a způsobit tak různé projevy jako jsou pneumonie, bakteriémie, endokarditida, meningitida, otitida, osteomyelitida, enterokolitida, záněty močových cest či poškození kůže [28].

2.2. Metody testování citlivosti bakterií v systému *in vitro*

2.2.1. Agarová difúzní metoda, diskový difúzní test

Tato metoda (viz. Obrázek 7) je jedním z nejstarších přístupů testování antimikrobiální citlivosti a zůstává stále jednou z nejvíce používaných metod v mnoha klinických laboratořích. Je vhodná pro testování většiny bakteriálních patogenů, také je univerzální pro široký rozsah antimikrobiálních látek, které mají být testovány a nevyžaduje žádné speciální vybavení^[29].

Princip metody spočívá v práci s disky napuštěnými předem stanovenými koncentracemi antibiotik a následnému položení těchto disků na povrch agarové půdy naočkované testovacími mikroorganismy. Z položených disků antibiotikum difunduje do agarové půdy. Přítomné bakterie rostou na agaru v závislosti na jejich citlivosti, či rezistenci vůči difundovanému antibiotiku^[30]. Pokud je bakterie vůči danému antibiotiku citlivá, pak neroste v blízkém okolí tohoto disku a vytváří se takzvaná zóna inhibice růstu (inhibiční zóna).



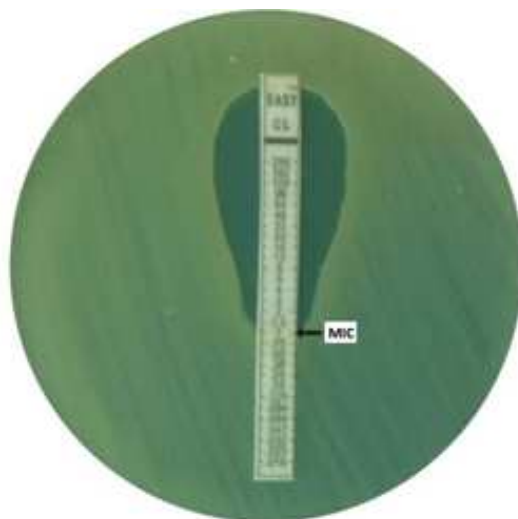
Obrázek 7: Příklad diskového difúzního testu. Na Mueller-Hintonův agar byl naočkován testovaný mikroorganismus a následně byly na agar nakladeny papírové disky napuštěné různými antibiotickými látkami. Po dostatečně dlouhé inkubační době se hodnotí růst či inhibice růstu testovaného klinického izolátu. Růst mikroorganismu se projevuje mikrobiálním povlakem na agaru. V případě inhibice růstu testovaného mikroorganismu není na agaru okolo disku přítomen mikrobiální povlak (chybí inhibiční zóny růstu).

převzato z: <http://easymbbs.com/antibiotic-sensitivity-test/> a upraveno^[31]

Po dostatečně dlouhé inkubaci (pro bakteriální agens většinou 18-24 hodin, při 37°C) se měří průměr inhibičních zón okolo jednotlivých disků. Tyto naměřené průměry se následně porovnávají s “breakpoint“ hodnotami (hraniční hodnoty velikosti inhibičních zón vymezující bakterie vůči testovanému antibiotiku do kategorie: citlivá, intermediálně citlivá, rezistentní) standarty poskytovanými organizací CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute, Institut pro klinické a laboratorní standardy) či organizací EUCAST (European Commite on Antimicrobial Susceptibility Testing, Evropská komise pro testování antimikrobiální citlivosti), která vychází právě z metodiky CLSI ^[32] ^[33]. Díky těmto metodikám výsledky poskytují lékařům možnost volby správné antibiotické terapie ^[32].

2.2.2. Gradientová difúzní metoda, E-test

Jedná se o kvantitativní difúzní metodu, založenou na práci s komerčně zakoupenými proužky porézního papíru, ve kterém jsou od sebe oddělena místa s přesně definovanou klesající koncentrací daného antibiotika. Tento proužek je umístěn na naočkovanou agarovou plotnu. Výsledkem je inhibiční zóna mající tvar kapky, která svým ostrým hrotem určuje místo, kde je koncentrace testované látky rovna MIC (minimal inhibitory concentration, minimální inhibiční koncentrace). Nevýhodou této metody je její finanční náročnost ^[34] ^[35]. Gradientová difúzní metoda je znázorněná na následujícím Obrázku 8.



Obrázek 8: Gradientová difúzní metoda, E-test. Na agar byl naočkován testovaný mikroorganismus (*Pseudomonas aeruginosa*) a přiložen komerčně dostupný proužek napuštěný antibiotikem colistinem. Po dostatečně dlouhé inkubační době dochází k odečtení hodnoty MIC.

převzato z: <http://www.himedialabs.com/intl/en/products/Microbiology/Antimicrobial-Susceptibility-Ezy-MIC%E2%84%A2-Strips-Single-Antibacterial/Colistin-0-016256-mcgml-EM020#> ^[36] a upraveno

2.2.3. Agarová diluční metoda

Princip této metody je založen na přípravě sestavy Petriho misek se standardním objemem agarové půdy s přidanými přesně definovanými koncentracemi antibiotik. Na povrch jednotlivých Petriho misek s různými koncentracemi antibiotik se naočkuje větší počet testovaných kmenů a dochází k následné inkubaci za předepsaných podmínek (viz. Obrázek 9). Plotna, která obsahuje nejnižší množství antibiotika, kde není pozorován růst mikroba, odpovídá hodnotě MIC ^[34].

Z důvodu časové i materiální náročnosti tato metoda nemá široké využití v laboratorní praxi, a proto se nepoužívá pro rutinní testování ^[34].



Obrázek 9: Ilustrativní snímek znázorňující provedení agarové diluční metody. V každé ze sedmi Petriho misek je homogenně dispergované dané množství testované antimikrobiální látky. Koncentrace testovaných látek jsou 0,5, 1, 2, 4, 8, 16 a 32 µg/ml. Následně bylo na každou z těchto misek zaočkováno 11 bakteriálních kmenů testovaných mikroorganismů a poté byla sledována MIC antimikrobiální látky.

převzato z:

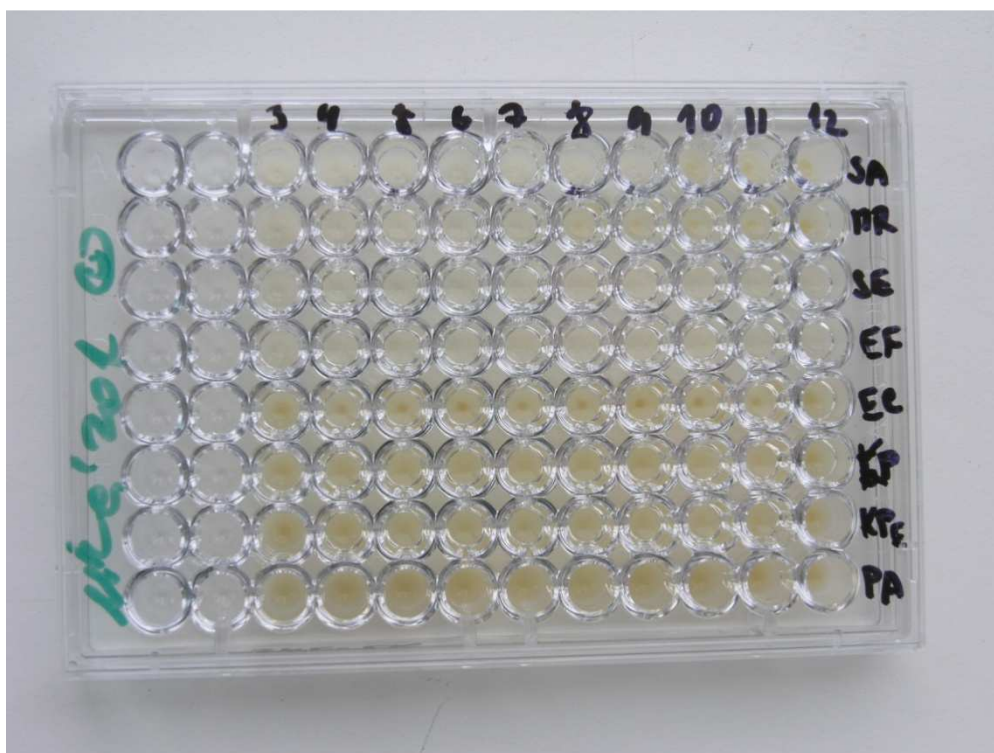
http://www.atmph.org/viewimage.asp?img=AnnTropMedPublicHealth_2012_5_3_178_98609_u1.jpg ^[37]

2.2.4. Bujónová diluční metoda

Jedná se o kvantitativní test pro určení citlivosti mikrobů k antibiotikům, kde se podle pracovního postupu rozlišují dva základní typy této metody. Prvním z nich je makrodiluční test, kde se pracuje celkově s větším objemem bujónu ve zkumavkách a také větším množstvím antibiotik. Vyhodnocení výsledků nastává po inkubaci po 16 až 20 hodinách při 37°C ^[34] ^[38].

Mnohem populárnější a také praktičtější uplatnění má v dnešní době mikrodiluční bujónová metoda, která byla využita i k hodnocení MIC v této práci (viz. Obrázek 10). Mezi výhody této metody patří zejména možnost testování většího počtu bakteriálních kmenů, jednoduchá inokulace destiček, poměrně nízké finanční náklady na vybavení, velice rychlý způsob zjištění citlivosti jednotlivých kmenů a také možnosti automatického odečtu a hodnocení výsledků pomocí spektrofotometru, který slouží k proměrování denzity mikrobiální suspenze v jednotlivých jamkách mikrotitračních destiček ^[34] ^[39].

Mikrotitrační destička se inkubuje v termostatu při teplotě 35°C po dobu 48 hodin a odečet výsledků probíhá po 24 hodinové inkubaci a následně po 48 hodinách. První jamka, v které není viditelný růst, udává hodnotu MIC ^[34].



Obrázek 10: Příklad mikrodilučního bujónového testu. Na přiložené fotografii můžeme pozorovat růst různých testovacích modelových kmenů bakterií, kdy jednotlivé kmeny byly pipetovány v rámci řádků. V tomto případě došlo k rozpuštění u testované látky až po přidání třetího ekvivalentu rozpouštědla DMSO (dimethylsulfoxid), a proto se začíná hodnotit růst bakteriálních kmenů až od koncentrace 125 $\mu\text{mol/l}$ (podrobněji viz. kapitola 3.5.2. Příprava dvojkové ředící řady testované látky v experimentální části této práce). V sloupcích 3-11 byla napipetována testovaná látka v rámci dvojkové ředící řady (podrobněji viz. kapitola 3.5.3. Pipetování do 96 jamkové mikrotitrační destičky). Sloupec č. 12 neobsahuje testovanou látku a slouží jako kontrola.

autor: Tereza Petlánová, pořízeno mobilním fotoaparátem HTC Desire X (firma HTC), mikrobiologická laboratoř Katedry biologických a lékařských věd, Faf UK HK

2.2.5. Automatizované systémy

Mnohé studie zabývající se srovnáváním výsledků získaných různými metodami určujícími citlivost testovacích bakteriálních kmenů demonstrovaly problémy týkající se vysoké variability výsledků. Ze závěrů těchto studií jasně vyplývá potřeba standardizace a případná automatizace těchto metod. V poslední době je zaznamenáván rostoucí zájem o využití přístrojů, které dovolují nejen automatické stanovení a hodnocení citlivosti mikroorganismů, ale mohou také identifikovat mikroorganismy, jenž jsou testovány. Nespornou výhodou těchto systémů je fakt, že tyto systémy poskytují výsledky citlivosti mnohem dříve, než je tomu u výše zmíněných metod a umožňují také elektronické zpracování dat ^[40].

Potřebný krátký časový interval kultivace pro následnou detekci citlivosti a identifikaci znamená, že výsledky jsou vyhodnoceny rychleji než při využití ručních mikrobiálních identifikačních technik ^[41].

V současné době existují čtyři automatizované systémy schválené FDA (Food and Drug Administration, Úřad pro kontrolu potravin a léčiv) využívající mikrodiluční bujónovou metodu ^[39].

MicroScanWalkAway je automatizovaný systém sloužící k bakteriální identifikaci a testování citlivosti. Tento systém je schopen identifikace a detekce citlivosti ve dvou pracovních módech založených na dvou rozdílných detekčních přístupech. Klasický detekční fotometrický přístup vyžaduje kultivaci přes noc, zatímco fluorimetrický přístup dovoluje vyhodnotit výsledky vedoucí k identifikaci či určení citlivosti již po dvou hodinách. Výhodou je také využití mikrotitračních panelů standardní velikosti ^[40].

Sensitire ARIS (Automatic Reading and Incubation System, Automatický čtecí a inkubační systém) také využívá standardní velikosti mikrotitrační destičky, která je po naočkování umístěna v inkubačním systému a dochází k automatickému fluorimetrickému sledování růstu po hydrolýze fluorogenních substrátů. Celý proces je řízen mikropočítačem. Tento systém byl původně vyvinut v USA (United States of America, Spojené státy americké) pouze pro noční testování citlivosti, ale v současné době je k dispozici v některých zemích pro testování po krátkodobé inkubaci ^[40].

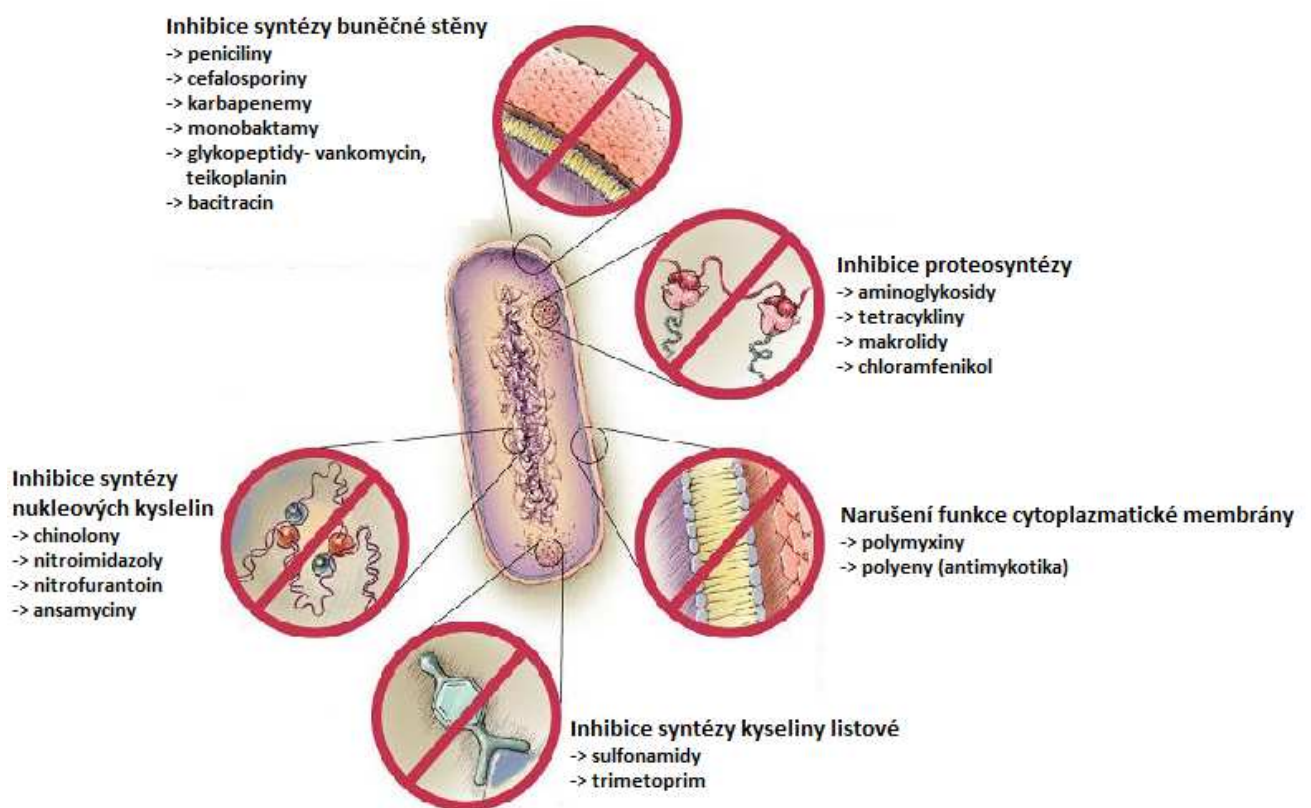
Automatizovaný **Vitek System** využívá tenkých plastových karet obsahujících asi 30 jamek nebo kapilár, kterými prochází bakteriální suspenze. Karty jsou k dispozici v různých koncentracích antimikrobiálních látek a identifikačních médií. Růst je stanoven turbidimetricky v hodinových intervalech po dobu až 15 hodin ^[40].

Vitek2 system byl vyvinut jako novější verze zmiňovaného systému Vitek. Tento systém automatizuje zpracování včetně úvodní přípravy antimikrobní látky, ověřuje automaticky hustotu inokula, plnění karty a uzavírání karty. Přístroj automaticky přenáší karty do čtečky a vyřadí je na konci testování. Systém umožňuje testování až 10 antimikrobiálních látek v závislosti na testovaných bakteriálních druzích ^[40]. Tento systém poskytuje větší automatizaci při současném zvýšení bezpečnosti a je schopen eliminovat opakující se manuální operace.

BD Phoenix systém zahrnuje velký čtecí inkubátor s kapacitou zpracování až 99 testovacích panelů, které obsahují po 84 jamkách s antibiotiky. V každém panelu je možné detekovat růst mikroorganismů jak turbidimetry, tak kolorimetry a to po 20ti minutových intervalech. Testovací panely jsou vyráběny jak pro G⁻ i G⁺ bakterie a výsledky MIC jsou generovány po 6-16 hodinách ^[39].

2.3. Antibiotika

Antibiotika jsou léčiva, která lze rozdělit na základě různých kritérií. Jedním ze způsobů jejich klasifikace je dělení dle konečného účinku na bakteriální patogeny, tedy na antibiotika bakteriostatická, která znemožňují další růst bakterií a antibiotika baktericidní, jež bakterie zabíjejí. Jednotlivé skupiny antibiotik lze také dělit podle jejich mechanismu účinku na bakteriální agens. Obrázek 11 a Tabulka 1 znázorňují mechanismy účinku antibiotik a také výsledný efekt antibiotik na bakterie.



Copyright © 2006 Pearson Education, Inc., publishing as Benjamin Cummings.

Obrázek 11: Mechanismus účinku jednotlivých skupin antibiotik. Na obrázku můžeme vidět základní mechanismy účinku jednotlivých skupin dosud známých antibiotik. Antibiotické látky lze dělit do několika skupin podle mechanismu účinku a to na: látky inhibující syntézu buněčné stěny, látky inhibující proteosyntézu, látky inhibující syntézu nukleových kyselin, látky inhibující syntézu kyseliny listové a v neposlední řadě na látky, které narušují funkci cytoplazmatické membrány.

převzato z: http://spot.pcc.edu/~jvolpe/b/bi234/lec/6_antimicrobials/ ^[42] a upraveno

Tabulka 1: Jednotlivé skupiny antibiotik, jejich mechanismus účinku a cílový účinek na bakteriální agens.

převzato z: Mechanismus of Antibacterial Resistance ^[43] a upraveno

Skupina antibiotik	Mechanismus účinku	Účinek
Peniciliny	inhibice syntézy buněčné stěny	baktericidní
Cefalosporiny	inhibice syntézy buněčné stěny	baktericidní
Monobaktamy	inhibice syntézy buněčné stěny	baktericidní
Karbapenemy	inhibice syntézy buněčné stěny	baktericidní
Glykopeptidová antibiotika	inhibice syntézy buněčné stěny	baktericidní
Bacitracin	inhibice syntézy buněčné stěny	baktericidní
Polymyxiny	porucha funkce cytoplazmatické membrány	baktericidní
Tetracykliny	inhibice proteosyntézy	bakteriostatická
Amfenikoly	inhibice proteosyntézy	bakteriostatická
Makrolidy	inhibice proteosyntézy	bakteriostatická*
Aminoglykosidy	inhibice proteosyntézy	baktericidní
Sulfonamidy + trimetoprim	inhibice syntézy kyseliny listové	bakteriostatická
Chinolony	inhibice syntézy nukleových kyselin	baktericidní
Nitroimidazoly	inhibice syntézy nukleových kyselin	baktericidní
Nitrofurantoin	inhibice syntézy nukleových kyselin	bakteriostatická*
Ansamyciny	inhibice syntézy nukleových kyselin	baktericidní

* závisí na druhu a koncentraci mikroorganismu, přičemž vyšší koncentrace mohou být i baktericidní

2.3.1. Beta-laktamová antibiotika

Charakteristickým znakem všech beta-laktamových antibiotik je přítomnost betalaktamového kruhu, který je základní podmínkou jejich účinku ^[44]. Tento kruh je možné enzymaticky štěpit pomocí specifických enzymů zvaných beta-laktamázy a následkem tohoto štěpení ztrácí struktura svůj antibiotický efekt ^[45].

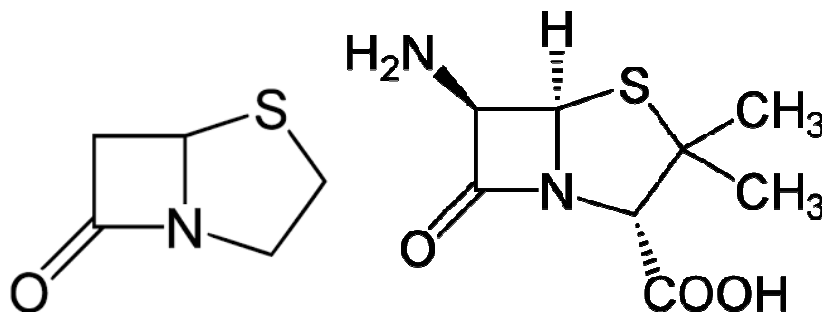
Mezi inhibitory beta-laktamáz řadíme kyselinu klavulánovou, sulbaktam a tazobaktam. Jsou to antibakteriálně neúčinné látky, které se kombinují s antibiotiky ^[45].

Historie beta-laktamových antibiotik se datuje od roku 1928, kdy Alexander Fleming pozoroval na kolonii stafylokoků účinek antibakteriální látky, která byla produkována plísní *Penicilium notatum*. Roku 1943 se začalo s průmyslovou výrobou penicilinu a u nás se penicilin začal vyrábět roku 1949 ^[44].

Antibiotika tohoto typu zahrnující peniciliny, cefalosporiny, karbapenemy a monobaktamy se vyznačují společným mechanismem účinku, což je selektivní inhibice syntézy bakteriální stěny^[44]. K poškození buněčné stěny dochází v několika krocích. Jde o vazbu na PBPs (penicilin-binding proteins, penicilin-vázající proteiny), které představují buněčné receptory. Inhibice syntézy bakteriální stěny je způsobena inhibicí peptidáz, a tím zabránění zpevnění peptidoglykanu, jakožto nejdůležitější součásti buněčné stěny spojené příčnými vazbami^[45]. Stavebními kameny peptidoglykanu jsou N-acetylmuramová kyselina a N-acetylglukosamin. Na N-acetylmuramovou kyselinu jsou navázány dlouhé peptidové řetězce zakončené D-alaninem a spojováním jednotlivých řetězců dochází k transpeptidační reakci a zpevnování peptidoglykanu příčnými vazbami. Celá tato reakce je katalyzována PBPs a právě inaktivací těchto transpeptidázových enzymů dochází k blokaci transpeptidační reakce a následné syntéze buněčné stěny^[46].

2.3.1.1. Penicilinová antibiotika

Peniciliny jsou deriváty kyseliny 6-aminopenicilanové, kdy základním skeletem je penam, což je beta-laktamový kruh kondenzovaný s thiazolidinem (viz.Obrázek 12)^[44].



Obrázek 12: Základní skelet penicilinových antibiotik penam a struktura kyseliny 6-aminopenicilanové.

převzato z: <https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Penam.svg>^[47] , https://en.wikipedia.org/wiki/6-APA#/media/File:6-Aminopenicillanic_acid.svg^[48]

Antimikrobiální spektrum základních penicilinů je poměrně úzké a zahrnuje G^+ mikroby, naproti tomu širokospektré peniciliny působí i na G^- mikroby. Farmakokinetické vlastnosti penicilinů spočívají zejména v dobré absorpci z gastrointestinálního traktu, dobrém průniku do buněk a převážným vylučováním ledvinami. Biologický poločas penicilinů je krátký, a to zhruba 1 hodina^[45].

Penicilinová antibiotika mají velice dobrý bezpečnostní profil. Mezi nejčastější nežádoucí účinky patří alergické reakce, které se objevují zhruba u 3% pacientů. Alergické reakce se projevují od lehkých kožních projevů, ale v některých případech může vzniknout až anafylaktický šok. Tyto alergické reakce neprobíhají v závislosti na dávce, což znamená, že alergická reakce může vzniknout i po malých dávkách antibiotik ^[45] ^[46]. Dalším neméně častým nežádoucím účinkem jsou gastrointestinální problémy zahrnující průjem či nauzeu. Po velmi vysokých dávkách se mohou vyvinout neurotoxické příznaky, jako jsou křeče či senzorické a motorické poruchy ^[46]. U depotních přípravků je možnost vzniku Hoigného syndromu, kdy dochází k mikroembolizaci, díky ve vodě špatně rozpustným komplexům ^[46].

Penicilin G, také benzylpenicilin se získává z plísně *Penicillium chrysogenum* ^[44]. Podává se pouze parenterálně, protože není stálý v kyselém prostředí a po perorální aplikaci by byl tak inaktivován. Vyznačuje se velice krátkým biologickým poločasem, proto byly připraveny jeho soli jako depotní přípravky. Mezi depotní přípravky zahrnujeme benzathin-benzylpenicilin či prokan-benzylpenicilin, které mají delší biologický poločas a jsou aplikovány intramuskulárně ^[46].

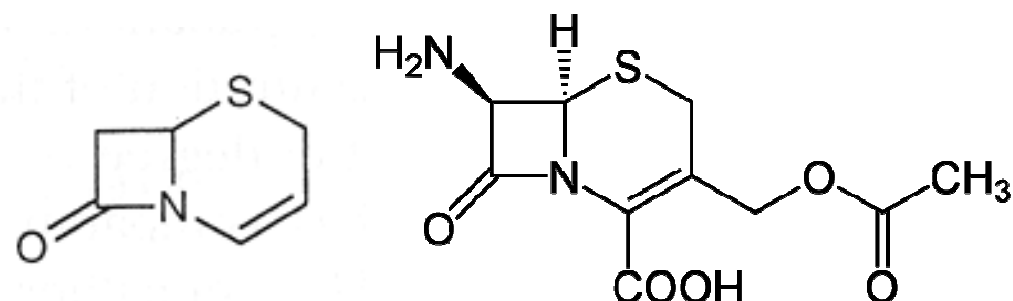
Penicilin V má podobné vlastnosti, je však stabilní v kyselém prostředí, proto ho lze podávat perorálně ^[49]. Další skupinou jsou acidostabilní peniciliny, stabilní vůči beta-laktamázám, které působí zejména na stafylokokové infekce. Mezi zástupce zařazujeme oxacilin, dikloxacilin, flukloxacilin ^[46].

Mezi širokospektré peniciliny zařazujeme aminopeniciliny, ureidopeniciliny a karboxypeniciliny. Do první zmiňované skupiny řadíme ampicilin či amoxicilin, kdy amoxicilin se absorbuje až 2x lépe než ampicilin, proto je podávání ampicilinu perorálně dnes obsoletní a takto se podává pouze amoxicilin ^[46]. Karboxypeniciliny jsou v současné době představovány tikarcilem, který se ale bohužel vyznačuje nedostatečnou stabilitou vůči beta-laktamázám. Mezi ureidopeniciliny řadíme piperacilin, kdy velice výhodná kombinace s tazobaktamem spočívá ve velice širokém bakteriálním spektru účinku ^[45].

Velice důležitou skupinou v praxi užívaných antibiotik jsou kombinované přípravky penicilinového antibiotika s inhibitory beta-laktamázy, které zahrnují co-amoxicilin (kyselina klavulánová + amoxicilin), co-ampicilin (sulbaktam + ampicilin), co-piperacilin (tazobaktam + piperacilin) a co-tikarcilin (kyselina klavulánová + tikarcilin) ^[44].

2.3.1.2. Cefalosporinová antibiotika

Chemickou strukturou jsou cefalosporiny velice blízké penicilinům, obsahují také beta-laktamový kruh a jejich kondenzovaný heterocyklický systém se nazývá cefem. Jedná se tedy o deriváty kyseliny 7-aminocefalosporanové (viz. Obrázek 13) ^{[44][46]}.



Obrázek 13: Základní skelet cefalosporinů a chemická struktura kyseliny 7-aminocefalosporanové.

převzato z: <https://quizlet.com/92920269/cell-wall-synthesis-inhibitors-flash-cards/> ^[50] a upraveno

Přírodní cefalosporiny jsou získávány z některých druhů nižších hub rodu *Cephalosporinum*, v dnešní době už se ale většina cefalosporinových antibiotik získává polosynteticky ^[44]. Antimikrobiální spektrum cefalosporinů je široké, a právě podle spektra účinku lze jednotlivé cefalosporiny zařadit do 5ti základních generací, přičemž v rámci posloupnosti jednotlivých generací se zhoršuje účinnost ke G⁺ mikrobům, ale podstatně se zvyšuje účinnost proti G⁻ mikroorganismům ^[45].

Z hlediska farmakokinetiky se cefalosporiny vyznačují vysokou rychlostí eliminace. Neesterifikované cefalosporiny jsou dobře absorbovány v tenkém střevě a mají vysokou biologickou dostupnost, kdežto esterifikované perorální cefalosporiny jsou proléčiva a po vstřebávání se hydrolyzují na účinnou formu ^[46].

Cefalosporiny mají také velmi dobrý bezpečnostní profil. Z nežádoucích účinků se mohou vyskytovat alergické reakce ve formě exantému, který může být doprovázen horečkou a eozinofilií až anafylaktickým šokem. Mezi další nežádoucí účinky patří tromboflebitida po nitrožilní aplikaci zejména po vyšších dávkách cefalosporinů. V určitých případech může docházet i ke změnám v krevním obraze, případně u perorálně podávaných cefalosporinů může docházet k poruchám funkcí trávicího ústrojí, jako je nevolnost, zvracení či průjem, což může zvyšovat riziko superinfekce a v ojedinělých případech se může objevit i pseudomembranózní kolitida ^[45]. Kvůli zvýšené nefrotoxicitě by se neměly kombinovat například s aminoglykosidy ^[46].

1. generace cefalosporinů je charakteristická svou vysokou účinností na G⁺ bakterie pro intravenózní podání, některé lze podávat i perorálně. Nepronikají přes hematoencefalickou bariéru a jsou odolné vůči stafylokokovým beta-laktamázám. Jednotliví zástupci jsou uvedeny v Tabulce 2 ^[45].

Tabulka 2: 1. generace cefalosporinů.

zpracováno podle: Lincová, D., *et al.*: Základní a aplikovaná farmakologie, 2007^[45]

1. generace cefalosporinů	
Parenterální	Perorální
cefalotin, cefapirin, cefazolin	cefalexin, cefadroxil

2. generace cefalosporinových antibiotik má také vysokou účinnost na G⁺ bakterie, ale vykazuje vyšší stabilitu vůči beta-laktamázám^[45]. Zástupci této generace jsou uvedeny v Tabulce 3.

Tabulka 3: 2. generace cefalosporinů.

zpracováno podle: Lincová, D., *et al.*: Základní a aplikovaná farmakologie, 2007^[45]

2. generace cefalosporinů	
Parenterální	Perorální
cefuroxim, cefamandol, cefoxitin, cefotiam	cefaklor, cefuroxim axetil

Cefalosporiny 3. generace se liší od cefalosporinů 1. a 2. generace nižší aktivitou proti stafylokokům a mají ze všech cefalosporinů nejvyšší účinek na G⁻ bakterie^[45]. Jednotliví zástupci pro parenterální a perorální podání jsou v Tabulce 4.

Tabulka 4: 3. generace cefalosporinů.

zpracováno podle: Lincová, D., *et al.*: Základní a aplikovaná farmakologie, 2007^[45]

3. generace cefalosporinů	
Parenterální	Perorální
cefotaxim, ceftizoxim, ceftriaxon, ceftazidim, cefoperazon	cefixim, ceftibuten, cefpodoxim proxetil

Do 4. generace cefalosporinů patří látky mající vysokou účinnost jak proti G^+ tak i G^- bakteriím včetně *Pseudomonas aeruginosa*^[45]. Existují pouze zástupci pro parenterální podání uvedeny v Tabulce 5.

Tabulka 5: 4. generace cefalosporinů.

zpracováno podle: Lincová, D., et al.: Základní a aplikovaná farmakologie, 2007^[45]

4. generace cefalosporinů	
Parenterální	Perorální
cefsulodim, cefpirom, cefepim	-----

Nejnovější 5. generace cefalosporinů zahrnuje léčiva, které se používají zejména pro život ohrožující stavy^[45]. Stejně jako 4. generace cefalosporinů, tak i 5. generace obsahuje zástupce pouze pro parenterální podání.

Tabulka 6: 5. generace cefalosporinů.

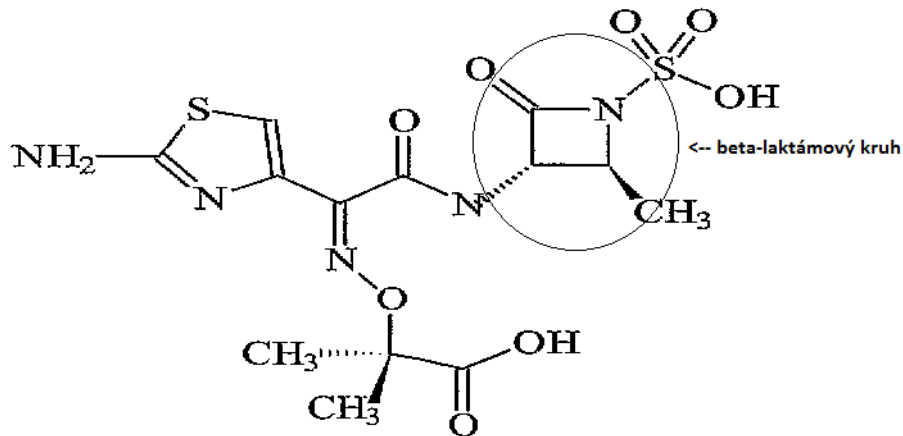
zpracováno podle: Lincová, D., et al.: Základní a aplikovaná farmakologie, 2007^[45]

5. generace cefalosporinů	
Parenterální	Perorální
ceftobiprol, ceftarolin fosamil	-----

2.3.1.3. Monobaktamy

Jediným klinicky používaným zástupcem této skupiny antibiotik je aztreonam, jehož strukturním základem je pouze beta-laktamový kruh, který je odolný vůči působení beta-laktamázy (viz. Obrázek 14). Oproti jiným širokospektrým beta-laktamovým antibiotikům je aztreonam účinný pouze na G^- aerobní patogeny^[45].

Po perorálním podání se špatně vstřebává, proto se podává výhradně parenterálně. Nedochozí k významné metabolizaci a vylučování probíhá primárně ledvinami. Z nežádoucích účinků jsou typické kožní vyrážky, alergické reakce či gastrointestinální projevy, které jsou typické i pro další skupiny beta-laktamových antibiotik^[45].



Obrázek 14: Vzorec aztreonamu a označení beta-laktamového kruhu.

převzato z: <http://www.google.com/patents/EP1527072A1?cl=en>^[51] a upraveno

2.3.1.4. Karbapenemy

V praxi využívaná antibiotika této skupiny jsou imipenem, meropenem, ertapenem a dorapenem. Jedná se o vysoce účinná antibiotika, které jsou stabilní vůči veškerým beta-laktamázám. Můžeme je zařadit do skupiny tzv. rezervních antibiotik, kdy jejich využití přichází při sepsích či život ohrožujících infekcích^[46].

Po perorálním podání nejsou absorbovány, proto musí být podávány intramuskulárně nebo intravenózní infúzí. K nežádoucím účinkům se řadí alergické reakce, nauzea, zvracení, změny v krevním obraze a při vysokých dávkách se může vyskytovat i neurotoxicita^{[45] [46]}.

2.3.2. Další antibiotika inhibující syntézu bakteriální stěny

2.3.2.1. Glykopeptidová antibiotika

Složením se tato antibiotika řadí mezi polypeptidy obsahující navíc glykosidicky vázané různé cukry. Jejich mechanismus účinku spočívá v inhibici biosyntézy peptidoglykanových mureinů, což jsou základní stavební jednotky buněčné stěny^[44].

Vankomycin je účinný pouze na G^+ koky, rychle se eliminuje ledvinami a po perorálním podání se vankomycin téměř neresorbuje, takže se používá lokálně k terapii střevních onemocnění. K možným nežádoucím účinkům patří ototoxicita vedoucí až k ohluchnutí, dále také alergické reakce^[46].

Druhým zástupcem je teikoplanin, který se získává z kultur *Actinoplanes teichomyceticus*. Používá se u těžkých infekcí vyvolaných G^+ patogeny, které nelze potlačit klasickými beta-laktamovými antibiotiky ^[46]. Mezi novější látky tzv. druhé generace se řadí oritavancin, dalbavancin, televancin ^[52].

2.3.2.2. Bacitracin

Bacitracin můžeme zařadit do skupiny polypeptidových antibiotik, kdy se jedná o polypeptid získávaný z *Bacillus subtilis*. Blokuje regeneraci lipidového přenašeče důležitého při tvorbě peptidoglykanu a tím blokuje syntézu buněčné stěny. Používá se pouze lokálně, a to často v kombinaci s neomycinem, k lokální léčbě infekcí kůže a sliznic. Je vysoce neurotoxický, proto se pro perorální podávání neužívá ^[45] ^[46].

2.3.3. Antibiotika způsobující poškození buněčné membrány

Jedná se o bazické polypeptidy získané z kmenů *Bacillus polymyxa*. Základ tvoří heptapeptidový kruh s postranním tripeptidovým řetězcem. Používají se pro lokální, tak i systémové aplikace, kde ale z důvodu jejich vysoké toxicity jsou využívány pouze u infekcí rezistentních na jiná antibiotika ^[44].

Polymyxin B působí pouze proti G^- patogenům a k častým nežádoucím účinkům patří nefrotoxicita a neurotoxicita. Mezi další zástupce řadíme polymyxin E (kolistin), který se získává z bakterie *Bacillus colistinus* ^[46].

Tato antibiotika interagují s fosfolipidy buněčných membrán, kde působí jako kationtové detergenty a poškozují tak permeabilitu a současně integritu buněčné membrány ^[53].

2.3.4. Antibiotika inhibující proteosyntézu

2.3.4.1. Tetracyklinová antibiotika

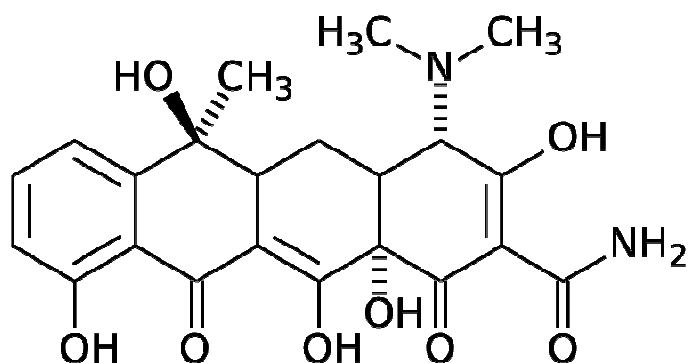
Jedná se o deriváty oktahydrotetracenu a jejich molekula je tvořena čtyřmi šestičlennými lineárně kondenzovanými cykly (viz. Obrázek 15). Jsou produkovány některými druhy rodu *Streptomyces*. Mechanismus účinku spočívá v inhibici proteosyntézy bakteriální buňky a působí tak bakteriostaticky ^[44]. Dochází k jejich vazbě na 30S podjednotku ribozomu, čímž je znemožněno navázání aminoacyl-tRNA (transfer ribonucleic acid, transferová

ribonukleová kyselina) na vazebné místo pro aminoacyl a zabráněno tak další inkorporaci aminokyselin do řetězce ^[46] ^[53].

Řadí se mezi širokospektrá antibiotika, jelikož působí proti G^+ i G^- mikrobům, proti chlamydiím, rickettsiím či spirochétám, ale i na některá protozoa ^[44].

Tetracykliny dráždí sliznice trávicího ústrojí a navíc svým bakteriostatickým účinkem negativně ovlivňují střevní mikroflóru, což může způsobovat průjemy a zvracení. Zvyšuje se tak možnost superinfekce způsobené *Clostridium difficile* nebo stafylokoky a hrozí riziko rozvoje pseudomembranózní enterokolitidy. Současným podáváním vícemocných iontů Ca^{2+} , Fe^{2+} , Mg^{2+} , Al^{3+} vznikají komplexy a je tím snížena resorpce tetracyklinů. Tyto komplexy se mohou vázat v nově tvořených kostech, zubech zejména u malých dětí a tím může docházet k poruše růstových chrupavek a deformitě kostí ^[45] ^[46].

Jednotlivé tetracykliny se liší rychlostí resorpce z trávicího ústrojí a vazbou na plazmatické bílkoviny. Přednostně se podávají perorálně a absorpce je nejvyšší nalačno. Tetracykliny se vylučují stolicí, žlučí, močí v bakteriostaticky účinných koncentracích ^[46].



Obrázek 15: Základní skelet tetracyklinových antibiotik.

převzato z: https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Tetracycline_structure.svg ^[54]

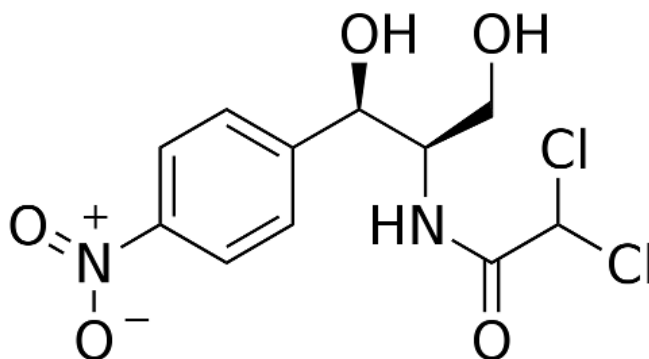
2.3.4.2. Amfenikoly

Z chemického hlediska jsou amfenikoly deriváty 2-amino-1-fenylpropan-1,3-diolu, z nichž nejvýznamnějším zástupcem je chloramfenikol (viz. Obrázek 16). Mechanismus účinku spočívá v blokadě proteosyntézy, váže se na 50S podjednotku ribozomu a inhibuje navázání enzymu peptidyltransferázy, čímž inhibuje transpeptidační reakci ^[44]. Původně byl izolován ze *Streptomyces venezuelae*, ale nyní se připravuje synteticky ^[46]. Spektrum účinku

je velmi široké a podobá se tetracyklinům, zahrnuje většinu G^+ i G^- bakterií, rickettsie, chlamydie i mykoplazmata [53].

Po perorálním podání se velmi dobře vstřebává, proniká dobře do likvoru a prochází placentou i do mateřského mléka. Lze ho podávat rovněž intravenózně [46].

Při dlouhodobějším podávání chloramfenikolu může docházet k poškození krvetvorby až útlumu kostní dřeně, což je nejzávažnější nežádoucí účinek, který může mít až fatální průběh. Díky své toxicitě se většinou používá až jako antibiotikum druhé volby a je rezervován pro závažné infekce, kde užitek jednoznačně převažuje riziko a kde nejsou k dispozici méně toxická antibiotika. Dalším velice závažným nežádoucím účinkem je tzv. „baby gray syndrom“ (šedý syndrom u novorozenců) a to zejména u předčasně narozených dětí, u kterých následně dochází k průjmům, zvracení a k šedavému zabarvení kůže [45] [46] [53].



Obrázek 16: Chemická struktura chloramfenikolu.

převzato z: <http://medicalcheatsheets.blogspot.cz/2012/01/chloromycetin-aplicaps-chloramphenicol.html> [55]

2.3.4.3. Makrolidová antibiotika

V současné době je známo přes 40 přírodních látek této struktury, ale pouze několik z nich našlo uplatnění v klinické praxi. Jedná se o sloučeniny glykosidické povahy a pro jejich strukturu je charakteristický 14 až 16 čtený makrocyclický laktonový kruh (viz.Obrázek 17) [44].

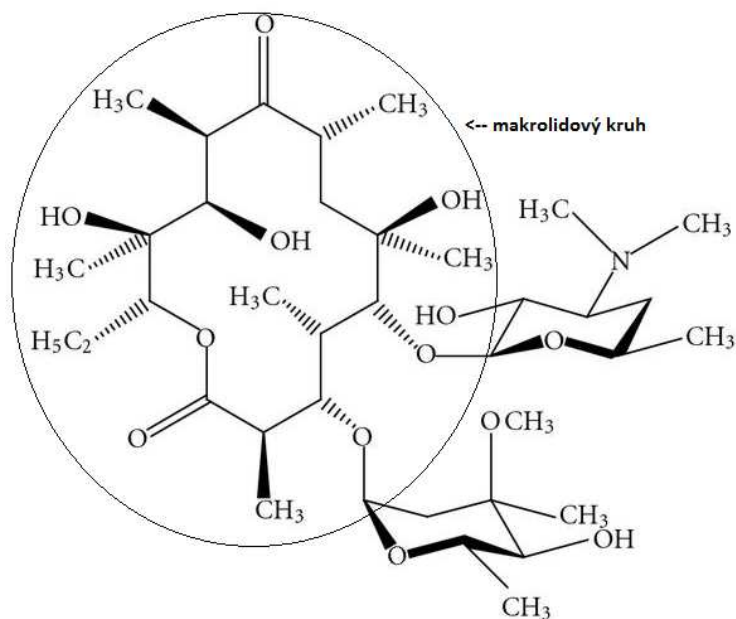
Dochází k inhibici syntézy bílkovin ireverzibilní vazbou na 50S podjednotku ribozomu, čímž se zbrzdí translokace a dojde k úplné zástavě proteosyntézy. Spektrum jejich účinku se u jednotlivých zástupců liší. Erythromycin má spektrum podobné penicilinu a je

vhodný jako náhrada u pacientů netolerujících penicilinová antibiotika. Novější léčiva působí i proti G⁻ mikroorganismům a jsou také účinná na některá protozoa [45] [53].

Tato antibiotika vykazují celkově nízkou orgánovou toxicitu, proto jsou často doporučována v pediatrii, někdy i v těhotenství. Vyskytují se nežádoucí reakce jako je zvracení, nauzea či průjemy. Další nežádoucí účinky zahrnují ototoxicitu či hypersenzitivní reakce [45].

Makrolidová antibiotika můžeme třídit na přírodní a semisyntetické preparáty. Do první zmiňované skupiny řadíme erytromycin, spiramycin, josamycin a druhá skupina zahrnuje klaritromycin, azitromycin, roxitromycin, diritromycin [44].

Do společných farmakokinetických vlastností celé skupiny makrolidových antibiotik patří rychlé vstřebávání a dobrý průnik do tělních tekutin s výjimkou cerebrospinální tekutiny [45].



synergicky působících streptograminů, dalfopristin (streptogramin A) a quinopristin (streptogramin B). Jde o semisyntetické deriváty používané injekčně ^[45].

Dalšími novějšími léčivými jsou oxazolidinony, kam patří prozatím jediný terapeuticky používaný zástupce linezolid, mající relativně jednoduchou strukturu ^[44]. V současné době je vyhrazen pouze pro velmi závažné infekce jako rezervní antibiotikum ^[45].

Telitromycin je prvním klinicky používaným ketolidem mající podobné antibakteriální spektrum jako makrolidy. Jeho výhodou je, že s makrolidovými antibiotiky nemá zcela zkříženou rezistenci. Má výhodné farmakokinetické vlastnosti, které umožňují podávání telitromycinu pouze v jedné denní dávce ^[44] ^[45].

Linkosamidy jsou sloučeniny obsahující síru izolované z *Streptomyces lincolnensis*. Chemicky se jedná o amidy substituovaného prolinu s aminocukrem. Přírodním antibiotikem využívaným v klinické praxi je linkomycin, který je ale dnes nahrazen novějšími polysyntetickými deriváty. Z novějších linkosamidů můžeme zmínit například klindamycin, který působí zejména bakteriostaticky ^[45].

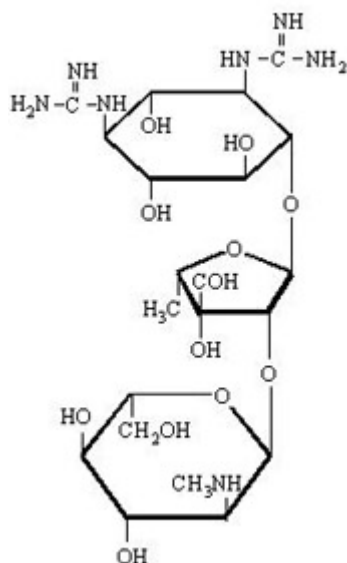
2.3.4.5. Aminoglykosidová antibiotika

Z chemického hlediska jde o trisacharidy až tetrasacharidy obsahující neobvyklé aminosacharidy typické pro tuto skupinu antibiotik (viz. Obrázek 18) ^[44]. Mechanismus účinku spočívá v inhibici proteosyntézy na 30S podjednotce ribozomu, brání tak vzniku iniciačních komplexů, od nichž se následně syntéza bílkovin vyvíjí ^[53]. Antimikrobiální spektrum aminoglykosidů zahrnuje řadu klinicky významných G⁻ patogenů, avšak anaerobní bakterie jsou k aminoglykosidům rezistentní ^[45].

Jednotlivé zástupce lze rozdělit dle způsobu jejich aplikace na antibiotika pro systémové použití a aminoglykosidová antibiotika pro lokální použití. Do první zmiňované skupiny zařazujeme gentamycin, tobramycin, netilmicin, amikacin a pro lokální použití se v klinické praxi využívá zejména neomycin, kanamycin, spektinomycin a další ^[46].

Po perorálním podání se většinou špatně vstřebávají, proto je nutné je podávat parenterálně. Vylučují se glomerulární filtrací v téměř nezměněné formě ^[45].

Nežádoucí účinky aminoglykosidů jsou časté a zahrnují zejména nefrotoxicitu, ototoxicitu, neuromuskulární blokádu či alergické reakce ^[44]. Jelikož se jedná o vysoce toxickou skupinu látek, je jejich podání kontraindikováno v těhotenství, při chorobách vnitřního ucha a z důvodu inhibice neuromuskulárního přenosu u onemocnění myastenia gravis ^[46].



Obrázek 18: Základní chemická struktura streptomycinu-zástupce aminoglykosidů.

převzato z: <https://www.plantmanagementnetwork.org/elements/view.aspx?ID=199> ^[57]

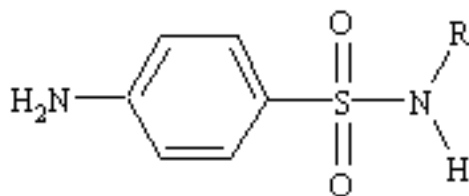
2.3.5. Antibiotika inhibující syntézu kyseliny listové

2.3.5.1. Sulfonamidy a trimetoprim

Sulfonamidy byly vůbec prvními účinnými antibakteriálními chemoterapeutiky zavedenými do klinické praxe ^[46]. Základem všech sulfonamidů je 4-aminobenzensulfonamidové seskupení (viz.Obrázek 19) ^[44]. Jedná se o kompetitivní inhibitory dihydropteroátsyntházy, bakteriálního enzymu odpovědného za kondenzaci kyseliny p-aminobenzoové a substituovaného pteridinpyrofosfátu. Bakterie potřebují jako růstový faktor kyselinu p-aminobenzoovou, kterou zabudují do molekuly kyseliny dihydrolistové. Na základě své chemické podobnosti s kyselinou p-aminobenzoovou obsazují sulfonamidy místa, které běžně obsazuje tato kyselina. Následkem toho dochází ke zbrždění syntézy kyseliny dihydrolistové, nutné pro množení bakterií a následně i kyseliny tetrahydrolistové nezbytné k tvorbě nukleových kyselin bakterií ^[44] ^[46].

Současná sulfonamidová chemoterapeutika se nejčastěji podávají v kombinaci s trimetoprimem, který blokuje syntézu kyseliny tetrahydrolistové blokací enzymu dihydrofolát reduktázy. Touto kombinací se docílí širšího antibakteriálního spektra zahrnujícího streptokoky, hemofily, chlamydie a další ^[45].

Většina sulfonamidů i trimetoprim se z gastrointestinálního traktu absorbují rychle, maximálních plazmatických koncentrací je dosaženo za 4 až 6 hodin. Kompletně se eliminují močí, částečně v nezměněné formě, částečně jako metabolity ^[46].



Obrázek 19: Základní skelet sulfonamidů.

převzato z: http://faculty.weber.edu/ewalker/Medicinal_Chemistry/topics/Antimicrobial/Antimicrobial.htm ^[58] a upraveno

K nejčastějším nežádoucím účinkům patří nauzea, zvracení, poškození ledvin, a to zvláště u starších přípravků se špatnou rozpustností, dále alergické kožní reakce, fototoxicita a v neposlední řadě také poruchy krvetvorby ^[46].

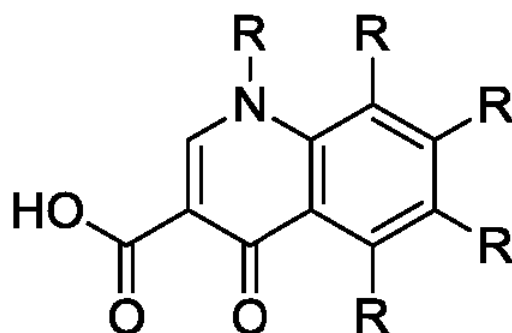
Mezi zástupce patří sulfametoxazol, který se používá v kombinaci s trimetoprimem (co-trimoxazol). K lokálnímu použití se řadí sulfacetamid, sulfadiazin ^[45].

2.3.6. Antibiotika inhibující syntézu nukleových kyselin

2.3.6.1. Chinolony

Jako chinolonová chemoterapeutika jsou označovány deriváty 1,4-dihydro-4-oxochinolin-3-karboxylové kyseliny (viz.Obrázek 20) ^[44]. Jejich mechanismus účinku spočívá v inhibici bakteriálních enzymů DNA gyrázy (topoizomeráza II) a topoizomerázy IV, následkem čehož dochází k inhibici syntézy nukleových kyselin bakterií. Výsledný účinek je baktericidní ^[45].

Spektrum účinku je velmi široké a jsou rozděleny do několika generací. Původní chinolony jsou účinné zejména na G⁻ mikroorganismy, ale fluorované novější deriváty mají rozšířené spektrum účinku i na G⁺ koky a klinicky významná účinnost je také proti intracelulárním patogenům (*Legionella pneumophila*, *Chlamydia pneumoniae*, *Mycoplasma pneumoniae*) ^[45].



Obrázek 20: 1,4-dihydro-4-oxochinolin-3-karboxylová kyselina- základní skelet chinolonů

převzato z: <http://www.google.com/patents/WO2012116010A2?cl=en> ^[59]

Jednotliví zástupci se liší svými farmakokinetickými vlastnostmi. Obecně po perorálním podání se výborně vstřebávají a dobře pronikají do všech tkání. Vylučují se převážně močí a v moči dosahují dvakrát vyšších koncentrací než v krvi. Biologický poločas je u jednotlivých derivátů rozdílný ^[45].

Jedná se o dobře snášená léčiva, nežádoucí účinky nejsou časté, vyskytují se zhruba u 2-8% nemocných. Nejčastěji se jedná o gastrointestinální potíže jako je bolest břicha, zvracení, nauzea, nechut' k jídlu, průjem a další. Kromě poruch trávicího ústrojí se vyskytují zejména poruchy funkcí centrální nervové soustavy (zmatenost, bolesti hlavy, poruchy spánku, závratě). Asi u 1% nemocných se vyskytují alergické kožní projevy ^[45] ^[46].

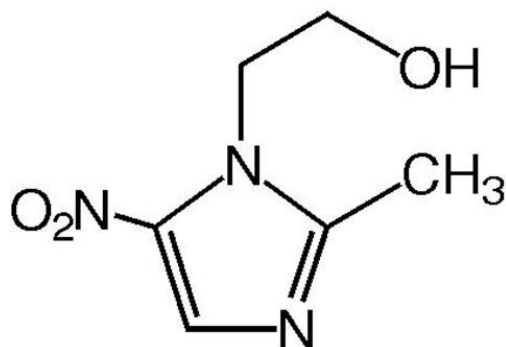
Tabulka 7: Přehled jednotlivých generací chinolonů.

zpracováno podle: Lincová, D., *et al.*: Základní a aplikovaná farmakologie, 2007 ^[45]

Název	Spektrum účinku	Zástupci
1. generace	úzké spektrum zahrnující pouze enterobakterie	kyselina nalidixová, kyselina oxolinová, kyselina pipemidová
2. generace	rozšíření spektra na enterobakterie i na G ⁺ koky	norfloxacin, pefloxacin, ciprofloxacin, ofloxacin
3. generace	rozšíření spektra proti pneumokokům	sparfloxacin, grepafloxacin, levofloxacin
4. generace	zesílená aktivita proti G ⁺ kokům a některým anaerobům	moxifloxacin, trovafloxacin, prulifloxacin

2.3.6.2. Nitroimidazolová chemoterapeutika

Jsou to různě substituované deriváty 5-nitroimidazolu mající baktericidní účinek ^[44]. Nejvýznamnějšími zástupci této skupiny jsou metronidazol (viz.Obrázek 21), ornidazol, tinidazol ^[45]. Mechanismus účinku spočívá v inhibici replikace mikrobiální DNA. V anaerobním prostředí se nitroskupina přeměňuje na redukované metabolity, které zasahují do oxidativních procesů bakterií s následným vznikem reaktivních kyslíkových radikálů a poškození DNA ^[60].



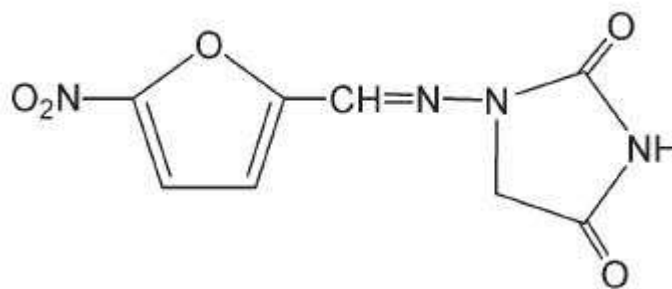
Obrázek 21: Zástupce nitroimidazolových chemoterapeutik, metronidazol.

převzato z: <http://www.drugs.com/drp/noritate-cream-1.html> ^[61]

Nežádoucí účinky nejsou časté a zahrnují zejména gastrointestinální potíže. Při vyšších dávkách mohou způsobit neurotoxicitu (poruchy centrální nervové soustavy ve formě závratí, ataxie, poruch spánku) a při současném požití alkoholu při léčbě těmito chemoterapeutiky je velké riziko vzniku disulfirámového efektu ^[45].

2.3.6.3. Nitrofurany

Nitrofurany jsou odvozeny od 5-nitrofuran-2-karbaldehydu (viz.Obrázek 22) ^[44]. Mechanismus účinku nejvýznamnějšího zástupce skupiny nitrofurantoinu spočívá v poškození DNA. Je aktivován bakteriálními flavoproteiny za vzniku vysoce reaktivního meziprojektu, který vede k poškození ribozomálních proteinů a DNA, v důsledku čehož dochází k inhibici syntézy RNA, buněčné stěny či bakteriálních proteinů ^[62].



Obrázek 22: Nitrofurantoin.

převzato z: <http://medlibrary.org/lib/rx/meds/nitrofurantoin-monohydratemacrocystals-7/> ^[63]

Po perorálním podání se velmi dobře vstřebává a absorpce z gastrointestinálního traktu je rychlá a úplná. Účinných terapeutických koncentrací dosahuje pouze v moči. Alkalizace moči účinnost nitrofurantoinu snižuje ^[45] ^[46]. Nežádoucí účinky jsou časté, zahrnující gastrointestinální potíže, mimo jiné i periferní neuropatii, alergické projevy provázené horečkou a těžkými plicními projevy.

2.3.6.4. Ansamyciny

Z chemického hlediska se jedná o makrocyclické laktamy, protože společným znakem struktury této skupiny antibiotik je makrocyklus, obsahující laktamovou vazbu ^[44]. Mechanismus účinku spočívá v inhibici DNA dependentní RNA polymerázy, čímž je znemožněna transkripce do mRNA (messenger ribonucleic acid, mediátorová ribonukleová kyselina) a následná proteosyntéza ^[45].

Nejvýznamější skupinou jsou rifamyciny izolované z *Nocardia mediteranei*. V současné době se používají polysyntetické deriváty v čele s rifampicinem, který byl vůbec prvním klinicky používaným derivátem, ale dodnes představuje léčivo první volby v terapii mykobakteriálních infekcí ^[44].

2.4. Rezistence

Pojem bakteriální rezistence je definován jako odolnost mikroorganismu vůči antibakteriální látce, která byla původně, při léčbě infekcí způsobených daným mikrobiálním agens, účinná. Vznik a šíření rezistentních bakteriálních kmenů je přirozený jev, který se v současné době vyskytuje velice často. Vznik těchto rezistentních kmenů urychluje využívání a zneužívání antimikrobiálních léků.

Antibiotická rezistence se týká konkrétně antibiotik, kdežto antimikrobiální rezistence je širší pojem, který zahrnuje odolnost vůči látkám využívaným k léčbě infekcí způsobených i jinými mikroby, než pouze bakteriemi. Infekce způsobené rezistentními mikroorganismy často nereagují na standardní léčbu, což má za následek delší dobu nemoci, vyšší výdaje na zdravotní péči a vyšší riziko úmrtí ^[64].

Je nezbytné zpomalit vývoj a šíření rezistence pomocí antibiotik tak, aby s léčivými, které máme k dispozici, byla možnost i nadále pracovat. Také je zde naléhavá potřeba věnovat více prostředků na výzkum a vývoj nových antibiotik. Lékaři, zdravotní sestry, veterináři a další zdravotničtí pracovníci by neměli předepisovat nebo vydávat antibiotika, pokud nejsou skutečně nezbytná a především by měli vynaložit veškeré úsilí na určení, které antibiotikum je pro daného pacienta trpícího infekčním onemocněním vhodné. Lidé by měli užívat antibiotika pouze tehdy, pokud jsou předepsané certifikovaným zdravotnickým pracovníkem a dodržovat správné zásady při užívání těchto léčiv. Dalším problémem, přispívajícím k odolnosti bakterií vůči antibiotikům, může být zneužívání antibiotik v zemědělství. Antibiotika by se měla užívat pouze tehdy, pokud jsou nutná k léčbě infekčních chorob, a pod veterinárním dozorem. Čisté podmínky chovu a očkování zvířat může snížit potřebu antibiotik ^[65].

I přes velké pokroky v antimikrobiální terapii infekčních onemocnění představuje rezistence vůči antibiotikům velké zdravotnické problémy, a to zejména u imunokompromitovaných pacientů. Konkrétně, infekční činitelé zejména ze skupiny G⁻ patogenů jsou zodpovědné za vysokou úmrtnost, díky rezistenci vůči více léčivům ^[66].

V současné době patří k nejproblematictějšími MDR (multi-drug resistance, mnohočetná léková rezistence) mikroorganismům zejména *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, vankomycin rezistentní enterokoky, MRSA, vankomycin-rezistentní MRSA a extenzivně rezistentní *Mycobacterium tuberculosis* ^[67].

Rostoucí prevalence rezistence byla hlášena u mnoha patogenů v průběhu let v různých regionech světa, včetně rozvojových zemí ^[68]. Bylo to přičítáno měnícím se mikrobiálním vlastnostem, častým používáním antimikrobiálních látek, společenským i technologickým změnám, které přispívají k častějšímu vzniku rezistentních kmenů. Nejdůležitějším faktorem zodpovědným za zvýšenou antimikrobiální rezistenci je právě používání antimikrobiálních látek ^[68].

Důvody, které vedly ke zvyšování úrovně rezistence jsou zejména způsobeny nesprávným používáním antimikrobiálních látek pro prevenci a léčbu infekcí, nedodržování kontroly infekcí v praxi, prodloužená hospitalizace, zvýšení počtu a trvání infekcí, více komorbidit u hospitalizovaných pacientů, zvýšené využívání invazivních prostředků, seskupení kolonizovaných pacientů v zařízeních dlouhodobé péče, používání antibiotik v zemědělství či rostoucí národní a mezinárodní cestování ^[68].

2.4.1. Primární rezistence

Primární, neboli přirozená rezistence znamená, že mikroorganismy vrozeně nemají cílová místa pro antimikrobiální látky, a proto nemůže daný lék zapůsobit svým mechanismem účinku na cílovou strukturu v buňce. Případně se může jednat o nízkou propustnost antimikrobiálních látek k cílové struktuře ^[68]. Tento typ rezistence je možno u jednotlivých bakteriálních kmenů předpokládat, a proto nepředstavuje tak velkou hrozbu ^[46] ^[69].

Příkladem bakterií, které disponují například vrozenou rezistencí ke glykopeptidům nebo linezolidu, jsou zástupci čeledi *Enterobacteriaceae*. *Proteus mirabilis* je dále primárně rezistentní vůči nitrofurantoinu a kolistinu ^[70] ^[71]. Dalším příkladem mohou být některé G⁻ bakterie, které jsou mnohem méně citlivé na antibiotika penicilinové řady než bakterie G⁺, jsou však citlivé zase k antibiotikům jiným ^[72].

2.4.2. Sekundární rezistence

Sekundární, neboli získaná rezistence se vyskytuje u mikroorganismů, které byly dříve vnímavé vůči daným antibakteriálním látkám, ale následkem antibakteriální léčby došlo k rozvoji rezistence ^[68]. Tento typ rezistence vzniká jako důsledek mutací, nebo je výsledkem horizontálního přenosu genetické informace. Bakterie, která byla původně citlivá k antibiotiku začne být najednou vůči tomuto antibiotiku odolná ^[72].

Sekundární rezistence má mnoho forem. Může například spočívat v produkci enzymů mikroorganismy, jež destrukují účinnou látku. Jde například o produkci beta-laktamáz G⁻ mikroby či stafylokoky, které štěpí beta-laktamový kruh, čímž ruší účinek beta-laktamových antibiotik. Jiným příkladem mohou být G⁻ bakterie rezistentní vůči aminoglykosidům, které vytvářejí enzymy modifikující účinek těchto antibiotik fosforylací, adenylací nebo acetylací prostetických skupin v chemické struktuře antibiotika a mnohé další příklady ^[73].

V rámci sekundární rezistence lze dále rozlišovat rezistenci zkříženou a rezistenci sdruženou. Zkřížená rezistence znamená současnou necitlivost na antibiotika nejčastěji téže skupiny, které mají podobnou chemickou strukturu a mechanismus účinku ^[73].

V případě sdružené rezistence mikroorganismy vykazují necitlivost k několika skupinám antibiotik najednou. Tento typ rezistence mikrobi nejčastěji vykazují vůči beta-laktamovým antibiotikům, aminoglykosidům, sulfonamidům či fluorochinolonům ^[74].

2.5. Mechanismy rezistence mikroorganismů k antibiotickým látkám

2.5.1. Genetické mechanismy rezistence

Primární rezistence je genetickou vlastností mikroorganismu zakódovanou v chromozomální DNA a je sdílena všemi členy druhu. Získaná rezistence je spojená se změnou v DNA mikroorganismu ^[75].

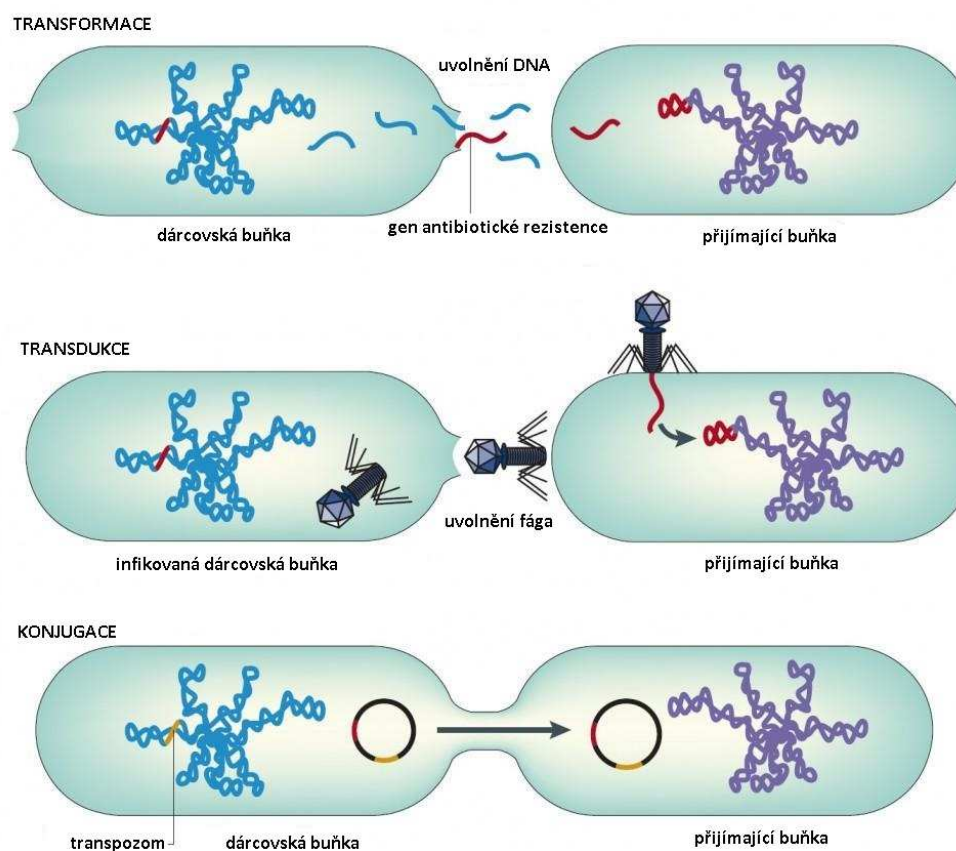
2.5.1.1. Mutace

Frekvence mutací v daných genech je poměrně nízká, ale i přes nízkou pravděpodobnost se mutace vyskytují a mají za následek fenotypové změny, které vedou k menší náchylnosti při působení antimikrobiálních látek. Spontánní mutace jsou poměrně vzácné, vyskytují se o frekvenci jedna mutace na populaci 10^6 - 10^8 mikroorganismů ^[75] ^[76]. Většinou se jedná o chybu vzniklou při replikaci, či opravě DNA u rychle se množících mikroorganismů ^[76].

2.5.1.2. Vznik nové DNA-přenos genů

Nové geny rezistence jsou přenášeny mezi bakteriemi a mohou být integrovány do bakteriálního chromozomu, přičemž se nadále dědí z generace na generaci. Plazmidy mohou nést geny kódující celou řadu vlastností, včetně antimikrobiální odolnosti [75].

Nová chromozomální nebo plazmidová DNA obsahující geny rezistence může být přenesena z jedné bakterie do druhé konjugací, transdukací a transformací [75] [77]. V podstatě jde o mechanismy zajišťující přenos genů rezistence vázaných na plazmidy, vázaných v genomu virů, či o přenos volné DNA. Všechny uvedené mechanismy jsou znázorněny na obrázku 23 [76] [78].



Obrázek 23: Hlavní mechanismy přenosu genů rezistence do bakterií. Transformací mohou být geny antibiotické rezistence integrovány do chromozomu nebo plazmidu v buňce příjemce. Během transdukce jsou geny antibiotické rezistence přenášeny z jedné bakterie do druhé pomocí bakteriofágů a mohou být integrovány do chromozomu buňky příjemce. Ke konjugaci dochází přímým kontaktem mezi dvěma bakteriemi, plazmidy tvoří jakýsi most skrz bakterie a DNA je tak vyměněna, což může vést opět k získání genů pro rezistenci k antibiotikům u přijímající buňky.

převzato z: http://www.nature.com/nrmicro/journal/v4/n1/fig_tab/nrmicro1325_F2.html [79] a upraveno

Při konjugaci jsou plazmidy přenášeny prostřednictvím pili zejména u G^- bakterií a méně často také u bakterií G^+ . Při procesu transdukce jsou bakteriální geny rezistence předávány z jedné bakterie do další pomocí bakteriofágů. Při transformaci dochází k předání DNA do hostitelské buňky, jedná se o neméně důležitý mechanismus pro získávání nových DNA ^[75].

2.5.2. Biochemické mechanismy rezistence

K tomu, aby mohlo antibiotikum působit efektivně na bakteriální buňky, musí být splněny následující podmínky. V bakteriální buňce musí být vždy přítomna cílová struktura, na kterou se bude antibiotikum vázat, nebo bude působit. Další z podmínek je dostatečná koncentrace účinné látky v místě, kde má působit. V neposlední řadě by mělo být splněno kritérium, aby antibiotikum nebylo inaktivováno či modifikováno, aby mohlo dojít k efektivní antibiotické terapii ^{[71][80]}.

Pokud nejsou splněny výše uvedené podmínky, tak může dojít k neefektivnímu působení antibiotika. Jednotlivé příklady biochemických mechanismů rezistence jsou znázorněny na Obrázku 24 a vše je také uvedeno v Tabulce 8.

Tabulka 8: Biochemické mechanismy rezistence.

převzato z: Dzidic, S., *et al.*: Antibiotic Resistance Mechanisms in Bacteria, 2008 ^[80] a upraveno

1) Inaktivace antibiotik	2) Cílená modifikace	3) Efluxní pumpy	4) Snížená propustnost přes buněčnou stěnu
hydrolýza	změna struktury peptidoglykanu		
přenos skupin	rozrušení struktury proteinů		
redoxní procesy	změny v syntéze DNA		

2.5.2.1. Inaktivace nebo modifikace antibiotika

Rezistentní bakteriální kmeny produkují zvláštní destruktivní nebo modifikující enzymy, které způsobují nečinnost antibiotika. Nejčastěji se jedná o produkci hydrolytických enzymů produkovaných rezistentními bakteriemi. Velké množství dosud známých antibiotik má hydrolyticky citlivé chemické vazby a také existuje řada enzymů, které mají schopnost tyto vazby rozrušovat. Nejlépe prostudovanou skupinou hydrolytických enzymů jsou beta-laktamázy, jenž rozrušují strukturu beta-laktamového kruhu antibioticky účinných látek penicilinů, cefalosporinů, karbapenemů i monobaktámů^{[80] [81] [82]}.

V současné době je známo více než 200 beta-laktamáz, které mají schopnost štěpit beta-laktamový kruh a tím snižovat účinnost antibiotik. Použitím specifických inhibitorů beta-laktamáz lze docílit snížení rezistence. Mezi tyto inhibitory řadíme kyselinu klavulanovou, sulbaktam a tazobakam^[83].

K inaktivaci antibiotik dochází také působením dalších enzymů jako jsou například esterázy, které inhibují účinek makrolidových antibiotik^{[76] [84]}.

Dalším příkladem mohou být transferázy, což jsou enzymy, které přenášejí funkční skupiny antibiotik a následně tak způsobují jejich inaktivaci^[80]. Tento mechanismus rezistence je významný zejména u skupiny aminoglykosidových antibiotik, kde existuje řada různých enzymů, které způsobují jejich inaktivaci^[74].

2.5.2.2. Modifikace cílového místa pro vazbu antibiotik

Interakce mezi antibiotikem a cílovým místem je velmi specifická, proto i malé změny v cílové struktuře mohou ovlivňovat výsledný účinek antibiotika. Pokud dojde ke změně cílového místa, tak se antibiotikum nemůže správně navázat na místo účinku a dochází tím k rezistenci^[76].

Jedním z typů tohoto mechanismu rezistence je změna struktury bakteriálního peptidoglykanu, jako je například změna ve struktuře tzv. PBPs. Při účinku beta-laktamových antibiotik dochází k vytvoření kovalentní vazby na cytoplazmatickou membránu do specifických vazebných míst PBPs. Následkem mutace může docházet ke změně struktury cílového místa, v důsledku čehož může pak docházet ke snížení vazebné afinity antibiotika. Příkladem může být rezistence u stafylokoků, která je založena právě na změně PBPs. Dalším příkladem bakterií, které disponují tímto typem rezistence, mohou být kmeny MRSA či kmeny PRSP (penicillin resistant *Streptococcus pneumoniae*, penicilin rezistentní

Streptococcus pneumoniae)^{[76] [83] [85]}. Popsaný typ rezistence je známý u všech beta-laktamových antibiotik.

Dalším z mechanismů rezistence je mutace 23S rRNA (23 svedberg ribosomal ribonucleic acid, 23 svedbergerova jednotka ribozomální ribonukleové kyseliny) bakterií. Řada antibiotik jako jsou aminoglykosidy, tetracykliny, makrolidy, chloramfenikol, kyselina fusidová, mupirocin, streptograminy či oxazolidinony blokují proteinovou syntézu bakterií na základě vazby na 50S ribozomální podjednotku. Příčinou rezistence k těmto antibiotikům může být mutace vedoucí k posttranskripční modifikaci komponenty 23S rRNA, velké podjednotky 50S bakteriálních ribozomů^{[76] [86]}.

Zásah do syntézy DNA může způsobit také cílené modifikace. K mechanismu rezistence dochází změnou dvou enzymů a to DNA gyrázy (topoisoméraza II) nebo topoisomérazy IV. Tato rezistence se objevuje u antibiotik skupiny chinolonů a fluorochinolonů^[76].

2.5.2.3. Efluxní pumpy

Efluxní pumpy, neboli také efluxní transportéry, jsou membránové proteiny, které zajišťují export antibiotik ven z cílové bakteriální buňky. Tyto proteiny jsou schopny vylučovat celou škálu antibiotik v důsledku jejich polysubstrátové specifity a tím mohou přispívat k bakteriální MDR^[76]. Efluxní pumpy sehrávají fyziologickou funkci zejména při adaptaci buněk na stres^{[87] [88]}.

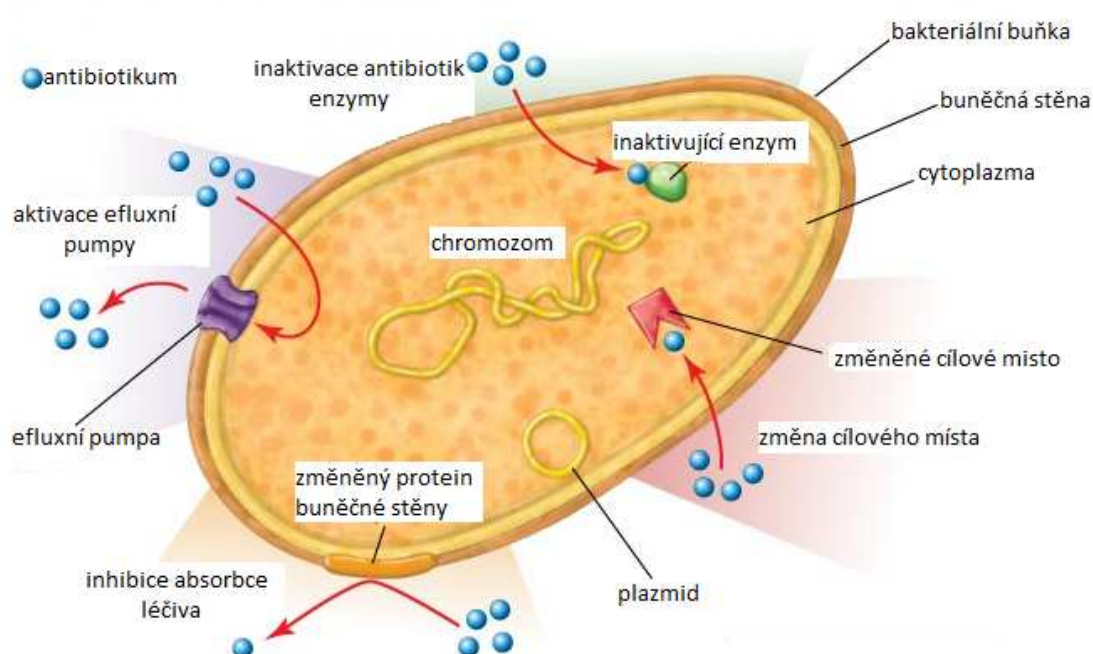
Tento způsob rezistence je nejvíce popsán u makrolidů, tetracyklinů či chinolonů. Snížená akumulace antibiotik způsobuje zvýšenou hodnotu MIC^[83].

2.5.2.4. Snížená permeabilita vnější bakteriální membrány

G^+ a G^- bakterie se liší stavbou své buněčné stěny, avšak obě obsahují určité množství peptidoglykanu. G^+ bakterie mají buněčnou stěnu složenou ze silné vrstvy peptidoglykanu (cukr složený z kyseliny N-acetylmuramové a N-acetyl-glukosaminu), která je lokalizovaná přímo na vnější straně cytoplazmatické membrány. Polysacharidové řetězce spojuje velké množství peptidů^[83].

Buněčná stěna G^- bakterií je mnohem tenčí a obsahuje i menší vrstvu peptidoglykanu. Na rozdíl od G^+ bakterií je u G^- bakterií přítomna tzv. vnější membrána, která je od té vnitřní, tvořené cytoplazmatickou membránou s vrstvou peptidoglykanu oddělena periplazmatickým prostorem. Ve vnější membráně G^- bakterií jsou přítomny lipopolysacharidy a také jsou zde

ukotveny OMPs (outer membrane proteins, proteiny vnější membrány), kam patří i poriny ^[45]. Poriny mohou fungovat jako vodné kanály, které propouštějí hydrofilní látky přes membránovou strukturu do periplazmatického prostoru G⁻ bakterií. Rezistence bakterií může být spojena s nízkým počtem porinů nebo s genetickými mutacemi, které vedou nejen ke změně v jejich počtu, ale i tvaru a to může mít v konečném důsledku velký vliv na prostupnost antibiotika přes buněčnou stěnu. Tyto jevy jsou dobře popsány u G⁻ bakterií, například u D2 porin-deficientní *Pseudomonas aeruginosa*, k chinolinům rezistentní *Escherichia coli*, či u *Haemophilus influenzae* a jeho rezistence k chloramfenikolu a trimetoprimu ^{[76] [80] [83]}. Výše uvedené mechanismy rezistence jsou zobrazeny na obrázku 24.



Obrázek 24: Příklady biochemických mechanismů antibiotické rezistence. Na obrázku je znázorněno několik biochemických mechanismů rezistence bakterií vůči antibiotikům. Příklady zahrnují inaktivaci léčiva enzymy, aktivaci efluxních pump, které následně vypuzují antibiotikum ven z buňky, změnu cílového místa pro vazbu antibiotik a inhibici vychytávání léčiva do buňky sníženou propustností přes buněčnou stěnu.

převzato z: <http://www.britannica.com/EBchecked/topic/1027479/antibiotic-resistance> ^{[71] [89]} a upraveno

2.6. Mechanismy rezistence u jednotlivých skupin antibiotik

2.6.1. Beta-laktamová antibiotika

Rezistence k beta-laktamovým antibiotikům je obvykle způsobena produkcí enzymů beta-laktamázy, změnou vazebného místa PBP nebo sníženou buněčnou permeabilitou ^[68].

Beta-laktamázy jsou enzymy, které hydrolyticky štěpí beta-laktamový kruh antibiotik, a tím antibiotika inaktivují ^[90]. Jedny z nejvýznamnějších beta-laktamázy, které způsobují tento typ rezistence, jsou širokospektré beta-laktamázy typu ESBL a AmpC, jejichž počet neustále rapidně stoupá ^[91]. Širokospektré beta-laktamázy jsou enzymy produkované některými bakteriemi, které inaktivují peniciliny, cefalosporiny a monobaktámy, obvykle však nehydrolyzují karbapenemy. K jejich inaktivaci dochází pomocí inhibitorů beta-laktamázy, jako je například kyselina klavulánová. Beta-laktamázy typu AmpC jsou produkovány řadou mikroorganismů jako je *Enterobacter* spp., *Citrobacter freundii*, *Morganella morganii*, *Providencia* spp., *Serratia* spp. Inaktivují peniciliny, většinu cefalosporinů, monobaktámy, ale také hydrolyzují karbapenemy a na rozdíl od ESBL nejsou inaktivovány inhibitory beta-laktamázy ^[92].

2.6.2. Tetracykliny

Rezistence k tetracyklinovým antibiotikům vzniká na základě tří mechanismů. Jedním z nich je efluxní vylučování antibiotika z buňky, kdy exportní proteiny nejčastěji z rodiny MFS (major facilitator superfamily, nadrodina hlavních zprostředkovatelů) zprostředkovávají export tetracyklinů z buňky. Tyto exportní proteiny jsou spojeny s membránovými proteiny a jsou kódovány takzvanými *tet* geny. Dalším z mechanismů rezistence je snížený transport k ribozomům. Cytoplazmatické proteiny, vážící se na ribozomy, mohou způsobit změny v ribozomální konformaci, která brání navázání tetracyklinů na ribozom, aniž by se změnila nebo zastavila proteosyntéza. Posledním z mechanismů rezistence k tetracyklinům je enzymatická modifikace antibiotika, která je také často způsobena již zmíněnými *tet* geny ^[68].

2.6.3. Chloramfenikol

Rezistence k chloramfenikolu je obecně způsobena inaktivací antibiotika acetyltransferázou ^[93]. Byly popsány různé enzymy, které jsou kódovány tzv. *cat* geny nacházejícími se u G^- i u G^+ bakterií ^[94]. Dále může docházet ke snížení permeability zevní membrány nebo k aktivnímu efluxu, jenž je zodpovědný za rezistenci u G^- bakterií ^[68].

2.6.4. Aminoglykosidy

Odolnost k aminoglykosidovým antibiotikům, jako je gentamycin, tobramycin, amikacin a streptomycin je velmi rozšířena, a v současné době je popsáno více než 50 modifikujících enzymů způsobujících rezistenci. Většina těchto enzymů způsobuje rezistenci u G^- bakterií. Nejčastěji se jedná o enzymy klasifikované jako aminoglykosidové acetyltransferázy, aminoglykosidové adenyltransferázy a aminoglykosidové fosfotransferázy. Díky těmto modifikujícím enzymům ztrácejí antibiotika svou schopnost vázat se na ribozom a inhibovat proteosyntézu. Dalším mechanismem rezistence jsou efluxní systémy a popsány byly také rRNA (ribosomal ribonucleic acid, ribozomální ribonukleová kyselina) mutace^[68].

2.6.5. Chinolony

Mechanismy bakteriální rezistence na chinolony se dělí do dvou hlavních kategorií. První z nich jsou změny cílových enzymů DNA gyrázy zejména u G^- mikroorganismů a topoisomerázy IV u G^+ bakterií^[95]. Dále dochází k změnám v propustnosti vnější membrány u G^- bakterií, kdy je omezena prostupnost léku na cílovou strukturu v buňce^[68].

2.6.6. Makrolidy

Nejčastějším mechanismem rezistence u makrolidových antibiotik je posttranskripční modifikace 23S rRNA způsobená geny methyltransferázy. Stále častější se v poslední době objevuje odolnost k této skupině antibiotik díky efluxním pumpám, a v neposlední řadě dochází díky hydrolytickým enzymům k inaktivaci antibiotik^[68].

2.6.7. Vankomycin

Rezistence na vankomycin se kromě rezistence u enterokoků často nevyskytuje. V současné době je známo 5 fenotypů rezistence enterokoků k vankomycinu- fenotypy A, B, C, D, E. Fenotypy VanC, VanD a VanE jsou konstitutivní a tedy nepřenositelné na jiné kmeny. Vlastní mechanismus rezistence enterokoků ke glykopeptidům je dán tvorbou modifikovaných peptidoglykovaných prekurzorů v buněčné stěně, ke kterým se vankomycin váže jen slabě^[96].

2.6.8. Sulfonamidy

Rezistence je nejčastěji zprostředkována rezistentními formami dihydropteroátsyntázy. U trimetoprimu je způsobena řadou mechanismů, z nichž mezi nejvýznamnější patří nadprodukce hostitelské dihydrofolátreduktázy či mutace genu pro dihydrofolátreduktázu [68].

2.7. Bakteriální biofilm

Bakteriální biofilm je seskupení bakteriálních buněk, většinou pevně adherovaných k biotickému, či abiotickému povrchu, které jsou obklopené extracelulární polymerní matrix. Tato matrix je převážně tvořena polysacharidy, které stojí za slizotvornou konzistencí biofilmu. Bakteriální buňky ukotvené v biofilmu se svými vlastnostmi a chováním liší od planktonické formy života bakterií (tzv. flotujících, volně se vznášejících buněk) [97] [98].

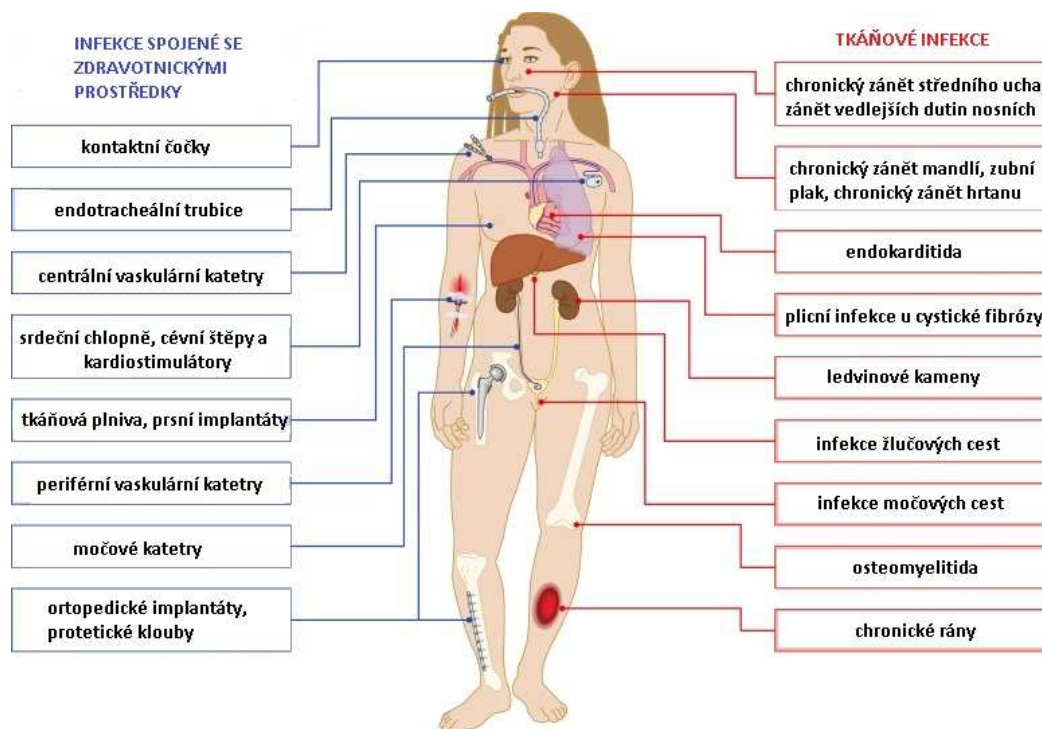
Biofilmy jsou ubikvitérní a v různých ekosystémech sehrávají často nepostrádanou roli. Na druhou stranu, vzhledem k tomu, že bakterie jsou schopny vytvářet biofilmy také na živých površích, jsou zahrnuty v široké škále infekčních onemocnění. Schopnost patogenních biofilm-formujících bakterií přežít v přítomnosti vysokých koncentrací antibiotik je jednou z jejich charakteristických vlastností, což vede k selhání léčby a opakovaným infekcím [99].

Formace biofilmu zahrnuje více kroků. Prvním krokem je adheze na biotický či abiotický povrch. Zformovaný biofilm má definovanou strukturu a poskytuje optimální prostředí pro výměnu genetického materiálu mezi bakteriálními buňkami. Buňky mohou mezi sebou komunikovat pomocí procesu *quorum sensing*, což může nadále ovlivnit další procesy ve vývoji biofilmu [98].

Po celá staletí trpělo lidstvo na život ohrožující infekce způsobené patogeny jako jsou například *Streptococcus pneumoniae*, *Vibrio cholerae* či *Yersinia pestis*. Objev a využití hygieny, antibiotik a vakcín vedlo k masivnímu snížení úmrtnosti v souvislosti s těmito infekcemi. Po tomto antibiotickém „zlatém věku“ nastávají dva hlavní problémy antiinfekční medicíny, a to vznik a šíření bakteriální rezistence vůči antibiotikům, a dále vzestup chronických, těžko vymýtitelných infekcí. Právě za chronickými infekcemi ve valné většině případů stojí bakteriální biofilmy [99].

Bylo také zjištěno, že se biofilm rozšiřuje používáním různých typů zdravotnických prostředků, které jsou lidem implantovány, a takto způsobená kolonizace může vést také k infekcím. V tomto ohledu byl poskytnut první důkaz tvorby biofilmů na zdravotnických

zařizování roku 1982, pomocí elektronové mikroskopie při studii kardiostimulátoru u pacienta s recidivující infekcí vyvolanou bakterií *Staphylococcus aureus*. Od této doby se téměř všechny typy zavedených zařízení staly potenciální hrozbou výskytu bakteriálních nebo houbových biofilmů ^[100]. Bakteriální biofilmy se podílejí na široké škále infekčních onemocnění (viz. Obrázek 25).



Obrázek 25: Onemocnění způsobená mikrobiálním biofilmem. Na obrázku jsou uvedeny různé typy infekčních onemocnění způsobených bakteriemi tvořícími biofilm. Jedná se o infekce, kde se biofilm tvoří na zdravotnických prostředcích a infekce, kde dochází k tvorbě biofilmu na tkáních.

převzato z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4187679/> ^[99] a upraveno

Vzhledem k vysoké toleranci biofilm-formujících bakterií vůči antibiotikům jsou infekce jimi způsobené velice obtížně léčitelné a dochází tak k vystavení pacienta riziku recidivy ^[101] ^[102]. Ve většině případů, jediný účinný způsob, jak efektivně eliminovat infekční ložisko, spočívá ve vyjmutí kolonizovaného zdravotnického prostředku nebo v chirurgickém odstranění infikované tkáně ^[101].

2.7.1. Komunikace bakterií pomocí *quorum sensing*

Bakteriální buňky jsou schopné vzájemné komunikace založené buď na chemických signálech nebo na signálech elektrických. Jedním z typů chemické komunikace je proces

zvaný *quorum sensing* (*QS*). Tento způsob komunikace je patogeny široce používán a slouží k tvorbě faktorů virulence, případně tvorbě biofilmu, jakmile je dosaženo prahové hodnoty velikosti populace. Obecně lze říci, že *QS* slouží k monitorování situace a k adaptaci na okolní prostředí ^[103].

Bakterie pomocí tohoto procesu komunikují tak, že produkují a rozpoznávají malé chemické signální molekuly, zvané autoinduktory ^{[104] [105]}.

QS byl prvně popsán u vodní luminiscentní bakterie *Vibrio fischeri*, u které bylo prokázáno, že funguje jako kontrolní mechanismus pro tvorbu dalších specifických znaků bakterie. Po celá léta se myslelo, že tento jev je omezen pouze na několik mořských organismů, ale k dnešní době bylo zjištěno, že tento fenomén je z velké míry využíván řadou bakteriálních agens, jakožto součást regulačních mechanismů ^[106].

V posledních několika desetiletích bylo získáno mnoho poznatků ohledně mechanismů používaných bakteriemi takto komunikovat. Je jasné, že vztah mezi *QS* a bakteriální virulencí představuje perspektivní oblast, která může být jakousi výzvou do budoucna s možností předkládat tyto znalosti do oblasti syntézy nových léčiv, které by efektivně cílily na tento mechanismus ^[106].

Schopnost bakterií komunikovat a chovat se jako skupina za účelem sociálních interakcí, poskytuje značné výhody pro bakterie při kolonizaci hostitele, formování biofilmu, obraně proti konkurentům či adaptaci na měnící se prostředí. Detailní pochopení molekulárních mechanismů procesu *QS*, pochopení a objasnění systému regulace *QS*, jak bylo zmíněno výše, může otevřít novou cestu pro kontrolu bakteriálních infekcí ^[104].

2.8. Mechanismy rezistence u bakterií tvořících biofilm

Biofilmy jsou spojeny se vznikem bakteriálních kolonií odolných vůči antibiotikům. Bakterie ukotvené ve společenství biofilmu jsou až 1000krát odolnější vůči léčbě antibiotiky než bakterie stejného druhu, které žijí planktonickou formou života. Většina bakterií v přírodním prostředí se nachází právě ve formě biofilmu ^{[107] [108]}.

Antibiotická rezistence bakterií v biofilmu je jedním ze způsobů, který přispívá k chronicitě infekcí, jako jsou například infekce spojené s implantovanými zdravotnickými prostředky. Mechanismy rezistence v biofilmu se od klasických mechanismů rezistence bakterií liší, jelikož odpor závisí na vícebuněčné povaze biofilmu ^[109].

Znalosti o rezistenci vůči antibiotikům až do posledních let závisely do značné míry na údajích poskytovaných tradičními metodami kultivace. Nedávné pokroky v oblasti genomiky a metagenomiky dnes poskytují nové cesty k pochopení evolučních procesů týkajících se mechanismů rezistence a jejich šíření mezi mikrobiální populaci ^[108].

Strukturální povaha biofilmů a charakter přisedlých buněk zvyšuje odolnost vůči antimikrobiálním látkám, což vede k vývoji rezistence právě u bakterií tvořících biofilm.

Mechanismy antibiotické rezistence biofilmů nejsou doposud zcela objasněny. Bylo navrženo několik teorií, ale přesný mechanismus jak rezistence vzniká, nebyl dosud objasněn. Nicméně je možné tyto mechanismy rozdělit na vrozené nebo indukované ^{[110] [111]}.

2.8.1. Vrozené faktory rezistence biofilmu

Vzhledem k heterogenní povaze biofilmu je pravděpodobné, že existuje více mechanismů rezistence. Mezi vrozené (vnitřní) faktory rezistence patří samotná struktura biofilmu. Tyto mechanismy zahrnují fyzikální nebo chemické difúzní bariéry vůči pronikání antimikrobiální látky do biofilmu, zpomalení, či zastavení bakteriálního růstu z důvodu omezení množství živin (tzv. hladovění), nebo aktivace obecné stresové odpovědi u bakterií a vznik specifického fenotypu pro biofilm ^[112]. Byly identifikovány ale i další faktory, které ovlivňují odolnost vůči antibiotikům, jako je zvýšení oxidativního stresu a další degradační mechanismy, k nimž dochází v některých částech biofilmu a které vedou k zvýšené diverzitě, mutabilitě a antibiotické rezistenci v rámci biofilmu ^[110].

2.8.1.1. Matrix biofilmu

Extracelulární polymerní substance, neboli matrix biofilmu, může omezit nebo dokonce zabránit průniku antimikrobiálních látek do buněk biofilmu. Jedná se o počáteční bariéru, která může zpomalovat penetraci antimikrobiální látky a vést k rozvoji rezistence ^[113]. Matrix biofilmu může působit jako difúzní bariéra, čímž se zabrání antibiotiku dosáhnout svého cíle. Antibiotikum tak nemůže proniknout do těchto struktur prostřednictvím husté směsi exopolysacharidů, DNA a bílkovin, aby dosáhlo svých cílů. Tato teorie se nezdá být univerzální pro všechny biofilmy, ale matrix je jedním z hlavních faktorů přispívající k rezistenci v bakteriálních biofilmech ^[110]. Z mnohých studií je zřejmé, že exopolysacharidová matrix představuje počáteční bariéru, která může zpomalit pronikání antimikrobiální látky, ale je zapotřebí více mechanismů potřebných pro celkovou antimikrobiální rezistenci ^{[112] [114]}.

2.8.1.2. *Metabolické změny v aktivitě bakterií tvořících biofilm*

Také vyčerpání živin a kyslíku uvnitř biofilmů může způsobit změny metabolické aktivity bakterií. Některé studie prokázaly omezení kyslíku a přítomnost zón hypoxie hluboko uvnitř biofilmu. V rámci biofilmu byla prokázána růstová a metabolická diverzita, kde zejména na povrchu dochází k syntéze bílkovin a metabolické aktivitě, zatímco ve středu biofilmu je růst pomalý nebo žádný. S ohledem na skutečnost, že valná většina antibiotik působí právě na metabolicky aktivní bakterie, nabízí se tímto vysvětlení snížené citlivosti biofilmu na antibiotika. Tedy, také z důvodu pomalého růstu se nepochybně zvyšuje riziko rezistence v biofilmu ^{[110] [115]}.

2.8.1.3. *Perzistentní buňky*

Perzistentní bakteriální buňky jsou nerostoucími nebo velmi pomalu rostoucími buňkami, pro které je charakteristická vysoce redukováná citlivost vůči antimikrobním látkám a mají také významně sníženou citlivost na antibiotika. Jedná se tedy o bakteriální buňky, které jsou schopny přežít extrémní antibiotickou léčbu. Tyto buňky se mohou formovat při tvorbě biofilmů široké škály bakterií. Jaký vztah však existuje mezi rezistencí v biofilmu a tímto mechanismem není stále dosud známý ^[110].

2.8.1.4. *Oxidativní stres*

Zvýšená produkce oxidantů z důvodu oxidativního stresu je dalším z možných mechanismů zvýšené rezistence v rámci biofilmu. Tato hypotéza má zcela logický a opodstatněný základ, protože jak je známo stres, jako výsledek reakce fyziologických změn, působí na ochranu buněk před škodlivými účinky tepelného šoku, změn pH a mnoha chemických agens ^[112]. Nerovnováha v produkci oxidantů a antioxidantů ve prospěch nadprodukce reaktivních forem kyslíku může mít za následek poškození buněčných struktur včetně matrix biofilmu, DNA, proteinů a lipidů. Oxidativní stres způsobuje zvýšenou nestálost v biologických vrstvách biofilmů a nedávné údaje naznačují, že v případě oxidativního stresu v biofilmu je podporována antibiotická rezistence ^{[110] [113] [115]}.

2.8.1.5. *Quorum sensing*

Dalším z možných mechanismů podílejících se na rezistenci v biofilmu je také možná *QS* komunikace mezi buňkami, jenž může ovlivňovat nejen vývoj biofilmu, ale také určit jeho toleranci na antibiotickou léčbu ^[110]. Role *QS* v otázkách týkajících se bakteriální rezistence není zatím ještě objasněna, nicméně některé studie ukazují, že defektní mutanty v *QS* nejsou schopny vytvářet biofilmy s normální architekturou, zatímco jiné studie dokázaly, že u mutantů defektních v *QS* nemusí zákonitě dojít ke snížení odolnosti vůči detergentům a antibiotikům ^{[112][113]}.

2.8.1.6. *Heterogenita*

Další podíl na schopnosti biofilmu odolávat vysokým koncentracím detergentů a antibiotik má s vysokou pravděpodobností heterogenita v rámci biofilmu ^[112]. Veškeré buňky v biofilmu žijí ve chráněném fenotypovém stavu, rostou jiným tempem a vytváří útvary podobné spórám. Tento stav významně přispívá ke snížené citlivosti biofilmů na antibakteriální látky ^[113].

2.8.2. Získané faktory rezistence bakterií biofilmu

Získané faktory rezistence vyplývají z léčby antibiotiky samotnými. Frekvence mutací u biofilm-formujících bakterií je výrazně zvýšená ve srovnání s planktonickou formou života bakterií. Právě tyto fyziologické podmínky mohou vysvětlovat, proč biofilm-formující bakterie se mohou lehce stát rezistentní vůči léčivům pomocí tradičních mechanismů rezistence na beta-laktamová antibiotika, aminoglykosidy či fluorochinolony. Bakteriální buňky v biofilmu mohou současně produkovat enzymy, které degradují antibiotika, mají nízkou afinitu k cíli působení, nebo nadměrně exprimují efluxní pumpy ^[110].

2.9. Metody testování citlivosti u biofilm-formujících mikroorganismů

Vzhledem k rostoucímu zájmu testování antimikrobiální citlivosti biofilm-formujících mikroorganismů bylo vyvinuto několik metod. V závislosti na dodávce živin rozdělujeme růstové modely na uzavřené a otevřené systémy. Výhodou uzavřených systémů je jednoduchá použitelnost, zatímco otevřené systémy umožňují lepší kontrolu růstových parametrů ^[116] ^[117] ^[118].

Ve zjednodušených *in vitro* modelech jsou řešeny otázky týkající se tvorby, fyziologie a architektury biofilmu. Tyto metody nabízejí řadu výhod jako je nízká cena, snadné provedení a snaží se napodobovat charakteristické znaky biofilmu jako jsou gradienty živin, plynů či produkty látkové výměny. Kompletní seznam *in vitro* biofilm modelů je uveden v Tabulkách 9 a 10 ^[118]. Základní metody testování biofilmu *in vitro* je možno rozdělit do tří odlišných skupin a to na uzavřené modely, otevřené modely a takzvané mikrokosmosy ^[119].

První tři standardizované metody pro studium biofilmu, schválené ASTM (American Society for Testing and Materials), jsou otočný diskový reaktor (ASTM E2196), metoda schválena v roce 2002, CDC reaktor (ASTM E2562) schválen v roce 2007 a Drip flow reaktor (ASTM E2647) schválen v roce 2008. Metoda MBEC, původně označována jako Calgary biofilm device (ASTM E2799), kde se biofilm formuje za daných podmínek, doplňuje tuto řadu zatím dostupných metod testování růstu biofilmu. Tato metoda byla schválena ASTM v roce 2011 ^[120]. Metody schválené ASTM jsou v následujících tabulkách označeny tučně a následně stručně popsány.

2.9.1. Uzavřené modely

První skupinou jsou uzavřené, neboli statické modely, které disponují omezeným množstvím živin a omezenými možnostmi v přístupu kyslíku. Tyto modely zahrnují jedny z nejpopulárnějších a nejúspěšnějších modelů ^[119]. Jednotlivé metody, jejich popis a využití v praxi, jsou uvedeny v Tabulce 9.

Tabulka 9: Uzavřené, statické modely.

převzato z: From *in vitro* to *in vivo* Models of Bacterial Biofilm-Related Infections ^[119] a upraveno, dále ^[102]
^[121] ^[122] ^[123] a upraveno

Metoda	Popis	Výhoda	Použití modelu
Kolonie biofilmu	kolonie biofilmu jsou kultivovány na polykarbonátové membráně umístěné na agaru, jsou zachovány základní charakteristiky biofilmu	reprodukovatelná a jednoduchá metoda	posuzování účinnosti antibiotik
Metoda mikrotitrační destičky	běžně používaná metoda, bakterie adherují na povrch jamek destičky	jednoduchý postup, velké kvantum dat v rámci jednoho testu, vhodné pro molekulárně genetické testy	vyhodnocení tvorby biofilmu, antibiotické tolerance a rezistence, studium účinnosti antimikrobiálních přípravků
Biofilm ring test	imobilizace magnetických kuliček, výsledky jsou automatizovány a analyzovány pomocí analýzy obrazu	umožňuje rychlé sledování tvorby biofilmu, možnost rychlé a automatické analýzy	vyhodnocení tvorby jednotlivých kmenů biofilmu
Calgary Biofilm Device	probíhá na bázi 96-jamkové testovací mikrotitrační desky, systém zahrnuje víko s 96 kolíčky, na kterém se biofilmy vyvíjejí	komerčně dostupný systém, kolíky lze odstranit jednotlivě bez otevření systému, a tím se eliminuje množství nečistot	vyhodnocení antibiotické rezistence a tolerance, studium účinnosti antimikrobiálních přípravků, studium vývoje biofilmu v průběhu času

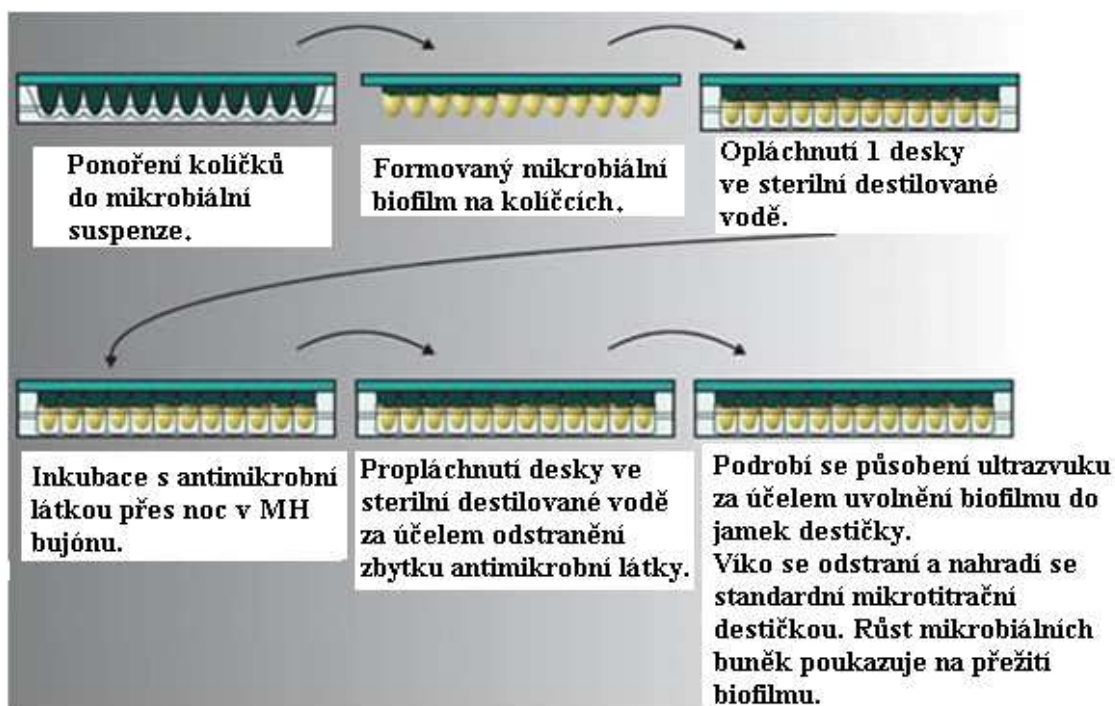
2.9.1.1. Calgary biofilm device, MBEC assay

Je to první metoda schválená ASTM, jejíž validita je doložena řadou studií provedených v různých laboratořích. Účelem těchto studií bylo posoudit, zda je tato metoda také kvalitativně i kvantitativně reprodukovatelná. Reprodukovatelnost metody byla testována v rámci různých laboratoří, zejména s ohledem na reprodukovatelnost při formování referenčních mikrobiálních biofilmů a testování jejich citlivosti ^[120].

Jedná se o skříninkový test používaný za účelem stanovení účinnosti antimikrobních látek proti biofilmům tvořených různými mikroorganismy (viz. Obrázek 26). Základ tvoří plastové víko s 96ti polystyrenovými kolíčky a odpovídající základní destička, která je obdobná klasickému 96 jamkovému panelu. Bakterie se naočkují do základní destičky a celá destička se následně přikryje víčkem s kolíčky. Biofilmy se formují na kolíčcích upevněných na víko mikrotitrační destičky většinou při inkubační teplotě 37°C po dobu 20 hodin a to buď za stálého míchání, nebo bez míchání. Poté jsou kolíčky opláchnuty a inkubovány při teplotě 37°C po dobu 18-20hodin v přítomnosti různých koncentrací antibiotik. Kolíčky se znovu opláchnou a za působení ultrazvuku je přenesen biofilm z kolíků do jamek. Dále dochází k měření OD (optical density, optická denzita) při 650nm ^[118]. Biofilmy vznikají na kolíčcích za daných podmínek a většinou za mírného míchání, přičemž planktonické formy bakterií zůstávají v prostoru jamek základní destičky. Tato metoda dovoluje stanovit farmakodynamické parametry antibiotické aktivity v biofilmu jako jsou: MBIC (minimal biofilm inhibitory concentration, minimální koncentrace inhibující tvorbu biofilmu), BBC (biofilm bactericidal concentration, baktericidní koncentrace biofilmu), MBEC (minimal biofilm-eradication concentration, minimální koncentrace vedoucí k vymýcení biofilmu), BPC (biofilm-prevention concentration, minimální koncentrace vedoucí k prevenci tvorby biofilmu). Popis jednotlivých parametrů je uveden v Tabulce 10 ^{[118] [124]}.

Inokulace a formování biofilmu je zahájeno nalitím inokula do reagenčního zásobníku. Pomocí vícekanálové pipety se přidá 150 µl inokula do každé jamky destičky. Na mikrotitrační destičku se umístí víčko s kolíčky a inkubuje se po dobu potřebnou k dosažení formace biofilmu. Růst biofilmu se mezi jednotlivými kmeny liší, ale pro většinu bakterií je 16 ± 2 hodiny dostatečná doba pro vývoj biofilmu ^[124].

Test MBEC umožňuje velmi rychlé testování řady sloučenin zahrnující dezinfekční prostředky, biocidní látky či kovy ^{[102] [125] [126]}. S použitím tohoto testu byla testována řada různých bakteriálních druhů a kvasinek včetně *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus* spp., *Mycobacterium* spp., *Candida* spp., *Burkholderia* spp. a mnoho dalších ^[124].



Obrázek 26: Schématické znázornění metodického postupu MBEC testu. Na obrázku lze vidět tvorbu a formování biofilmu za použití MBEC testu. Pracovní postup je podrobněji popsán v jednotlivých metodických krocích na obrázku.

převzato z: ANTIMICROBIAL SENSITIVITY online ^[127] a upraveno

Tabulka 10: Hodnotící farmakodynamické parametry antibiotické aktivity v biofilmu.

převzato z: Macia, M., D., *et al.*: Antimicrobial susceptibility testing in biofilm-growing bacteria, 2014 ^[118] a upraveno

Parametr (zkratka)	Parametr	Definice
MBIC	minimální inhibiční koncentrace v biofilmu (minimal biofilm inhibitory concentration)	jedná se o nejnižší koncentraci antibiotika, kdy nedochází ke zvýšení průměrného počtu životaschopných buněk biofilmu, tato koncentrace antimikrobní látky vede k rozdílu $\leq 10\%$ (rozdíl v růstu po 6 hodinách inkubace) mezi množstvím biomasy biofilmu ovlivněného testovanou látkou a průměru dvou pozitivních kontrol (bez vlivu testované látky)
BBC	baktericidní koncentrace v biofilmu (biofilm bactericidal concentration)	jedná se o nejnižší koncentraci antibiotika, která vede k redukci životaschopných mikroorganismů v biofilmu z 99,9% v porovnání s pozitivní kontrolou růstu

MBEC	minimální koncentrace vedoucí k eradikaci biofilmu (minimal biofilm eradication concentration)	jedná se o nejnižší koncentraci antibiotika, která vede k odstranění biofilmu
BPC	minimální koncentrace vedoucí k prevenci tvorby biofilmu (biofilm prevention concentration)	stejně jako MBIC, ale testované antimikrobní látky nepůsobí přímo na maturovaný biofilm, ale na mikroby, které jsou schopné vytvořit biofilm (současná inokulace bakterií a expozice antimikrobní látkou)

2.9.2. Otevřené modely

Otevřené neboli dynamické systémy obecně umožňují kontrolu ekologických parametrů, a proto se ve velké míře používají ke studiu fyzikální a chemické odolnosti biofilmu. Jsou však ve většině případů méně přizpůsobeny tzv. “high throughput” analýze, jejíž nespornou výhodou je možnost automatizace všech kroků a další možností automatické analýzy, což vede k získávání velkého množství dat v kratším časovém horizontu s minimálním rizikem vnesení chyby. Navíc tyto modely často vyžadují specializované vybavení a technické dovednosti ^[119].

Výhodou otevřených systémů je, že se snaží napodobit podmínky *in vivo* prostřednictvím kontinuální dodávky živin, stálého průtoku a teploty. Kromě toho umožňují provádět farmokinetické či farmakodynamické studie, a také mikroskopické pozorování ^[118]. Přehled jednotlivých metod je uveden v Tabulce 11.

Tabulka 11: Otevřené, dynamické modely.

převzato z: From *in vitro* to *in vivo* Models of Bacterial Biofilm-Related Infections ^[119] a upraveno, dále ^[128] ^[129] ^[130] ^[131] ^[132] ^[133] ^[134] ^[135] ^[136] ^[137] a upraveno

Metoda	Popis	Výhoda	Použití modelu
Kadouri system	založen na bázi mikrotitrační destičky s konstantním obnovováním média	dochází k tvorbě biofilmu v mikrotitrační destičce a vzniká tam velké množství biomasy, které je dále použito ke studiu	umožňuje tak testování za různých podmínek

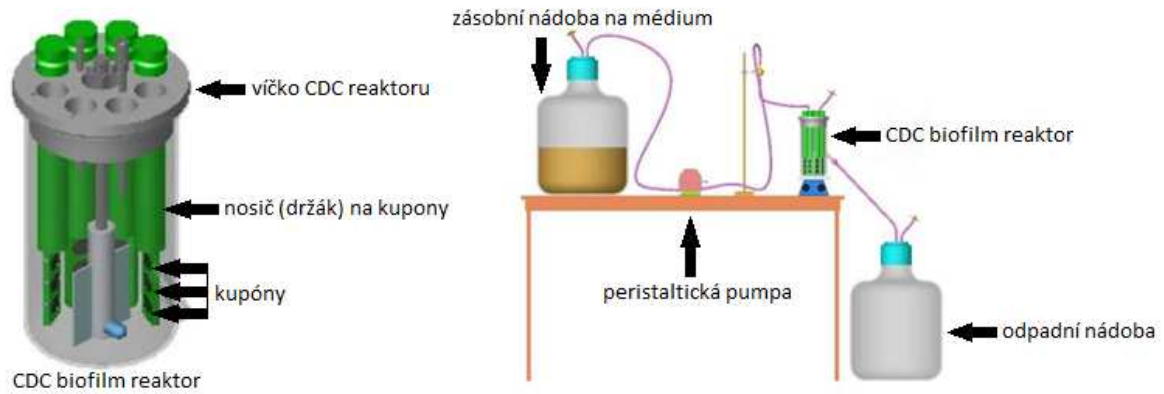
Průtoková cela	poměrně nákladný systém, pro studium jsou třeba odborné znalosti	systém je automatizován a je k dispozici analýza obrazu, umožňuje nedestruktivní pozorování biofilmu (i vizualizace buněk) s vynikající kvalitou obrazu	možnost vyhodnocování tvorby jednotlivých kmenů tvořících biofilm, testování antibiotické rezistence a efektivity po podání antimikrobiálních látek
CDC Biofilm reaktor	komerčně dostupný systém, umožňující snadný odběr vzorků v různých časových intervalech	použitelný k vyhodnocování tvorby biofilmu, studiu antibiotické účinnosti či rezistence a také k testům dezinfekční účinnosti	pomocí něho lze studovat vývoj biofilmu v průběhu času
Drip flow reaktor	pomocí tohoto zařízení jsou biofilmy formovány v šikmé poloze a jednotlivé kanály jsou zavedeny do polykarbonátových bloků, kde může být umístěno mikroskopické sklíčko	používá se k testování antimikrobiální účinnosti a dalších strategických kroků vedoucích k eradikaci biofilmu	vyhodnocení desinfekčních a antimikrobiálních účinků, schopnost studovat různorodost biofilmu
Mikrofermentory	biofilmy se vyvíjejí na odnímatelných špachtlích tvořených z různých materiálů	schopnost produkce velkého množství biofilmu, umožňuje mikroskopické, genetické, biochemické analýzy	vyhodnocení antibiotické účinnosti a schopnost tvorby jednotlivých kmenů biofilmu
Mikrofluidní biočipy	biočipy jsou vloženy do hliníkového bloku, kde je regulovaná teplota, vyhodnocení probíhá pomocí bezkontaktních dielektrických mikrosenzorů	neinvazivní technika, studium růstu a citlivosti biofilmu	užitečné pro studium populační dynamiky a kvantitativní analýzy buněk

Rotating disk reaktor	teflonový rotor drží několik kupónů přes které se formují biofilmy	použití také ke studiu vícedruhových biofilmů	vyhodnocení antimikrobiální účinnosti
BioFlux Device	jedná se o zařízení složené z 96 jednotlivých mikrofluidních kanálků spojených s pneumatickým čerpadlem	nízké energetické náklady, přesná kontrola podmínek prostředí, studium chování jednotlivých buněk v rámci komunity	vyhodnocení tvorby biofilmu, studium antimikrobní rezistence, účinnost antimikrobních látek
Prstencové reaktory	založeno na principu dvou soustředných válců, kdy vnitřní válec je rotující	vyhodnocení dezinfekční efektivity a antimikrobiální účinnosti	speciálně vhodný ke studiu vodních biofilmů
Sorbarod zařízení (SBF)	zařízení složené z filtračních zátek s celulózovou maticí promývanou médiem	jednoduché nastavení, možnost ovládání tempa růstu biofilmu, umožňující inokulaci rozptýlených buněk	slouží k vyhodnocení účinků antibiotik

2.9.2.1. CDC biofilmový reaktor

Jedná se o komerčně dostupné zařízení sloužící k tvorbě a následnému studiu biofilmů. Je to otevřený, dynamický systém. Celý systém se skládá ze skleněného reaktoru, v jehož víčku je ukotveno 8 držáků s tzv. kupóny. Tyto kupóny mohou být vytvořeny z různých materiálů, jako je například: borosilikát, teflon, polystyren, polykarbonát, nerezová ocel a řada dalších. Samotný reaktor je připojen pomocí hadiček k baňce se sterilním kultivačním médiem a tok kultivačního média je zajištěn peristaltickou pumpou ^[138] ^[139]. Zařízení CDC reaktoru je zobrazeno na přiloženém Obrázku 27. Při studiu účinnosti antibiotik jsou antibiotické látky přidány do zásobní láhve s kultivačním médiem, které následně proudí do reaktoru a tímto způsobem jsou exponovány všechny kupóny s formovanými biofilmy.

V případě potřeby kvantifikovat množství biofilmu či biofilm-formujících mikroorganismů je struktura biofilmu uvolněna z kupónů pomocí ultrazvuku a intenzivního víření. Následně dochází ke kvantifikaci počtu viabilních mikroorganismů tvořících biofilm ředěním pomocí desítkové ředící řady a výsevu na vhodná kultivační media ^[118].

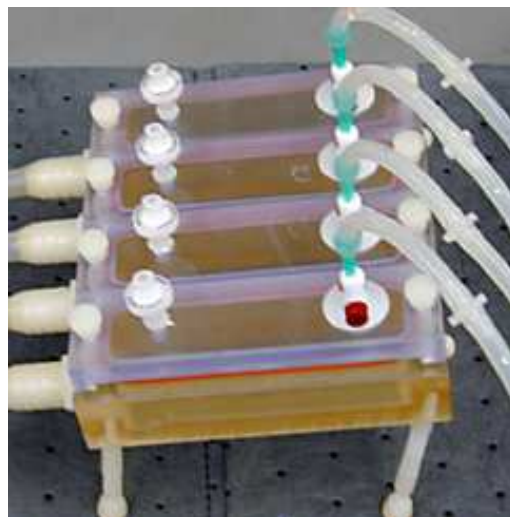


Obrázek 27: CDC biofilm reaktor. Na obrázku v levé části je znázorněn samotný CDC biofilm reaktor, dále v pravé části můžeme vidět celé zařízení, na jehož základě dochází k testování citlivosti biofilmu *in vitro*.

převzato z: BioSurface Technologies Corporation <http://www.biofilms.biz/wp-content/uploads/2014/07/CDC-Pricing.pdf> [139] a upraveno

2.9.2.2. Drip flow reaktor

Tento reaktor se skládá ze čtyř paralelních testovacích kanálů, z nichž každý může pojmout jedno mikroskopické sklíčko. Systém je vhodný zejména pro obecné studie biofilmů, či pro studium kontaminace zdravotnického materiálu a lékařských přístrojů (viz.Obrázek 28) [140].



Obrázek 28: Drip flow reaktor.

převzato z: <https://www.biofilm.montana.edu/files/CBE/images/msucbedripflow1.jpg>. [141]

Zjednodušeně, postup přípravy tohoto reaktoru spočívá v opatření každé komory sklíčkem či kupónem, na kterém se má formovat biofilm a také nalitím kultivačního média. Komory jsou následně uzavřeny víčkem a autoklávovány. Následuje inokulace mikrobiálního agens a inkubace v termostatu. Po inkubaci se odsvorkuje hadička pro odtok média a celý reaktor je položen na podložku, pod úhlem 10 stupňů. Asepticky je připojena hadička sloužící k přívádění čerstvého kultivačního média. Je také zapojena pumpa, jejíž výkon je nastaven tak, aby docházelo pouze k prokapávání čerstvého média do komůrek. Tímto způsobem je umožněn kontinuální průtok čerstvého média komorami a zároveň odvádění mikrobiálních metabolitů ^[140].

2.9.2.3. Rotační diskový reaktor

Rotační diskový reaktor, neboli originálně označovaný jako “rotating disk reactor”, se skládá z teflonového disku, který obsahuje odnímatelné kupóny (viz.Obrázek 29). Kupóny mohou být vyrobené z různých materiálů. Spodní část rotujícího disku obsahuje tyčový magnet, který umožňuje rotaci disku a cirkulaci kultivačního média. Celý disk obsahuje 18 kupónů. Cirkulace růstového média je dále zajištěna systémem hadiček a peristaltickou pumpou. Tento reaktor byl vytvořen zejména pro účely studia antibiofilm/biocidních aktivit látek, pro studium možností v odstranění již formovaného biofilmu a pro testování nových materiálů a studiu jejich potenciálu inhibovat formaci biofilmu na jejich povrchu ^[140].

Do reaktoru se umístí 250ml kultivačního sterilního média a následně dojde k inokulaci 0,5ml testovací mikrobiální kultury. Reaktor je poté umístěn na magnetickou míchací desku, kde je nastavena rychlost 250 otáček za minutu. Takto nastavený reaktor je inkubován přes noc při požadované teplotě. Po dostatečně dlouhé inkubaci (autoři Schwartz, Stephenson, Hernandez *et al.*, uvádí v případě studia tvorby biofilmů tvořených bakterií *Staphylococcus aureus* 16 hodinovou inkubaci) se připojí hadice pro přívod čerstvého kultivačního média a připojí se také peristaltická pumpa. Po zapnutí pumpy je nastaven průtok dle požadované rychlosti růstu. Po dostatečně dlouhé době inkubace pro formaci studovaného biofilmu se reaktor zastaví a asepticky se vyjme rotační disk. Pomocí sterilní pinzety se odstraní kupóny z disku a každý z nich se ponoří do fyziologického fosfátového pufru, aby byly odstraněny všechny volně připojené, neboli flotující bakterie ^[140].



Obrázek 29: Rotační diskový reaktor.

převzato z:

<http://www.biofilms.biz/wp-content/uploads/2010/11/dk-20-rotating-disc-biofilm-reactor-300x300.png> ^[142]

2.9.3. Mikrokosmosy

Mikrokosmosy jsou nejvíce sofistikovaným, komplexním a heterogenním *in vitro* modelem pro studium biofilmu. Tento model je schopen nejlépe mimikovat situaci *in vivo*. Testovací mikrokosmos-biofilmy jsou tvořeny více mikrobiálními agens, které se přirozeně podílí na tvorbě biofilmu v modelech *in vivo*. Mikrokosmosy tedy nejlépe odrážejí složitost a různorodost fyziologických parametrů biofilmů ^[119].

2.9.4. *Ex vivo* modely

Jakýmsi přechodem mezi systémem *in vitro* a *in vivo* modely jsou takzvané *ex vivo* modely, které jsou založeny na práci se zvířecími orgány a tkáňovými explanty. Nejčastěji se pro tyto studie využívají prasečí a myší tkáně. Nespornou výhodou těchto systémů je možnost větší kontroly experimentálních podmínek než je tomu u modelů *in vivo* ^[119].

2.9.5. *In vivo* modely

Slabinou *in vitro* modelů je, že zcela neodráží komplexní a dynamickou povahu interakce mezi hostitelem a patogeny, tedy v tomto případě biofilm-formujícími mikroby. Pro případ validace výsledků získaných v rámci *in vitro* studií je tedy nezbytné, za účelem potvrzení pracovních hypotéz získaných na základě *in vitro* studií, k dalšímu studiu využít *in vivo* modely ^[119].

In vivo modely lze obecně rozdělit na savčí a nesavčí modely. Příkladem nesavčího, jednoduchého modelu může být rostlinný model jako je huseníček rolní (lat. *Arabidopsis thaliana*) a okřehek menší (lat. *Lemna minor*), které byly úspěšně použity ke zjištění korelace mezi tvorbou biofilmu a virulence. Příkladem dalšího nesavčího modelu založeného na využití bezobratlých živočichů může být využití háďátka malého (lat. *Caenorhabditis elegans*), háďátka živorodého (lat. *Panagrellus redivivus*), octomilky obecné (lat. *Drosophila melanogaster*) a řady dalších. K nejčastěji využívaným savčím modelům patří například myši, potkani, morčata, králíci a řada dalších ^[119].

3.EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1. Použitý materiál

Pomůcky:

- sterilní mikrotitrační destičky s víčky (Gamedium, Jesenice u Prahy)
- sterilní špičky (Fischer Scientific s.r.o., Pardubice)
- mikropipety (Fischer Scientific s.r.o., Pardubice)
- dvanácti jamkový rezervoár na médium (Gamedium, Jesenice u Prahy)
- stojánky na zkumavky (Gamedium, Jesenice u Prahy)
- sterilní zkumavky (Gamedium, Jesenice u Prahy)
- jednorázové očkovací kličky (Gamedium, Jesenice u Prahy)

Přístroje:

- laminární box Esco Class II type A2 (dodavatel- Dynex laboratorie s.r.o., Buštěhrad)
- termostat Binder WTB (dodavatel- Fisher Scientific s.r.o., Pardubice)
- vortex MS2 Minishaker IKA (dodavatel- P-lab, Praha)
- denzitometr DEN-1B McFarland Densitometer Biosan (dodavatel- P-lab, Praha)

Chemikálie:

- kultivační médium- MHB (Muller-Hinton Broth, Mueller-Hinton bujón), (dodavatel- Čaderský Envitek, Brno)
- dimethylsulfoxid (DMSO), (dodavatel- Sigma Aldrich, Praha)
- sterilní deionizovaná voda (příprava z MilliQ deionizované vody autoklávováním)

3.2. Modelové kmeny bakterií:

Testování potenciální antibakteriální aktivity bylo prováděno na 8 kmenech bakterií uvedených v Tabulce 12.

Tabulka 12: Modelové kmeny bakterií.

Modelový kmen	Zkratka	Kód-sbírkový kmen	Získání
<i>Staphylococcus aureus</i>	SA	CCM 4516/08	Česká sbírka mikroorganismů, Masarykova univerzita Brno
<i>Staphylococcus aureus</i> - methicilin rezistentní	MRSA	H 5996/08	Fakultní nemocnice Hradec Králové
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	SE	H 6966/08	Fakultní nemocnice Hradec Králové
<i>Enterococcus</i> sp.	EF	J 14365/08	Fakultní nemocnice Hradec Králové
<i>Escherichia coli</i>	EC	CCM 4517	Česká sbírka mikroorganismů, Masarykova univerzita Brno
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	KP	D 11750/08	Česká sbírka mikroorganismů, Masarykova univerzita Brno
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ESBL	KP ESBL	J 14368/08	Fakultní nemocnice Hradec Králové
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	PA	CCM 1961	Fakultní nemocnice Hradec Králové

3.3. Koncentrace testované látky

Všechny nově syntetizované testované látky byly ředěny dvojkovou ředící řadou v rozmezí koncentrací od 500 $\mu\text{mol/l}$ až 0,488 $\mu\text{mol/l}$, tedy v koncentracích:

500; 250; 125; 62,5; 31,25; 15,625; 7,813; 3,906; 1,953; 0,977 a 0,488 $\mu\text{mol/l}$.

3.4. Skupiny testovaných látek

V rámci této rigorózní práce bylo testováno 73 chemických látek. Celkem bylo poskytnuto Katedrou anorganické a organické chemie Farmaceutické fakulty v Hradci Králové 78 sloučenin, z nichž 5 nebylo dále testováno, jelikož byly nerozpustné v DMSO

nebo při ředění došlo k jejich vysrážení. Po chemické stránce se jednalo o salicylanilidové karbamáty (pracovní označení: SC-1A, SC-1B, SC-1C, SC-1D, SC-2A, SC-2B, SC-2C, SC-2D, SC-2E, SC-3A, SC-3B, SC-3C, SC-3D, SC-3E, SC-4A, SC-4B, SC-4C, SC-4D, SC-4E, SC-5A, SC-5B, SC-5C, SC-5D, SC-6A, SC-6C, SC-7A, PB-3, PB-4), sulfonamidové močoviny-deriváty sulfamethoxazolu (pracovní označení: SMXU-1, SMXU-2, SMXU-3, SMXU-4, SMXU-5, SMXU-6, SMXU-7, SMXU-8, SMXU-9, SMX-AU-2, SMX-AU-4, SMX-AU-5, SMX-AU-6, SMX-AU-8, SMX-AU-9, SMX-AU-10, SMX-AU-12, SMX-13, SMX-10, SMX-12, SMX-15, SMX-16, SMX-Me-Ph-U), deriváty isoniazidu (pracovní označení: INH-1, INH-2, INH-3, INH-4, INH-5, INH-6, INH-7), sulfonamidové imidazolidintronny-deriváty sulfamethoxazolu (pracovní označení: SMX-C-1, SMX-C-2, SMX-C-3, SMX-C-4, SMX-C-5, SMX-C-6, SMX-C-7, SMX-C-8, SMX-C-9) a další látky nejednotné chemické struktury (pracovní označení: 4-Cl-Ph, SAL-4I, TZA-1, TZE-1, TZK-1, IRGASAN).

3.5. Metodika

3.5.1. Příprava suspenzí testovacích modelových kmenů bakterií

Nejprve bylo popsáno 8 sterilních zkumavek zkratkami testovacích kmenů bakterií (SA, MRSA, SE, EF, EC, KP, KP ESBL, PA). Tyto sbírkové kmeny bakterií byly kultivovány na živném agaru v termostatu po dobu 24 hodin při teplotě 37°C. Z kultury bakterií narostlých na agaru byla odebrána malá část kolonie, která byla následně resuspendována ve zkumavce s 5 ml sterilní deionizované vody. Takto připravená bakteriální suspenze byla důkladně promíchána na vortexu a pomocí stolního denzitometru byla proměřena optická denzita. Výsledná optická denzita bakteriální suspenze by měla odpovídat denzitě s hodnotou 0,5 stupně dle referenční zákalové stupnice McFarlanda. Takto připravené bakteriální suspenze testovacích kmenů by měly vydržet v lednici při teplotě 2-8 °C po dobu maximálně 14 dní.

3.5.2. Příprava dvojkové ředící řady testované látky

Testovaná látka nám byla dodána, společně s informacemi o navážce a molekulové hmotnosti, pracovníky Katedry anorganické a organické chemie. Každá látka byla rozpuštěna v příslušném objemu DMSO tak, aby první testovaná koncentrace látky byla 500 µmol/l a

zároveň koncentrace DMSO v jamce mikrotitrační destičky nepřesáhla 1%. Následně bylo vše ve zkumavce promícháno na vortexu. Požadovaný objem DMSO byl vypočítaný pomocí následujícího vzorce, kde m = navážka testované látky (g), c = první testovaná koncentrace = 500 $\mu\text{mol/l}$ = 0,0005 mol/l a M = molární hmotnost.

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

Při přípravě pracovních roztoků je přidáváno ke kultivačnímu médiu o objemu 1,98 ml jen 20 μl testované látky rozpuštěné v DMSO proto, aby koncentrace DMSO v jamce mikrotitrační destičky nepřesáhla 1%. Z tohoto důvodu je nutné testovanou látku rozpustit tak, aby její koncentrace byla 100x násobně vyšší. Právě po přidání 1,98 ml kultivačního média k 20 μl testované rozpuštěné látky o 100x násobně vyšší koncentraci, odpovídá cílová koncentrace testované látky požadované hodnotě 500 $\mu\text{mol/l}$.

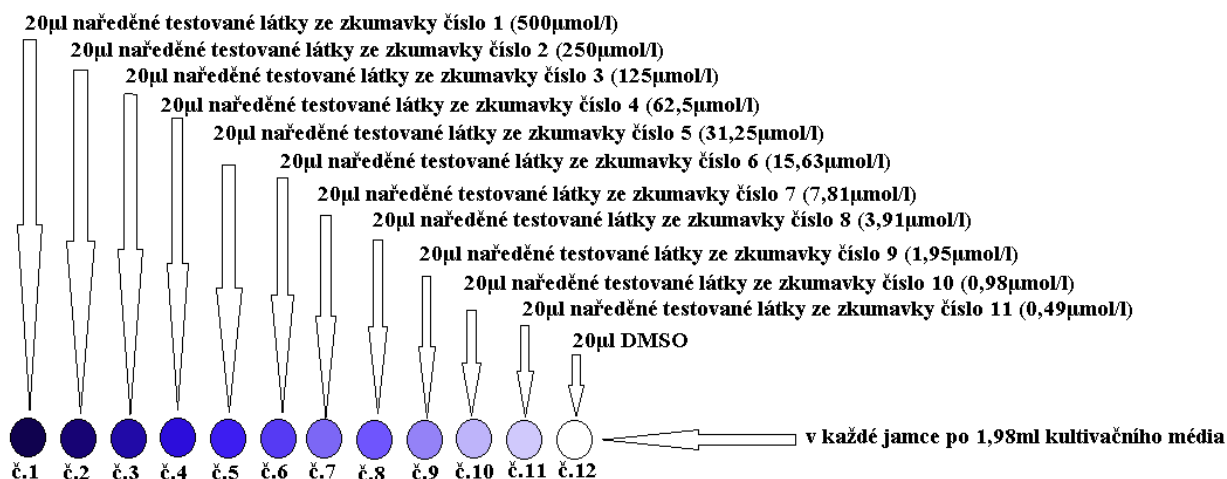
Pokud se látka rozpustí nebo vytvoří homogenní suspenzi, přistoupí se k dalšímu kroku ředění. Jestliže se však testovaná látka vysráží nebo nerozpustí, přidá se druhý, případně třetí ekvivalent rozpouštědla DMSO. Každým přidáním ekvivalentu rozpouštědla se posouvá první testovaná koncentrace o jedno ředění dozadu (z 500 $\mu\text{mol/l}$ na 250 $\mu\text{mol/l}$ atd.).

Do sterilní zkumavky, která byla označena číslem 1, bylo napipetováno 1,98 ml růstového média a 20 μl rozpuštěné testované látky. Obsah zkumavky byl řádně promíchán na vortexu a byla provedena opětovná kontrola, zda se daná látka v kultivačním médiu nevysrážela. Pokud nedošlo k vysrážení, přistoupilo se k dalšímu ředění. Pokud došlo k vysrážení, byl přidán druhý, případně třetí ekvivalent kultivačního média. Takto připravené pracovní roztoky byly asepticky přeneseny do první jamky dvanácti jamkového rezervoáru.

Do deseti sterilních zkumavek, které byly popsány číslicemi 2-11 bylo napipetováno po 0,5 ml DMSO. Do zkumavky označené číslem 2 bylo napipetováno 0,5 ml testované látky rozpuštěné v DMSO, roztok byl řádně promíchán a z tohoto roztoku bylo odpipetováno 0,5 ml do zkumavky číslo 3. Obsah zkumavky číslo 3 byl opět řádně promíchán, opět bylo odpipetováno 0,5 ml a tento objem byl přenesen do zkumavky číslo 4. V tomto sledu kroků se pokračovalo až po zkumavku číslo 11. Tímto způsobem byla připravena dvojková ředící řada testované látky v DMSO, kdy v každé následující zkumavce je testovaná látka o poloviční koncentraci, než ve zkumavce předchozí.

Do jamek 2-12 dvanácti jamkového rezervoáru bylo napipetováno po 1,98 ml kultivačního média a bylo přidáno 20 μl naředěné testované látky (tzn. ze zkumavky 2 do

jamky 2, ze zkumavky 3 do jamky 3 atd.). Do poslední dvanácté jamky bylo přidáno 20 μl samotného DMSO, který slouží jako tzv. pozitivní kontrola růstu. Takto byly získány 2 ml pracovních roztoků s postupně klesajícími koncentracemi (jamky 1-11) a kontrolní jamka bez testované látky (jamka 12), (viz.Obrázek 30).



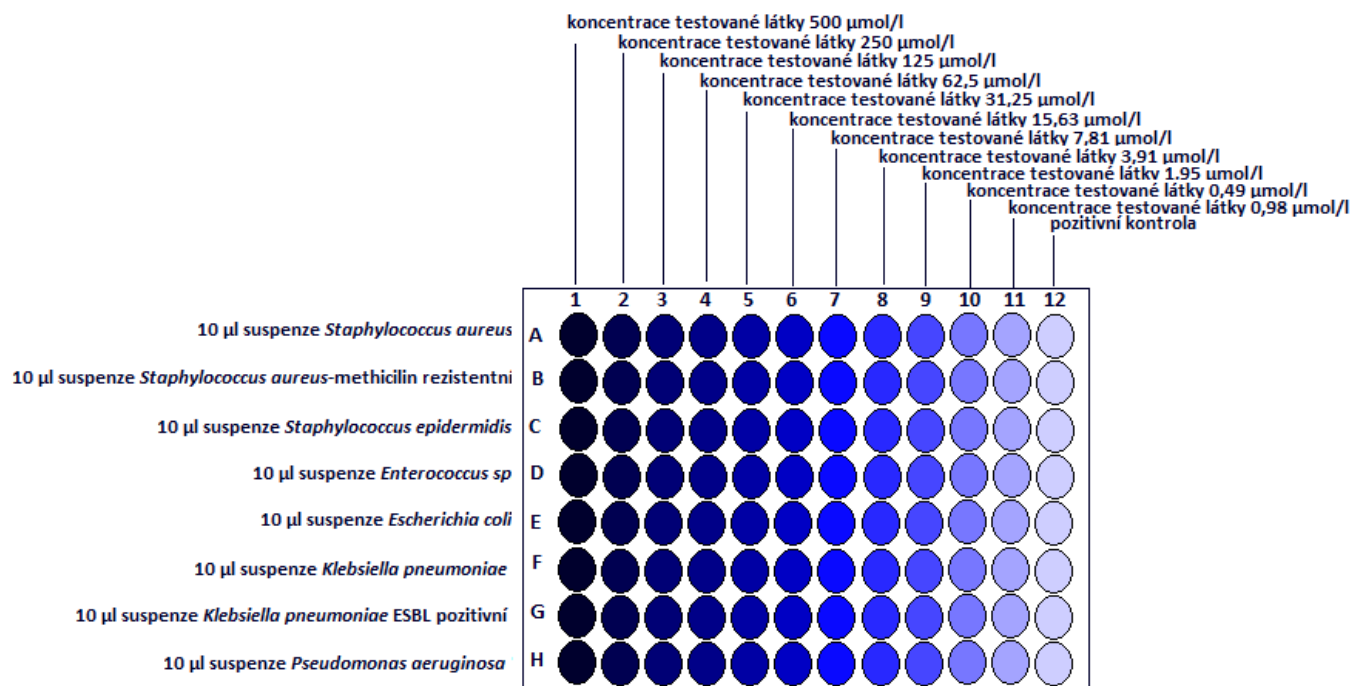
Obrázek 30: Náčrt pracovního postupu při pipetování 20 μl naředěné testované látky.

3.5.3. Pipetování do 96 jamkové mikrotitrační destičky

Pomocí dvanácti kanálové pipety bylo přeneseno z příslušných jamek dvanácti jamkového rezervoáru po 200 μl ředěné testované látky do všech řádků (jeden řádek, tj. 12 jamek) jedné 96 jamkové mikrotitrační destičky.

Do každé jamky řádku A bylo napipetováno 10 μl připravené suspenze *Staphylococcus aureus* SA CCM4516/08. Do každé jamky řádku B bylo napipetováno 10 μl připravené suspenze *Staphylococcus aureus*-methicilin rezistentní MRSA H 5996/08. Do každé jamky řádku C bylo napipetováno 10 μl připravené suspenze *Staphylococcus epidermidis* SE H6966/08. Do každé jamky řádku D bylo napipetováno 10 μl připravené suspenze *Enterococcus* sp. EF J 14365/08. Do každé jamky řádku E bylo napipetováno 10 μl připravené suspenze *Escherichia coli* EC CCM 4517. Do každé jamky řádku F bylo napipetováno 10 μl připravené suspenze *Klebsiella pneumoniae* KP D 11750/08. Do každé jamky řádku G bylo nepipetováno 10 μl připravené suspenze *Klebsiella pneumoniae* ESBL pozitivní KP ESBL J 14368/08. Do každé jamky řádku H bylo napipetováno 10 μl připravené suspenze *Pseudomonas aeruginosa* PA CCM 1961. Mikrotitrační destička byla přikryta víčkem a inkubována v termostatu při 35°C.

Vždy ve všech jamkách sloupce č. 1 je roztok testované látky o cílové koncentraci 500 $\mu\text{mol/l}$, v jamkách sloupce č. 2 je 250 $\mu\text{mol/l}$, v jamkách sloupce č. 3 je 125 $\mu\text{mol/l}$, v jamkách sloupce č. 4 je 62,5 $\mu\text{mol/l}$, v jamkách sloupce č. 5 je 31,25 $\mu\text{mol/l}$, v jamkách sloupce č. 6 je 15,625 $\mu\text{mol/l}$, v jamkách sloupce č. 7 je 7,813 $\mu\text{mol/l}$, v jamkách sloupce č. 8 je 3,906 $\mu\text{mol/l}$, v jamkách sloupce č. 9 je 1,953 $\mu\text{mol/l}$, v jamkách sloupce č. 10 je 0,977 $\mu\text{mol/l}$, v jamkách sloupce č. 11 je 0,488 $\mu\text{mol/l}$ (viz.Obrázek 31).



Obrázek 31: Náčrt mikrotitrační destičky a jednotlivé koncentrace testované látky.

3.5.4. Vyhodnocení- odečet minimální inhibiční koncentrace

Po uplynutí inkubační doby bylo provedeno vizuální odečítání inhibice růstu bakterií, tzn. byla vyhledávána první jamka každého řádku, ve které nebyl detekován zákal, tj. tedy jamka, kde již nedošlo k viditelnému nárůstu bakterie. Výsledky byly stanovovány po 24 hodinové a 48 hodinové inkubaci v termostatu. Hodnota minimální inhibiční koncentrace testované látky se odečítá v jamce s nejnižší koncentrací testované látky, kde již nebyl zaznamenán růst bakterie. V této práci při hodnocení výsledků je využita také zkratka IC_{95} , která se váže ke koncentraci testované látky, která inhibuje růst z 95 %, tj. zbylých 5 % bakterií není v růstu inhibováno. Bohužel pouhým okem nejsme schopni zhodnotit přímo čistou jamku, proto se zde počítá s 5% tolerancí. V praxi to proto znamená, že pokud se jamka

mikrotitrační destičky jevila jako čirá a bez zákalu při pozorování okem, byla vyhodnocena koncentrace účinné látky jako inhibiční.

Pro přesnější odečet účinnosti testovaných látek lze také využít přístrojové instrumentace jako je například spektrofotometr, který je schopen automaticky odečíst intenzitu zákalu (turbiditu).

3.6. Testované látky s potenciální antimikrobiální aktivitou

V rámci rigorózní práce bylo hodnoceno 73 chemických látek syntetizovaných na Katedře anorganické a organické chemie Farmaceutické fakulty v Hradci Králové. Účinnost testovaných látek byla zkoušena v rozsahu koncentrací 500 $\mu\text{mol/l}$ až 0,488 $\mu\text{mol/l}$. Po uplynutí inkubační doby byl vizuálně hodnocen nárůst bakterií ve všech jamkách mikrotitrační destičky. MIC odpovídala koncentraci testované látky v jamce, kde došlo k minimálně 95% potlačení růstu kmene ($\text{MIC}=\text{IC}_{95}$). Tyto hodnoty byly odečítány vizuálně.

Přehled skupin testovaných látek:

1) salicylanilidové karbamáty

-celkem 28 látek, viz.Tabulka 13

2) sulfonamidové močoviny- deriváty sulfamethoxazolu

-celkem 23 látek, viz.Tabulka 14

3) deriváty isoniazidu-

-celkem 7 látek, viz.Tabulka 15

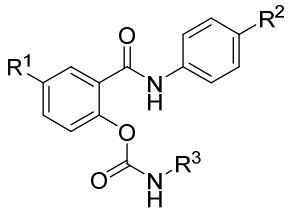
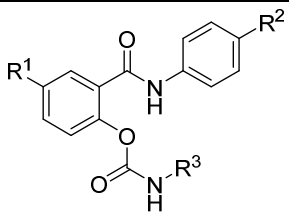
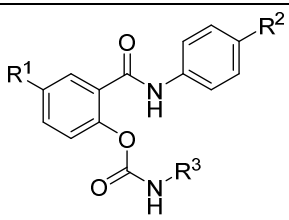
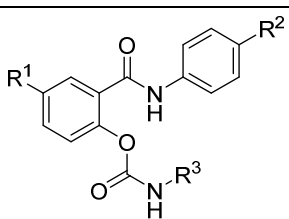
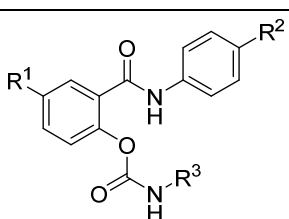
4) sulfonamidové imidazolidinriony- deriváty sulfamethoxazolu

-celkem 9 látek, viz.Tabulka 16

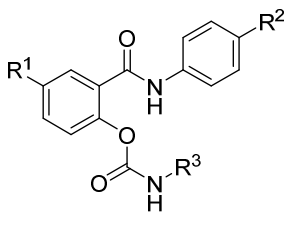
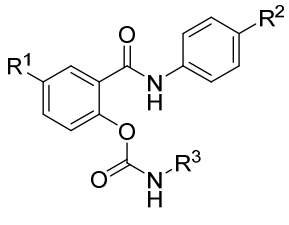
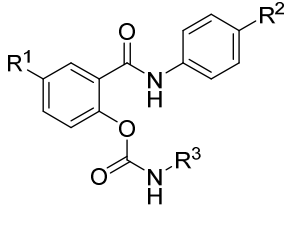
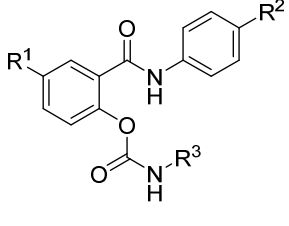
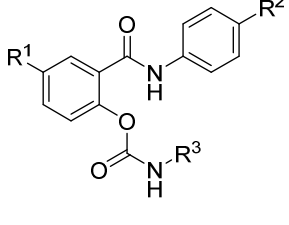
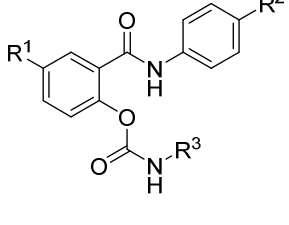
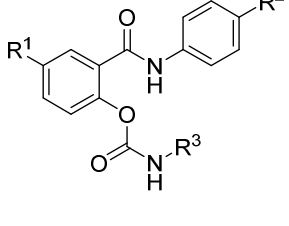
5) další nejednotné chemické struktury

-celkem 6 látek, viz.Tabulka 17

Tabulka 13: Přehled testovaných látek ze skupiny salicilanilidových karbamátů.

Kód látky + MW	Chemický vzorec	Substituenty			Název struktury	Navážka (mg) + DMSO (ml)
		R ¹	R ²	R ³		
SC-1A + 338,40		H	H	cyklohexyl	2-(fenylkarbamoyl) fenylcyklohexyl karbamát	10,0 + 591,0
SC-1B + 332,35		H	H	fenyl	2-(fenylkarbamoyl) fenylfenylkarbamát	10,3 + 619,8
SC-1C + 346,38		H	H	benzyl	2-(fenylkarbamoyl) fenylbenzylkarbamát	14,2 + 819,9
SC-1D + 360,41		H	H	fenethyl	2-(fenylkarbamoyl) fenylfenethyl karbamát	12,5 + 693,7
SC-2A + 407,29		Cl	Cl	cyklohexyl	4-chlor-2-[(4- chlorfenyl) karbamoyl]fenyl cyklohexylkarbamát	18,1 + 888,8

SC-2B + 401,24		Cl	Cl	fenyl	4-chlor-2-[(4-chlorofenyl) karbamoyl] fenylfenylkarbamát	15,0 + 747,7
SC-2C + 415,27		Cl	Cl	benzyl	4-chlor-2-[(4-chlorofenyl) karbamoyl] fenylbenzylkarbamát	15,8 + 761,0
SC-2D + 429,30		Cl	Cl	fenethyl	4-chlor-2-[(4-chlorofenyl) karbamoyl] fenylfenethyl karbamát	12,6 + 587,0
SC-2E + 459,36		Cl	Cl	admantan-yl	4-chlor-2-[(4-chlorofenyl) karbamoyl] fenyladamantan-1-ylkarbamát	10,7 + 465,9
SC-3A + 451,74		Cl	Br	cyklohexyl	2-[(4-bromofenyl) karbamoyl]-4-chlorofenylcyklohexylkarbamát	15,1 + 668,5
SC-3B + 445,69		Cl	Br	fenyl	2-[(4-bromofenyl) karbamoyl]-4-chlorofenyl fenylkarbamát	11,2 + 502,6
SC-3C + 459,72		Cl	Br	benzyl	2-[(4-bromofenyl) karbamoyl]-4-chlorofenylbenzyl karbamát	16,6 + 722,2

SC-3D + 473,75		Cl	Br	fenethyl	2-[(4-bromfenyl) karbamoyl]-4-chlorfenylfenethyl karbamát	10,3 + 434,8
SC-3E + 503,82		Cl	Br	admantan-1-yl	2-[(4-bromfenyl) karbamoyl]-4-chlorfenyladamantan-1-ylkarbamát	17,7 + 702,6
SC-4A + 390,84		Cl	F	cyklohexyl	4-chlor-2-[(4-fluorfenyl) karbamoyl]fenyl cyklohexylkarbamát	15,8 + 808,5
SC-4B + 384,84		Cl	F	fenyl	4-chlor-2-[(4-fluorfenyl) karbamoyl] fenylfenylkarbamát	18,0 + 644,5
SC-4C + 398,81		Cl	F	benzyl	4-chlor-2-[(4-fluorfenyl) karbamoyl] fenylbenzylkarbamát	15,5 + 777,3
SC-4D + 412,84		Cl	F	fenethyl	4-chlor-2-[(4-fluorfenyl) karbamoyl] fenylfenethyl karbamát	15,9 + 770,3
SC-4E + 442,91		Cl	F	admantan-1-yl	4-chlor-2-[(4-fluorfenyl) karbamoyl] fenyl adamantan-1-ylkarbamát	16,7 + 754,1

SC-5A + 440,84		Cl	CF ₃	cyklohexyl	4-chlor-2-{{4-(trifluormethyl)fenyl}karbamoyl}fenylcyklohexylkarbamát	19,4 + 880,1
SC-5B + 434,80		Cl	CF ₃	fenyl	4-chlor-2-{{4-(trifluormethyl)fenyl}karbamoyl}fenylfenylkarbamát	15,9 + 731,4
SC-5C + 448,82		Cl	CF ₃	benzyl	4-chlor-2-{{4-(trifluormethyl)fenyl}karbamoyl}fenylbenzylkarbamát	15,8 + 704,1
SC-5D + 462,85		Cl	CF ₃	fenethyl	4-chlor-2-{{4-(trifluormethyl)fenyl}karbamoyl}fenylfenehtylkarbamát	10,7 + 462,4
SD-6A + 407,29		-	-	cyklohexyl	4-chlor-2-{{3-chlorofenyl}karbamoyl}fenylcyklohexylkarbamát	18,1 + 888,8
SD-6C + 415,27		-	-	benzyl	4-chlor-2-{{3-chlorofenyl}karbamoyl}fenylbenzylkarbamát	14,5 + 698,3
SC-7A + 441,74		-	-	-	4-chlor-2-{{3,4-dichlorofenyl}karbamoyl}fenylcyklohexylkarbamát	11,2 + 507,1

PB-3 + 586,80		Br	-	-	dibenzyl{2-[(4-bromfenyl) karbamoyl]-4-chlorfenyl}fosfát	10,5 + 357,9
PB-4 + 575,90		CF 3	-	-	dibenzyl(4-chlor-2-[[4-(trifluormethyl)feny] karbamoyl]fenyl) fosfát	14,5 + 503,6

Vysvětlivka: MW – molecular weight, molekulová hmotnost; DMSO – dimethylsulfoxid.

Tabulka 14: Přehled testovaných látek ze skupiny sulfonamidové močoviny (deriváty sulfamethoxazolu).

Kód látky + MW	Chemický vzorec	Substituent	Název struktury	Navážka (mg) + DMSO (ml)
SMX-U-1 + 378,45		cyklohexyl	4-(3-cyklohexylureido)-N-(5-methylisoxazol-3-yl) benzensulfonamid	16,1 + 850,8
SMX-U-2 + 372,40		fenyl	4-(3-fenylureido)-N-(5-methylisoxazol-3-yl) benzensulfonamid	14,5 + 778,7
SMX-U-3 + 386,42		benzyl	4-(3-benzylureido)-N-(5-methylisoxazol-3-yl)benzen sulfonamid	11,3 + 584,9

SMX- U-4 + 400,45		fenethyl	4-(3-fenethylureido)- <i>N</i> -(5-methylisoxazol- 3-yl)benzen sulfonamid	12,0 + 599,3
SMX- U-5 + 430,52		admantan-1-yl	4-[3-(adamantan-1- yl)ureido]- <i>N</i> -(5- methylisoxazol-3- yl)benzen sulfonamid	10,1 + 469,2
SMX- U-6 + 338,38		propyl	<i>N</i> -(5-methylisoxazol- 3-yl)-4-(3- propylureido) benzensulfonamid	14,1 + 833,4
SMX- U-7 + 394,49		heptyl	4-(3-heptylureido)- <i>N</i> -(5-methylisoxazol- 3-yl) benzensulfonamid	14,0 + 709,8
SMX- U-8 + 440,40		4-(trifluor methyl) fenyl	<i>N</i> -(5-methylisoxazol- 3-yl)-4-{3-[4- (trifluormethyl)feny] ureido} benzensulfonamid	13,9 + 631,2
SMX- U-9 + 428,50		4-(<i>terc</i> - butyl)fenyl	4-{3-[4-(<i>terc</i> - butyl)fenyl]ureido- <i>N</i> - (5-methylisoxazol-3- yl)benzensulfonamid	13,5 + 630,1
SMX- AU-2 + 324,36		ethyl	4-(3-ethylureido)- <i>N</i> - (5-methylisoxazol-3- yl) benzensulfonamid	15,4 + 949,6
SMX- AU-4 + 352,41		butyl	4-(3-butylureido)- <i>N</i> - (5-methylisoxazol-3- yl) benzensulfonamid	11,9 + 675,3

SMX- AU-5 + 366,44		pentyl	<i>N</i> -(5-methylisoxazol-3-yl)-4-(3-pentylureido)benzenesulfonamid	12,0 + 655,0
SMX- AU-6 + 380,46		hexyl	4-(3-hexylureido)- <i>N</i> -(5-methylisoxazol-3-yl)benzenesulfonamid	13,3 + 699,2
SMX- AU-8 + 408,52		oktyl	<i>N</i> -(5-methylisoxazol-3-yl)-4-(3-oktylureido)benzenesulfonamid	12,0 + 582,5
SMX- AU-9 + 422,54		nonyl	<i>N</i> -(5-methylisoxazol-3-yl)-4-(3-nonylureido)benzenesulfonamid	11,8 + 558,5
SMX- AU-10 + 436,57		decyl	4-(3-decylureido)- <i>N</i> -(5-methylisoxazol-3-yl)benzenesulfonamid	19,1 + 875,0
SMX- AU-12 + 464,62		dodecyl	4-(3-dodecylureido)- <i>N</i> -(5-methylisoxazol-3-yl)benzenesulfonamid	15,0 + 645,7
SMX- 13 + 336,37		cyklopropyl	4-(3-cyklopropylureido)- <i>N</i> -(5-methylisoxazol-3-yl)benzenesulfonamid	13,8 + 820,5
SMX- 10 + 560,56			<i>N</i> ¹ , <i>N</i> ² -bis{4-[<i>N</i> -(5-methylisoxazol-3-yl)sulfamoyl]fenyl}oxalamid	12,4 + 442,4

SMX-12 + 614,56		4,4'-(2,3,5,6-tetraoxopiperazin-1,4-diyl)bis[<i>N</i> -(5-methylisoxazol-3-yl)benzensulfonamid]	15,0 + 488,2
SMX-15 + 532,55		4,4'-[karbonylbis(azandiy 1)]bis[<i>N</i> -(5-methylisoxazol-3-yl)benzensulfonamid]	15,4 + 873,6
SMX-16 + 380,46		4-(3,3-diisopropylureido)- <i>N</i> -(5-methylisoxazol-3-yl)benzensulfonamid	11,5 + 604,5
SMX-Me-Ph-U + 386,46		4-(3-fenyl-3-methylureido)- <i>N</i> -(5-methylisoxazol-3-yl)benzensulfonamid	13,9 + 719,4

Vysvětlivka: MW – molecular weight, molekulová hmotnost; DMSO – dimethylsulfoxid.

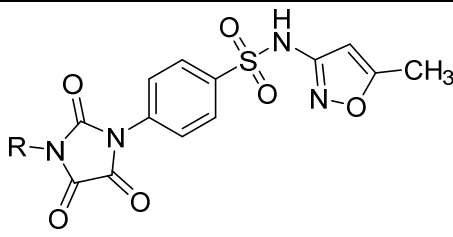
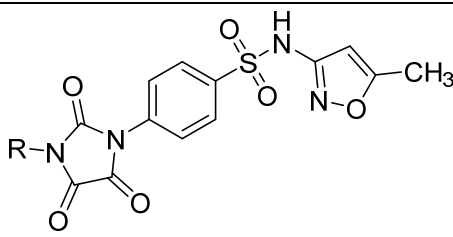
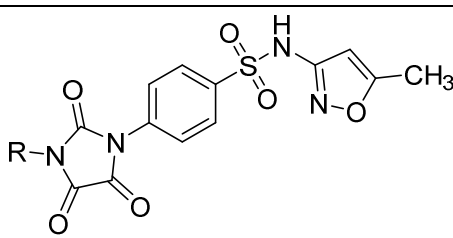
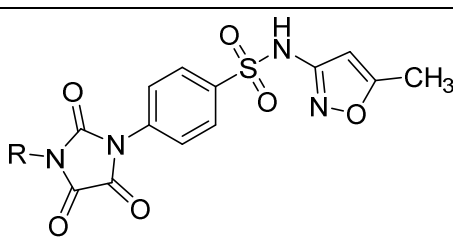
Tabulka 15: Přehled testovaných látek ze skupiny derivátů isoniazidu.

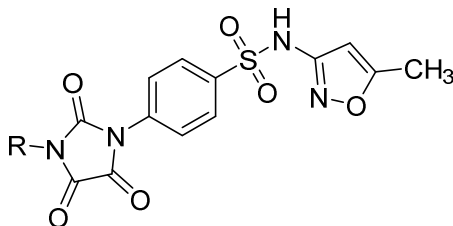
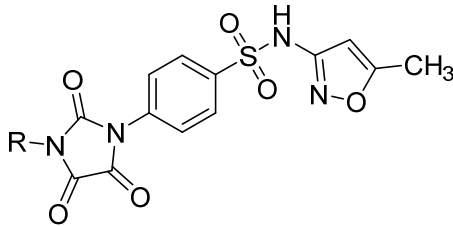
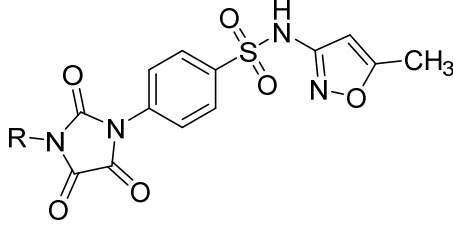
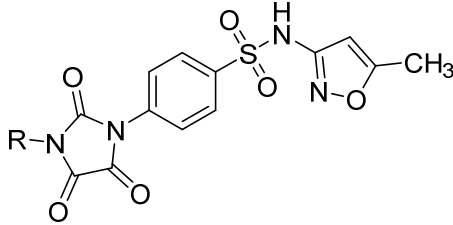
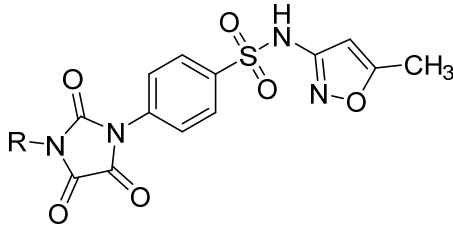
Kód látky + MW	Chemický vzorec	Substituent	Název struktury	Navážka (mg) + DMSO (ml)
INH-1 + 312,37		4- <i>terc</i> -butyl	<i>N</i> -[4-(<i>terc</i> -butyl)fenyl]-2-isonikotinoylhydrazin karboxamid	18,8 + 1203,7

INH-2 + 312,37		butyl	<i>N</i> -(4-butylfenyl)-2-isonikotinoylhydrazin karboxamid	15,3 + 979,6
INH-3 + 326,39		pentyl	2-isonikotinoyl- <i>N</i> -(4-pentylfenyl)hydrazin karboxamid	13,9 + 851,7
INH-4 + 340,42		hexyl	<i>N</i> -(4-hexylfenyl)-2-isonikotinoylhydrazin karboxamid	17,9 + 1051,6
INH-5 + 354,45		heptyl	<i>N</i> -(4-heptylfenyl)-2-isonikotinoylhydrazin karboxamid	11,9 + 671,5
INH-6 + 368,47		oktyl	2-isonikotinoyl- <i>N</i> -(4-oktylfenyl)hydrazin karboxamid	12,2 + 662,2
INH-7 + 278,35		-	<i>N</i> -heptyl-2-isonikotinoylhydrazin-1-karboxamid	21,0 + 1508,9

Vysvětlivka: MW – molecular weight, molekulová hmotnost; DMSO – dimethylsulfoxid.

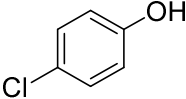
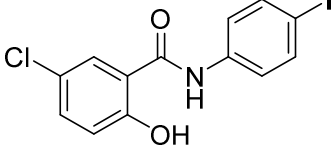
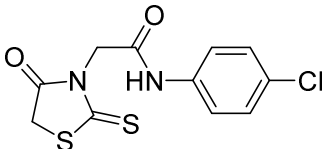
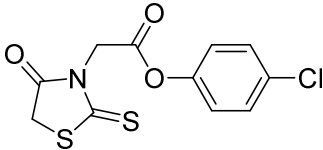
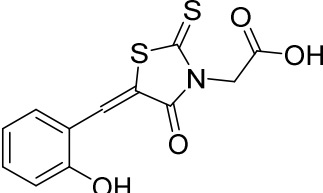
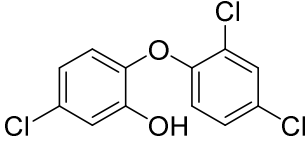
Tabulka 16: Přehled testovaných látek ze skupiny sulfonamidových imidazolidintronů (deriváty sulfamethoxazolu).

Kód látky + MW	Chemický vzorec	Substituent	Název struktury	Navážka (mg) + DMSO (ml)
SMX-C-1 + 432,45		cyklohexyl	4-(3-cyklohexyl-2,4,5-trioxoimidazolidin-1-yl)-N(5-methylisoxazol-3-yl)benzensulfonamid	11,1 + 513,4
SMX-C-2 + 426,40		fenyl	4-(3-fenyl-2,4,5-trioxoimidazolidin-1-yl)-N-(5-methylisoxazol-3-yl)benzensulfonamid	14,3 + 670,7
SMX-C-3 + 440,43		benzyl	4-(3-benzyl-2,4,5-trioxoimidazolidin-1-yl)-N-(5-methylisoxazol-3-yl)benzensulfonamid	12,9 + 585,8
SMX-C-4 + 454,46		fenethyl	4-(3-fenethyl-2,4,5-trioxoimidazolidin-1-yl)-N-(5-methylisoxazol-3-yl)benzensulfonamid	10,2 + 448,9

SMX-C-5 + 484,52		admantan-1-yl	4-[3-(adamantan-1-yl)-2,4,5-trioxoimidazolidin-1-yl]-N-(5-methylisoxazol-3-yl)benzensulfonamid	7,0 + 288,9
SMX-C-6 + 392,39		propyl	N-(5-methylisoxazol-3-yl)-4-(2,4,5-trioxo-3-propylimidazolidin-1-yl)benzensulfonamid	17,2 + 876,7
SMX-C-7 + 448,49		heptyl	4-(3-heptyl-2,4,5-trioxoimidazolidin-1-yl)-N-(5-methylisoxazol-3-yl)benzensulfonamid	10,7 + 477,2
SMX-C-8 + 494,40		4-(trifluormethyl)fenyl	N-(5-methylisoxazol-3-yl)-4-{2,4,5-trioxo-3-[4-(trifluormethyl)fenyl]imidazolidin-1-yl}benzensulfonamid	12,3 + 497,6
SMX-C-9 + 482,51		4-(<i>tert</i> -butyl)fenyl	4-{3-[4-(<i>tert</i> -butyl)fenyl]-2,4,5-trioxoimidazolidin-1-yl}-N-(5-methylisoxazol-3-yl)benzensulfonamid	10,5 + 435,2

Vysvětlivka: MW – molecular weight, molekulová hmotnost; DMSO – dimethylsulfoxid.

Tabulka 17: Přehled testovaných látek dalších struktur.

Kód látky + MW	Chemický vzorec	Název struktury	Navážka (mg) + DMSO (ml)
4-Cl-Ph + 128,56		4-chlorfenol	14,4 + 2240,2
SAL-4I + 373,57		5-chlor-2-hydroxy- <i>N</i> -(4- jodfenyl)benzamid	16,1 + 862,0
TZA-1 + 300,78		<i>N</i> -(4-chlorfenyl)-2-(4-oxo-2- thioxothiazolidin-3-yl)acetamid	11,1 + 738,1
TZE-1 + 301,77		4-chlorfenyl 2-(4-oxo-2- thioxothiazolidin-3-yl)acetát, ev. 4-chlorfenyl ester kyseliny 2-(4-oxo-2- thioxothiazolidin-3-yl)octové	12,6 + 835,1
TZK-1 + 295,33		2-[5-(2-hydroxybenzyliden)-4- oxo-2-thioxothiazolidin-3- yl]octová kyselina	16,1 + 1090,3
IRGASAN(= triclosan) + 289,54		5-chlor-2-(2,4- dichlorfenoxy)fenol	17,2 + 1188,1

Vysvětlivka: MW – molecular weight, molekulová hmotnost; DMSO – dimethylsulfoxid.

3.7. Výsledky

Výsledky pro jednotlivé skupiny testovaných látek jsou uvedeny v následujících tabulkách, kde odečtené hodnoty MIC jsou zvýrazněny tučně červenou barvou a následně je vše zhodnoceno slovně. Znak ">" znamená, že případná účinná inhibiční koncentrace testované látky přesahuje příslušnou hodnotu koncentrace testované látky. Tedy, v případě že látka byla dobře rozpustitelná (vice viz.kapitola 3.5.2. Příprava dvojkové ředící řady testované látky), nejvyšší koncentrace testované látky činila 500 $\mu\text{mol/l}$ a ani při této nejvyšší koncentraci nebyla zaznamenána dostatečná inhibice růstu testovacího mikroorganismu, pak výsledek v tabulce je zaznamenán způsobem >500.

Tabulka 18: Stanovené hodnoty minimálních inhibičních koncentrací salicylanilidových karbamátů (1.část).

KMEN (kód)	DOBA INKUBACE	TESTOVANÁ LÁTKA (kód) –MIC/IC ₉₅ ($\mu\text{mol/l}$)				
		SC-1A	SC-1B	SC-1C	SC-1D	SC-2A
SA	24h	250	500	250	125	1,95
	48h	250	500	250	125	7,81
MRSA	24h	500	500	500	125	3,9
	48h	500	500	500	125	15,62
SE	24h	500	500	500	125	0,98
	48h	500	500	500	125	0,98
EF	24h	500	>500	>500	>500	>125
	48h	500	>500	>500	>500	>125
EC	24h	>500	>500	>500	>500	>125
	48h	>500	>500	>500	>500	>125
KP	24h	>500	>500	>500	>500	>125
	48h	>500	>500	>500	>500	>125
KP-ESBL	24h	>500	>500	>500	>500	>125
	48h	>500	>500	>500	>500	>125
PA	24h	>500	>500	>500	>500	>125
	48h	>500	>500	>500	>500	>125

Vysvětlivka: SA – *Staphylococcus aureus*, sbírkový kmen: CCM 4516/08, MRSA – methicilin rezistentní *Staphylococcus aureus*, sbírkový kmen: H 5996/08, SE – *Staphylococcus epidermidis*, sbírkový kmen: H 6966/08, EF – *Enterococcus* sp., sbírkový kmen: J 14365/08, EC – *Escherichia coli*, sbírkový kmen: CCM 4517, KP – *Klebsiella pneumoniae*, sbírkový kmen: D 11750/08, KP ESBL – *Klebsiella pneumoniae* ESBL pozitivní, sbírkový kmen: J 14368/08, PA – *Pseudomonas aeruginosa*, sbírkový kmen CCM 1961, MIC (minimal inhibitory concentration, minimální inhibiční koncentrace), IC (inhibitory concentration, inhibiční koncentrace).

Ze skupiny salicylanilidových karbamátů vykazovaly antibakteriální aktivitu v testovaném koncentračním rozmezí všechny látky, ale pouze k určitému bakteriálnímu agens. Bylo zjištěno, že všechny látky vykazují antibakteriální aktivitu ke kmenu SA, MRSA a dále ve velkém počtu působily také na SE a EF. Poměrně rezistentní se zdály být kmeny bakterií EC, KP, KP-ESBL a PA, kdy pouze 8 látek ze skupiny salicylanilidových karbamátů vykazovalo aktivitu k těmto kmenům.

Velice dobrých výsledků dosáhla látka SC-2A, u níž byla odečtena hodnota MIC po 24 hodinách na SA 1,95 $\mu\text{mol/l}$ a po 48 hodinách inkubace 7,81 $\mu\text{mol/l}$. Tato látka byla také velmi účinná na kmen MRSA, kde stanovená hodnota MIC činila po 24 hodinách 3,9 $\mu\text{mol/l}$ a po 48 hodinách inkubace byla odečtena hodnota MIC rovna 15,62 $\mu\text{mol/l}$. U modelového kmene SE byly po testování aktivity této látky odečteny hodnoty MIC po 24 i 48 hodinách inkubace 0,98 $\mu\text{mol/l}$.

Tabulka 19: Stanovené hodnoty minimálních inhibičních koncentrací salicylanilidových karbamátů (2.část).

KMEN (kód)	DOBA INKUBACE	TESTOVANÁ LÁTKA (kód) –MIC/IC ₉₅ ($\mu\text{mol/l}$)				
		SC-2B	SC-2C	SC-2D	SC-2E	SC-3A
SA	24h	31,25	3,9	3,9	3,9	0,49
	48h	31,25	15,62	15,62	15,62	0,98
MRSA	24h	31,25	7,81	3,9	3,9	0,49
	48h	31,25	31,25	15,62	31,25	1,95
SE	24h	31,25	3,9	3,9	3,9	0,49
	48h	31,25	3,9	15,62	3,9	0,98
EF	24h	500	>125	500	250	500
	48h	500	>125	500	250	500
EC	24h	500	>125	125	>250	>500
	48h	500	>125	500	>250	>500
KP	24h	500	125	500	>250	>500
	48h	500	125	500	>250	>500
KP-ESBL	24h	62,5	62,5	31,25	62,5	>500
	48h	62,5	125	31,25	62,5	>500
PA	24h	>500	>125	>500	>250	>500
	48h	>500	>125	>500	>250	>500

Vysvětlivka: SA – *Staphylococcus aureus*, sbírkový kmen: CCM 4516/08, MRSA – methicilin rezistentní *Staphylococcus aureus*, sbírkový kmen: H 5996/08, SE – *Staphylococcus epidermidis*, sbírkový kmen: H

6966/08, EF – *Enterococcus* sp., sbírkový kmen: J 14365/08, EC – *Escherichia coli*, sbírkový kmen: CCM 4517, KP – *Klebsiella pneumoniae*, sbírkový kmen: D 11750/08, KP ESBL – *Klebsiella pneumoniae* ESBL pozitivní, sbírkový kmen: J 14368/08, PA – *Pseudomonas aeruginosa*, sbírkový kmen CCM 1961, MIC (minimal inhibitory concentration, minimální inhibiční koncentrace), IC (inhibitory concentration, inhibiční koncentrace).

Nejširší spektrum účinku měly látky s pracovním označením SC-2B a SC-2D, které vykazovaly antibakteriální aktivitu u všech testovacích kmenů kromě PA. Látka s pracovním označením SC-3A byla účinná na SA, po 24 hodinách inkubace byla odečtena hodnota MIC 0,49 $\mu\text{mol/l}$ a po 48 hodinách 0,98 $\mu\text{mol/l}$, tato látka také působila na kmen MRSA a SE s odečtenými hodnotami MIC 0,49 $\mu\text{mol/l}$ po 24 hodinách a 1,95 $\mu\text{mol/l}$ po 48 hodinách inkubace u kmene MRSA a 0,98 $\mu\text{mol/l}$ u kmene SE.

Tabulka 20: Stanovené hodnoty minimálních inhibičních koncentrací salicylanilidových karbamátů (3.část).

KMEN (kód)	DOBA INKUBACE	TESTOVANÁ LÁTKA (kód) –MIC/IC ₉₅ ($\mu\text{mol/l}$)				
		SC-3B	SC-3C	SC-3D	SC-3E	SC-4A
SA	24h	0,49	0,49	0,49	0,98	15,62
	48h	0,98	0,98	1,95	1,95	15,62
MRSA	24h	0,49	0,49	0,98	1,95	31,25
	48h	0,98	1,95	1,95	3,9	31,25
SE	24h	0,49	0,49	0,49	0,98	7,81
	48h	0,98	0,98	0,98	1,95	7,81
EF	24h	500	>500	>500	>250	>125
	48h	500	>500	>500	>250	>125
EC	24h	>500	>500	>500	>250	>125
	48h	>500	>500	>500	>250	>125
KP	24h	>500	>500	>500	>250	>125
	48h	>500	>500	>500	>250	>125
KP-ESBL	24h	>500	>500	>500	31,25	62,5
	48h	>500	>500	>500	125	62,5
PA	24h	>500	>500	>500	>250	>125
	48h	>500	>500	>500	>250	>125

Vysvětlivka: SA – *Staphylococcus aureus*, sbírkový kmen: CCM 4516/08, MRSA – methicilin rezistentní *Staphylococcus aureus*, sbírkový kmen: H 5996/08, SE – *Staphylococcus epidermidis*, sbírkový kmen: H 6966/08, EF – *Enterococcus* sp., sbírkový kmen: J 14365/08, EC – *Escherichia coli*, sbírkový kmen: CCM 4517,

KP – *Klebsiella pneumoniae*, sbírkový kmen: D 11750/08, KP ESBL – *Klebsiella pneumoniae* ESBL pozitivní, sbírkový kmen: J 14368/08, PA – *Pseudomonas aeruginosa*, sbírkový kmen CCM 1961, MIC (minimal inhibitory concentration, minimální inhibiční koncentrace), IC (inhibitory concentration, inhibiční koncentrace).

Látky s pracovním označením SC-3B, SC-3C, SC-3D vykazovaly také slibnou aktivitu, po 24 hodinové inkubaci byla odečtena hodnota MIC 0,49 $\mu\text{mol/l}$ pro testovací kmen SA. Látka SC-3E a látka SC-4A působily inhibičně také na velmi rezistentní kmen KP-ESBL a to jak po 24, tak po 48 hodinové inkubační době.

Tabulka 21: Stanovené hodnoty minimálních inhibičních koncentrací salicylanilidových karbamátů (4.část).

KMEN (kód)	DOBA INKUBACE	TESTOVANÁ LÁTKA (kód) –MIC/IC ₉₅ ($\mu\text{mol/l}$)				
		SC-4B	SC-4C	SC-4D	SC-4E	SC-5A
SA	24h	7,81	15,62	7,81	15,62	3,9
	48h	7,81	15,62	15,62	15,62	7,81
MRSA	24h	7,81	15,62	15,62	62,5	3,9
	48h	7,81	31,25	62,5	62,5	7,81
SE	24h	7,81	15,62	15,62	250	3,9
	48h	7,81	15,62	15,62	250	7,81
EF	24h	250	>500	>500	125	62,5
	48h	250	>500	>500	125	500
EC	24h	>500	>500	>500	>500	>500
	48h	>500	>500	>500	>500	>500
KP	24h	250	>500	>500	>500	>500
	48h	250	>500	>500	>500	>500
KP-ESBL	24h	250	>500	>500	>500	>500
	48h	250	>500	>500	>500	>500
PA	24h	>500	>500	>500	>500	>500
	48h	>500	>500	>500	>500	>500

Vysvětlivka: SA – *Staphylococcus aureus*, sbírkový kmen: CCM 4516/08, MRSA – methicilin rezistentní *Staphylococcus aureus*, sbírkový kmen: H 5996/08, SE – *Staphylococcus epidermidis*, sbírkový kmen: H 6966/08, EF – *Enterococcus* sp., sbírkový kmen: J 14365/08, EC – *Escherichia coli*, sbírkový kmen: CCM 4517, KP – *Klebsiella pneumoniae*, sbírkový kmen: D 11750/08, KP ESBL – *Klebsiella pneumoniae* ESBL pozitivní, sbírkový kmen: J 14368/08, PA – *Pseudomonas aeruginosa*, sbírkový kmen CCM 1961, MIC (minimal inhibitory concentration, minimální inhibiční koncentrace), IC (inhibitory concentration, inhibiční koncentrace).

Látka s pracovním označením SC-4B vykazovala hodnoty MIC získané po 24 i 48 hodinách u bakteriálních kmenů SA, MRSA a SE 7,81 $\mu\text{mol/l}$. Velmi pozoruhodných výsledků dosáhla látka s označením SC-5A, kde byla odečtená hodnota MIC po 24 hodinách inkubace u kmenů SA, MRSA, SE 3,9 $\mu\text{mol/l}$ a po 48 hodinách 7,81 $\mu\text{mol/l}$.

Tabulka 22: Stanovené hodnoty minimálních inhibičních koncentrací salicylanilidových karbamátů (5.část).

KMEN (kód)	DOBA INKUBACE	TESTOVANÁ LÁTKA (kód) –MIC/IC ₉₅ ($\mu\text{mol/l}$)				
		SC-5B	SC-5C	SC-5D	SC-6A	SC-6C
SA	24h	0,98	1,95	1,98	3,9	0,98
	48h	3,9	1,95	1,98	3,9	1,95
MRSA	24h	0,98	1,95	1,98	3,9	1,95
	48h	7,81	3,9	1,98	3,9	1,95
SE	24h	31,25	125	>500	250	250
	48h	250	>125	>500	250	250
EF	24h	250	>125	>500	250	250
	48h	>500	>125	>500	250	500
EC	24h	>500	>125	>500	500	>500
	48h	>500	>125	>500	500	>500
KP	24h	>500	>125	>500	>500	>500
	48h	>500	>125	>500	>500	>500
KP-ESBL	24h	>500	>125	>500	>500	>500
	48h	>500	>125	>500	>500	>500
PA	24h	>500	>125	>500	>500	>500
	48h	>500	>125	>500	>500	>500

Vysvětlivka: SA – *Staphylococcus aureus*, sbírkový kmen: CCM 4516/08, MRSA – methicilin rezistentní *Staphylococcus aureus*, sbírkový kmen: H 5996/08, SE – *Staphylococcus epidermidis*, sbírkový kmen: H 6966/08, EF – *Enterococcus* sp., sbírkový kmen: J 14365/08, EC – *Escherichia coli*, sbírkový kmen: CCM 4517, KP – *Klebsiella pneumoniae*, sbírkový kmen: D 11750/08, KP ESBL – *Klebsiella pneumoniae* ESBL pozitivní, sbírkový kmen: J 14368/08, PA – *Pseudomonas aeruginosa*, sbírkový kmen CCM 1961, MIC (minimal inhibitory concentration, minimální inhibiční koncentrace), IC (inhibitory concentration, inhibiční koncentrace).

Testovaná látka SC-5B vykazovala účinek ke 4 testovacím kmenům (SA, MRSA, SE, EF). Po 24 hodinách inkubace byla odečtena hodnota MIC u kmene SA a MRSA 0,98 $\mu\text{mol/l}$, u kmene SE 31,25 $\mu\text{mol/l}$ a u kmene EF byla odečtena hodnota MIC 250 $\mu\text{mol/l}$. Široké antibakteriální spektrum lze vidět také u látky SC-6A, která byla účinná na bakterie kmene

SA, MRSA, SE, EF a EC. Látka s pracovním označením SC-6C působila inhibičně na testovací kmen SA s hodnotami MIC po 24 hodinách inkubace 0,98 $\mu\text{mol/l}$ a po 48 hodinách 1,95 $\mu\text{mol/l}$. Hodnoty 1,95 $\mu\text{mol/l}$ dosáhla tato látka také u kmene MRSA a SE po 24 hodinách inkubace.

Tabulka 23: Stanovené hodnoty minimálních inhibičních koncentrací salicylanilidových karbamátů (6.část).

KMEN (kód)	DOBA INKUBACE	TESTOVANÁ LÁTKA (kód) –MIC/IC ₉₅ ($\mu\text{mol/l}$)		
		SC-7A	PB-3	PB-4
SA	24h	0,98	15,62	3,9
	48h	3,9	125	3,9
MRSA	24h	3,9	31,25	3,9
	48h	3,9	125	3,9
SE	24h	250	500	>500
	48h	250	>500	>500
EF	24h	125	>500	>500
	48h	125	>500	>500
EC	24h	>500	>500	>500
	48h	>500	>500	>500
KP	24h	>500	>500	>500
	48h	>500	>500	>500
KP-ESBL	24h	>500	>500	>500
	48h	>500	>500	>500
PA	24h	>500	>500	>500
	48h	>500	>500	>500

Vysvětlivka: SA – *Staphylococcus aureus*, sbírkový kmen: CCM 4516/08, MRSA – methicilin rezistentní *Staphylococcus aureus*, sbírkový kmen: H 5996/08, SE – *Staphylococcus epidermidis*, sbírkový kmen: H 6966/08, EF – *Enterococcus* sp., sbírkový kmen: J 14365/08, EC – *Escherichia coli*, sbírkový kmen: CCM 4517, KP – *Klebsiella pneumoniae*, sbírkový kmen: D 11750/08, KP ESBL – *Klebsiella pneumoniae* ESBL pozitivní, sbírkový kmen: J 14368/08, PA – *Pseudomonas aeruginosa*, sbírkový kmen CCM 1961, MIC (minimal inhibitory concentration, minimální inhibiční koncentrace), IC (inhibitory concentration, inhibiční koncentrace).

Látka SC-7A vykazovala inhibiční účinek po 24 hodinách inkubace u kmene SA odpovídající hodnotě MIC 0,98 $\mu\text{mol/l}$ a po 48 hodinách odpovídající hodnotě MIC 3,9 $\mu\text{mol/l}$, stejné hodnoty MIC 3,9 $\mu\text{mol/l}$ dosáhla tato látka i u kmene MRSA jak po 24

hodinové, tak po 48 hodinové inkubační době. Hodnotu MIC 3,9 $\mu\text{mol/l}$ vykazovala také látka PB-4 u kmene SA a MRSA po 24 i 48 hodinové inkubační době.

Ze získaných výsledků lze usoudit, že nově syntetizované látky této skupiny působí inhibičně zejména na kmen SA. Všechny látky vykazovaly vyšší účinnost již po 24 hodinové inkubaci než při odečítání výsledků po 48 hodinách. Je to způsobeno pravděpodobně tím, že látky působí inhibičně na růst testovacích kmenů, nikoliv baktericidně.

Tabulka 24: Stanovené hodnoty minimálních inhibičních koncentrací sulfonamidových močovinných derivátů sulfamethoxazolu (1.část).

KMEN (kód)	DOBA INKUBACE	TESTOVANÁ LÁTKA (kód) –MIC/IC ₉₅ ($\mu\text{mol/l}$)				
		SMXU-1	SMXU-2	SMXU-3	SMXU-4	SMXU-5
SA	24h	>500	>500	>500	>500	>125
	48h	>500	>500	>500	>500	>125
MRSA	24h	>500	>500	>500	>500	>125
	48h	>500	>500	>500	>500	>125
SE	24h	>500	>500	>500	>500	>125
	48h	>500	>500	>500	>500	>125
EF	24h	>500	>500	>500	>500	>125
	48h	>500	>500	>500	>500	>125
EC	24h	>500	>500	>500	>500	>125
	48h	>500	>500	>500	>500	>125
KP	24h	>500	>500	>500	>500	>125
	48h	>500	>500	>500	>500	>125
KP-ESBL	24h	>500	>500	>500	>500	>125
	48h	>500	>500	>500	>500	>125
PA	24h	>500	>500	>500	>500	>125
	48h	>500	>500	>500	>500	>125

Vysvětlivka: SA – *Staphylococcus aureus*, sbírkový kmen: CCM 4516/08, MRSA – methicilin rezistentní *Staphylococcus aureus*, sbírkový kmen: H 5996/08, SE – *Staphylococcus epidermidis*, sbírkový kmen: H 6966/08, EF – *Enterococcus* sp., sbírkový kmen: J 14365/08, EC – *Escherichia coli*, sbírkový kmen: CCM 4517, KP – *Klebsiella pneumoniae*, sbírkový kmen: D 11750/08, KP ESBL – *Klebsiella pneumoniae* ESBL pozitivní, sbírkový kmen: J 14368/08, PA – *Pseudomonas aeruginosa*, sbírkový kmen CCM 1961, MIC (minimal inhibitory concentration, minimální inhibiční koncentrace), IC (inhibitory concentration, inhibiční koncentrace).

Ve druhé skupině látek bylo testováno celkem 23 látek. Látky s pracovním označením SMXU-1, SMXU-2, SMXU-3, SMXU-4, SMXU-5 nevykazovaly antibakteriální účinnost v testovaném koncentračním rozsahu na žádný z testovacích bakteriálních kmenů.

Tabulka 25: Stanovené hodnoty minimálních inhibičních koncentrací sulfonamidových močovinných derivátů sulfamethoxazolu (2.část).

KMEN (kód)	DOBA INKUBACE	TESTOVANÁ LÁTKA (kód) –MIC/IC ₉₅ (μmol/l)			
		SMXU-6	SMXU-7	SMXU-8	SMXU-9
SA	24h	>500	125	125	250
	48h	>500	250	500	500
MRSA	24h	>500	250	125	500
	48h	>500	250	250	>500
SE	24h	>500	125	>500	>500
	48h	>500	250	>500	>500
EF	24h	>500	500	>500	>500
	48h	>500	>500	>500	>500
EC	24h	500	>500	>500	>500
	48h	>500	>500	>500	>500
KP	24h	>500	>500	>500	>500
	48h	>500	>500	>500	>500
KP-ESBL	24h	>500	>500	>500	>500
	48h	>500	>500	>500	>500
PA	24h	>500	>500	>500	>500
	48h	>500	>500	>500	>500

Vysvětlivka: SA – *Staphylococcus aureus*, sbírkový kmen: CCM 4516/08, MRSA – methicilin rezistentní *Staphylococcus aureus*, sbírkový kmen: H 5996/08, SE – *Staphylococcus epidermidis*, sbírkový kmen: H 6966/08, EF – *Enterococcus* sp., sbírkový kmen: J 14365/08, EC – *Escherichia coli*, sbírkový kmen: CCM 4517, KP – *Klebsiella pneumoniae*, sbírkový kmen: D 11750/08, KP ESBL – *Klebsiella pneumoniae* ESBL pozitivní, sbírkový kmen: J 14368/08, PA – *Pseudomonas aeruginosa*, sbírkový kmen CCM 1961, MIC (minimal inhibitory concentration, minimální inhibiční koncentrace), IC (inhibitory concentration, inhibiční koncentrace).

Proti širokému spektru bakterií působila látka SMXU-7, která vykazovala účinek na SA, MRSA, SE a EF. Hodnoty MIC se pohybovaly v rozmezí 500 μmol/l až 125 μmol/l. Opět dle přiložených tabulek můžeme vidět, že po 24 hodinové inkubaci byla antibakteriální účinnost vyšší než po 48 hodinách odečítání.

Tabulka 26: Stanovené hodnoty minimálních inhibičních koncentrací sulfonamidových močovinných derivátů sulfamethoxazolu (3.část).

KMEN (kód)	DOBA INKUBACE	TESTOVANÁ LÁTKA (kód) –MIC/IC ₉₅ (μmol/l)				
		SMX-AU-2	SMX-AU-4	SMX-AU-5	SMX-AU-6	SMX-AU-8
SA	24h	>500	>500	>500	>500	>500
	48h	>500	>500	>500	>500	>500
MRSA	24h	>500	>500	>500	>500	>500
	48h	>500	>500	>500	>500	>500
SE	24h	>500	>500	>500	>500	>500
	48h	>500	>500	>500	>500	>500
EF	24h	>500	>500	>500	>500	>500
	48h	>500	>500	>500	>500	>500
EC	24h	>500	>500	>500	>500	>500
	48h	>500	>500	>500	>500	>500
KP	24h	>500	>500	>500	>500	>500
	48h	>500	>500	>500	>500	>500
KP-ESBL	24h	>500	>500	>500	>500	>500
	48h	>500	>500	>500	>500	>500
PA	24h	>500	>500	>500	>500	>500
	48h	>500	>500	>500	>500	>500

Vysvětlivka: SA – *Staphylococcus aureus*, sbírkový kmen: CCM 4516/08, MRSA – methicilin rezistentní *Staphylococcus aureus*, sbírkový kmen: H 5996/08, SE – *Staphylococcus epidermidis*, sbírkový kmen: H 6966/08, EF – *Enterococcus* sp., sbírkový kmen: J 14365/08, EC – *Escherichia coli*, sbírkový kmen: CCM 4517, KP – *Klebsiella pneumoniae*, sbírkový kmen: D 11750/08, KP ESBL – *Klebsiella pneumoniae* ESBL pozitivní, sbírkový kmen: J 14368/08, PA – *Pseudomonas aeruginosa*, sbírkový kmen CCM 1961, MIC (minimal inhibitory concentration, minimální inhibiční koncentrace), IC (inhibitory concentration, inhibiční koncentrace).

U testovaných látek s pracovním označením SMX-AU-2, SMX-AU-4, SMX-AU-5, SMX-AU-6, SMX-AU-8 nevykazovala v testovaném koncentračním rozmezí žádná antibakteriální účinnost.

Tabulka 27: Stanovené hodnoty minimálních inhibičních koncentrací sulfonamidových močovinných derivátů sulfamethoxazolu (4.část).

KMEN (kód)	DOBA INKUBACE	TESTOVANÁ LÁTKA (kód) –MIC/IC ₉₅ (μmol/l)				
		SMX-AU-9	SMX-AU-10	SMX-AU-12	SMX-13	SMX-10
SA	24h	>500	>500	>500	500	62,5
	48h	>500	>500	>500	>500	250
MRSA	24h	>500	>500	>500	500	125
	48h	>500	>500	>500	>500	500
SE	24h	>500	>500	>500	500	250
	48h	>500	>500	>500	>500	500
EF	24h	>500	>500	>500	>500	250
	48h	>500	>500	>500	>500	500
EC	24h	>500	>500	>500	500	500
	48h	>500	>500	>500	>500	>500
KP	24h	>500	>500	>500	500	>500
	48h	>500	>500	>500	>500	>500
KP-ESBL	24h	>500	>500	>500	>500	>500
	48h	>500	>500	>500	>500	>500
PA	24h	>500	>500	>500	>500	>500
	48h	>500	>500	>500	>500	>500

Vysvětlivka: SA – *Staphylococcus aureus*, sbírkový kmen: CCM 4516/08, MRSA – methicilin rezistentní *Staphylococcus aureus*, sbírkový kmen: H 5996/08, SE – *Staphylococcus epidermidis*, sbírkový kmen: H 6966/08, EF – *Enterococcus* sp., sbírkový kmen: J 14365/08, EC – *Escherichia coli*, sbírkový kmen: CCM 4517, KP – *Klebsiella pneumoniae*, sbírkový kmen: D 11750/08, KP ESBL – *Klebsiella pneumoniae* ESBL pozitivní, sbírkový kmen: J 14368/08, PA – *Pseudomonas aeruginosa*, sbírkový kmen CCM 1961, MIC (minimal inhibitory concentration, minimální inhibiční koncentrace), IC (inhibitory concentration, inhibiční koncentrace).

Testovaná látka SMX-10 vykazovala účinnost proti bakteriálním kmenům SA, MRSA, SE, EF a EC. Hodnota MIC u kmene SA po 24 hodinách inkubace byla 62,5 μmol/l a po 48 hodinách 250 μmol/l. U kmene MRSA 125 μmol/l po 24 hodinách a po 48 hodinách inkubační doby byla odečtena hodnota 500 μmol/l.

Tabulka 28: Stanovené hodnoty minimálních inhibičních koncentrací sulfonamidových močovinných derivátů sulfamethoxazolu (5.část).

KMEN (kód)	DOBA INKUBACE	TESTOVANÁ LÁTKA (kód) –MIC/IC ₉₅ (μmol/l)			
		SMX-12	SMX-15	SMX-16	SMX-Me- Ph-U
SA	24h	125	125	>500	500
	48h	500	250	>500	500
MRSA	24h	250	125	>500	500
	48h	>500	250	>500	>500
SE	24h	250	500	>500	>500
	48h	500	>500	>500	>500
EF	24h	125	500	>500	>500
	48h	500	>500	>500	>500
EC	24h	>500	500	>500	>500
	48h	>500	500	>500	>500
KP	24h	>500	>500	>500	>500
	48h	>500	>500	>500	>500
KP-ESBL	24h	>500	>500	>500	>500
	48h	>500	>500	>500	>500
PA	24h	>500	>500	>500	>500
	48h	>500	>500	>500	>500

Vysvětlivka: SA – *Staphylococcus aureus*, sbírkový kmen: CCM 4516/08, MRSA – methicilin rezistentní *Staphylococcus aureus*, sbírkový kmen: H 5996/08, SE – *Staphylococcus epidermidis*, sbírkový kmen: H 6966/08, EF – *Enterococcus* sp., sbírkový kmen: J 14365/08, EC – *Escherichia coli*, sbírkový kmen: CCM 4517, KP – *Klebsiella pneumoniae*, sbírkový kmen: D 11750/08, KP ESBL – *Klebsiella pneumoniae* ESBL pozitivní, sbírkový kmen: J 14368/08, PA – *Pseudomonas aeruginosa*, sbírkový kmen CCM 1961, MIC (minimal inhibitory concentration, minimální inhibiční koncentrace), IC (inhibitory concentration, inhibiční koncentrace).

Dále, v testovaném koncentračním rozmezí, vykazovala inhibiční účinnost látka SMX-12 po 24 i 48 hodinách inkubace, stejně tak látka SMX-15 a látka SMX-Me-Ph-U.

Tabulka 29: Stanovené hodnoty minimálních inhibičních koncentrací derivátů isoniazidu (1.část).

KMEN (kód)	DOBA INKUBACE	TESTOVANÁ LÁTKA (kód) –MIC/IC ₉₅ (μmol/l)			
		INH-1	INH-2	INH-3	INH-4
SA	24h	>500	>500	500	>500
	48h	>500	>500	>500	>500
MRSA	24h	>500	>500	>500	>500
	48h	>500	>500	>500	>500
SE	24h	>500	>500	500	500
	48h	>500	>500	>500	>500
EF	24h	>500	>500	500	500
	48h	>500	>500	>500	>500
EC	24h	>500	>500	500	500
	48h	>500	>500	>500	>500
KP	24h	>500	>500	>500	500
	48h	>500	>500	>500	>500
KP-ESBL	24h	>500	>500	>500	>500
	48h	>500	>500	>500	>500
PA	24h	>500	>500	>500	>500
	48h	>500	>500	>500	>500

Vysvětlivka: SA – *Staphylococcus aureus*, sbírkový kmen: CCM 4516/08, MRSA – methicilin rezistentní *Staphylococcus aureus*, sbírkový kmen: H 5996/08, SE – *Staphylococcus epidermidis*, sbírkový kmen: H 6966/08, EF – *Enterococcus* sp., sbírkový kmen: J 14365/08, EC – *Escherichia coli*, sbírkový kmen: CCM 4517, KP – *Klebsiella pneumoniae*, sbírkový kmen: D 11750/08, KP ESBL – *Klebsiella pneumoniae* ESBL pozitivní, sbírkový kmen: J 14368/08, PA – *Pseudomonas aeruginosa*, sbírkový kmen CCM 1961, MIC (minimal inhibitory concentration, minimální inhibiční koncentrace), IC (inhibitory concentration, inhibiční koncentrace).

Třetí skupinu látek tvoří deriváty isoniazidu, kde bylo testováno celkem 7 látek. Minimální antibakteriální aktivitu vykazovaly 3 látky ze 7 testovaných. Slabá *in vitro* aktivita se projevila u látky INH-3, která vykazovala po 24 hodinové inkubaci MIC=500 μmol/l u modelového kmene SA, SE, EF a EC. U látky INH-4 byla zjištěna po 24 hodinách inkubace MIC 500 μmol/l u modelových kmenů SE, EF, KC, KP.

Tabulka 30: Stanovené hodnoty minimálních inhibičních koncentrací derivátů isoniazidu (2.část).

KMEN (kód)	DOBA INKUBACE	TESTOVANÁ LÁTKA (kód) –MIC/IC ₉₅ (μmol/l)		
		INH-5	INH-6	INH-7
SA	24h	>250	>500	>500
	48h	>250	>500	>500
MRSA	24h	>250	>500	>500
	48h	>250	>500	>500
SE	24h	>250	>500	>500
	48h	>250	>500	>500
EF	24h	>250	>500	500
	48h	>250	>500	>500
EC	24h	>250	>500	>500
	48h	>250	>500	>500
KP	24h	>250	>500	>500
	48h	>250	>500	>500
KP-ESBL	24h	>250	>500	>500
	48h	>250	>500	>500
PA	24h	>250	>500	>500
	48h	>250	>500	>500

Vysvětlivka: SA – *Staphylococcus aureus*, sbírkový kmen: CCM 4516/08, MRSA – methicilin rezistentní *Staphylococcus aureus*, sbírkový kmen: H 5996/08, SE – *Staphylococcus epidermidis*, sbírkový kmen: H 6966/08, EF – *Enterococcus* sp., sbírkový kmen: J 14365/08, EC – *Escherichia coli*, sbírkový kmen: CCM 4517, KP – *Klebsiella pneumoniae*, sbírkový kmen: D 11750/08, KP ESBL – *Klebsiella pneumoniae* ESBL pozitivní, sbírkový kmen: J 14368/08, PA – *Pseudomonas aeruginosa*, sbírkový kmen CCM 1961, MIC (minimal inhibitory concentration, minimální inhibiční koncentrace), IC (inhibitory concentration, inhibiční koncentrace).

Z látek uvedených v rámci tabulky stanovovaných hodnot minimálních inhibičních koncentrací derivátů isoniazidu (2.část) vykazovala inhibiční účinek v testovaném rozsahu koncentrací pouze látka INH-7, a to pouze v případě testovacího kmene EF, kde hodnota MIC odečtená po 24 hodinové inkubaci činila 500 μmol/l.

Tabulka 31: Stanovené hodnoty minimálních inhibičních koncentrací sulfonamidových imidazolidintronů- deriváty sulfamethoxazolu (1.část).

KMEN (kód)	DOBA INKUBACE	TESTOVANÁ LÁTKA (kód) –MIC/IC ₉₅ (μmol/l)				
		SMX-C-1	SMX-C-2	SMX-C-3	SMX-C-4	SMX-C-5
SA	24h	500	>500	>500	500	500
	48h	500	>500	>500	>500	500
MRSA	24h	>500	>500	>500	500	500
	48h	>500	>500	>500	>500	500
SE	24h	>500	>500	>500	500	500
	48h	>500	>500	>500	>500	>500
EF	24h	>500	>500	>500	500	500
	48h	>500	>500	>500	>500	>500
EC	24h	>500	>500	>500	>500	>500
	48h	>500	>500	>500	>500	>500
KP	24h	>500	>500	>500	>500	>500
	48h	>500	>500	>500	>500	>500
KP-ESBL	24h	>500	>500	>500	>500	>500
	48h	>500	>500	>500	>500	>500
PA	24h	>500	>500	>500	>500	>500
	48h	>500	>500	>500	>500	>500

Vysvětlivka: SA – *Staphylococcus aureus*, sbírkový kmen: CCM 4516/08, MRSA – methicilin rezistentní *Staphylococcus aureus*, sbírkový kmen: H 5996/08, SE – *Staphylococcus epidermidis*, sbírkový kmen: H 6966/08, EF – *Enterococcus* sp., sbírkový kmen: J 14365/08, EC – *Escherichia coli*, sbírkový kmen: CCM 4517, KP – *Klebsiella pneumoniae*, sbírkový kmen: D 11750/08, KP ESBL – *Klebsiella pneumoniae* ESBL pozitivní, sbírkový kmen: J 14368/08, PA – *Pseudomonas aeruginosa*, sbírkový kmen CCM 1961, MIC (minimal inhibitory concentration, minimální inhibiční koncentrace), IC (inhibitory concentration, inhibiční koncentrace).

Z další skupiny testovaných látek vykazovalo účinnost 6 látek. Na nejširší bakteriální spektrum působily látky SMX-C-5 a SMX-C-9, které vykazovaly účinnost k modelovým kmenům SA, MRSA, SE a EF. Hodnoty MIC u látky SMX-C-5 po 24 i 48 hodinové inkubaci byly 500 μmol/l.

Tabulka 32: Stanovené hodnoty minimálních inhibičních koncentrací sulfonamidových imidazolidintronů- deriváty sulfamethoxazolu (2.část).

KMEN (kód)	DOBA INKUBACE	TESTOVANÁ LÁTKA (kód) –MIC/IC ₉₅ (μmol/l)			
		SMX-C-6	SMX-C-7	SMX-C-8	SMX-C-9
SA	24h	500	>500	500	250
	48h	>500	>500	500	500
MRSA	24h	500	>500	500	250
	48h	>500	>500	500	500
SE	24h	>500	>500	>500	250
	48h	>500	>500	>500	500
EF	24h	500	>500	500	250
	48h	>500	>500	>500	>500
EC	24h	>500	>500	>500	>500
	48h	>500	>500	>500	>500
KP	24h	>500	>500	>500	>500
	48h	>500	>500	>500	>500
KP-ESBL	24h	>500	>500	>500	>500
	48h	>500	>500	>500	>500
PA	24h	>500	>500	>500	>500
	48h	>500	>500	>500	>500

Vysvětlivka: SA – *Staphylococcus aureus*, sbírkový kmen: CCM 4516/08, MRSA – methicilin rezistentní *Staphylococcus aureus*, sbírkový kmen: H 5996/08, SE – *Staphylococcus epidermidis*, sbírkový kmen: H 6966/08, EF – *Enterococcus* sp., sbírkový kmen: J 14365/08, EC – *Escherichia coli*, sbírkový kmen: CCM 4517, KP – *Klebsiella pneumoniae*, sbírkový kmen: D 11750/08, KP ESBL – *Klebsiella pneumoniae* ESBL pozitivní, sbírkový kmen: J 14368/08, PA – *Pseudomonas aeruginosa*, sbírkový kmen CCM 1961, MIC (minimal inhibitory concentration, minimální inhibiční koncentrace), IC (inhibitory concentration, inhibiční koncentrace).

U druhé ze zmiňovaných látek- SMX-C-9 byla odečtena hodnota MIC po 24 hodinové inkubaci u čtyřech bakteriálních kmenů 250 μmol/l.

Tabulka 33: Stanovené hodnoty minimálních inhibičních koncentrací dalších chemických struktur (1.část).

KMEN (kód)	DOBA INKUBACE	TESTOVANÁ LÁTKA (kód) –MIC/IC ₉₅ (μmol/l)		
		4-Cl-Ph	SAL-4I	TZA-1
SA	24h	>500	0,49	>500
	48h	>500	0,98	>500
MRSA	24h	>500	7,81	>500
	48h	>500	15,62	>500
SE	24h	>500	250	500
	48h	>500	250	>500
EF	24h	>500	250	500
	48h	>500	250	>500
EC	24h	>500	>500	>500
	48h	>500	>500	>500
KP	24h	>500	>500	>500
	48h	>500	>500	>500
KP-ESBL	24h	>500	>500	>500
	48h	>500	>500	>500
PA	24h	>500	>500	>500
	48h	>500	>500	>500

Vysvětlivka: SA – *Staphylococcus aureus*, sbírkový kmen: CCM 4516/08, MRSA – methicilin rezistentní *Staphylococcus aureus*, sbírkový kmen: H 5996/08, SE – *Staphylococcus epidermidis*, sbírkový kmen: H 6966/08, EF – *Enterococcus* sp., sbírkový kmen: J 14365/08, EC – *Escherichia coli*, sbírkový kmen: CCM 4517, KP – *Klebsiella pneumoniae*, sbírkový kmen: D 11750/08, KP ESBL – *Klebsiella pneumoniae* ESBL pozitivní, sbírkový kmen: J 14368/08, PA – *Pseudomonas aeruginosa*, sbírkový kmen CCM 1961, MIC (minimal inhibitory concentration, minimální inhibiční koncentrace), IC (inhibitory concentration, inhibiční koncentrace).

Z poslední skupiny testovaných látek se jeví jako potenciálně účinné 4 látky. Látka s pracovním označením TZA-1 působila pouze na SE a EF, kde odečtená hodnota MIC po 24 hodinové inkubaci činila 500 μmol/l. Látka s názvem SAL-4I byla účinná na všechny G⁺ kmeny testovacích bakterií. Odečtené hodnoty MIC po 24 i 48 hodinách inkubace se rovnaly hodnotě 250 μmol/l u modelových kmenů SE a EF. U kmene SA činila hodnota MIC po 24 hodinové inkubaci 0,49 μmol/l a po 48 hodinové inkubační době 0,98 μmol/l. Vysoce inhibičně se tato látka chovala k bakteriálnímu kmenu MRSA, kde odečtená hodnota MIC po 24 hodinové inkubaci byla 7,81 μmol/l a po 48 hodinové inkubaci 15,62 μmol/l.

Tabulka 34: Stanovené hodnoty minimálních inhibičních koncentrací dalších chemických struktur (2.část).

KMEN (kód)	DOBA INKUBACE	TESTOVANÁ LÁTKA (kód) –MIC/IC ₉₅ (μmol/l)		
		TZE-1	TZK-1	IRGASAN
SA	24h	>500	62,5	0,49
	48h	>500	62,5	0,49
MRSA	24h	>500	62,5	0,98
	48h	>500	62,5	0,98
SE	24h	>500	125	7,81
	48h	>500	125	15,62
EF	24h	>500	125	31,25
	48h	>500	125	62,5
EC	24h	>500	>500	15,62
	48h	>500	>500	62,5
KP	24h	>500	>500	1,98
	48h	>500	>500	1,98
KP-ESBL	24h	>500	>500	7,81
	48h	>500	>500	31,25
PA	24h	>500	>500	>500
	48h	>500	>500	>500

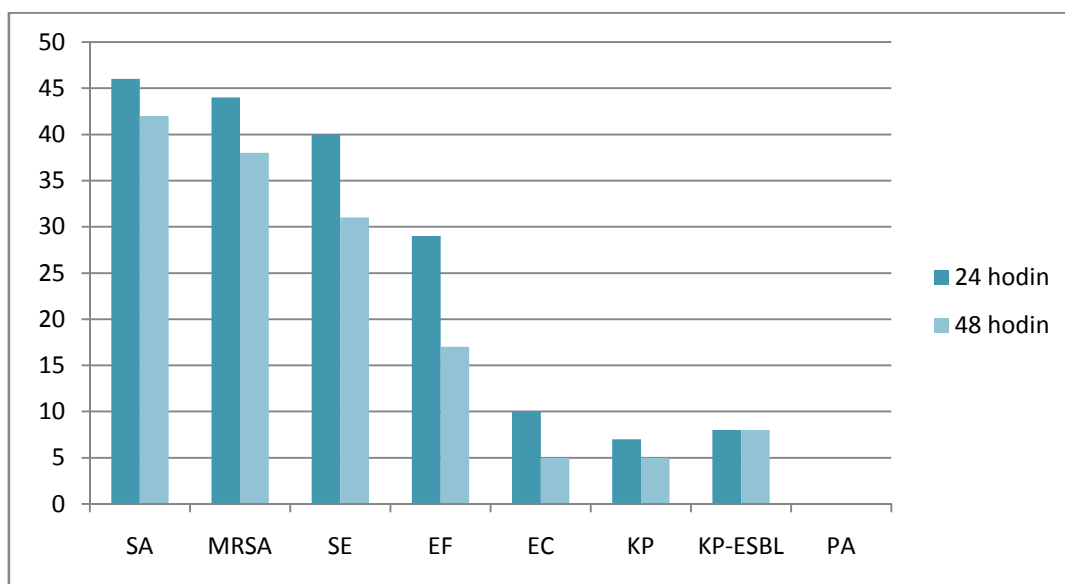
Vysvětlivka: SA – *Staphylococcus aureus*, sbírkový kmen: CCM 4516/08, MRSA – methicilin rezistentní *Staphylococcus aureus*, sbírkový kmen: H 5996/08, SE – *Staphylococcus epidermidis*, sbírkový kmen: H 6966/08, EF – *Enterococcus* sp., sbírkový kmen: J 14365/08, EC – *Escherichia coli*, sbírkový kmen: CCM 4517, KP – *Klebsiella pneumoniae*, sbírkový kmen: D 11750/08, KP ESBL – *Klebsiella pneumoniae* ESBL pozitivní, sbírkový kmen: J 14368/08, PA – *Pseudomonas aeruginosa*, sbírkový kmen CCM 1961, MIC (minimal inhibitory concentration, minimální inhibiční koncentrace), IC (inhibitory concentration, inhibiční koncentrace).

Látka s pracovním označením TZK-1 působila inhibičně na kmeny SA a MRSA s odečtenými hodnotami MIC jak po 24 hodinové, tak po 48 hodinové inkubaci 62,5 μmol/l. Tato látka vykazovala účinnost také k modelovým kmenům SE a EF s vizuálně odečtenými hodnotami MIC, které se rovnaly 125 μmol/l po 24 hodinové i 48 hodinové inkubaci.

Poslední testovaná látka byla námi označena IRGASAN, a právě tato látka působila inhibičně proti nejširšímu spektru testovacích modelových kmenů. Inhibiční účinek byl pozorován u všech kmenů kromě PA. Hodnoty MIC u SA byly po 24 i 48 hodinách 0,49 μmol/l, u MRSA po 24 i 48 hodinách 0,98 μmol/l, u SE po 24 hodinách 7,81 μmol/l a po 48 hodinách 15,62 μmol/l, u EF po 24 hodinách 31,25 μmol/l a po 48 hodinách 31,25 μmol/l.

Velice pozoruhodné bylo, že působila také na G^- kmeny testovacích bakterií, jelikož většina nově syntetizovaných látek tento účinek neměla. U kmene EC byly hodnoty MIC po 24 hodinové inkubaci 15,62 $\mu\text{mol/l}$ a po 48 hodinové inkubaci 62,5 $\mu\text{mol/l}$. U velice rezistentního kmene KP činily hodnoty MIC jak po 24, tak po 48 hodinové inkubaci 1,98 $\mu\text{mol/l}$ a u kmene KP-ESBL byla vizuálně odečtená hodnota MIC po 24 hodinách 7,81 $\mu\text{mol/l}$ a po 48 hodinách 31,25 $\mu\text{mol/l}$.

Graf 1: Jednotlivé bakteriální kmeny a počet účinných látek v rozsahu testovaných koncentrací daného testovacího systému z celkového počtu 73 testovaných látek.



Vysvětlivka: SA – *Staphylococcus aureus*, MRSA – methicilin rezistentní *Staphylococcus aureus*, SE – *Staphylococcus epidermidis*, EF – *Enterococcus* sp., EC – *Escherichia coli*, KP – *Klebsiella pneumoniae*, KP-ESBL – *Klebsiella pneumoniae* ESBL pozitivní, PA – *Pseudomonas aeruginosa*.

V přiloženém grafu můžeme vidět počet účinných látek na jednotlivé modelové kmeny bakterií. Z grafu je patrné, že k testovaným látkám v rozsahu testovaných koncentrací, tedy od 500 $\mu\text{mol/l}$, byl nejcitlivější bakteriální kmen SA, kdy po 24 hodinové inkubaci byla pozorována účinnost 46 látek a po 48 hodinové inkubační době byla zjištěna účinnost 42 testovaných látek. Nižší účinek vykazovaly látky ke kmenům G^- bakterií, kdy po 24 hodinové inkubaci byla zjištěna aktivita 10 látek a po 48 hodinách inkubace 5 látek k modelovému kmenu EC. U kmene KP byla pozorována účinnost u 7 látek po 24 hodinové inkubaci a 5 látek po 48 hodinách inkubační doby. U kmene KP-ESBL byl účinek pozorován u 8 testovaných látek jak po 24 hodinové, tak po 48 hodinové inkubaci. Bohužel žádná z nově syntetizovaných látek nebyla účinná na bakteriální kmen PA.

4. DISKUZE

Účinnost antibiotik je vážně ohrožena a alarmující vývoj lékové rezistence mezi lidskými patogeny, způsobený především nevhodným používáním či zneužíváním antibiotik, si žádá vývoj nových antimikrobiálně působících látek. Za poměrně krátké období od roku 2000 došlo ke vzestupu rezistence některých významných patogenů až o desítky procent. Tento trend se netýká pouze České republiky, ale většiny evropských zemí. Antibiotická rezistence způsobuje významné zvýšení jak mortality, tak i morbidity a její příčinou je zejména nesprávné používání antibiotik v humánní i veterinární medicíně ^[143].

V průběhu svého vývoje byly bakterie schopny vyvinout úspěšné strategie pro přežití. Jednou z těchto strategií jsou i tvorby biofilmů, kde se bakterie chovají odlišně od volně flotujících buněk. Vzhledem k heterogenní povaze biofilmů je pravděpodobné, že rezistence vůči antibiotikům je výsledkem složité směsi vnějších i vnitřních faktorů. Ačkoliv metody pro testování citlivosti biofilm-formujících bakterií již byly vyvinuty, jejich klinický význam je zatím minimální.

Je zřejmé, že je zapotřebí dalších výzkumů, které by pomohly odhalit a objasnit multifaktoriální povahu antibiotické rezistence uvnitř struktur mikrobiálních biofilmů. Pochopení mechanismů rezistence a nabití nových poznatků ohledně faktorů podílejících se na vzniku rezistence uvnitř struktur biofilmu by mohlo výrazně přispět k léčbě infekcí souvisejících s biofilmy ^[110]. Podrobnější informace o biofilmech a jednotlivých metodách jsou uvedeny v teoretické části této práce.

Náplní mé rigorózní práce bylo zhodnotit účinnost 73 nově syntetizovaných látek k osmi bakteriálním kmenům. Nově syntetizované sloučeniny byly rozděleny na základě strukturálních rysů do 5ti skupin. Všechny látky byly testovány pomocí mikrodiluční bujónové metody, což je poměrně rozšířená, rychlá, jednoduchá metoda nenáročná na materiální a přístrojové vybavení. Výsledky byly vizuálně odečítány po 24 a 48 hodinách inkubace. Velkou výhodou je, že lze zkoušet citlivost různých koncentrací látek na více bakteriálních druhů. V našem případě jsme testovali citlivost k osmi bakteriálním kmenům.

V našem případě byly hodnoty MIC získány vizuální inspekci, která se zdá být zcela postačující pro účely základního skrínungu antimikrobní aktivity testovaných látek. Nicméně, využití spektrofotometru pro odečet hodnot MIC by bylo vhodné zejména u látek, jejichž působení pouze růst mikroba zpomaluje, ale nezastavuje. Pro získání přesnějších výsledků by

bylo také vhodné, kdyby každé měření bylo prováděno několikrát a naměřené hodnoty by bylo možno statisticky zpracovat.

V souvislosti s tím, že testování nebylo automatizované, tak mohlo dojít s vyšší pravděpodobností k chybám různého charakteru. Chyba se může vyskytnout téměř v každém pracovním kroku. Nezbytnou podmínkou pro testování účinnosti kandidátních látek je práce se sterilními nástroji a pomůckami (očkovací kličky, zkumavky, jamkové rezervoáry, ...) v laminárním boxu. První z možných chyb při testování může vzniknout již při přípravě suspenzí bakteriálních kmenů či následné kultivaci kmenů. Proto se v rámci každého testování ověřuje čistota testované kultury, či sterilita kultivačního média. Aby nedocházelo k chybám a odchylkám ve výsledcích, musí být také dodržována konstantní teplota při kultivaci, délka kultivace či stejné složení kultivačního růstového média.

Další z chyb může vznikat při přípravě testovaných látek. Testované látky by měly být dodány v požadované čistotě, nemělo by se pokračovat v testování, pokud by došlo k vysrážení látky při rozpouštění v DMSO či růstovém médiu a také je nezbytné, aby byla látka rozpuštěna ve správném objemu DMSO. V kroku přípravy dvojkové ředící řady viz.kapitola 3.5.2. Příprava dvojkové ředící řady, experimentální části práce, může docházet k chybám například napipetováním nesprávného objemu, nesprávného média, vynecháním jedné či více jamek při pipetování, nebo naopak pipetování stejného objemu vícekrát do jedné zkumavky. Také při inkubaci může dojít k chybám a to zejména nedodržením vhodné délky inkubace či chybným nastavením teploty termostatu.

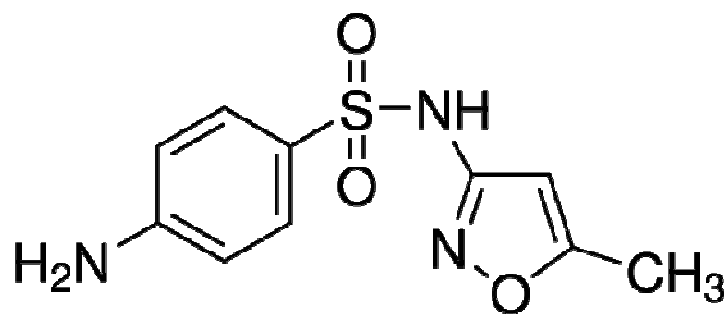
Na základě našeho testování byly zjištěny údaje o aktivitě 73 experimentálně připravených látek vůči 8 bakteriálním kmenům. Ze získaných výsledků testování byla vyhodnocena pro každý bakteriální kmen nejúčinnější látka po 24 hodinové i 48 hodinové inkubaci. Je to látka s nejnižší hodnotou MIC. Látky s pracovním označením SC-3A, SC-3B, SC-3C, SAL-4I a IRGASAN poskytly nejnižší hodnoty MIC u kmene SA po 24 hodinách inkubace a to 0,49 $\mu\text{mol/l}$. Po 48 hodinách inkubace u SA byla zaznamenána nejnižší hodnota MIC u stejných látek a to 0,98 $\mu\text{mol/l}$, akorát u látky IRGASAN byla naměřena hodnota 0,49 $\mu\text{mol/l}$. Na kmen MRSA působily nejvyšším inhibičním účinkem po 24 hodinách inkubace látky s označením SC-3B a SC-3C s hodnotou MIC 0,49 $\mu\text{mol/l}$ a po 48 hodinách to byly látky SC-3B a IRGASAN s hodnotou MIC 0,98 $\mu\text{mol/l}$. U bakteriálního kmene SE se jednalo o látky SC-3A, SC-3B, SC-3C, SC-3D s hodnotou MIC 0,49 $\mu\text{mol/l}$ po 24 hodinách inkubace a po 48 hodinách to byly látky SC-2A, SC-3A, SC-3B, SC-3D, kde naměřená MIC byla 0,98 $\mu\text{mol/l}$. U kmene EF byly naměřeny nejnižší hodnoty MIC u látky IRGASAN a to po 24 hodinové inkubaci 31,25 $\mu\text{mol/l}$ a po 48 hodinách 62,5 $\mu\text{mol/l}$. Látka

IRGASAN působila také nejvyšším inhibičním účinkem na bakteriální kmen EC, kde po 24 hodinách inkubace byla naměřena hodnota MIC 15,62 $\mu\text{mol/l}$ a po 48 hodinách 62,5 $\mu\text{mol/l}$. Na bakteriální kmen KP vyšla z našeho měření opět jako neúčinnější látka s označením IRGASAN, kde hodnoty MIC byly po 24 i 48 hodinách inkubace 1,98 $\mu\text{mol/l}$. Tato látka inhibovala také růst bakterie KP-ESBL a jevila se proto jako neúčinnější, jak po 24 hodinách inkubace s hodnotou MIC 7,81 $\mu\text{mol/l}$, tak po 48 hodinové inkubační době s hodnotou MIC 31,25 $\mu\text{mol/l}$. Na bakteriální kmen PA nepůsobila ani jedna z námi testovaných sloučenin.

Testována byla účinnost derivátů sulfonamidů, salicylanilidů, isoniazidu a dalších strukturálně podobných látek. Sulfonamidy jsou známá antibiotika, jejichž základem je 4-aminobenzensulfonamidové seskupení. Jedná se o vůbec první antibakteriální chemoterapeutika zavedena do klinické praxe pro terapii bakteriálních infekcí ^[44].

Sulfonamidy byly široce používané látky k léčbě jak G^+ , tak G^- bakteriálních infekcí. Kromě toho byly tyto deriváty také kdysi používány pro léčbu tuberkulózy, ale díky své toxicitě se později přestaly pro tuto indikaci používat ^[144].

Obecně sulfonamidy působí jako strukturální analogy kyseliny 4-aminobenzoové, a tedy jsou schopny inhibovat dihydropteroát syntázu, a tím narušit biosyntézu folátů. Bližší informace o této skupině antibiotik jsou uvedeny v teoretické části práce oddílu 2.3.5.1. Sulfonamidy a trimetoprim. Také základní skelet sulfonamidů je zobrazen na Obrázku 19 v teoretické části práce. Pro účinek sulfonamidů je nezbytná volná aromatická aminoskupina v poloze 4, která může být nahrazena pouze funkčními skupinami, které jsou schopny se v organismu zpět na aminoskupinu přeměnit (například: $-\text{NO}_2$, $-\text{NHOH}$, $-\text{N}=\text{N}-$, $-\text{N}_3$). Substituce sulfonamidové skupiny je možná pouze tehdy, kdy jeden z vodíků je zachován a druhý může být nahrazen heterocyklem nebo acylem, substituce alkyly se neosvědčila ^[44]. Námi testované sloučeniny měly jeden vodík sulfonamidové skupiny nahrazený substituovaným heterocyklem (methylisoxazolem) a druhý vodík byl ponechán kvůli zachování antibakteriálního účinku. Jedná se o sloučeninu sulfomethoxazol, která je v praxi využívána jako látka s antibakteriálním účinkem. Její struktura je uvedena na následujícím Obrázku 32.



Obrázek 32: Chemická struktura sulfomethoxazolu.

převzato z: <http://www.mpbio.com/product.php?pid=02156711&country=56> ^[145]

Prakticky jediným používaným zástupcem ze skupiny sulfonamidových antibiotik je právě sulfomethoxazol, který je k dispozici pouze v kombinaci s trimetoprimem. Kombinace těchto dvou látek se nazývá co-trimoxazol. K jeho výhodám patří poměrně dlouhý poločas a dobrý průnik do tkání. Je využíván zejména pro léčbu infekcí horních cest dýchacích a infekcí močových cest ^[44].

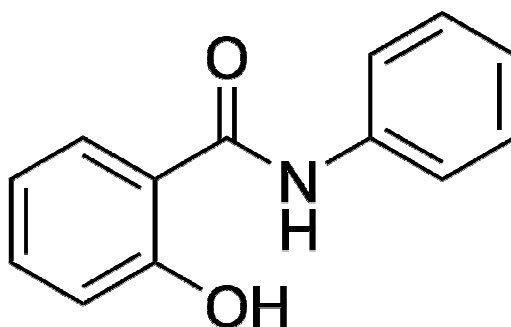
Deriváty sulfonamidů respektive sulfomethoxazolu tvořily dvě skupiny námi testovaných látek a byla to skupina sulfonamidových močovín, kde byl nahrazen jeden vodík aromatické aminoskupiny substituovaným heterocyklem či acylem a skupina sulfonamidových imidazolidintronů, kde byl nahrazen jeden vodík aromatické aminoskupiny různě substituovaným 2,4,5-trioxoimidazolidinem.

Jednu z pěti skupin námi testovaných sloučenin tvořily sulfonamidové močoviny, kde vykazovalo určitou účinnost 9 z 23 zkoušených látek. Jednalo se o sloučeniny s pracovním označením SMXU-6, SMXU-7, SMXU-8, SMXU-9, SMX-13, SMX-10, SMX-12, SMX-15 a SMX-Me-Ph-U. Proti nejširšímu spektru bakterií byly účinné látky SMX-10, SMX-15 a to na pět z osmi testovacích bakteriálních agens.

Další skupinou derivátů sulfomethoxazolu byly sulfonamidové imidazolidindiony, kde bylo testováno celkem 9 sloučenin s pracovním označením SMX-C-1, SMX-C-2, SMX-C-3, SMX-C-4, SMX-C-5, SMX-C-6, SMX-C-7, SMX-C-8, SMX-C-9. Určitý antibakteriální účinek vykazovalo 5 z 9 zkoušených látek. Jako látky s nejširším bakteriálním spektrem se jevíly látky s označením SMX-C-5 a SMX-C-9, které inhibovaly určitým způsobem růst čtyřech bakteriálních kmenů z osmi testovacích.

Neexistuje jednoznačný vliv cyklizace močoviny na biologickou aktivitu, ale bylo zjištěno, že v určitých případech u sloučenin imidazolidin-2,4,5-trionů se zlepšila účinnost a snížila buněčná toxicita ^[144].

Další velkou testovanou skupinou sloučenin byly deriváty salicylanilidu. Jedná se o amidy kyseliny salicylové a anilinu. Deriváty salicylanilidu mají řadu farmakologických použití. Chlorované deriváty se používají zejména jako anthelmintika, bromované deriváty jako dezinfekční prostředky s antibakteriálními a antifungálními účinky. V naší práci jsme zkoušeli účinnost nově syntetizovaných sloučenin a to salicylanilidových karbamátů. Karbamáty jsou sloučeniny odvozené od kyseliny karbámové a salicylanilidové, karbamáty jsou tedy estery salicylanilidů s kyselinou karbámovou^[146]. Strukturální vzorec salicylanilidu je uveden na následujícím obrázku.



Obrázek 33: Chemická struktura salicylanilidu.

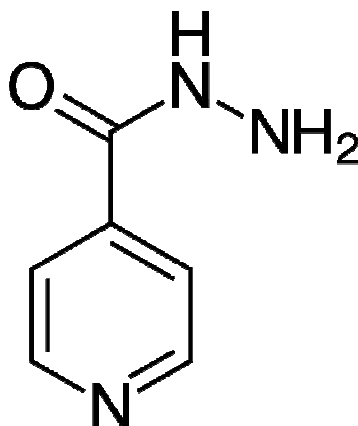
převzato z: <https://en.wikipedia.org/wiki/Salicylanilide>^[147]

Testované látky byly různě substituovány jak na aromatických jádrech, tak na hydroxyskupině. Dle výsledků lze vidět, že substituce má velice významný vliv na antibakteriální účinek. Všechny testované látky ze skupiny salicylanilidových derivátů byly účinné na G^+ bakterie. Největší účinek vykazovaly na bakterie SA a MRSA, kde všechny látky této skupiny vykazovaly účinek jak po 24, tak po 48 hodinové inkubaci. Jako látky s nejlepším antibakteriálním působením se jeví látky s pracovním označením SC-3A, SC-3B, SC-3C, SC-3D, SC-3E, u nichž byla zjištěna hodnota MIC po 24 hodinové inkubaci na bakteriální kmen SA 0,49 $\mu\text{mol/l}$. Společným znakem těchto molekul je substituce prvního benzenového kruhu molekulou chloru a dalším společným substituentem na druhém benzenovém jádře je brom.

Obecně platí, že G^+ bakterie vykazovaly vyšší citlivost ke zkoumaným sloučeninám, byly naměřeny hodnoty MIC již od 0,49 $\mu\text{mol/l}$. U G^- druhů byly naměřené hodnoty MIC \geq 31,25 $\mu\text{mol/l}$. Žádný z derivátů neinhibuje růst bakterie PA ani při nízkých koncentracích. Všechny karbamáty byly vždy aktivní alespoň proti třem kmenům bakterií. Dihalogenované deriváty jednoznačně ukázaly zlepšenou antibakteriální aktivitu než karbamáty odvozené od nesubstituovaných salicylanilidů. Bez ohledu na lékovou rezistenci byl rod *Staphylococcus*

(SA i SE) nejvíce citlivý. Byly inhibovány všechny karbamáty s hodnotami MIC od 0,49 $\mu\text{mol/l}$ do 500 $\mu\text{mol/l}$. S ohledem na N-substituci karbamátů působily sloučeniny proti stafylokokům na základě klesající účinnosti takto: cyklohexyl \geq benzyl > fenethyl > fenyl > adamantan-1-yl. Je zřejmé, že aromatizace cyklohexylovým kruhem nebo vložení dlouhého řetězce s dvěma uhlíky snižuje účinnost, ale z výsledků vyplývá, že methylenový můstek je tolerován bez jakéhokoliv všeobecného zhoršení akce ^[148].

Další testovanou skupinu tvořily deriváty isoniazidu. Isoniazid, také známý jako isonicotinylhydrazid je antituberkulotikum, které se používá jako léčivo první linie pro prevenci a léčbu tuberkulózy. Je účinný proti mykobakteriím a to zejména *Mycobacterium tuberculosis*. Je rovněž účinný proti některým atypickým druhům mykobakterií jako je *Mycobacterium kansasii* a *Mycobacterium xenopi* ^[149]. Struktura isoniazidu je uvedena na následujícím Obrázku 34.



Obrázek 34: Chemická struktura isoniazidu.

převzato z: <https://en.wikipedia.org/wiki/Isoniazid> ^[149]

Struktura isoniazidu je známa již od roku 1912, ale její antituberkulotické účinky byly zjištěny až později a jako antituberkulotikum se používá od roku 1952. Ze studií vyplynulo, že pyridinové jádro nelze nahradit jiným cyklem či alifatickým zbytkem a další substituce pyridinového jádra se také neosvědčila. Žádný efekt nepřinesla ani záměna hydrazinové skupiny jinými skupinami. Pouze tvorba proléčiv, kde dochází k substituci hydrazinového zbytku, má určitý terapeutický význam, tato substituce byla provedena i na námi testovaných sloučeninách ^[44].

Mechanismus účinku isoniazidu spočívá v interferenci při syntéze kyseliny mykolové, která je nezbytná pro tvorbu buněčné stěny mykobakterií. Látka se v současnosti používá v kombinacích s dalšími antituberkulotiky v terapii tuberkulózy ^[44].

Je popsána již celá řada syntetických modifikací isoniazidu jako je například spojení s další účinnou molekulou přes methinový most, konjugací s anilinovou skupinou či nový typ aktivních molekul založených na fluorovaných hydrazidech kyseliny benzoové ^[150].

Jak bylo již zmíněno, tak deriváty isoniazidu jsou původně látky, které působí zejména na mykobakterie. Naším testováním jsme vyzkoušeli účinek těchto sloučenin na osmi bakteriálních kmenech. Testováno bylo celkem 7 látek a určitý stupeň aktivity vykazovaly pouze 3 z nich. Slabá *in vitro* aktivita se projevila u látky INH-3, která vykazovala po 24 hodinové inkubaci MIC 500 $\mu\text{mol/l}$ u modelového kmene SA, SE, EF a EC. U látky INH-4 byla zjištěna po 24 hodinách inkubace MIC 500 $\mu\text{mol/l}$ u modelových kmenů SE, EF, KC, KP. Látka INH-7 vykazovala účinnost pouze na modelový kmen EF po 24 hodinové inkubaci s hodnotou MIC 500 $\mu\text{mol/l}$.

U daných sloučenin byla testována i antimykobakteriální aktivita *in vitro*. Biologické údaje ze zkoušek pro *Mycobacterium tuberculosis* ukázaly, že žádná ze syntetizovaných sloučenin nevykazovala vyšší aktivitu než isoniazid, avšak sloučenina s pracovním označením INH-6 dosáhla po 3 hodinách téměř stejné *in vitro* účinnosti ^[150].

Poslední skupinou námi testovaných sloučenin byly látky různých chemických struktur, kam bylo zařazeno 6 testovaných látek. Látka s pracovním označením IRGASAN měla nejširší spektrum účinku ze všech testovaných látek a působila na 7 z celkového počtu 8 bakteriálních kmenů, tedy na všechny kmeny kromě PA. Vykazovala také jedny z nejnižších hodnot MIC u většiny testovacích kmenů.

Jedná se o chlorovanou aromatickou sloučeninu obsahující jak etherové, tak i fenolové funkční skupiny. IRGASAN, neboli triclosan, je přidáván do mnoha spotřebitelských výrobků pro snížení či prevenci bakteriální kontaminace. Přidává se do mýdel, past na zuby, deodorantů, ústních vod či čistících prostředků ^{[151][152]}.

5. ZÁVĚR

- Celkem bylo testováno 73 látek na osmi bakteriálních kmenech pomocí mikrodiluční bujónové metody.
- Jednotlivé sloučeniny byly rozděleny dle společných strukturálních rysů do pěti skupin.
- Z celkového počtu 73 kandidátních látek vykazovalo určitou antibakteriální aktivitu 50 z nich.
- Nejcitlivějším kmenem k testovaným látkám byl kmen SA, naopak nejvíce rezistentní byla bakterie PA, na kterou inhibičně nepůsobila ani jedna z námi testovaných sloučenin.
- Nejvyšší antibakteriální aktivita byla zaznamenána u skupiny salicylanilidových karbamátů, kde celkem 28 látek z 28 testovaných této skupiny vykazovaly jistou antibakteriální aktivitu.
- Naopak nejnižší antibakteriální aktivita byla u látek skupiny sulfonamidových močovinných derivátů sulfamethoxazolu, kde účinek vykazovalo pouze 9 látek z 23 testovaných.
- Látky, u nichž byly získány nejnižší hodnoty MIC této práce, což bylo 0,49 $\mu\text{mol/l}$, jsou: IRGASAN, SAL-4I, SC-3B, SC-3C a SC-3D.
- Graficky je znázorněn počet účinných látek na jednotlivé bakteriální kmeny po 24 i 48 hodinové inkubaci.
- V některých případech jde o významné kandidáty pro další testování, ale aby mohly tyto sloučeniny najít místo v klinické praxi, je zapotřebí ještě řady dalších testů a klinických studií.

6. SEZNAM OBRÁZKŮ A TABULEK

Obrázek 1: G ⁺ koky bakterie <i>Staphylococcus aureus</i>	16
Obrázek 2: Kolonie <i>Staphylococcus epidermidis</i>	18
Obrázek 3: G ⁺ koky bakterie <i>Enterococcus faecalis</i>	20
Obrázek 4: <i>Escherichia coli</i>	21
Obrázek 5: Kolonie bakterie <i>Klebsiella pneumoniae</i>	23
Obrázek 6: Kolonie <i>Pseudomonas aeruginosa</i> na krevním agaru.....	24
Obrázek 7: Příklad diskového difúzního testu.	25
Obrázek 8: Gradientová difúzní metoda, E-test.	26
Obrázek 9: Ilustrativní snímek znázorňující provedení agarové diluční metody.....	27
Obrázek 10: Příklad mikrodilučního bujónového testu.....	28
Obrázek 11: Mechanismus účinku jednotlivých skupin antibiotik.	31
Obrázek 12: Základní skelet penicilinových antibiotik penam a struktura kyseliny 6-aminopenicilánové.	33
Obrázek 13: Základní skelet cefalosporinů a chemická struktura kyseliny 7-aminocefalosporinové.	35
Obrázek 14: Vzorec aztreonamu a označení beta-laktamového kruhu.....	38
Obrázek 15: Základní skelet tetracyklinových antibiotik.....	40
Obrázek 16: Chemická struktura chloramfenikolu.	41
Obrázek 17: Zástupce makrolidových antibiotik erythromycin.....	42
Obrázek 18: Základní chemická struktura streptomycinu-zástupce aminoglykosidů.....	44
Obrázek 19: Základní skelet sulfonamidů.....	45
Obrázek 20: 1,4-dihydro-4-oxochinolin-3-karboxylová kyselina -základní skelet chinolonů. 46	
Obrázek 21: Zástupce nitroimidazolových chemoterapeutik, metronidazol.....	47
Obrázek 22: Nitrofurantoin.	48
Obrázek 23: Hlavní mechanismy přenosu genů rezistence do bakterií.....	52
Obrázek 24: Příklady biochemických mechanismů antibiotické rezistence.....	56
Obrázek 25: Onemocnění způsobená mikrobiálním biofilmem.	60
Obrázek 26: Schématické znázornění metodického postupu MBEC testu.....	68
Obrázek 27: CDC biofilm reaktor.....	72
Obrázek 28: Drip flow reaktor.	72
Obrázek 29: Rotační diskový reaktor.....	74

Obrázek 30: Náčrt pracovního postupu při pipetování 20 µl naředěné testované látky.....	80
Obrázek 31: Náčrt mikrotitrační destičky a jednotlivé koncentrace testované látky.	81
Obrázek 32: Chemická struktura sulfomethoxazolu.	116
Obrázek 33: Chemická struktura salicylanilidu.	117
Obrázek 34: Chemická struktura isoniazidu.	118
Tabulka 1: Jednotlivé skupiny antibiotik, jejich mechanismus účinku a cílový účinek na bakteriální agens.....	32
Tabulka 2: 1.generace cefalosporinů.....	36
Tabulka 3: 2.generace cefalosporinů.....	36
Tabulka 4: 3.generace cefalosporinů.....	36
Tabulka 5: 4.generace cefalosporinů.....	37
Tabulka 6: 5.generace cefalosporinů.....	37
Tabulka 7: Přehled jednotlivých generací chinolonů.....	46
Tabulka 8: Biochemické mechanismy rezistence.	53
Tabulka 9: Uzavřené, statické modely.	66
Tabulka 10: Hodnotící farmakodynamické parametry antibiotické aktivity v biofilmu.....	68
Tabulka 11: Otevřené, dynamické modely.	69
Tabulka 12: Modelové kmeny bakterií.	77
Tabulka 13: Přehled testovaných látek ze skupiny salicylanilidových karbamátů.....	83
Tabulka 14: Přehled testovaných látek ze skupiny sulfonamidové močoviny (deriváty sulfamethoxazolu).	87
Tabulka 15: Přehled testovaných látek ze skupiny derivátů isoniazidu.....	90
Tabulka 16: Přehled testovaných látek ze skupiny sulfonamidových imidazolidintronů (deriváty sulfamethoxazolu).....	92
Tabulka 17: Přehled testovaných látek dalších struktur.....	94
Tabulka 18: Stanovené hodnoty minimálních inhibičních koncentrací salicylanilidových karbamátů (1.část).	95
Tabulka 19: Stanovené hodnoty minimálních inhibičních koncentrací salicylanilidových karbamátů (2.část).	96
Tabulka 20: Stanovené hodnoty minimálních inhibičních koncentrací salicylanilidových karbamátů (3.část).	97

Tabulka 21: Stanovené hodnoty minimálních inhibičních koncentrací salicylanilidových karbamátů (4.část).	98
Tabulka 22: Stanovené hodnoty minimálních inhibičních koncentrací salicylanilidových karbamátů (5.část).	99
Tabulka 23: Stanovené hodnoty minimálních inhibičních koncentrací salicylanilidových karbamátů (6.část).	100
Tabulka 24: Stanovené hodnoty minimálních inhibičních koncentrací sulfonamidových močovinných derivátů sulfamethoxazolu (1.část).	101
Tabulka 25: Stanovené hodnoty minimálních inhibičních koncentrací sulfonamidových močovinných derivátů sulfamethoxazolu (2.část).	102
Tabulka 26: Stanovené hodnoty minimálních inhibičních koncentrací sulfonamidových močovinných derivátů sulfamethoxazolu (3.část).	103
Tabulka 27: Stanovené hodnoty minimálních inhibičních koncentrací sulfonamidových močovinných derivátů sulfamethoxazolu (4.část).	104
Tabulka 28: Stanovené hodnoty minimálních inhibičních koncentrací sulfonamidových močovinných derivátů sulfamethoxazolu (5.část).	105
Tabulka 29: Stanovené hodnoty minimálních inhibičních koncentrací derivátů isoniazidu (1.část).	106
Tabulka 30: Stanovené hodnoty minimálních inhibičních koncentrací derivátů isoniazidu (2.část).	107
Tabulka 31: Stanovené hodnoty minimálních inhibičních koncentrací sulfonamidových imidazolidintronů- derivátů sulfamethoxazolu (1.část).	108
Tabulka 32: Stanovené hodnoty minimálních inhibičních koncentrací sulfonamidových imidazolidintronů- derivátů sulfamethoxazolu (2.část).	109
Tabulka 33: Stanovené hodnoty minimálních inhibičních koncentrací dalších chemických struktur (1.část).	110
Tabulka 34: Stanovené hodnoty minimálních inhibičních koncentrací dalších chemických struktur (2.část).	111
Graf 1: Jednotlivé bakteriální kmeny a počet účinných látek.	112

7. SEZNAM LITERATURY

1. Světová zdravotnická organizace - rezistence vůči antibiotikům [online]. [cit. 2016-04-22]. Dostupné z: http://www.who.cz/attachments/article/27/WHO_factsheet_every_CZE.pdf.
2. WHO - Media center - Antibiotic resistance [online]. [cit. 2016-04-13]. Dostupné z: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/antibiotic-resistance/en/>.
3. Facklam, R.R., Collins, M.D.: Identification of *Enterococcus* Species Isolated from Human Infections by a Conventional Test Scheme. *Journal of Clinical Microbiology*, 1988, 27 (4), s.731 - 734.
4. Bednář, M., Fraňková, V., Schindler, J., *et al.*: *Lékařská mikrobiologie*, 1996. Praha: Nakladatelství Triton, s.193-195, ISBN: 80 - 2380 - 297 - 6.
5. Namvar, A.E., Bastarahang, S., Abbasi, N., *et al.*: Clinical characteristics of *Staphylococcus epidermidis*: a systematic review. *GMS Hygiene and Infection Control*, 2014, 9 (3), ISSN: 2196 - 5226.
6. Murray, P.R., Rosenthal, K.S., Tenover, M.A.: *Medical Microbiology*, 2009. Philadelphia: Elsevier 6th edition, ISBN: 978 - 0 - 323 - 05470 - 6.
7. Schindler, J.: *Mikrobiologie pro studenty zdravotnických oborů*, 2.přepracované vydání, 2014. Praha: Grada, s.58 - 68, ISBN: 978 - 80 - 247 - 4771 - 2.
8. Bakteriální původci alimentárních onemocnění [online]. [cit. 2016-01-24]. Dostupné z: <http://cit.vfu.cz/alimentarni-onemocneni/xsa/xsa01.html>.
9. News medical - What is *Staphylococcus Aureus*? [online]. [cit. 2016-01-12]. Dostupné z: <http://www.news-medical.net/health/What-is-Staphylococcus-Aureus.aspx>.
10. Medscape - *Staphylococcus Aureus* Infection [online]. [cit. 2015-11-16]. Dostupné z: <http://emedicine.medscape.com/article/971358-overview>.
11. Wielders, C.L.C., Fluit, A.C., Brisse, S., *et al.*: *mecA* Gene Is Widely Disseminated in *Staphylococcus aureus* Population. *Journal of Clinical Microbiology*, 2002, 40 (11), s.3970 - 3975.

12. WebMD - Understanding MRSA Infection - the Basics [online]. [cit. 2015–11–16].
Dostupné z:
<http://www.webmd.com/skin-problems-and-treatments/understanding-mrsa?page=1>.
13. Bacteria in Photos [online]. [cit. 2015–11–22]. Dostupné z:
<http://www.bacteriainphotos.com/bacteria%20under%20microscope/staphylococcus%20epidermidis%20microscopy.html>.
14. Otto, M.: *Staphylococcus epidermidis* - the "accidental" patogen. National Institute of Health, 2009, 7 (8), s.555 - 567.
15. Zervos, M.J.M.D., Chow, J.W.M.D., Chen, A.M.D., *et al.*: Enterococcus species. Infectious Disease and Antimicrobial Agents [online]. [cit. 2015–11–25]. Dostupné z:
<http://www.antimicrobe.org/new/b03.asp>.
16. Bacteria in Photos [online]. [cit. 2015–11–23]. Dostupné z:
<http://www.bacteriainphotos.com/Enterococcus%20faecalis%20light%20microscopy.html>.
17. Vergis, E.N., Shankar, N., Chow, J.W., *et al.*: Association between the Presence of Enterococcal Virulence Factors Gelatinase, Hemolysin, and Enterococcal Surface Protein and Mortality among Patients with Bacteremia Due to *Enterococcus faecalis*. Clinical Infectious Diseases, 2002, 35 (5), s.570 - 575.
18. World Health Organization [online]. [cit. 2015–12–03]. Dostupné z:
http://www.who.int/topics/escherichia_coli_infections/en/.
19. Bacteria in Photos [online]. [cit. 2015–12–03]. Dostupné z:
<http://www.bacteriainphotos.com/Escherichia%20coli%20light%20microscopy.html>
20. Podschun, R., Ullman, U.: *Klebsiella* spp. as Nosocomial Pathogens: Epidemiology, Taxonomy, Typing Methods, and Pathogenicity Factors. Clinical Microbiology Reviews, 1998, 11 (4), s.589 - 603.
21. Bacteria in Photos [online]. [cit. 2015–12–05]. Dostupné z:
<http://www.bacteriainphotos.com/klebsiella-pneumoniae-colonies.html>.
22. Parveen, R.M., Khan, M.A., Menezes, G.A., *et al.*: Extended-spectrum β -lactamase producing *Klebsiella pneumoniae* from blood cultures in Puducherry, India. Indian Journal of Medical Research, 2011, 134 (3), s.392 - 395.

23. Gupta, A., Krow, A., Rubenstein, D., Saiman, L.: Extended Spectrum β -Lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* Infections: a Review of the Literature. *Journal of Perinatology*, 2003, 23, s.439 - 443.
24. Peterson, D.L., Gottberg, A.V., Mohapatra, S., *et al.*: Antibiotic Therapy for *Klebsiella pneumoniae* Bacteremia: Implications of Production of Extended-Spectrum β -Lactamases. *Clinical Infectious Diseases*, 2004, 39 (1), s.31 - 37.
25. Bradford, P.A.: Extended-Spectrum β -Lactamases in the 21st Century: Characterization, Epidemiology, and Detection of This Important Resistance Threat. *Clinical Microbiology Reviews*, 2001, 14 (4), s.933 - 951.
26. Bacteria in Photos [online]. [cit. 2015–12–05]. Dostupné z: <http://www.bacteriainphotos.com/pseudomonas%20aeruginosa%20colonies.html>.
27. Ramirez-Estrada, S., Borgatta, B., Rello, J.: *Pseudomonas aeruginosa* ventilator-associated pneumonia management. *Infection and Drug Resistance*, 2016, 9, s.7 - 18.
28. *Pseudomonas aeruginosa* Infections [online]. [cit. 2016–01–20]. Dostupné z: <http://emedicine.medscape.com/article/226748-overview>.
29. EUCAST Disk Diffusion Method for Antimicrobial Susceptibility Testing [online]. [cit. 2016–01–08]. Dostupné z: http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Disk_test_documents/Manual_v_5.0_EUCAST_Disk_Test.pdf.
30. Diskový difúzní test [online]. [cit. 2016–01–20]. Dostupné z: <http://old.lf3.cuni.cz/mikrobiologie/bak/uceb/obsah/disktest/disktest.htm>.
31. Easy Study MBBS - Antibiotic sensitivity test [online]. [cit. 2016–01–21]. Dostupné z: <http://easymbbs.com/antibiotic-sensitivity-test/>.
32. Jenkins, S.G., Schuetz, A.N.: Current Concepts in Laboratory Testing to Guide Antimicrobial Therapy. *Mayo Clinic Proceedings*, 2012, 87 (3), s.290 - 308.
33. Urbášková, P., Žemličková, H., Hrabák, J.: Jaké breakpointy používat pro interpretaci výsledků vyšetření citlivosti bakterií k antibiotikům? *Zprávy epidemiologie a mikrobiologie (SZÚ Praha)*, 2010, 19 (9), s.266 – 267.

34. Jílek, P., Buchta, V., Kubanová, P., *et al.*: Úvod do mikrobiologických vyšetřovacích metod, 2002. Praha: Nakladatelství Karolinum, 105s., ISBN 80 – 240 – 0459 – 0.
35. Baker, C.N., Stocker, S.A., Culver, D.H., *et al.*: Comparison of the E Test to agar dilution, broth microdilution, and agar diffusion susceptibility testing techniques by using a special challenge set of bacteria. *Journal of Clinical Microbiology*, 1991, 29 (3), s.533 – 538.
36. Himedia - Colistin Ezy MICTM Strip (CL) (0.016-256 mcg/ml) [online]. [cit. 2016–01–21]. Dostupné z: <http://himedialabs.com/TD/EM020.pdf>.
37. Tropical Medicine and Public Health [online]. [cit. 2015–04–02]. Dostupné z: http://www.atmph.org/viewimage.asp?img=AnnTropMedPublicHealth_2012_5_3_178_9860_9_u1.jpg.
38. Coyle, M.B., Cavalieri, S.J., Harbeck, R.J., *et al.*: Manual of antimicrobial susceptibility testing, 2005. American society for microbiology, Library of Congress Cataloging-in-Publication Data, 236s., ISBN 1 – 55581 – 349 - 6.
39. Jorgensen, J.H., Ferraro, M.J.: Antimicrobial Susceptibility Testing: A Review of General Principles and Contemporary Practices. *Clinical Infectious Diseases*, 2009, 49 (11), s.1749 – 1755.
40. Felmingham, D., Brown, D.F.J.: Instrumentation in antimicrobial susceptibility testing. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2001, 48 (1), s.81 – 85.
41. Biomerieux - Vitek 2 Healthcare [online]. [cit. 2016–01–21]. Dostupné z: <http://www.biomerieux-usa.com/clinical/vitek-2-healthcare>.
42. Antimicrobial drugs [online]. [cit. 2016–02–12]. Dostupné z: http://spot.pcc.edu/~jvolpe/b/bi234/lec/6_antimicrobials/.
43. Alekshun, M.N., Levy, S.B.: Molecular Mechanisms of Antibacterial Multidrug Resistance. *Cell*, 2007, 128 (6), s.1037 – 1050.
44. Hartl, J., Doležal, M., Miletín, M., *et al.*: Farmaceutická chemie IV., 2006. Praha: Nakladatelství Karolinum, 166s., ISBN: 80 - 246 - 1169 - 4.

45. Lincová, D., Farghali, H., Kršiak, M., *et al.*: Základní a aplikovaná farmakologie. Druhé doplněné a přepracované vydání, 2007. Praha: Galén, 672s., ISBN: 978 – 80 – 7262 – 373 – 0.
46. Lüllmann, H., Mohr, K., Wehling, M.: Farmakologie a toxikologie. 2. české vydání, 2004. Praha: Grada Publishing a.s., 725s., ISBN: 80 – 247 – 0836 - 1.
47. Wikimedia Commons [online]. [cit. 2016–02–13]. Dostupné z: <https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Penam.svg>.
48. Wikipedia - The Free Encyclopedia [online]. [cit. 2016–02–13]. Dostupné z: <https://en.wikipedia.org/wiki/6-APA>.
49. Táborská, J.: Beta-laktamová antibiotika [online]. Zdraví E15, 2002. [cit. 2015-02-18]. Dostupné z: <http://zdravi.e15.cz/clanek/priloha-lekarske-listy/beta-laktamova-antibiotika-142697>.
50. Cell Wall Synthesis Inhibitors [online]. [cit. 2016–02–19]. Dostupné z: <https://quizlet.com/92920269/cell-wall-synthesis-inhibitors-flash-cards/>.
51. Preparation of aztreonam [online]. [cit. 2016–02–26]. Dostupné z: <http://www.google.com/patents/WO2004013133A1?hl=cs&cl=en>.
52. Binda, E., Marinelli, F., Marcone, G.L.: Old and New Glycopeptide Antibiotics: Action and Resistance. *Antibiotics*, 2014, 3 (4), s.572 – 594.
53. Votava, M.: Lékařská mikrobiologie obecná, 2005. Druhé přepracované vydání. Brno: Nakladatelství Neptun, 351s., ISBN: 80 – 86850 – 00 – 5.
54. Wikimedia Commons [online]. [cit. 2016–02–22]. Dostupné z: https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Tetracycline_structure.svg.
55. Chloromycetin Aplicaps (Chloramphenicol Eye Ointment) - Active Ingredient And Chemical structure [online]. [cit. 2016–02–24]. Dostupné z: <http://medicalcheatsheets.blogspot.cz/2012/01/chloromycetin-aplicaps-chloramphenicol.html>.
56. Steel, H.C., Theron, A.J., Cockeran, R., *et al.*: Pathogen- and Host-Directed Anti-Inflammatory Activities of Macrolide Antibiotics. *Mediators of Inflammation*, 2012, 2012, s.1 - 17.

57. Plant Management Network [online]. [cit. 2016-02-27]. Dostupné z: <https://www.plantmanagementnetwork.org/elements/view.aspx?ID=199>.
58. Antimicrobial Drugs [online]. [cit. 2016-02-27]. Dostupné z: http://faculty.weber.edu/ewalker/Medicinal_Chemistry/topics/Antimicrobial/Antimicrobial.htm.
59. Antibiotic Tolerance Inhibitors [online]. [cit. 2016-02-26]. Dostupné z: <http://www.google.com/patents/WO2012116010A2?cl=en>.
60. Drug bank [online]. [cit. 2015-04-11]. Dostupné z: <http://www.drugbank.ca/drugs/DB00916>.
61. Drugs.com [online]. [cit. 2016-02-26]. Dostupné z: <https://www.drugs.com/drp/noritate-cream-1.html>.
62. Drug bank [online]. [cit. 2015-03-13]. Dostupné z: <http://www.drugbank.ca/drugs/DB00698>.
63. Med Library.org [online]. [cit. 2016-03-11]. Dostupné z: <http://medlibrary.org/lib/rx/meds/nitrofurantoin-monohydratemacrocrystals-7/>.
64. WHO - Antimicrobial resistance [online]. [cit. 2016-04-13]. Dostupné z: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs194/en/>.
65. WHO - How to stop antibiotic resistance? Here's a WHO prescription [online]. [cit. 2016-04-13]. Dostupné z: <http://www.who.int/mediacentre/commentaries/stop-antibiotic-resistance/en/>.
66. Bassetti, M., Righi, E.: Multidrug - resistance bacteria: what is the threat? Infectious diseases complications encountered by the practicing hematologist, 2013, 2013 (1), s.428 - 432.
67. Dobrovolná, L.: Biochemické aspekty užívání antibiotik. Bakalářská práce. 2010. Masarykova Univerzita, Pedagogická fakulta, Brno, s.67.
68. Byarugaba, D.K.: Mechanisms of Antimicrobial Resistance. Antimicrobial Resistance in Developing Countries, 2009, s.15 - 26.

69. Kolář, M.: Bakteriální rezistence k antibiotické léčbě [online]. Zdraví E15. Postgraduální medicína, 2013. [cit. 2015-02-25]. Dostupné z: <http://zdravi.e15.cz/clanek/postgradualni-medicina/bakterialni-rezistence-k-antibioticke-lecbe-472462>
70. Leclercq, R., Cantón, R., Brown, D.F.J., *et al.*: EUCAST expert rules in antimicrobial susceptibility testing. *Clinical Microbiology and Infection*, 2013, 19, s.141 - 160.
71. Petlánová, T.: Vyhodnocení aktivity potenciálně antibiotických látek pomocí mikrodiluční bujónové metody III. Diplomová práce. 2015. Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta, Hradec Králové, s.95.
72. Spížek, J.: Rezistence na antibiotika [online]. Přírodovědecký časopis Vesmír, 1991, 78 (27), s.27 – 32. [cit. 2015-02-18]. Dostupné z: <http://casopis.vesmir.cz/clanek/rezistence-na-antibiotika>
73. Martínková, J.: Farmakologie pro studenty zdravotnických oborů. 2. zcela přepracované a doplněné vydání, 2007. Praha: Grada Publishing, a. s., 380s., ISBN: 978 – 80 – 247 – 1356 – 4.
74. Urbášková, P., Hrabák, J., Žemličková, H.: Antibiotická rezistence bakterií- hrozba selhání léčby infekcí neustále sílí [online]. *Medical Tribune.cz*, 2012. [cit. 2015-02-24]. Dostupné z: <http://www.tribune.cz/clanek/25673-antibioticka-rezistence-bakterii-hrozba-selhani-lecby-infekci-neustale-sili>
75. McManus, M.C.: Mechanisms of bacterial resistance to antimicrobial agents. *American Journal of Health-System Pharmacy*, 1997, 54 (12), s.1420 - 1433.
76. Giedraitienė, A., Vitkauskienė, A., Naginienė, R., *et al.*: Antibiotic Resistance Mechanisms of Clinically Important Bacteria. *Medicina (Kaunas)*, 2011, 47 (3), s.137 – 146.
77. Noel, B.A., Arthur, M., Courvalin, P.: Evidence for natural gene transfer from gram-positive cocci to *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 1988, 170 (4), s.1739 - 1745.
78. Bennett, P.M.: Plasmid encoded antibiotic resistance: acquisition and transfer of antibiotic resistance genes in bacteria. *British Journal of Pharmacology*, 2008, 153 (1), s.347 – 357.
79. Nature reviews- Microbiology [online]. [cit. 2016-04-24]. Dostupné z: http://www.nature.com/nrmicro/journal/v4/n1/fig_tab/nrmicro1325_F2.html.

80. Džidic, S., Šuškovc, J., Kos, B.: Antibiotic Resistance Mechanisms in Bacteria: Biochemical and Genetics Aspects. *Food Technology and Biotechnology*, 2008, 46 (1), s.11 – 21.
81. Bonnet, R.: Growing Group of Extended-Spectrum β -Lactamases: the CTX-M Enzymes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2004, 48 (1), s.1 – 14.
82. Levy, S.B.: Antibiotický paradox: jak se nesprávným používáním antibiotik ruší jejich léčebná moc. 1. vydání, Praha: Academia, 2007, 312s. ISBN: 978 - 80 - 200 - 1485 - 6.
83. Barker, K.F.: Antibiotic resistance: a current perspective. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 1999, 48 (2), s.109 – 124.
84. Kim, Y.H., Cha, Ch.J., Cerniglia, C.E.: Purification and characterization of an erythromycin esterase from an erythromycin-resistant *Pseudomonas* sp. *FEMS Microbiology Letters*, 2002, 210 (2), s.239 – 244.
85. Leski, T.A., Tomasz, A.: Role of penicillin-binding protein 2 (PBP2) in the antibiotic susceptibility and cell wall cross - linking of *Staphylococcus aureus*: evidence for the cooperative functioning of PBP2, PBP4, and PBP2A. *Journal of Bacteriology*, 2005, 187 (5), s.1815 – 1824.
86. Wang, G., Taylor, D.E.: Site-Specific Mutations in the 23S rRNA Gene of *Helicobacter pylori* Confer Two Types of Resistance to Macrolide-Lincosamide-Streptogramin B Antibiotics. *Antimicrobial Agent and Chemotherapy*, 1998, 42 (8), s.1952 – 1958.
87. Sun, J., Deng, Z., Yan, A.: Bacterial multidrug efflux pumps: Mechanisms, physiology and pharmacological exploitations. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2014, 453 (2), s.254 – 267.
88. Lambert, P.A.: Mechanisms of antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of the Royal Society of Medicine*, 2002, 95 (41), s.22 – 26.
89. Encyclopaedia britannica [online]. [cit. 2015–04–02]. Dostupné z: <http://www.britannica.com/EBchecked/topic/1027479/antibiotic-resistance>
90. Hobstová, J.: Beta-laktamová antibiotika, beta-laktamázy a jejich inhibitory [online]. *Zdraví Euro*, 2003. [cit. 2016-03-18]. Dostupné z: <http://zdravi.euro.cz/clanek/priloha-lekarske-listy/beta-laktamova-antibiotika-beta-laktamazy-a-jejich-inhibitory-151726>.

91. Kolář, M., Urbánek, K., Hanulík, V., *et al.*: Vliv antibiotické léčby na vývoj bakteriální rezistence. *Medicína pro praxi*, 2011, 8 (11), s.463 - 465.
92. Hrabák, J., Vaniš, V., Bergerová, T., *et al.*: Průkaz beta-laktamáz širokého spektra (ESBL) a typu AmpC u enterobakterií [online]. Státní Zdravotní Ústav, 2016 [cit.2016 - 03 - 22]. Dostupné z: <http://www.szu.cz/prukaz-beta-laktamaz-sirokeho-spektra-esbl-a-typu-ampc-u>
93. Trieu-Cout, P., Cespédés, G., Bentorcha, F., *et al.*: Study of heterogeneity of chloramphenicol acetyltransferase (CAT) genes in streptococci and enterococci by polymerase chain reaction: characterization of a new CAT determinant. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 1993, 37 (12), s.2593 - 2598.
94. Kehrenberk, C., Schulze-Tanzil, G., Martel, J.L., *et al.*: Antimicrobial resistance in *Pasteurella* and *Mannheimia*: epidemiology and genetic basis. *Veterinary Research, BioMed Central*, 2001, 32 (3-4), s.323 - 339.
95. Piddock, L.J.V.: Fluoroquinolone resistance - Overuse of fluoroquinolones in human and veterinary medicine can breed resistance. *Journal List*, 1998, 317 (7165), s.1029 - 1030.
96. Vankomycin [online]. [cit. 2015-04-02]. Dostupné z: https://www.ikem.cz/plm_lp/HVEZDALAEK.htm.
97. Simoes, M., Simoes, L.C., Vieira, M.J.: A review of current and emergent biofilm control strategies. *LWT- Food Science and Technology*, 2010, 43, s.573 - 583.
98. Donlan, R.M.: Biofilms: Microbial Life on Surfaces. *Emerging Infectious Diseases*, 2002, 8 (9), s.881 - 890.
99. Lebeaux, D., Ghigo, J.M., Beloin, Ch.: Biofilm-Related Infections: Bridging the Gap between Clinical Management and Fundamental Aspects of Recalcitrance toward Antibiotics. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2014, 78 (3), s.510 - 543.
100. Donlan, R.M., Costeron, J.W.: Biofilms: Survival Mechanisms of Clinically Relevant Microorganisms. *Clinical Microbiology Reviews*, 2002, 15 (2), s.167 - 193.
101. Lewis, K.: Riddle of Biofilm Resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2001, 45 (4), s.999 - 1007.

102. Ceri, H., Olson, E.M., Stremick, C., *et al.*: The Calgary Biofilm Device: New Technology for Rapid Determination of Antibiotic Susceptibilities of Bacterial Biofilms. *Journal of Clinical Microbiology*, 1999, 37 (6), s.1771 - 1776.
103. Castillo-Juarez, I., Maeda, T., Tomás, M., *et al.*: Role of quorum sensing in bacterial infections. *World Journal of Clinical Cases*, 2015, 3 (7), s.575 - 598.
104. Li, Y.H., Tian, X.: Quorum Sensing and Bacterial Social Interactions in Biofilms. *Sensors (Basel)*, 2012, 12 (3), s.2519 - 2538.
105. Zhang, W., Li, Ch.: Exploiting Quorum Sensing Interfering Strategies in Gram-Negative Bacteria for the Enhancement of Environmental Applications. *Frontiers in Microbiology*, 2015, 6, s.1535.
106. Antunes, L.C.M., Ferreira, R.B.R., Buckner, M.M.C., *et al.*: Quorum sensing in bacterial virulence. *Microbiology*, 2010, 156, s.2271 - 2282.
107. Chadha, T.: Bacterial Biofilms: Survival Mechanisms and Antibiotic Resistance. *Journal of Bacteriology & Parasitology*, 2014, 5 (3), s.1 - 4.
108. Balczár, J.L., Subiratz, J., Borrego, C.M.: The role of biofilms as environmental reservoirs of antibiotic resistance. *Frontiers in Microbiology*, 2015, 6, s.1216.
109. Stewart, P.S., Costerton, J.W.: Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. *The Lancet*, 2001, 358 (9276), s.135 - 138.
110. Paraje, M.G.: Antimicrobial resistance in biofilm. *Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances*, 2011, s.736 - 744.
111. Anderson, G.G., O'Toole, G.A.: Innate and induced resistance mechanisms of bacterial biofilms. *Current topics in microbiology and immunology*, 2008, 312, s.85 - 105.
112. Mah, T-F.C., O'Toole, G.A.: Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. *Trends in Microbiology*, 2001, 9 (1), s.34 - 39.
113. Zhou, G., Shi, Q-S., Huang, X-M., *et al.*: The Three Bacterial Lines of Defense against Antimicrobial Agents. *International Journal of Molecular Sciences*, 2015, 16 (9), s.21711 - 21733.

114. Costerton, J.W., Stewart, P.S., Greenberg, E.P.: Bacterial Biofilms: A Common Cause of Persistent Infections. *Science*, 1999, 284, s.1318 – 1322.
115. Stewart, P.S., Costerton, J.W.: Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. *The Lancet*, 2001, 358 (9276), s.135 – 138.
116. McBain, A.J.: Chapter 4: In vitro biofilm models: an overview. *Advances in applied microbiology*, 2009, 69, s.99 - 132.
117. Lourenco, A., Coenye, T., Goeres, D.M., *et al.*: Minimum information about a biofilm experiment (MIABiE): standards for reporting experiments and data on sessile microbial communities living at interfaces. *Pathogens and Disease*, 2014, 70, s.250 - 256.
118. Macia, M.D., Molinero, E.R., Oliver, A.: Antimicrobial susceptibility testing in biofilm-growing bacteria. *Clinical Microbiology and Infection*, 2014, 20 (10), s.981 – 990.
119. Lebeaux, D., Chauhan, A., Rendueles, O., *et al.*: From *in vitro* to *in vivo* Models of Bacterial Biofilm-Related Infections. *Pathogens*, 2013, 2, s.288 - 356.
120. Parker, A.E., Walker, D.K., Goeres, D.M., *et al.*: Ruggedness and reproducibility of the MBEC biofilm disinfectant efficacy test. *Journal of Microbiological Methods*, 2014, 102, s.55 - 64.
121. Anderl, J.N., Franklin, M.J., Stewart, P.S.: Role of antibiotic penetration limitation in *Klebsiella pneumoniae* biofilm resistance to ampicillin and ciprofloxacin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2000, 44, s.1818 – 1824.
122. Genevaux, P., Muller, S., Bauda, P.: A rapid screening procedure to identify mini-Tn10 insertion mutants of *Escherichia coli* K-12 with altered adhesion properties. *FEMS Microbiology Letters*, 1996, 142, s.27 – 30.
123. Chavant, P., Gaillard-Martinie, B., Talon, R., *et al.*: A new device for rapid evaluation of biofilm formation potential by bacteria. *Journal of Microbiology Methods*, 2007, 68, s.605 – 612.
124. Innovotech - MBEC ASSAY - procedural manual [online]. [cit. 2016-02-17]. Dostupné z: <http://www.innovotech.ca/MBEC-Procedural-Manual-v1.pdf>.

125. Ceri, H., Olson, M., Morck, D., *et al.*: The MBEC Assay System: Multiple Equivalent Biofilms for Antibiotic and Biocide Susceptibility Testing. *Methods in Enzymology*, 2001, 337, s.377 - 385.
126. Harrison, J.J., Turner, R.J., Ceri, H.: High-throughput metal susceptibility testing of microbial biofilms. *BMC Microbiology*, 2005, 5, s.53.
127. Antimicrobial Sensitivity: Biofilm vs. Planktonic Cells [online]. [cit. 2016-04-16]. Dostupné z:
<http://www.cs.montana.edu/webworks/projects/stevesbook/contents/chapters/chapter011/section023/blue/page001.html>.
128. Merritt, J.H., Kadouri, D.E., O'Toole, G.A.: Growing and analyzing static biofilms. In *Current Protocols in Microbiology*, 2005, 1 (B1), s.1 - 17.
129. Heydorn, A., Nielsen, A.T., Hentzer, M., *et al.*: Quantification of biofilm structures by the novel computer program COMSTAT. *Microbiology*, 2000, 146, s.2395 – 2407.
130. Donlan, R.M., Piede, J.A., Heyes, C.D., *et al.*: Model system for growing and quantifying *Streptococcus pneumoniae* biofilms *in situ* and in real time. *Applied Environment in Microbiology*, 2004, 70 (8), s.4980 – 4988.
131. Xu, K.D., Stewart, P.S., Xia, F., *et al.*: Spatial physiological heterogeneity in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm is determined by oxygen availability. *Applied and Environment in Microbiology*, 1998, 64 (10), s.4035 – 4039.
132. Ghigo, J.M.: Natural conjugative plasmids induce bacterial biofilm development. *Nature* 2001, 412, s.442 – 445.
133. Richter, L., Stepper, C., Mak, A., *et al.*: Development of a microfluidic biochip for online monitoring of fungal biofilm dynamics. *Lab on a Chip* 2007, 7, s.1723 – 1731.
134. Pitts, B., Willse, A., McFeters, G.A., *et al.*: A repeatable laboratory method for testing the efficacy of biocides against toilet bowl biofilms. *Journal of Applied Microbiology*, 2001, 91 (1), s.110 – 117.
135. Benoit, M.R., Conant, C.G., Ionescu-Zanetti, C., *et al.*: New device for high-throughput viability screening of flow biofilms. *Applied and Environmental Microbiology*, 2010, 76 (13), s.4136 – 4142.

136. Lawrence, J.R., Swerhone, G.D., Neu, T.R.: A simple rotating annular reactor for replicated biofilm studies. *Journal of Microbiological Methods*, 2000, 42 (3), s.215 – 224.
137. Hodgson, A.E., Nelson, S.M., Brown, M.R., *et al.*: A simple *in vitro* model for growth control of bacterial biofilms. *Journal of Applied Microbiology*. 1995, 79 (1), s.87 – 93.
138. Moskowitz, S.M., Foster, J.M., Emersonand, J., *et al.*: Clinically Feasible Biofilm Susceptibility Assay for Isolates of *Pseudomonasaeruginosa* from Patients with Cystic fibrosis. *Journal of Clinical Microbiology*, 2004, 42 (5), s.1915 - 1922.
139. BioSurface Technologies Corporation. CDC Biofilm Reactor [online]. [cit. 2015-02-17]. Dostupné z: <http://www.biofilms.biz/wp-content/uploads/2014/07/CDC-Pricing.pdf>
140. Schwartz, K., Stephenson, R., Hernandez, M., *et al.*: The Use of Drip Flow and Rotating Disk Reactors for *Staphylococcus aureus* Biofilm Analysis. *Journal of Visualized Experiments*, 2010, 46, s.2470.
141. CBE drip flow reactor [online]. [cit. 2016-04-17]. Dostupné z: <https://www.biofilm.montana.edu/files/CBE/images/msucbedripflow1.jpg>.
142. Biofilms.biz [online]. [cit. 2016-06-27]. Dostupné z: <http://www.biofilms.biz/wp-content/uploads/2010/11/dk-20-rotating-disc-biofilm-reactor-300x300.png>.
143. Národní antibiotický program v České republice [online]. [cit. 2016-06-28]. Dostupné z: <http://www.tribune.cz/clanek/16873-narodni-antibioticky-program-v-ceske-republice>.
144. Krátký, M., Mandíková, J., Trejtnar, F., *et al.*: Synthesis and antimicrobial activity of sulphamethoxazole-based ureas and imidazolidine-2,4,5-triones. *Chemical Papers*, 2015, 69 (8), s.1108 - 1117.
145. Sulfomethoxazol [online]. [cit. 2016-06-28]. Dostupné z: <http://www.mpbio.com/product.php?pid=02156711&country=56>.
146. WAISSER, K.: Nové české názvosloví organické chemie. 2. přepracované vydání. Praha: Karolinum, 2006. 178s., ISBN 80 - 246 - 0910 - X.
147. Wikipedia - The Free Encyclopedia - Salicylanilide [online]. [cit. 2016-06-28]. Dostupné z: <https://en.wikipedia.org/wiki/Salicylanilide>.

148. Krátký, M., Vinšová, J.: Salicylanilide N-monosubstituted carbamates: Synthesis and in vitro antimicrobial activity. *Bioorganic and medical chemistry*, 2016, 24 (6), s.1332 - 1330.

149. Wikipedia - The Free Encyclopedia - Isoniazid [online]. [cit. 2016-06-28]. Dostupné z: <https://en.wikipedia.org/wiki/Isoniazid>.

150. Rychtarčíková, Z., Krátký, M., Gazvoda, M., *et al.*: N-Substituted 2-Isonicotinoylhydrazinecarboxamides- New Antimycobacterial Active Molecules. *Molecules*, 2014, 19, s.3851 - 3868.

151. Wikipedie - Otevřená encyklopedie - Triclosan [online]. [cit. 2016-06-28]. Dostupné z: <https://cs.wikipedia.org/wiki/Triclosan>.

152. Triclosan: What Consumers Shold Know [online]. [cit. 2016-06-28]. Dostupné z: <http://www.fda.gov/ForConsumers/ConsumerUpdates/ucm205999.htm>.