

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



**Vyhodnocení aktivity potenciálně antimikrobních
látek pomocí mikrodiluční bujónové metody**

Rigorózní práce

Konzultant: Mgr. Marcela Vejsová, Ph.D.

Hradec Králové, 2014

Mgr. Marie Márová

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

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

Rigorous thesis

Consultant: Mgr. Marcela Vejsová, Ph.D.

Hradec Králové, 2014

Mgr. Marie Márová

„Prohlašuji, že tato rigorózní práce je mým původním autorským dílem, které jsem vypracovala samostatně (pod vedením konzultanta). Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány. Práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného kvalifikačního titulu.“

V Hradci Králové, datum:

podpis:

Ráda bych poděkovala vedoucí rigorózní práce Mgr. Marcele Vejsové, Ph.D. za rady a připomínky, kterými přispěla k vypracování práce. Dále děkuji paní laborantce Idě Dufkové za ochotu a pomoc s experimentální částí. Chtěla bych poděkovat také panu Mgr. Martinovi Krátkému, Ph.D. a paní Prof. RNDr. Jarmile Vinšové, CSc. za chemické podklady k práci. V neposlední řadě děkuji mé rodině a blízkým za morální podporu.

Obsah

1. Abstrakt	8
2. Abstract	9
3. Seznam zkratek	10
4. Úvod	12
5. Zadání – cíl práce	13
6. Teoretická část	14
6.1 Bakterie versus kvasinky a vláknité houby	14
6.1.1 Bakterie.....	14
6.1.2 Kvasinky a vláknité houby	15
6.2 Testovací kmeny bakterií	16
6.2.1 <i>Staphylococcus aureus</i>	16
6.2.2 <i>Staphylococcus aureus</i> methicilin rezistentní.....	17
6.2.3 <i>Staphylococcus epidermidis</i>	17
6.2.4 <i>Enterococcus faecalis</i>	18
6.2.5 <i>Escherichia coli</i>	19
6.2.6 <i>Klebsiella pneumoniae</i>	21
6.2.7 <i>Klebsiella pneumoniae</i> ESBL pozitivní	22
6.2.8 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	22
6.3 Testovací kmeny kvasinek a vláknitých hub	24
6.3.1 <i>Candida albicans</i>	24
6.3.2 <i>Candida tropicalis</i>	26
6.3.3 <i>Candida krusei</i>	26
6.3.4 <i>Candida glabrata</i>	27
6.3.5 <i>Trichosporon asahii</i>	28
6.3.6 <i>Aspergillus fumigatus</i>	29

6.3.7	<i>Absidia corymbifera</i>	31
6.3.8	<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	32
6.4	Přehled nejvýznamnějších antibiotik	33
6.4.1	Antibiotika inhibující syntézu buněčné stěny	33
6.4.2	Antibiotika inhibující cytoplazmatickou membránu	35
6.4.3	Antibiotika inhibující syntézu bílkovin	35
6.4.4	Antibiotika inhibující syntézu nukleových kyselin	37
6.4.5	Antibiotika inhibující metabolismus kys. listové (antimetabolity)	39
6.5	Přehled nejvýznamnějších antimykotik	40
6.5.1	Polyenová antimykotika	40
6.5.2	Imidazolová antimykotika	41
6.5.3	Triazolová antimykotika.....	42
6.5.4	Ostatní antimykotika.....	42
6.6	Metody stanovení antimikrobiální aktivity in vitro	45
6.6.1	Kvalitativní testy.....	45
6.6.2	Kvantitativní testy.....	46
6.6.3	Zjišťování rezistence k antimikrobní látce	48
6.6.4	Standardní metodiky pro testování antimykotické aktivity	50
7.	Experimentální část	52
7.1	Materiál	52
7.1.1	Testovací kmeny bakterií.....	52
7.1.2	Testovací kmeny kvasinek a vláknitých hub	52
7.1.3	Pomůcky	53
7.1.4	Přístroje.....	53
7.1.5	Chemikálie.....	53
7.1.6	Růstová média	54
7.2	Postup testování	56

7.2.1 Kultivace testovacích kmenů.....	56
7.2.2 Příprava suspenzí testovacích kmenů	56
7.2.3 Příprava růstového média	57
7.2.4 Příprava ředící řady testované látky	58
7.2.5 Příprava mikrotitrační destičky	60
7.2.6 Inkubace.....	60
7.2.7 Vyhodnocení.....	61
7.3 Testované látky	62
8. Výsledky	73
8.1 4-chlor-2-[(4'-chlorfenyl) karbamoyl] fenyl karbamáty.....	74
8.2 2-[(4'-bromfenyl) karbamoyl]-4-chlorfenyl karbamáty	76
8.3 4-chlor-2-[(4'-fluorfenyl) karbamoyl] fenyl karbamáty	78
8.4 2-[[4'-(trifluormethyl) fenyl] karbamoyl]-4-chlorfenyl karbamáty	80
8.5 2-(fenylkarbamoyl) fenyl karbamáty	82
8.6 Thiokarbamáty salicylanilidů	84
8.7 2-[[4'-(trifluormethyl) fenyl] karbamoyl]-4-chlorfenyl benzoáty	86
8.8 4-brom-2-[[4'-(trifluormethyl) fenyl] karbamoyl] fenyl benzoáty	88
8.9 Derivátů 2-merkaptobenzothiazolu	90
8.10 Deriváty různých struktur.....	94
9. Diskuze	96
10. Závěr	106
11. Použitá literatura.....	107
12. Seznam obrázků	113
13. Seznam tabulek.....	115

1. Abstrakt

Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra: Katedra biologických a lékařských věd

Kandidát: Mgr. Marie Márová

Konzultant: Mgr. Marcela Vejsová, Ph.D.

Název rigorózní práce: Vyhodnocení aktivity potenciálně antimikrobních látek pomocí mikrodiluční bujónové metody

Cílem rigorózní práce bylo otestovat 35 látek a vyhodnotit jejich antimikrobiální aktivitu. Látky byly rozděleny podle struktury do 10 skupin, šlo o karbamáty a benzoáty salicylanilidů, deriváty merkaptobenzothiazolu a deriváty dalších struktur. Látky jsme testovali na 8 bakteriálních a 8 fungálních kmenech.

K testování jsme využili mikrodiluční bujónovou metodu. Metoda slouží ke kvantitativnímu stanovení citlivosti kmene k testované látce, míru citlivosti mikroba vyjadřuje minimální inhibiční koncentrace (MIC). Jamky mikrotitrační destičky byly naplněny růstovým médiem, testovanou látkou v postupně klesajících koncentracích a suspenzí kmene. MIC odpovídá koncentraci látky, která ještě potlačila růst kolonie a její jamka zůstala po inkubaci čirá.

Nejsilnější antibakteriální účinek jsme zaznamenali u látek 6. skupiny (thiokarbamáty salicylanilidů), působily na grampozitivní koky, kromě kmene *Enterococcus faecalis* (EF). Vůči EF pak působila nejsilněji látka SAL-1-Bz z 10. skupiny (deriváty různých struktur). Neobjevili jsme žádnou látku účinkující na gramnegativní tyčky. Antibakteriální účinek neprojevily látky 2., 4. a 5. skupiny.

Nejsilnější antimykotický účinek prokázaly opět látky 6. skupiny (thiokarbamáty salicylanilidů), působily však pouze na kmen *Trichophyton mentagrophytes*. Nejširší spektrum účinku měla látka ITAM-IMIN z 10. skupiny (deriváty různých struktur). Působila na všechny fungální kmeny. Antimykotický účinek neprojevily látky 2., 4., 5., 7. a 8. skupiny.

Podářilo se nám najít jak účinné, tak neúčinné látky. Nejcitlivější bakteriální kmen byl *Staphylococcus aureus*, nejcitlivější kmen fungální pak *Trichophyton mentagrophytes*.

2. Abstract

Charles University in Prague, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of: Department of Biological and Medical Sciences

Candidate: Mgr. Marie Márová

Consultant: Mgr. Marcela Vejsová, Ph.D.

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

The aim of the present thesis was to test 35 substances and evaluate their antimicrobial activity. The substances were divided by their structure in 10 groups, it concerned carbamates and benzoates of salicylanilides, derivates of mercaptobenzothiazole and derivates of other structures. The substances were tested on 8 bacterial and 8 fungal strains.

We used microdilution broth method for testing. This method serves to quantitative determination of sensitivity of the strain to the tested substance, minimal inhibitive concentration (MIC) indicates the sensitivity rate of microb. The holes of microtitration plate were filled with growth medium, tested substance in gradually decreasing concentrations and suspension of the strain. MIC conforms to the concentration of the substance which suppresses the growth of the colony and its hole stayed clear after the incubation.

The strongest antibacterial effect was noticed by the substances of the 6th group (thiocarbamates of salicylanilides), they effected on gram-positive cocci, except the strain *Enterococcus faecalis* (EF). The substance SAL-1-Bz of the 10th group (derivates of different structures) had the strongest effect on EF. We did not find any substance effecting on gram-negative bars. The substances of the 2nd, 4th and 5th group did not show any antibacterial effect.

The strongest antimycotic effect showed again the substances of the 6th group (thiocarbamates of salicylanilides), they effected only on the strain *Trichophyton mentagrophytes*. The widest spectrum of effect had the substance ITAM-IMIN of the 10th group (derivates of different structures). It effected on all of the fungal strains. The substance of the 2nd, 4th, 5th, 7th and 8th group did not show any antimycotic effect.

We succeeded in founding effective as well as ineffective substances. The most sensitive bacterial strain was *Staphylococcus aureus*, the most sensitive fungal strain then *Trichophyton mentagrophytes*.

3. Seznam zkratek

AC	<i>Absidia corymbifera</i>
AF	<i>Aspergillus fumigatus</i>
ATB	antibiotik/um, a
CA	<i>Candida albicans</i>
CG	<i>Candida glabrata</i>
CK	<i>Candida krusei</i>
CT	<i>Candida tropicalis</i>
DDST	double-disc synergy test
DMSO	dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonucleic acid
EAEC	enteroaggregative <i>Escherichia coli</i> (enteroagregativní)
EAF	enteropathogenic adherence factor
EAST	enteroaggregative stable toxin
EC	<i>Escherichia coli</i>
EF	<i>Enterococcus faecalis</i>
EHEC	enterohemorrhagic <i>Escherichia coli</i> (enterohemorhagická)
EIEC	enteroinvasive <i>Escherichia coli</i> (enteroivazivní)
EPEC	enteropathogenic <i>Escherichia coli</i> (enteropatogenní)
Eps protein	extracellular polymeric substance protein
ESBL	extended specter beta lactamase
ETEC	enterotoxigenic <i>Escherichia coli</i> (enterotoxigenní)
GISA	glycopeptide-intermediate resistant <i>Staphylococcus aureus</i>
GRE	glycopeptide-resistant <i>Enterococcus</i>
GRSA	glycopeptide-resistant <i>Staphylococcus aureus</i>
KP ESBL	<i>Klebsiella pneumoniae</i> ESBL pozitivní
KP	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
KPCs	<i>Klebsiella pneumoniae</i> carbapenemases
LT	labile toxin (labilní)
MBC	minimal bactericidal concentration (minimální baktericidní koncentrace)
MEC	minimal effective concentration (minimální efektivní koncentrace)
MH agar	Mueller-Hintonův agar

MH bujón	Mueller-Hintonův bujón
MIC	minimal inhibitory concentration (minimální inhibiční koncentrace)
MOPS	3-(N-morfolino) propansulfonová kyselina
MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> methicillin resistant
PA	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
PBP	penicilin-binding protein
PYRáza	pyrrolidonyl arylamidáza
RNA	ribonucleic acid
SA	<i>Staphylococcus aureus</i>
SE	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
ST	stable toxin (stabilní)
STX	Shiga toxin
TA	<i>Trichosporon asahii</i>
TM	<i>Trichophyton mentagrophytes</i>
VISA	vancomycin-intermediate resistant <i>Staphylococcus aureus</i>
VRE	vancomycin-resistant <i>Enterococcus</i>
VRSA	vancomycin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i>

4. Úvod

Rezistence mikroorganismů vůči antimikrobním látkám je hlavním tématem, které je v lékařské praxi řešeno denně. Rezistence nepůsobí problém pouze v České republice, jde o problém celosvětově rozšířený.

Rezistenci lze definovat jako schopnost mikroorganismu odolat inhibiční koncentraci antimikrobní látky. Rozděluje se na přirozenou (primární) a získanou (sekundární). Přirozená rezistence je vrozená a kódována již v genetické informaci. Mnohem nebezpečnější z lékařského hlediska je rezistence získaná, kdy kmen původně citlivý se rázem stane rezistentní. Tento zvrát může být realizován fenotypickou a genetickou adaptací. Při genetické adaptaci dochází ke změně v genomu nebo k přijetí genetické informace z jiné buňky (Buchta a kol., 2002).

Na vzniku rezistence se podílí jak mikroorganismus, tak vnější prostředí a především sám člověk. Nadměrným, zbytečným a nesprávným užíváním antimikrobních látek podporujeme mikroorganismy k vytvoření rezistence.

Z výše zmíněného vyplývá, že je nutné objevovat a zkoumat stále nové antimikrobní látky. Objevem nových, třeba i účinnějších, látek by se mohla snížit mikrobiální rezistence. Poklesla by morbidita a mortalita populace a zabránilo by se zbytečným úmrtím. Naším testováním jsme se proto k hledání těchto nových látek připojili.

5. Zadání – cíl práce

- Cílem práce bylo otestovat 35 potenciálně antimikrobních látek na 8 bakteriálních a 8 fungálních kmenech. Kmeny byly vybrány na základě toho, že jsou častými původci infekcí a některé z nich vykazují rezistenci k antimikrobiální terapii. K testování byla využita mikrodiluční bujónová metoda, sloužící ke kvantitativnímu stanovení citlivosti testovacího kmene.
- Teoretická část – rešerže literatury, citace zdrojů
- Experimentální část – zvládnutí příslušné metodiky, správná laboratorní praxe
- Výsledky – zpracování a interpretace výsledků
- Diskuze – vyhodnocení výsledků, diskuze na dané téma, konfrontace s teoretickou částí
- Závěr – shrnutí výsledků

6. Teoretická část

6.1 Bakterie versus kvasinky a vláknité houby

6.1.1 Bakterie

Bakterie jsou prokaryotické jednobuněčné organismy. Velikost bakteriálních buněk se pohybuje v rozmezí 0,3 – 25 μm . Vyskytují se jako kulovité koky, podlouhlé tyčky či vlákna. Tyčky jsou uspořádané většinou jednotlivě, koky bývají přichyceny mezi sebou a tvoří řetízky či různé shluky (Votava, 2005).

Cytoplazma bakterií je obklopena cytoplazmatickou membránou a pevnou buněčnou stěnou. Podle stavby buněčné stěny rozdělujeme bakterie na grampozitivní a gramnegativní. Na povrchu mohou mít bakterie pouzdro, vrstvu slizu, bičíky či fimbrie. V cytoplazmě se nachází nukleoid, plazmid, ribozomy, inkluzní tělíska, vakuoly a granula. Nukleoid je tvořen nejčastěji cirkulární molekulou DNA. Jde o nepravé jádro, které není ohraničeno membránou a neobsahuje jadérko. V buňce se může nacházet i několik nukleoidů (Votava, 2005; Kim and Gadd, 2008).

6.1.2 Kvasinky a vláknité houby

Kvasinky a vláknité houby řadíme do říše hub (Fungi), jejich strukturní základ tvoří eukaryotická buňka. Kvasinky jsou organismy jednobuněčné, vláknité houby zase mnohobuněčné. Velikost eukaryotické buňky se pohybuje v rozmezí 10 – 100 μm . Od prokaryotické buňky se liší především strukturou jádra a obsahem membránových organel (Bednář a kol., 1996).

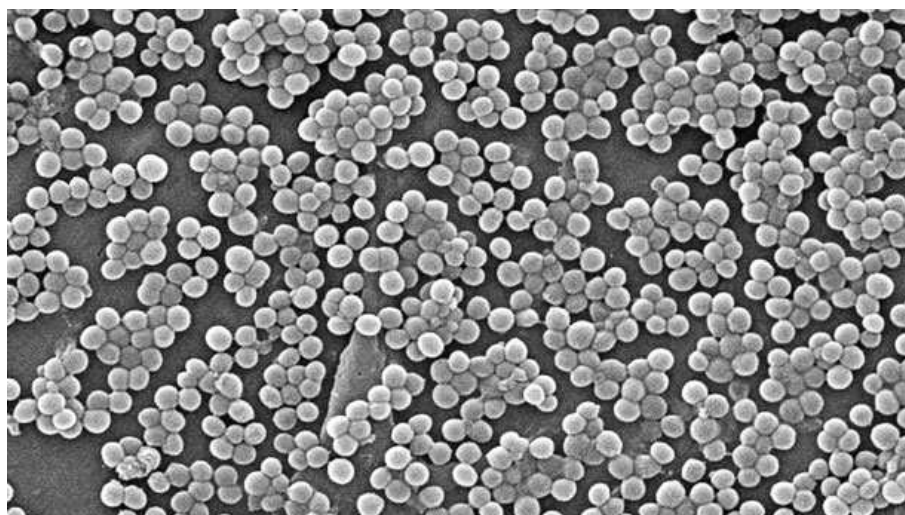
Cytoplazma eukaryotické buňky kvasinek a vláknitých hub je obklopena cytoplazmatickou membránou a buněčnou stěnou. Hlavní chemickou složkou buněčné stěny je chitin. V cytoplazmě se nachází jádro, ribozomy, endoplazmatické retikulum, Golgiho aparát, mitochondrie a cytoskeletální systém. Jádro je pravé, DNA zde najdeme ve formě chromozomů, je ohraničeno dvojitou pórovitou jadernou membránou a má jedno nebo více jadérek. Buňka neobsahuje plastidy s chlorofylem, tudíž není schopna fotosyntézy (Bednář a kol., 1996; Kar, 2008).

Houby způsobují různé chorobné stavy, mezi něž patří mykózy, mykotoxikózy, mykoalergózy a mycetizmy. Mykózy jsou pravá infekční onemocnění vyvolaná vláknitými houbami a kvasinkami. Rozdělujeme je na povrchové, orgánové a systémové. Mykotoxikózy jsou chorobné stavy vyvolané metabolickými produkty hub. Dělí se na houbové intoxikace, způsobené požitím houby, a klasické mykotoxikózy, jež působí toxické metabolity uvolněné do okolí. Mykoalergóza je stav přecitlivělosti na metabolické produkty hub, ale i samotnou houbu. Mycetizmus je chorobný stav vyvolaný mycetickými elementy, které způsobují podráždění tkáně (Bednář a kol., 1996).

6.2 Testovací kmeny bakterií

6.2.1 *Staphylococcus aureus* (SA)

Rod *Staphylococcus* zahrnuje grampozitivní, nesporulující, nepohyblivé často opouzdřené sférické fakultativně anaerobní koky s průměrnou velikostí kolem 1 μm . Vyskytují se jednotlivě, ve dvojicích nebo v typických shlucích hroznovitého tvaru (Obr. 1). Vytváří šedé nebo bílé kolonie. Kolonie, které tvoří pigmenty, mohou být žlutě až oranžově zbarvené. Jsou rezistentní k nepříznivým vlivům prostředí. Na základě produkce koagulázy se dělí na koaguláza-pozitivní a koaguláza-negativní stafylokoky. Koaguláza je enzym přeměňující fibrinogen na fibrin, čímž dochází ke koagulaci plazmy (Bednář a kol., 1996).



Obrázek 1 Hroznovité kolonie *S. aureus*

Zdroj: <http://www.biotechnologie.de/BIO/Navigation/DE/root,did=165096.html>

SA patří mezi biochemicky nejaktivnější bakteriální druhy, je to koaguláza-pozitivní stafylokok. Produkuje antigenní látky buněčné stěny (adheziny, protein A, aglutinogeny, kyselina teichoová, peptidoglykan; zevně buněčné stěny navíc pouzdro), exoenzymy (plazmakoaguláza, stafylokináza, termorezistentní nukleáza, hyaluronidáza, hemolyzin alfa, beta, gama, delta, leukocidin, penicilináza, protéza, lipáza,...), toxiny (toxin toxického šokového syndromu, enterotoxiny A – R, exfoliantiny), které se následně uplatňují jako faktory virulence. Je dobře adaptovaný na kolonizaci kůže a sliznic. Patří mezi nejčastější původce pyrogenních infekcí u člověka (Murray et al., 2013).

6.2.2 *Staphylococcus aureus* methicilin rezistentní (MRSA)

SA odolný i k polosyntetickým penicilinům, působí problémy v nemocnicích, způsobuje nozokomiální infekce. Podstatou rezistence je gen *mecA*, jenž kóduje pozměněný druh penicilinvázajícího proteinu (PBP). MRSA není rezistentní jen vůči β -laktamovým antibiotikům (ATB), ale i jejich kombinacím s inhibitory β -laktamázy a k řadě dalších ATB (Votava a kol., 2003).

Záložním ATB byl dříve vyčleněn glykopeptid vankomycin (později teikoplanin). Začaly se však objevovat kmeny s menší citlivostí i na něj vancomycin-intermediate resistant *Staphylococcus aureus* (VISA) a zároveň méně citlivé i vůči teikoplaninu glycopeptide-intermediate resistant *Staphylococcus aureus* (GISA). Tato částečná rezistence je způsobena silnou stěnou peptidoglykanu stafylokoků. V roce 2002 byl izolován první zcela rezistentní kmen vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* (VRSA) a zároveň rezistentní i na teikoplanin glycopeptide-resistant *Staphylococcus aureus* (GRSA). Tuto rezistenci vůči glykopeptidům způsobuje gen *vanA* (Baddour, 2010).

Ve fázi vývoje (preklinické a klinické hodnocení) jsou nové chinolony s potenciální anti-MRSA aktivitou. Jde o některé nově syntetizované chinolony a sloučeniny odvozené od 6-fluorochinolonů, 6-fluoronaftyridonů, 6-desfluorochinolonů, chinazolindionů a 4-chinolizinonů (Emami, 2010).

6.2.3 *Staphylococcus epidermidis* (SE)

Patří mezi koaguláza-negativní stafylokoky, je to oportunní patogen, napadající imunokompromitované pacienty. Tvoří součást lidské mikroflóry, běžně se vyskytuje na kůži a sliznicích člověka, odkud dochází ke kontaminaci. Velmi dobře adheruje na cizí tělesa, která přichází do styku s tělem pacienta. Tento fakt působí problém především v nemocnicích (Bednář a kol., 1996).

SE produkuje do okolí polysacharidovou slizovou vrstvu. Množením SE obalených slizovou vrstvou vzniká tzv. biofilm, jenž upevňuje adhezenci a zabraňuje průniku ATB, protilátek a fagocytů. Testováním bylo prokázáno, že SE adheruje lépe k hydrofobním povrchům (Cerca et al., 2005).

Na rozdíl od SA neprodukuje koagulázu, pigment, hemolyzin alfa, beta, leukocidin, fibrinolysin a termostabilní nukleázu. Neprodukuje ani toxiny (enterotoxiny,

exfoliantiny, toxin toxického šokového syndromu). SE způsobuje nozokomiální nákazy, je multirezistentní k ATB, dokonce ve větším rozsahu než SA (Bednář a kol., 1996).

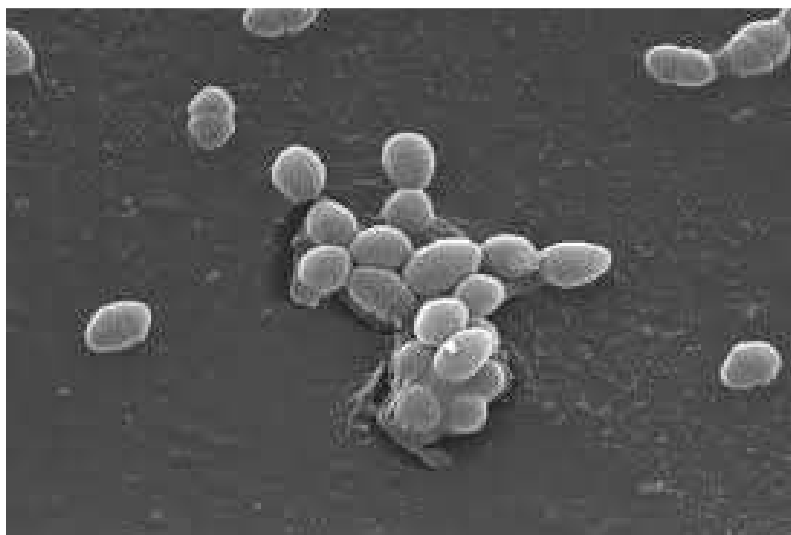
6.2.4 *Enterococcus faecalis* (EF)

Rod *Enterococcus* zahrnuje grampozitivní, nesporulující, fakultativně anaerobní koky. Nejčastěji se vyskytují ve dvojicích a krátkých řetězcích (Obr. 2). Vyznačují se kultivační nenáročností a odolností vůči vnějším vlivům (vysoké pH, hypertonické prostředí, vyšší i nižší teploty). Tvoří součást mikroflóry tlustého střeva.

Jsou to kataláza-negativní koky. Nesou charakteristický skupinový stěnový antigen D, jenž je vázán na cytoplazmatickou membránu a je tvořen glycerol-teichoovou kyselinou. Faktory virulence jsou adheziny, umožňující vazbu na epitel (fimbrie, povrchové polysacharidy), dále agregační substance, jež chrání před fagocytózou a usnadňuje invazi a v neposlední řadě také Eps protein, napomáhající adhezi a tvorbě biofilmu. Z exoenzymů produkují některé druhy cytolytický hemolysin a želatinázu. Dále produkují enterociny, které působí negativně na sousední bakteriální mikroflóru. Enterokoky jsou podmíněné patogeny, narůstá u nich rezistence k ATB, čímž vyvolávají stále častěji se vyskytující nozokomiální nákazy (Julák, 2006).

Enterokoky jsou rezistentní k cefalosporinům. Citlivost projevují k ampicilinu a jeho kombinaci s inhibitory β -laktamázy (Votava a kol., 2003). V praxi se k léčbě užívaly účinné kombinace gentamicinu s penicilinem nebo vankomycinem. V roce 1990 byla však zaznamenána rezistence na penicilin i gentamicin. Nedávno se navíc objevily vancomycin-resistant enterococci (VRE) a zároveň glycopeptide-resistant enterococci (GRE). K léčbě se dnes proto užívají novější ATB jako linezolid, tigecyklin, chinupristin, dalfopristin, nové chinoliny,...(Wilks et al., 2003).

Na vzniku rezistence se výrazně podílejí geny. Rezistence EF na vankomycin je kódována geny vanA, vanB, vanC. VanC je přirozený gen rezistence enterokoků a není přenosný. Naopak geny vanA a vanB jsou kódovány v plazmidech, jejichž přenosem (při konjugaci buněk) EF rezistenci získává. Plazmid je malá kruhová molekula DNA schopná replikace. Kóduje doplňující vlastnosti buněk a přispívá k získávání nových vlastností (Votava a kol., 2003; Wardal et al., 2013).



Obrázek 2 *E. faecalis* zachycen rastrovacím elektronovým mikroskopem

Zdroj: http://pl.wikipedia.org/wiki/Plik:Enterococcus_faecalis_SEM_01.png

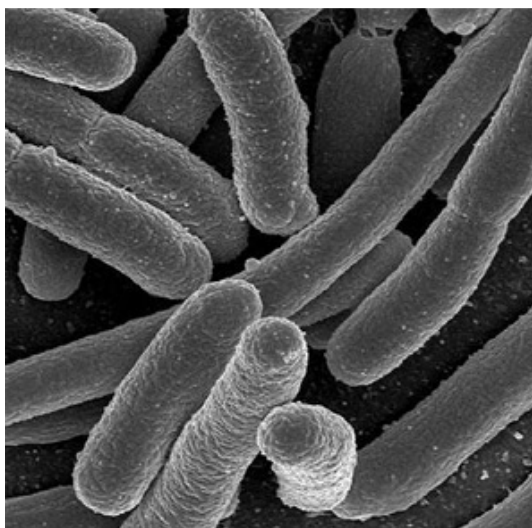
6.2.5 *Escherichia coli* (EC)

EC je gramnegativní nesporulující fakultativně anaerobní bakterie tvaru tyčky (Obr. 3). Tyto tyčky se pohybují, mají bičíky, fimbrie, některé druhy tvoří pouzdra, a tak vznikají kolonie s hlenovitým charakterem. EC je běžný komenzál v tlustém střevě. Jsou kataláza-pozitivní a netvoří oxidázu, štěpí glukózu a laktózu za tvorby plynu, tvoří indol a neštěpí močovinu (Torres, 2010; Bednář a kol., 1996).

Mezi antigenní struktury patří stěnový endotoxin (lipopolysacharidový komplex), což je charakteristická složka stěny gramnegativních bakterií. Skládá se z hydrofilní polysacharidové komponenty, jež je tvořena O specifickým polysacharidem, který je dále spojen s oligosacharidem a hydrofobním lipidem A. Stěnové O antigeny umožňují sérotypizaci v rámci rodu, povrchový kapsulární antigen K je tvořen polysacharidy a povrchové bičíkové H antigeny jsou proteinové povahy s termolabilními vlastnostmi. Výše zmíněné antigenní struktury působí jako faktory virulence.

Na základě antigenní struktury dělíme EC na několik sérotypů. Somatických O antigenů je 167, k nim se váží K a H antigeny, vzniká tak 240 sérotypů.

Na základě patogenního mechanismu působení rozdělujeme kmen EC na enterotoxigenní, enteroinvazivní, enteropatogenní, enteroagregativní a enterohemorhagický (Bednář a kol., 1996).



Obrázek 3 Tyčinkovitý tvar *E. coli*

Zdroj: http://chile-hoy.blogspot.cz/2011_12_25_archive.html

Enterotoxigenní EC (ETEC) – průjemy kojenců a cestovatelů v rozvojových zemích, neinvazivní, průjemy bez zánětu a horečky. Produkuje tepelně labilní toxin (LT) a tepelně stabilní toxin (ST), má fimbriální adheziny, které se váží na specifické receptory enterocytů.

Enteroinvazivní EC (EIEC) – invazivní, proniká do epitelálních buněk střeva, množí se zde, destruuje tyto buňky, způsobuje krvavý průjem s horečkou a zánětem. Má nefimbriální adheziny a vnější invazivní membránový protein. Neprodukuje LT ani ST, není pohyblivá, napadá a ničí střevní tkáň.

Enteropatogenní EC (EPEC) – nejčastější příčinou dětského průjmu v rozvojových zemích, vodnatý průjem, někdy krvavý, bez horečky, někdy zánět, mírně invazivní. Patogenezi způsobuje faktor adherence EAF (napomáhá přilnutí bakterie) a nefimbriální adhezin intimin (vnější membránový protein). Neprodukuje ST ani LT toxiny.

Enteroagregativní EC (EAEC) – přetrvávající průjemy malých dětí, připojuje se k tkáni agregačním způsobem, drží na sliznici střeva a způsobuje nekrvavý průjem, bez horečky a zánětu. Produkuje toxin EAST (enteroagregativní ST) a hemolysin.

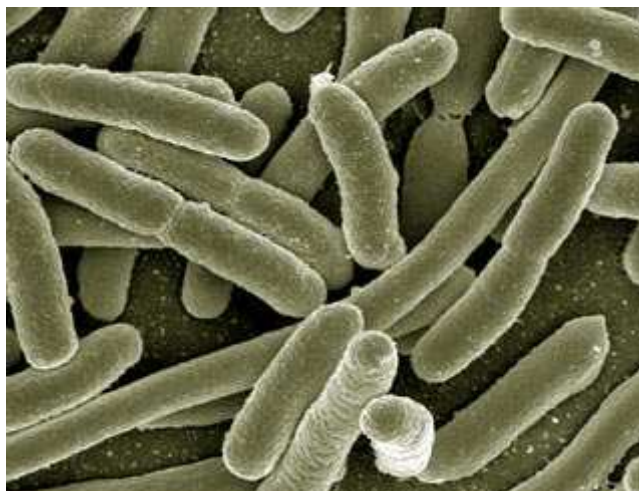
Enterohemoragická EC (EHEC) – hemoragická kolitida, krvavé průjemy se zánětem, invazivní, při invazi zapojeny fimbrie. Produkuje verotoxiny a Shiga toxin (STX). Způsobuje až hemolyticko-uremický syndrom, kdy dochází k akutnímu renálnímu selhání, trombocytopenii a hemolytické anemii. Tento stav může končit až smrtí (www.textbookofbacteriology.net).

6.2.6 *Klebsiella pneumoniae* (KP)

KP je gramnegativní nesporulující fakultativně anaerobní bakterie tvaru tyčky (Obr. 4). Tato bakterie se nepohybuje, vytváří polysacharidová pouzdra, kolonie mají hlenovitý charakter. Tvoří součást lidské mikroflóry, běžně se vykytuje v trávicím traktu a dýchacích cestách (microbewiki.kenyon.edu).

Významná je její ureázová aktivita. Působením enzymu ureázy dochází k přeměně močoviny na amoniak a oxid uhličitý (Vokurka a kol., 2008). Dále vykazuje pozitivní reakci na PYR-test. Principem tohoto testu je detekce pyrrolidonylpeptidázové (enzym PYRáza) aktivity, která je typická pro enterokoky (www.itest-plus.cz).

Hlavním faktorem virulence je pouzdro. Podle pouzdrového polysacharidového antigenu K, rozlišujeme 77 sérotypů KP. Liší se specifitou somatického antigenu O. KP je podmíněný patogen, zvyšuje se jeho rezistence k ATB a stále častěji vyvolává nozokomiální nákazy (Bednář a kol., 1996).



Obrázek 4 Tyčinkovitý tvar *K. pneumoniae*

Zdroj:http://klebsiella-pneumoniae.org/klebsiella_pneumoniae_urinary_tract_infection.html

6.2.7 *Klebsiella pneumoniae* ESBL pozitivní (KP ESBL)

Tato *Klebsiella* vykazuje stejné charakteristiky jako KP. Liší se pouze tím, že produkuje širokospektré β -laktamázy (ESBL = extended specter beta lactamase). Tyto β -laktamázy hydrolyzují β -laktamový kruh β -laktamových ATB, působí i na ty β -laktamy, které jsou chráněny inhibitory β -laktamáz (kyselina klavulanová, sulbaktam,...). KP ESBL bývá polyrezistentní, je proto významným původcem nozokomiálních infekcí. Je citlivá ke karbapenemům, cefalosporinům (4. generace), aminoglykosidům, nitrofurantoinu a kolistinu. Přesto je léčba těmito ATB složitá a komplikovaná (Votava a kol., 2003).

Ještě větší hrozbou posledních let je však KP produkující karbapenemázy (KPCs = *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases). Působí nozokomiální nákazy a systémové infekce. Má sníženou citlivost ke všem β -laktamovým ATB. Karbapenemy jsou v léčbě infekcí způsobených KPCs neúčinné. K dispozici je pouze omezené množství zbylých ATB, účinkujících na KP ESBL. Mortalita na nákazy vyvolané KPCs je vysoká (Nordmann et al., 2009).

6.2.8 *Pseudomonas aeruginosa* (PA)

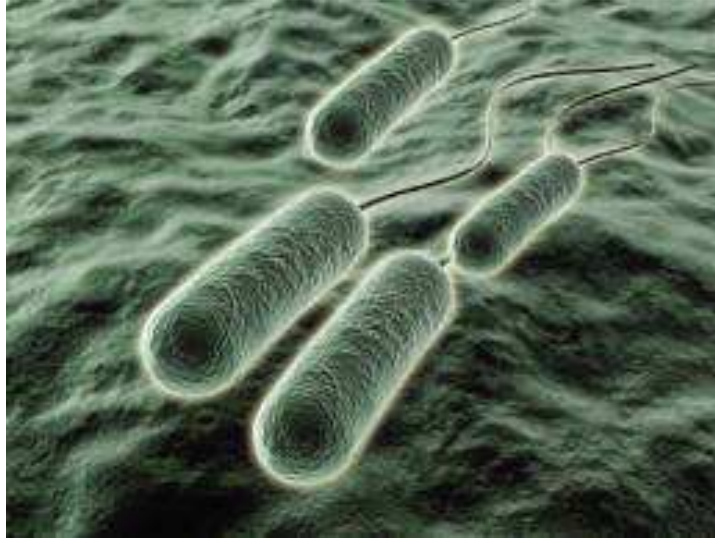
Jedná se o gramnegativní saprofytickou aerobní tyčku. PA je pohyblivá, na povrchu buňky nese polární bičík, bývá obalena slizovou vrstvou (Obr. 5). Je kataláza a oxidáza-pozitivní, nefermentuje sacharidy (Bednář a kol., 1996). PA tvoří typický biofilm, je zároveň modelovým organismem pro studium biofilmu. K tvorbě biofilmu přispívají nejméně 3 různé polymerní exopolysacharidy. Tyto polymery přispívají interaktivně k tvorbě biofilmu (Ghafoor et al., 2011).

Podle termostabilních somatických antigenů O rozlišujeme 17 sérotypů PA, další antigeny jsou vázány na bičíky (H) a fimbrie (K).

Na patogenitě se uplatňují jak faktory vázané na bakteriální buňku (extracelulární polysacharid, slizová vrstva, stěnový lipopolysacharid), tak i extracelulární produkty (enzymy, toxiny, pigment). Extracelulární polysacharid alginát obaluje kolonie PA a chrání je. Z extracelulárních enzymů jsou významné proteolytické enzymy. Štěpí kasein, fibrin, elastin a kolagen. Dalšími exolátkami jsou hemolysin, pyocyanin, exotonin, cytotoxin, leukocidin,... atd. (Bednář a kol., 1996).

Problém působí PA hlavně v nemocnicích. V nemocničním prostředí dobře přežívá, vyskytuje se zde ve velkém množství, je proto významným původcem

nozokomiálních nákaz. Napadá především pacienty s oslabeným imunitním systémem (cystická fibróza, rakovina, AIDS). Vykazuje vysoký stupeň rezistence vůči ATB (microbewiki.kenyon.edu).



Obrázek 5 *P. aeruginosa* s bičíkem

Zdroj: <http://www.fromquarkstoquasars.com/stress-and-heart-attacks/>

6.3 Testovací kmeny kvasinek a vláknitých hub

Testovací kmeny kvasinek a vláknitých hub z říše hub rozdělujeme do následujících oddělení (Tab. 1) (www.biolib.cz).

Tabulka 1 Rozdělení testovacích kvasinek a vláknitých hub

ŘÍŠE	ODDĚLENÍ	TESTOVACÍ MYKOORGANISMY
Fungi	Ascomycota (houby vřeckovýtrusé)	<i>Candida albicans</i> , <i>Candida tropicalis</i> , <i>Candida krusei</i> , <i>Candida glabrata</i> , <i>Aspergillus fumigatus</i> , <i>Trichophyton mentagrophytes</i>
	Basidiomycota (houby stopkovýtrusé)	<i>Trichosporon asahii</i>
	Zygomycota (houby spájkivé)	<i>Absidia corymbifera</i>

6.3.1 *Candida albicans* (CA)

Říše: Fungi, Oddělení: Ascomycota, Třída: Saccharomycetes

Mykoorganismy rodu *Candida* označujeme jako dimorfní houby. Výraz dimorfní (bifázické) houby znamená, že se mohou vyskytovat jak ve formě kvasinek, tak ve formě vláknitých hub. Kvasinkové buňky tzv. blastokonidie (blastospory) jsou oválné nebo kulovité, jejich velikost se pohybuje kolem 3 – 5 μm. Protáhlé blastokonidie mohou vytvářet větvené řetízky a vznikají tak tzv. pseudohyfy. Kandidy tvoří také hyfy pravé, jež jsou složeny z více buněk. Kvasinková forma se množí nepohlavně pučením. Na rozdíl od ostatních dimorfních hub se kandidy ve tkáni vyskytují jak jako kvasinky, tak jako vlákna.

Kandidy jsou růstově nenáročné aerobní mykoorganismy. Tvoří dva typy kolonií. První typ je smetanově bílý, hladký, kolonie jsou vypouklé, mazlavé konzistence a příjemné vůně. Buňky v kolonii mají oválný nebo kulovitý tvar. Druhý typ kolonií je tvořen protáhlými blastokonidii, kolonie bývají šedě zbarvené.

Buněčná stěna kandid obsahuje komplex antigenů (polysacharidy, proteiny a glykoproteiny). Díky tomuto komplexu antigenů můžeme kandidy rozlišit na různé sérotypy. Hyfy a zárodečné klíčky kandid se liší od blastokonidií některými

povrchovými znaky. Kandidy produkují také solubilní antigeny, příkladem může být protéza.

Kandidy jsou saprofytické mykoorganismy, vyskytují se u zdravých lidí jako přirozená součást mikroflóry. Kolonizují gastrointestinální trakt (orofarynx, rektum), genitální trakt a částečně i kůži. Odtud dochází při jejich přemnožení k endogenním infekcím. Některé kandidy jsou též nozokomiální patogeny, rozlišujeme kmeny virulentnější a méně virulentní. Mykoorganismy rodu *Candida* jsou původci povrchových i systémových mykóz, jejichž význam v posledních letech značně narůstá. Nejčastějším patogenním původcem tohoto rodu je druh CA. Nové epidemiologické studie ukazují na lehký mykologický posun od CA k non-albicans *Candida* druhům.

Charakteristickou vlastností CA je schopnost germinace. Pojem germinace znamená, že kandida vytváří zárodečné klíčky. Zárodečné klíčky jsou jemná vlákénka, vyrůstající z blastokonidií. Z nich se vytvářejí následně pravé hyfy. Za určitých podmínek tvoří CA rezistentní buňky tzv. chlamydozpy (Obr. 6). Mají kulovitý tvar, silné stěny, jsou větší velikosti a bývají umístěny po stranách a na koncích hyf.

Z biochemického hlediska kandidy zkvašují různé cukry. CA štěpí glukózu, maltózu, sacharózu, neštěpí však laktózu.

CA je potenciálně patogenní kvasinka. Jako komenzál se vyskytuje u zdravého hostitele. Plasticita genomu přispívá k rychlým změnám vlastností při kontaktu s hostitelem, a proto je CA schopna snadno a rychle se adaptovat k různým vnějším podmínkám. K patogenitě CA přispívá adherence, která je rychlá a silná. CA má typický adhezín mannanprotein, který vytváří na povrchu CA fibrilární vrstvu, chrání kandidu před fagocytózou a zvyšuje její virulenci. K patogenitě dále přispívá germinace a tvorba hyf. Klíčící buňky lépe adherují a germinací se snadno uvolňují z fagocytů. Vlákňité houby prorůstají do tkáně a jsou virulentnější než kandidy. Patogenní druhy CA produkují kyselou proteázu, která svým keratolytickým účinkem podporuje invazi kandidy do kůže. K virulenci přispívá zřejmě i fosfolipáza.

CA způsobuje povrchové i systémové kandidózy. Může jít o kandidózy primární, kdy je hostitel napaden vysoce virulentním kmenem. Kandidózy však mohou být i sekundární, kdy jsou napadeny osoby s oslabeným imunitním systémem. CA je stále častějším původcem nozokomiálních mykóz, jejichž výskyt v posledních desetiletích mnohonásobně stoupl (Bednář a kol., 1996).



Obrázek 6 Chlamydospory *C. albicans*

Zdroj: <http://www.microbeworld.org/component/jlibrary/?view=article&id=1097>

6.3.2 *Candida tropicalis* (CT)

Říše: Fungi, Oddělení: Ascomycota, Třída: Saccharomycetes

Dimorfní kvasinka, vyskytuje se ve formě kvasinky i vláknité houby. Nejčastěji se s ní setkáváme u imunokompromitovaných pacientů s nádorovým onemocněním, způsobuje kandidózy a je rozšířena po celém světě. V poslední době se snižuje její citlivost k flucytosinu a amfotericinu B. Testy na zvířecích modelech ukázaly, že CT je méně patogenní než CA.

CT tvoří součást přirozené mikroflóry člověka, najdeme ji na kůži a v trávicí soustavě zdravých lidí. V přírodě se vyskytuje v zemi a ve vodě. V průmyslu se využívá při výrobě polyesteru, polyamidu, aroma a při formaci xylitolu. Xylitol je cukerný alkohol, jímž můžeme nahradit kalorickou sacharózu (Reiss et al., 2002).

6.3.3 *Candida krusei* (CK)

Říše: Fungi, Oddělení: Ascomycota, Třída: Saccharomycetes

CK je dimorfní kvasinka oválného tvaru, jež by se dala tvarově přirovnat k zrnku rýže. Je méně patogenní než CA. Lehce se odlišuje svými vlastnostmi od charakteristických znaků rodu *Candida*, především strukturou (mannan buněčné stěny) a některými metabolickými rysy. Kvasí pouze glukózu.

CK obvykle najdeme ve dvou morfologických formách, což potvrzuje znak dimorfní houby. Forma kvasinky a vláknité houby se vyskytuje současně v rostoucí

kultuře a nejde je jednoduše oddělit. Roste v koloniích s matným nebo drsným bělavě žlutým povrchem.

V poslední době je to významný klinický patogen s širokým spektrem klinických projevů (fungémie, artritida, endokarditida,... atd.). Obvykle napadá imunokompromitované pacienty v nozokomiálním prostředí. Problémem současnosti je výrazné navýšení infekcí způsobených CK. Důvodem je vysoká incidence rezistence této kvasinky k antimykotikům. Svůj podíl na tom mají imunodeficiencie pacientů a virové infekce. CK je primárně rezistentní k flukonazolu.

Starší zprávy popisují CK jako organismus výjimečně izolovaný a malé klinické významnosti. Dnes je to významný nozokomiální patogen (Samaranayake Y. H. et Samaranayake L. P., 1994).

6.3.4 *Candida glabrata* (CG)

Říše: Fungi, Oddělení: Ascomycota, Třída: Saccharomycetes

Na rozdíl od ostatních druhů rodu *Candida* je CG nedimorfní kvasinka, vyskytuje se ve formě malých blastokonidií. Další charakteristikou je absence tvorby pseudohyf. Kolonie mají krémovou barvu a lesklý hladký povrch (Whelan et al., 1984). Kvasí a asimiluje pouze glukózu a trehalózu. Najdeme ji jako součást mikroflóry zdravých jedinců, může být ale zároveň i patogenem.

Do nedávné doby byla považována za nepatogenního komenzála lidských slizničních tkání. Se zvýšením užívání imunopresiv a širokospektrých antimykotik se zvýšila frekvence infekcí působených touto kvasinkou a ta nabyla na významu. Některé druhy CG mohou být odolné vůči antimykotikům, především azolům, které jsou účinné při léčbě infekcí vyvolaných jinými druhy rodu *Candida*. Léčba proto vyžaduje amfotericin B, flucytosin nebo echinokandiny. CG způsobuje, jako ostatní druhy rodu *Candida*, nozokomiální infekce.

Některé druhy CG mohou být k azolům citlivé, léčba flukonazolem se však nedoporučuje z důvodu vzniku sekundární rezistence (Fidel et al., 1999). Až schválení amfotericinu B, jako perorální suspenze, se stalo novou možností léčby pacientů rezistentních vůči azolům, ale i v tomto případě dochází často k recidivě (Nguyen et al., 1996).

6.3.5 *Trichosporon asahii* (TA)

Říše: Fungi, Oddělení: Basidiomycota, Třída: Tremellomycetes (houby mozkovkovité)

TA řadíme mezi kvasinky. Vytváří charakteristické hyfy, pseudohyfy, arthrokonidie a blastokonidie, nese tedy znaky dimorfní houby (Obr. 7). Kolonie jsou lesklé a hladké, šedě až krémově zbarvené. Nachází se v půdě, ve vzduchu, v řekách, odpadních vodách, vyskytuje se ale i na zvířatech a lidské kůži. Může kolonizovat mukózní povrch orofarynx, dolní část gastrointestinálního traktu a kůži. Vzácně kolonizuje neživé části prostředí.

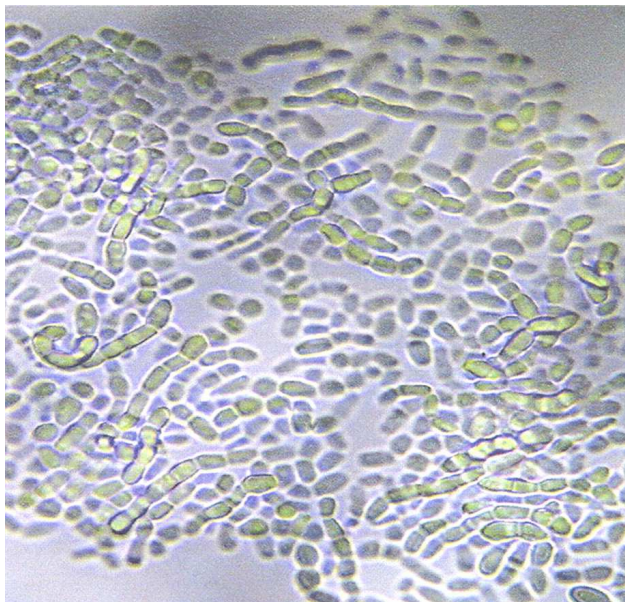
Je rizikovým faktorem pro vznik infekce především u lidí s oslabenou nebo zvrácenou imunitou. Jedná se o pacienty s nádorovým onemocněním (leukemie) a neutropenií, riziko invaze je při transplantacích, léčbě kortikoidy, hepatitidě a nitrožilním podáváním léků. TA vniká do těla přes dýchací nebo gastrointestinální trakt, dále přes katetry a různé nástroje používané v nemocnicích.

Vyvolává onemocnění nazývané trichosporonóza. Trichosporonózy klasifikujeme na povrchové a hloubkové. Povrchové zahrnují bílou piedru, onychomykózy a otomykózy (Dismukes et al., 2003). Bílá piedra je charakterizována bílými až krémovitě zbarvenými uzlíky ve vlasech. Růst houby okolo a uvnitř vlasu většinou vyžaduje skalpování vlasů. TA může navíc napadat vousy a ochlupenou část pánevní oblasti. Vyskytuje se především v tropických oblastech. (Mishra et Agrawal, 2013). Hloubkové trichosporonózy jsou invazivní, dělíme je na lokalizované a rozšířené do hluboké tkáně. Napadají jeden nebo více orgánů, nejčastěji však plíce. Rozšířené hloubkové trichosporonózy mohou být akutní nebo chronické, jsou to život ohrožující infekce. Způsobují úmrtí v 60 – 70 % případů. Skryté perzistující infekce a další infekce přispívají k mortalitě (Dismukes et al., 2003).

Optimální terapie trichosporonózy zatím nebyla ustanovena. V minulosti byla klasickým postupem léčba amfotericinem B s případným přidáním flucytosinu jako kombinační terapie (Walsh, 1989). Nicméně byly objeveny kmeny rezistentní na amfotericinu B. Testování na zvířecích modelech ukázalo, že ne polyeny, ale azoly jsou účinnější v eradikaci TA.

Moderní léčba využívá amfotericin B. Pokud samotný amfotericin B nestačí, přidává se flucytosin nebo flukonazol. V této kombinaci je působení synergické. Dále můžeme přidat ATB levofloxacin pro ještě lepší eradikaci (Dismukes et al., 2003).

Novější triazoly (vorikonazol, ravukonazol, posakonazol) ukázaly oproti primárním triazolům, že jsou aktivnější k více druhům kvasinek a plísní. Všechny tři působily *in vitro* velmi dobře na většinu izolátů TA. Nejnovější zprávy informují o výskytu multirezistentních kmenů TA (Wolf et al., 2001).



Obrázek 7 Kvasinka *T. asahii*

Zdroj: <http://jcm.asm.org/content/49/12/4405/F4.expansion.html>

6.3.6 *Aspergillus fumigatus* (AF)

Říše: Fungi, Oddělení: Ascomycota, Třída: Eurotiomycetes

Rod *Aspergillus* (kropidlák) zahrnuje asi 150 druhů, ne všechny druhy jsou však patogenní pro člověka. Nejčastějšími původci mykóz jsou *A. fumigatus*, méně *A. flavus* a *A. niger*.

AF je vláknitá houba. Hyfy jsou rozděleny přehrádkami a vytvářejí mycelium. Mycelium se dělí na dvě části, dle jeho umístění a funkce. Mycelium vegetativní (bazální) roste do kultivační půdy a čerpá z ní živiny. Mycelium vzdušné (reprodukční) je tvořeno reprodukčními orgány. Konce vláken jsou rozšířeny v konidiofor, jenž nese volné konidie (plísňové spory), které jsou řetízkově uspořádané a slouží k rozmnožování (Obr. 8).

Aspergily jsou poměrně nenáročné mykoorganismy, které rostou na různých půdách. Kolonie jsou chmýřité, zbarvení odpovídá barvě konidií, může být žluté, šedozelené nebo černé.

AF patří k nejrozšířenějším a nejvýznamnějším houbám vyskytujícím se v okolí člověka. Jsou to saprofyty, nachází se po celém světě. K přenosu na člověka dochází vzdušnou cestou, kdy dochází k inhalaci konidií. Někdy mohou být přítomny v dýchacích cestách plísňové spory a onemocnění nepropukne.

AF ohrožuje člověka intoxikací a infekcí. Produkuje mykotoxiny, které jsou hepatotoxické a kancerogenní. Způsobuje infekční onemocnění, které se nazývá aspergilóza. Postihuje především dýchací cesty, choroba může mít několik projevů. Častý je ohraničený aspergilom, astma, akutní pneumonie a bronchopneumonie. Další klinické projevy jsou pleuritidy, sinusitidy, otitidy, postižení očníce a centrální nervové soustavy.

Jsou to potenciálně patogenní houby. Onemocnění vzniká na základě masivní infekce a virulence kmene, svou roli hraje i zvýšená citlivost hostitele. Napadeni bývají často jedinci s oslabenou imunitou. U těžce nemocných se může rozšířit do různých orgánů. Je to významný původce nozokomiálních mykóz, jejichž nebezpečí narůstá. Ohroženi jsou pacienti se sníženou imunitou, po transplantacích, těžkých operacích a lidé inhalující vzduch kontaminovaný konidiami (Bednář a kol., 1996).



Obrázek 8 Konidiofor a konidie *A. fumigatus*

Zdroj: <http://www.eng.yale.edu/peccialab/>

6.3.7 *Absidia corymbifera* (AC)

Třída: Fungi, Oddělení: Zygomycota, Třída: Zygomycetes

Jde o vláknitou houbu, řadíme ji k pravým plísním. Má charakteristické mycelium, které nemá přehrádky. Nese sporangiofor, jenž je na konci zakončen vakovitým sporangiem, které obsahuje nepohlavně vzniklé spory. Spory tedy nejsou volné, ale uzavřené ve sporangiu, označujeme je proto jako endospory (Obr. 9).

AC je exoparazit, vyskytuje se po celém světě. K infekci dochází vdechnutím spor, kožním poraněním nebo alimentární cestou.

Tato plíseň je potenciálně patogenní. Vyvolává mykózy, jež se nazývají mukormykózy nebo též zygomykózy. V infikované tkáni se nachází silné hyfy, které jsou nepravidelné až deformované. Mukormykóza se může projevovat jako mykóza systémová, méně často jako kožní forma, v tropech jako forma podkožní. Systémové infekce vznikají sekundárně. Nejčastějším projevem je rhinocerebrální forma s postižením nosu, dutin, očnice a mozku. AC je velmi invazivní, její mycelium prorůstá do cév, způsobuje trombózy a nekrózy tkání. Systémová mukormykóza má velmi rychlý průběh a téměř vždy končí smrtí. Při včasné diagnóze se léčí amfotericinem B (Bednář a kol., 1996).



Obrázek 9 Sporangium s endosporami *A. corymbifera*

Zdroj: http://en.wikipedia.org/wiki/Absidia#mediaviewer/File:Mature_sporangium_of_a_Mucor_sp._fungus.jpg

6.3.8 *Trichophyton mentagrophytes* (TM)

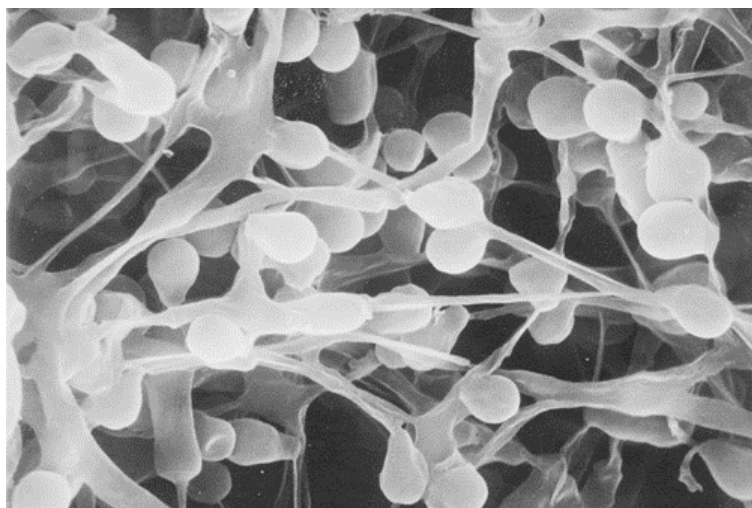
Říše: Fungi, Oddělení: Ascomycota, Třída: Eurotiomycetes

TM je mykoorganismus, který řadíme mezi dermatofyty (Obr. 10). Množí se v keratinových vrstvách kůže a jejích adnex, především vlasech a nehtech, neproniká však do hlubších tkání. Je to parazit, přenosný z lidí i zvířat. Přenos se děje přímým kontaktem nebo pomocí předmětů.

V keratinové vrstvě se nacházejí hyfy a tzv. arthrospory. Arthrospory jsou hranaté buňky vznikající fragmentací hyf. TM tvoří charakteristické kolonie s bohatým vzdušným myceliem, mají specifické antigeny. Takovým antigenem je např. trichofytin, což je směšený extrakt obsahující galaktomannan a peptid. Tento antigen vyvolává u lidí přecitlivělost pozdního typu, u atopiků a citlivějších jedinců může dojít k reakci časného typu.

Kolonie rodu *Trichophyton* mají různou pigmentaci, povrch je zrnitý, práškovitý nebo vatovitý. Reprodukční spory se nazývají mikrokonidie.

Mykózy vyvolané dermatofyty se nazývají dermatofytózy nebo též tinea. Podle postižených struktur se rozdělují na tinea capitis (vlasy), tinea barbae (vousy), tinea corporis (hladká kůže), tinea pedis (nohy) a tinea unguium (nehty). K laboratorní diagnostice se odebírají seškrabky s chorobných ložisek. TM napadá hlavně kůži a vousy. Působí meziprstní (interdigitální) mykózy (Bednář a kol., 1996).



Obrázek 10 Dermatofyt *T. mentagrophytes*

Zdroj: <http://www.natgeocreative.com/photography/522312>

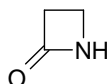
6.4 Přehled nejvýznamnějších antibiotik (Lincová a kol., 2007)

Antibiotika byla hlavním tématem mé diplomové práce (Márová, 2012). V této práci je proto představím jako velmi stručný přehled hlavních skupin, jejich struktur a základních vlastností. Antibiotika jsou antimikrobiálně účinné látky, získávané přirozeně, polosynteticky a synteticky (chemoterapeutika) (Julák, 2006). ATB rozdělujeme na základě chemické struktury a jí odpovídajících vlastností. Mechanismem účinku je: inhibice syntézy buněčné stěny, inhibice cytoplazmatické membrány, inhibice syntézy bílkovin, inhibice syntézy nukleových kyselin a inhibice metabolismu kyseliny listové. V této práci si rozdělíme ATB podle mechanismu účinku do 5 následujících skupin.

6.4.1 Antibiotika inhibující syntézu buněčné stěny

β-laktamová ATB

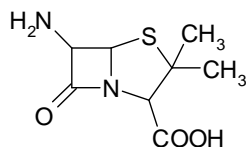
Strukturním základem všech β-laktamových ATB je β-laktamový kruh. Je to čtyřčlenný cyklus, tvořený atomy uhlíku a jedním atomem dusíku (Obr. 11). β-laktamy se navzájem liší složením dalšího kruhu, jenž je na β-laktamový kruh připojený. Mezi β-laktamová ATB patří peniciliny, cefalosporiny, monobaktamy a karbapenemy (Bryskier, 2005).



Obrázek 11 Strukturní vzorec β-laktamového kruhu

Peniciliny

- dělíme je na základní (přirozené) a širokospektré
- acylderiváty 6-aminopenicilanové kyseliny (Obr. 12), biotechnologická příprava s využitím kmenů *Penicillium chrysogenum*, baktericidní účinek (Hartl a kol., 2008).

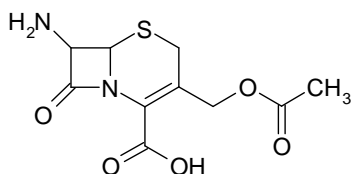


Obrázek 12 Strukturní vzorec 6-aminopenicilanové kyseliny

- spektrum účinku základních (přirozených) penicilinů je úzké, zahrnuje pouze grampozitivní mikroby, směrem k širokospektrým penicilinům se účinnost rozšiřuje i na mikroby gramnegativní (Buchta a kol., 2002)

Cefalosporiny

- rozděleny do 4 generací
- odvozeny od 7-aminocefalosporanové kyseliny (Obr. 13), polosyntetická příprava, baktericidní účinek (Buchta a kol., 2002)



Obrázek 13 Strukturní vzorec 7-aminocefalosporanové kyseliny

- širokospektrá ATB, směrem k vyšší generaci stoupá gramnegativní účinek a snižuje se účinek grampozitivní

Monobaktamy

- jediný zástupce aztreonam
- působí na aerobní gramnegativní patogeny, baktericidní účinek

Karbapenemy

- nejširší spektrum účinku z β -laktamů, působí na grampozitivní a gramnegativní, aerobní a anaerobní bakterie, baktericidní účinek

Glykopeptidy

- heteromerní heptapeptidy, na peptidový systém jsou glykosidicky vázány různé cukry, velká molekulová hmotnost, baktericidní účinek (Hartl a kol., 2008)
- spektrum zahrnuje grampozitivní bakterie, zejména rezistentní stafylokoky

Kyselina fusidová

- steroidní struktura, bakteriostatický účinek
- působí na stafylokoky (i rezistentní), korynebakteria a některé anaeroby (Sköld, 2011)

Fosfomycin

- spektrum účinku zahrnuje enterobakterie a stafylokoky (i rezistentní)

6.4.2 Antibiotika inhibující cytoplazmatickou membránu

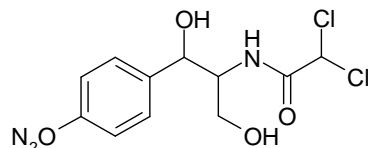
Polymyxin B, kolistin (polymyxin E)

- bazické polypeptidy, velmi toxická ATB, baktericidní účinek
- povrchově aktivní látky, poškozují cytoplazmatickou membránu mikrobů
- působí na gramnegativní mikroby (pubchem.ncbi.nlm.nih.gov)

6.4.3 Antibiotika inhibující syntézu bílkovin

Amfenikoly

- zástupce je chloramfenikol, derivát 2-amino-1-fenylpropan-1,3-diolu (Obr. 14), syntetická příprava, bakteriostatický účinek

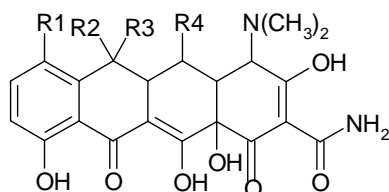


Obrázek 14 Strukturní vzorec chloramfenikolu

- široké spektrum účinku, působí na aerobní a anaerobní grampozitivní i gramnegativní mikroby (Sköld, 2011)

Tetracykliny

- deriváty oktahydrotetracenu, molekulu tvoří čtyři šestičlenné lineárně kondenzovanými cykly (Obr. 15), polosyntetická příprava, bakteriostatický účinek (Hartl a kol., 2008)



Obrázek 15 Základní struktura tetracyklinů

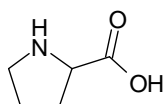
- široké spektrum účinku, zahrnuje grampozitivní i gramnegativní bakterie, mykoplazmata, chlamydie a spirochety

Makrolidy

- základ struktury tvoří 14 – 16ti členný makrocyclický lakton s glykosidicky navázaným aminocukrem a neutrálním cukrem, polosyntetická příprava, bakteriostatický účinek (Hartl a kol., 2008)
- středně široké spektrum účinku, grampozitivní i gramnegativní bakterie, anaeroby, chlamydie, mykoplazmata, spirochety

Linkosamidy

- amidy substituovaného prolinu s thiolinkosaminem (aminocukr) (Obr. 16), izolace ze *Streptomyces lincolnensis*, polosyntetická příprava, bakteriostatický až baktericidní účinek (Hartl a kol., 2008)



Obrázek 16 Strukturní vzorec prolinu

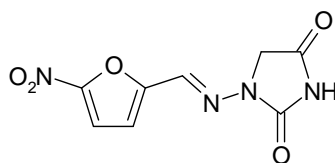
- účinkují na grampozitivní bakterie, anaerobní bakterie, mají antiprotozoální účinek (Bryskier, 2005)

Aminoglykosidy

- nemocniční ATB, nevstřebávají se ze střeva, parenterální podání
- základ tvoří aminocyklitol (cyklický alkohol) substituovaný aminoskupinami, na který je glykosidickou vazbou připojen aminocukr a neutrální cukr, jsou to oligosacharidy (trisacharidy až tetrasacharidy), izolovány z aktinomycet rodu *Streptomyces*, baktericidní účinek (Hartl a kol., 2008)
- účinek na gramnegativní mikroby (Anderson, 2012)

Nitrofurantoin

- patří mezi nitrofurany, odvozen od 5-nitofuran-2-karbaldehydu, jenž vytváří se sloučeninami obsahujícími aminoskupinu Schiffovy báze (Obr. 17), chemoterapeutikum, bakteriostatický účinek (Hartl a kol., 2008)



Obrázek 17 Strukturální vzorec nitrofurantoinu

- široké spektrum zahrnuje stafylokoky, streptokoky, enterokoky, escherichie a klebsiely (www.drugs.com)

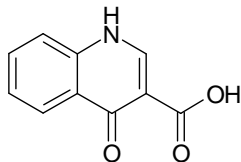
6.4.4 Antibiotika inhibující syntézu nukleových kyselin

Rifampicin

- patří mezi ansamycinová ATB, základ struktury tvoří makrocyclický laktam, jenž spojuje dvě nesousední místa na aromatické části molekuly (naftalen), polosyntetická příprava, baktericidní účinek
- širokospektrý, působí na bakterie, chlamydie, legionely a mykobakteria (Hartl a kol., 2008; pubchem.ncbi.nlm.nih.gov)

Chinolony

- rozděleny do 4 generací (1. generace nefluorované, ostatní fluorované chinolony)
- deriváty 1,4-dihydro-4-oxochinolin-3-karboxylové kyseliny (Obr. 18), chemoterapeutika, baktericidní účinek (Hartl a kol., 2008)

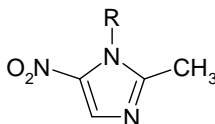


Obrázek 18 Strukturní vzorec 1,4-dihydro-4-oxochinolin-3-karboxylové kyseliny

- směrem k vyšším generacím se úzké spektrum první generace, působící jen na gramnegativní střevní tyčky (enterobakterie), postupně rozšiřuje až na grampozitivní koky a anaeroby

Imidazoly

- strukturální základ tvoří 5-nitroimidazol (Obr. 19), chemoterapeutika, baktericidní účinek



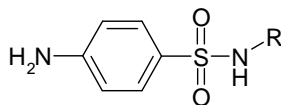
Obrázek 19 Základní struktura imidazolů

- úzké spektrum účinku, zahrnuje anaerobní mikroby a protozoa (Bryskier, 2005)

6.4.5 Antibiotika inhibující metabolismus kys. listové (antimetabolity)

Sulfonamidy

- základ tvoří 4-aminobenzensulfonamidové seskupení (Obr. 20), chemoterapeutika, bakteriostatický účinek (Hartl a kol., 2008)

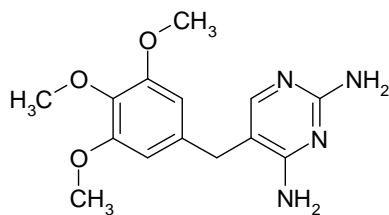


Obrázek 20 4-aminobenzensulfonamidové seskupení

- spektrum zahrnuje grampozitivní mikroby (streptokoky, stafylokoky, klostridia, nokardie) a gramnegativní mikroby (Votava, 2005)

Trimethoprim

- derivát 2,4-diaminopyrimidinu (Obr. 21), chemoterapeutikum, bakteriostatický účinek



Obrázek 21 Strukturní vzorec trimethoprimu

- působí na grampozitivní koky a gramnegativní tyčky (Anderson, 2012)

6.5 Přehled nejvýznamnějších antimykotik (Lincová a kol., 2007)

Antimykotika neboli antifungální látky jsou látky používané k léčbě mykóz (Vokurka a kol., 2008). Na základě chemické struktury je dělíme do čtyř skupin, a to polyenová, imidazolová, triazolová a ostatní antimykotika. Podle způsobu podání rozlišujeme antimykotika systémová a lokální. Systémová antimykotika podáváme parenterálně a perorálně, lokální se aplikují a působí topicky (Votava, 2005). Mechanismem účinku antimykotik jsou: inhibice syntézy ergosterolu, inhibice syntézy buněčné stěny, inhibice na úrovni jádra a ostatní inhibice (Hartl a kol., 2008).

6.5.1 Polyenová antimykotika

Látky antibiotického charakteru příbuzné makrolidům. Jejich strukturu tvoří 26 – 40ti členný makrocyclický laktonový kruh, jenž je tvořen lipofilním polyenovým uhlovodíkovým řetězcem a hydrofilním polyhydroxylovým řetězcem s glykosidicky navázaným aminocukrem (Hartl a kol., 2008). Vážou se na ergosterol (důležitá součást cytoplasmatické membrány) a ovlivňují tím permeabilitu cytoplasmatické membrány, což může vést až ke smrti buňky. Jedná se o poměrně toxické látky, systémově se podávají jen výjimečně (Votava, 2005).

- **Amfotericin B**

- systémové antimykotikum, parenterální podání, fungicidní účinek
- nejúčinnější antimykotikum, nejširší spektrum účinku, nejmenší výskyt rezistence
- pro snížení toxicity (nefrotoxicita) a lepší farmakokineticko-dynamické vlastnosti byl schválen (schválila FDA – Food and Drug Administration) k podávání s deoxycholátem sodným, přetrvání toxicity vedlo k vývoji lipidových formulací amfotericinu B užívaných dodnes (Loo et al., 2013)

- **Nystatin**

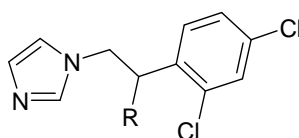
- lokální antimykotikum, fungistatický až fungicidní účinek
- kvasinky, vláknité houby rodu *Aspergillus*

- **Natamycin**

- lokální antimykotikum, fungistatický až fungicidní účinek
- široké spektrum: kvasinky, dermatofyta, plísňe, dimorfní houby
- synergismus s imidazolovými antimykotiky

6.5.2 Imidazolová antimykotika

Základní částí struktury je pětičlenný cyklus imidazolu s navázaným různě substituovaným fenylethylovým řetězcem (Obr. 22). Inhibují enzym lanosterol-14 α -demethylázu, katalyzující přeměnu lanosterolu na ergosterol. Dochází tak k inhibici syntézy ergosterolu, což se projevuje fungistatickým účinkem (Lincová a kol., 2007). Většina imidazolů slouží pouze k lokální léčbě, protože se v organismu rychle rozkládají (Votava, 2005).



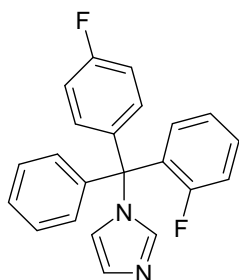
Obrázek 22 Základní struktura imidazolových antimykotik

- **Mikonazol, ketokonazol**

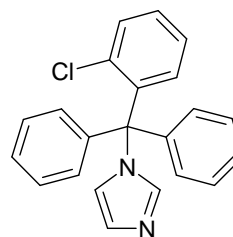
- širokospektrá systémová antimykotika

- **Ekonazol, fentikonazol, tiokonazol, oxikonazol, flutrimazol (Obr. 23), klotrimazol (Obr. 24),...**

- lokální antimykotika



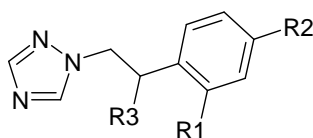
Obrázek 23 Strukturní vzorec flutrimazolu



Obrázek 24 Strukturní vzorec klotrimazolu

6.5.3 Triazolová antimykotika

Jde o antimykotika odvozená od imidazolových. Jsou modernější a v praxi čím dál více používaná, mají výhodnější farmakokinetické vlastnosti a méně nežádoucích účinků. Základní částí struktury je pětičlenný cyklus triazolu s navázaným různě substituovaným fenylethylovým řetězcem (Obr. 25). Mají fungistatický účinek a mechanismus účinku stejný jako imidazoly. Spektrum účinku je o něco širší než u imidazolů, zahrnuje i kryptokoky.



Obrázek 25 Základní struktura triazolových antimykotik

- **Flukonazol, itrakonazol, vorikonazol, ravukonazol, posakonazol**

- moderní širokospektrá systémová antimykotika

- **Terkonazol**

- lokální antimykotikum, léčba kandidových vulvovaginitid

6.5.4 Ostatní antimykotika

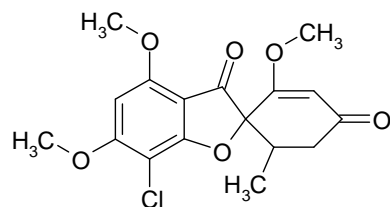
Řadíme sem látky různých struktur.

- **Griseofulvin**

- systémové benzofuranové antimykotické antibiotikum (Obr. 26), perorální podání, fungistatický účinek

- mitotický jed- denaturuje mikrotubulární aparát, nemožnost dělení, inhibice proteosyntézy a narušení výstavby buněčné stěny

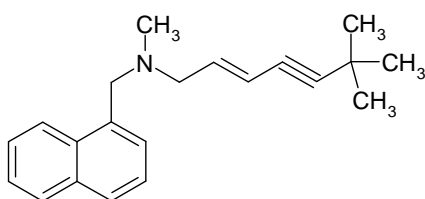
- úzké spektrum účinku zahrnuje dermatofyta (Murray et Baron, 2007)



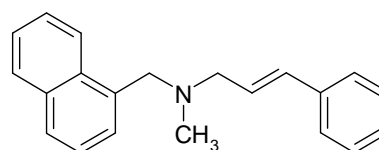
Obrázek 26 Strukturální vzorec griseofulvinu

- **Terbinafin, naftifin**

- terbinafin (systémové, lokální) a naftifin (lokální) jsou antimykotika s naftylmethylaminovým uspořádáním (Obr. 27 a 28), fungistatický až fungicidní účinek
- inhibují enzym skvalenepoxidázu, jenž katalyzuje syntézu lanosterolu, z něhož se tvoří ergosterol, dochází tedy k blokaci syntézy ergosterolu
- široké spektrum, vláknité houby jsou citlivější než kvasinky (Dismukes et al., 2003)



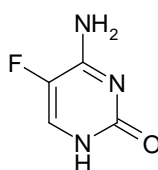
Obrázek 27 Strukturní vzorec terbinafinu



Obrázek 28 Strukturní vzorec naftifinu

- **Flucytosin**

- systémové antimykotikum, fluorovaná pyrimidinová báze (cytosin) (Obr. 29), perorální podání, fungistatický účinek
- jako antimetabolit je inkorporován do RNA, následně dochází k inhibici syntézy nukleových kyselin
- úzké spektrum účinku, hlavně kvasinky (Calderone et Clancy, 2012)



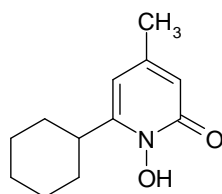
Obrázek 29 Strukturní vzorec flucytosinu

- **Kaspofungin, mikafungin, anidulafungin**

- patří mezi echinokandiny, cyklické hexamery aminokyselin s postranním lipofilním řetězcem
- systémová antimykotika, parenterální podání, fungicidní účinek
- inhibice syntézy β -(1,3)-glukanu, důležitá složka buněčné stěny hub, lýza buňky
- účinkují především na kandidy a aspergily (Kavanagh, 2011)

- **Ciklopirox**

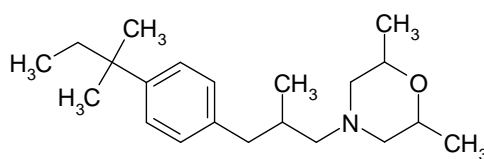
- lokální pyridinové antimykotikum (Obr. 30), fungicidní účinek
- inhibice příjmu esenciálních komponent do buňky, při vyšších koncentracích narušuje permeabilitu membrány (Hartl a kol., 2008)



Obrázek 30 Strukturní vzorec ciklopiroxu

- **Amorolfín**

- lokální fenylpropylmorfolinové antimykotikum (Obr. 31)
- inhibice syntézy sterolů, snížení obsahu ergosterolu
- širokospektrý, působí na kvasinky a dermatofyta



Obrázek 31 Strukturní vzorec amorolfinu

6.6 Metody stanovení antimikrobiální aktivity in vitro

Metody stanovení citlivosti bakterií a hub vůči antimikrobní látce in vitro jsou různé. Probíhají za přesných standardizovaných podmínek. Dají se dělit podle typu kultivačního média na agarové a bujónové, podle chování antimikrobní látky na diluční a difuzní, v neposlední řadě rozlišujeme metody kvalitativní a kvantitativní. V této práci využijeme rozdělení metod na kvalitativní a kvantitativní.

Mikrobiologické laboratoře umí spolehlivě diagnostikovat infekční agens, stanovit jeho míru citlivosti k antimikrobní látce a případnou rezistenci. Toho využíváme pro cílenou terapii konkrétního agens.

6.6.1 Kvalitativní testy

Tyto testy slouží k posouzení citlivosti vyšetřovaného kmene. Pomohou nám zjistit, zda je kmen na danou antimikrobní látku citlivý nebo rezistentní. Neurčí nám však minimální koncentraci látky, kterou je třeba použít. Jednoduchým a nejčastěji využívaným testem je diskový difuzní test (Votava, 2005).

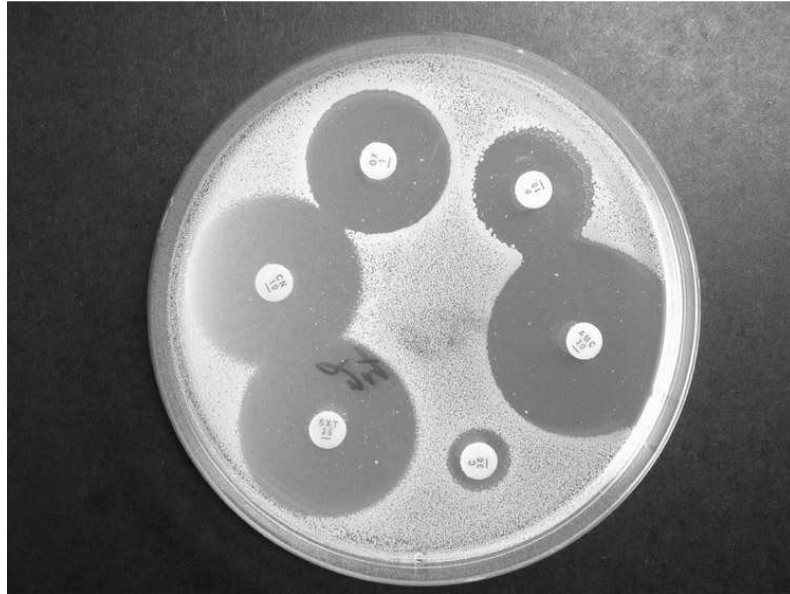
Diskový difuzní test

- kmen naočkovaný na Petriho misce
- disk impregnovaný antimikrobní látkou, jež difunduje do okolí
- inhibiční zóna kulovitěho tvaru v okolí disku

Jde o jednoduchou a finančně nenáročnou metodu. Základem je Petriho miska naočkovaná vyšetřovaným kmenem. Kmen očkujeme masivně, nejčastěji rozetřením vatovým tamponem. Dále se přidají disky impregnované antimikrobními látkami, jejich počet nepřesahuje číslo šest. Poté probíhá inkubace, při které se antimikrobní látka uvolňuje difuzně z disku do všech stran. Inkubuje se při teplotě 35 – 37 °C v průměru 18 hodin. Po uběhnutí časového intervalu inkubace se odečítají výsledky. Pokud je kmen citlivý, dojde k inhibici jeho růstu a v okolí disku vzniká tzv. inhibiční zóna růstu, jež má kulovitý tvar (Obr. 32). Průměr inhibičních zón závisí na hustotě mikrobiální suspenze (0,5 – 1 stupeň McFarlandovy zákalové stupnice). Inhibiční zóny mají přesně daný minimální průměr v mm. Odečet se provádí měřením inhibičních zón, výsledky se

porovnávají s hraničním průměrem zóny referenčního kmene daného druhu. Citlivý je ten mikroorganismus, který má průměr zóny stejný nebo větší.

Test se provádí za standardizovaných podmínek. Jako půda se využívá nejčastěji Mueller-Hintonův agar, s přesně určeným obsahem vápenatých a hořečnatých iontů, thyminu a thymidinu. Výška půdy v Petriho misce musí dosahovat 4 mm (Votava, 2005).



Obrázek 32 Diskový difuzní test. Výsledek kultivace *E. coli* na Mueller-Hinton agaru.

Zdroj: http://fvl.vfu.cz/sekce_ustavy/mikrobiologie/obrazova_priloha/mikrob/img/06-07.jpg

6.6.2 Kvantitativní testy

Kvantitativní testy stanovují minimální inhibiční koncentraci (MIC) antimikrobní látky, potřebné k inhibici růstu daného mikroorganismu. Vypovídají tak o míře citlivosti či rezistence vyšetřovaného kmene. Využívá se především mikrodiluční bujónová metoda (Votava, 2005).

Mikrodiluční bujónová metoda

- jamky mikrotitrační destičky naplněny antimikrobní látkou v postupně klesajících koncentracích
- pipetování suspenze testovaného kmene do jamek destičky
- MIC je koncentrace antimikrobní látky v poslední čiré jamce

Jde o jednoduchou, rozšířenou, ale poměrně nákladnou metodu. Jamky mikrotitrační destičky jsou naplněny růstovým médiem (bujónem) a naředěnou testovanou látkou v postupně klesajících koncentracích. Standardní suspenzi vyšetřovaného kmene napipetujeme do jamek mikrotitrační destičky, přiklopíme víčkem a necháme inkubovat. Po inkubaci se provádí vizuální odečet vzhledu jamek mikrotitrační destičky. Pozorujeme čirost, zákal nebo sediment v jamkách. Jako MIC určíme koncentraci antimikrobní látky, která ještě potlačila růst kolonie a jejíž jamka zůstala jako poslední čirá. Čím je MIC nižší, tím je kmen citlivější.

Tuto metodu jsme využívali při našem laboratorním testování. Její velkou výhodou v praxi je, že umožňuje otestovat citlivost jednoho kmene vůči více antimikrobním látkám najednou.

Dále můžeme určit i minimální baktericidní koncentraci (MBC). Tato hodnota vyjadřuje nejnižší koncentraci antimikrobní látky, jež je schopna usmrtit daný kmen. Provedeme to tak, že obsah čirých jamek naočkujeme na agar Petriho misek. Necháme inkubovat a pozorujeme, při jaké nejnižší koncentraci se neobjevil žádný nárůst kmene. Tuto koncentraci pak označíme jako MBC (Votava, 2005).

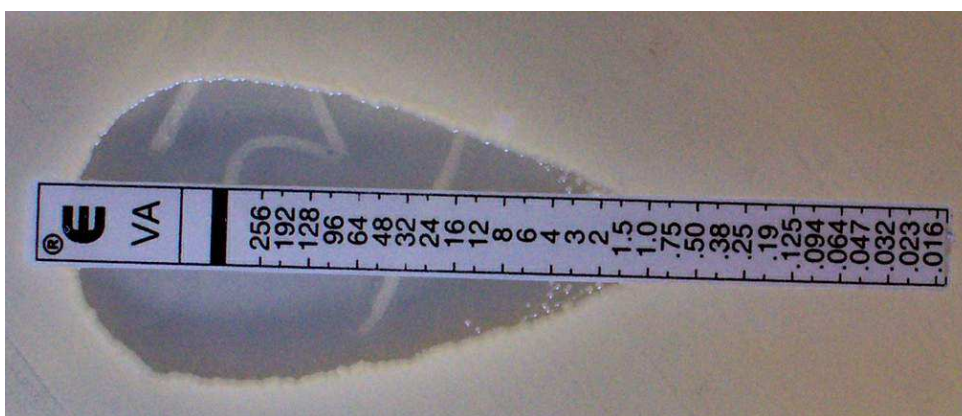
Ostatní diluční metody

Provádí se stejným způsobem jako mikrodiluční bujónová metoda, rozdíl je však v nádobách, v nichž probíhá finální testování. Mohou se použít Petriho misky s agarem nebo klasické sterilní zkumavky.

E-test

- kmen naočkovaný na Petriho misce
- proužek impregnovaný antimikrobní látkou, jež difunduje do okolí
- inhibiční zóna kapkovitého tvaru v okolí proužku, místo protnutí hrotu kapky s proužkem udává hodnotu MIC

Proti dilučním metodám je tato metoda jednodušší, ale zato nákladnější. Jde o proužek impregnovaný antimikrobní látkou ve stoupající koncentraci, hodnoty koncentrace jsou na proužku vyznačeny. Proužek umístíme na misku naočkovanou stejným způsobem jako při diskovém difuzním testu. Antimikrobní látka difunduje do okolí proužku, vzniká inhibiční zóna tvaru kapky. V místě, kde se hrot kapky dotkne okraje proužku, odečteme hodnotu MIC na proužku (Obr. 33) (Votava, 2005).



Obrázek 33 Testování citlivosti *S. aureus* na vankomycin s využitím E-testu

Zdroj: http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Etest_Vancomycin_S_aureus.jpg

6.6.3 Zjišťování rezistence k antimikrobní látce

Velkým problémem současnosti je mikrobiální rezistence, musíme ji proto umět odhalit. Využíváme k tomu již zmíněné výsledky vyšetření z mikrobiologických laboratoří. V praxi se nejčastěji jedná o průkaz β -laktamáz stafylokoků, neisserií a hemofilů.

K průkazu β -laktamáz se často využívá acidometrických testů. Jsou založeny na změně barvy testovacího proužku v kyselém prostředí. Při hydrolýze β -laktamového kruhu totiž vzniká penicilanová kyselina, která okyseluje prostředí. Další test využívá

cefalosporin nitrocefín, jenž je chromogenní. Pokud β -laktamáza naruší jeho strukturu, nitrocefín reaguje změnou barvy.

Gramnegativní bakterie, např. námi testovaná KP ESBL, produkují β -laktamázy se širokým spektrem účinku. Pro jejich důkaz se využívá speciálních DDST testů (DDST = double-disc synergy test) založených na tom, že ESBL jsou inaktivovány inhibitory β -laktamáz, především kyselinou klavulanovou. Producenti ESBL jsou přirozeně odolní k cefalosporinům a dalším ATB využívaným v DDST testu. Aktivita těchto ATB je obnovena inhibitorem β -laktamáz. K testování se používá disk impregnovaný aztreonamem nebo ceftriaxonem, v jehož sousedství se nachází disk s amoxicilinem a kyselinou klavulanovou. Pokud jsou přítomny ESBL, tak se inhibiční zóna kolem disku s aztreonamem (ceftriaxonem) deformuje a rozšíří výsečně směrem k disku s inhibitorem β -laktamáz (Obr. 34).

K určení rezistence pneumokoků na penicilin se dá využít disk s oxacilinem. K prokázání enterokoků rezistentních na vankomycin se používá agar s přídavkem vankomycinu. Pro důkaz rezistentních stafylokoků se mohou užít půdy s oxacilinem nebo vankomycinem. K průkazu MRSA se stanovuje citlivost kmene k oxacilinu a cefoxitinu (Votava, 2005).



Obrázek 34 DDST test pro určení ESBL

Z testu je patrná deformace inhibičních zón. V okolí disku s ATM je zřetelně zvětšená inhibiční zóna, jež se postupně zužuje směrem k disku s amoxicilinem a klavulanovou kyselinou.

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

6.6.4 Standardní metodiky pro testování antimykotické aktivity

V posledních desetiletích byl zaznamenán výrazný nárůst frekvence systémových mykóz u těžce nemocných pacientů. Na základě toho byla vyvinuta řada nových antimykotik. Postupem času však došlo k nárůstu rezistence kvasinek a vláknitých hub vůči všem antimykotikům, a to i těm novým (Mallátová et al.,2011).

Je proto potřeba testovat citlivost kvasinek a vláknitých hub in vitro a určit tak vhodnou látku s antimykotickou aktivitou. Testování se provádí v klinických mikrobiologických laboratořích, výsledky se sdělují lékařům, kteří je využívají při léčbě obtížně léčitelných kandidóz a aspergilóz. Testují se různé koncentrace látek, výsledkem je MIC pro izolovaný kmen, jež je měřítkem citlivosti mykoorganismu in vitro (Posteraro et al.,2014).

Cesta k přípravě první standardní metodiky začala roku 1982. Americký Národní výbor pro klinické laboratorní standardy (NCCLS, dnes Ústav pro klinické a laboratorní standardy – CLSI) tehdy ustanovil subkomisi, která měla testovat citlivost k antimykotikům. První vypracovaný dokument M27, popisující diluční bujónovou metodu pro testování citlivosti kvasinek, byl zveřejněn v roce 1992. Postupem času vznikly pak další 3 dokumenty. M38 pro testování vláknitých hub diluční metodou, M44 a M51 pro testování kvasinek diskovou difúzní metodou.

Zároveň s tím byla v roce 1997 v Evropě založena Evropská komise pro testování antimikrobiální citlivosti (EUCAST). Ta poté ustanovila svou subkomisi pro testování citlivosti k antimykotikům. Subkomise vytvořila dva dokumenty E. Def. 7.1 a E. Def. 9.1, které se zabývají diluční metodikou testující citlivost kvasinek a vláknitých hub k systémovým antimykotikům. Americká a evropská metodika pro provádění dilučních metod se převážně shodují, v několika aspektech se však odlišují (Mallátová et al.,2011).

Standardizace testování citlivosti kvasinek a vláknitých hub se v posledních letech poměrně zlepšila. Referenční metody byly vypracovány tak, aby je bylo možné provádět spolehlivým a standardizovaným způsobem. Referenční metodiky, ustanovené subkomisemi EUCAST a CLSI, pomohly určit citlivost nejrozšířenějších fungálních kmenů na různých druzích antimykotik. Tyto metodiky stanovují klinické zarážky (MIC) testovaných látek a určují citlivost kvasinek a vláknitých hub vůči antimykotikům (Cuenca-Estrella, 2011).

Testování citlivosti vláknitých hub, např. *Aspergillus* spp., probíhá za následujících podmínek (Tab. 2). Vycházíme ze dvou nezávislých standardizovaných metodik (EUCAST, CLSI) pro stanovení fungální citlivosti. Obě metodiky se v několika charakteristikách shodují. Jde o mikrodiluční metodiky, používaným médiem je RPMI 1640 bujón, inkubace probíhá při teplotě 35 °C po dobu 48 hodin a výsledek – MIC se odečítá vizuálně (jamka bez nárůstu) (Pfaller et al., 2011).

Tabulka 2 Rozdíly mezi dilučními metodikami EUCAST a CLSI pro vláknité houby

Charakteristika	EUCAST	CLSI
Denzita inokula (CFU/ml)	$2 - 5 \times 10^5$	$0,4 - 5 \times 10^4$
Glukóza v médiu (%)	2,0	0,2
Dno jamek destičky	ploché	kulaté

Při hodnocení citlivosti vláknitých hub vůči echinokandinům je navíc zavedena tzv. minimální efektivní koncentrace (MEC). Je to nejnižší koncentrace antimykotika, při níž dochází k abnormálnímu růstu v podobě krátkých větvených hyf, vytvářejících drobné okrouhlé mikrokolonie. V jamce kontroly je proti tomu nárůst v podobě dlouhých nevětvených vláken.

Testování citlivosti kvasinek metodikami EUCAST a CLSI se provádí za následujících podmínek (Tab. 3). Při fotometrickém hodnocení výsledku metodikou EUCAST se využívá spektrofotometrie při 530 nm (Mallátová et al., 2011).

Tabulka 3 Rozdíly mezi dilučními metodikami EUCAST a CLSI pro kvasinky

Charakteristika	EUCAST	CLSI
Denzita inokula (CFU/ml)	$0,5 - 2,5 \times 10^5$	$0,5 - 2,5 \times 10^3$
Glukóza v médiu (%)	2,0	0,2
Dno jamek destičky	ploché	kulaté
Teplota (°C)	35 – 37	35
Doba inkubace (hod)	24	24 – 48
Vyhodnocení	fotometricky	vizuálně

7. Experimentální část

7.1 Materiál

7.1.1 Testovací kmeny bakterií

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

Většinu bakteriálních kmenů jsme získali z Fakultní nemocnice v Hradci Králové (MRSA, SE, EF, KP, KP ESBL), zbylé kmeny byly dodány z České sbírky mikroorganismů (CCM) Masarykovy univerzity v Brně (SA, EC, PA).

7.1.2 Testovací kmeny kvasinek a vláknitých hub

- *Candida albicans* ATCC 44859 (**CA**)
- *Candida tropicalis* 156 (**CT**)
- *Candida krusei* E28 (**CK**)
- *Candida glabrata* 20/I (**CG**)
- *Trichosporon asahii* 1188 (**TA**)
- *Aspergillus fumigatus* 231 (**AF**)
- *Absidia corymbifera* 272 (**AC**)
- *Trichophyton mentagrophytes* 445 (**TM**)

Kvasinku CA jsme získali z České sbírky mikroorganismů (CCM) Masarykovy univerzity v Brně, ostatní kmeny jsou klinické izoláty z Fakultní nemocnice v Hradci Králové.

7.1.3 Pomůcky

sterilní mikrotitrační destičky s víčky
automatické pipety Eppendorf, Socorex
sterilní pipetovací špičky
12ti jamkové rezervoáry na média
sterilní zkumavky
stojánky na zkumavky
očkovací klíčky
Bürkerova počítací komůrka

7.1.4 Přístroje

laminární box ESCO class II type 2
termostat Binder
denzitometr BioSan Den-1B
mikroskop Olympus BX 40

7.1.5 Chemikálie

dimethylsulfoxid (DMSO, Sigma Aldrich)
3-(N-morfolino) propansulfonová kyselina (MOPS, Sigma Aldrich)
sterilní voda, sterilní fyziologický roztok (i.v.) (FreseniaCabi)
glukóza
10M NaOH
testované látky (KAOCH FaF UK HK)

7.1.6 Růstová média

- **Mueller-Hintonův agar** (MH agar)

Složení: (g/l destilované vody):

Hovězí masová infuze	2,0
Kyselý hydrolyzát kaseinu	17,5
Škrob	1,5
Agar	17,0

Příprava:

35 gramů dehydrovaného média se přidá do 1 litru destilované vody, sterilizuje se v autoklávu při 121 °C po dobu 15 minut. Rozplní se do sterilních zkumavek nebo Petriho misek.

- **Mueller-Hintonův bujón** (MH bujón)

Složení: (g/l destilované vody):

Hovězí masová infuze	2,0
Enzymatický hydrolyzát kaseinu	17,5
Škrob	1,5

Příprava:

25 gramů dehydrovaného média se přidá do 1 litru destilované vody, sterilizuje se v autoklávu při 121 °C po dobu 15 minut. Rozplní se do sterilních zkumavek nebo do lahví.

- **Sabouraudův agar**

Složení: (g/l destilované vody)

Pepton	10
Dextróza	40
Agar	15

Příprava:

65 gramů dehydrovaného média se přidá do 1 litru destilované vody, sterilizuje se v autoklávu při 121 °C po dobu 15 minut. Rozplní se do sterilních zkumavek nebo Petriho misek.

- **RPMI-1640 SEVAC médium** (KlinLab, Praha)

5× koncentrované růstové médium (Tab. 4)

Tabulka 4 Složení média RPMI-1640 SEVAC

Složení: (g/l destilované vody)

Dusičnan vápenatý tetrahydrát	0,5	L-prolin	0,1
Chlorid draselný	2,0	L-serin	0,15
Hydrogen fosforečnan sodný dihydrát	5,015	L-threonin	0,1
Síran hořečnatý heptahydrát	0,5	L-tryptofan	0,025
Chlorid sodný	30,0	L-tyrosin	0,1
L-arginin hydrochlorid	1,21	L-valin	0,1
L-asparagin monohydrát	0,27	Biotin	0,001
L-cystin	0,25	Cyanocobalamin	0,000025
L-glutamin	1,5	Cholin chlorid	0,015
Glutathion	0,005	I-inositol	0,175
Glycin	0,05	Kyselina listová	0,005
L-histidin HCl H ₂ O	0,102	Kyselina <i>p</i> -aminobenzoová	0,005
L-hydroxyprolin	0,1	Nikotinamid	0,005
L-isoleucin	0,25	D-Ca-Pantothenát	0,00125
Kyselina L-asparagová	0,1	Pyridoxin hydrochlorid	0,005
Kyselina L-glutamová	0,1	Riboflavin	0,001
L-leucin	0,25	Thiamid hydrochlorid	0,005
L-lysin hydrochlorid	0,2	Glukóza	10,0
L-methionin	0,075	Fenolčerveň	0,05
L-phenylalanin	0,075		

7.2 Postup testování

Pracovní postup zahrnoval několik následujících kroků. Nejprve jsme si nakultivovali testovací kmeny, následovala příprava suspenzí testovacích kmenů, příprava růstového média, příprava dvojkové ředící řady testované látky, pipetování do mikrotitrační destičky, inkubace a na závěr vyhodnocení účinku testované látky.

K jednotlivým krokům je v první části uveden vždy postup pro bakterie a v druhé části následuje postup pro kvasinky a vláknité houby.

7.2.1 Kultivace testovacích kmenů

Kultivace bakterií probíhala na MH agaru při teplotě 37 °C po dobu 24 hodin.

Kultivace kvasinek a vláknitých hub probíhala na Sabouraudově agaru při teplotě 35 °C. Kvasinky jsme inkubovaly 24 hodin, AF, AC 48 hodin a TM 72 hodin.

7.2.2 Příprava suspenzí testovacích kmenů

Bakterie

- 1) 8 sterilních zkumavek jsme si popsali zkratkami testovacích kmenů bakterií.
- 2) Do každé zkumavky napipetovali 3 ml sterilní vody.
- 3) Z nakultivovaných bakterií (add 7.2.1) jsme odebrali část kolonie a resuspendovali ji ve sterilní vodě zkumavky, promíchali na vortexu a několikrát změřili hustotu suspenze, tak aby ve výsledku činila 0,5 stupňů McFarlanda
- 4) Takto připravené suspenze vydrží cca 14 dní při teplotě 2 – 8 °C.

Kvasinky a vláknité houby

- 1) 8 sterilních zkumavek jsme si popsali zkratkami testovacích kmenů kvasinek a vláknitých hub.
- 2) Do každé zkumavky napipetovali 3 ml sterilní vody.
- 3) Z nakultivovaných kvasinek (add 7.2.1) jsme odebrali část kolonie a resuspendovali ji ve sterilní vodě zkumavky, promíchali na vortexu a 12 μ l suspenze napipetovali do Bürkerovy komůrky. Při zvětšení 200 jsme stanovili počet buněk na 100 čtverců, výsledná hustota by měla činit 25 – 50 CFU na 50 čtverců.
- 4) Z nakultivovaných vláknitých hub (add 7.2.1) jsme odebrali část kolonie a resuspendovali ji ve sterilní vodě zkumavky, promíchali na vortexu a 12 μ l suspenze napipetovali do Bürkerovy komůrky. Při zvětšení 200 jsme stanovili počet buněk na 100 čtverců, výsledná hustota by měla činit 100 buněk na 100 čtverců.
- 5) Takto připravené suspenze vydrží cca 14 dní při teplotě 2 – 8 °C

7.2.3 Příprava růstového média

Pro bakteriální kmeny jsme použili jako růstové médium MH bujón.

Pro kvasinky a vláknité houby jsme si růstové médium RPMI museli připravit. Ke 4 dílům MOPS s 1% glukózy jsme přidali 1 díl RPMI 1640 a pH jsme upravili přidáním 10M NaOH do rozmezí 6,5 – 7,9. Žlutý roztok tak změnil barvu na oranžovo-červenou.

7.2.4 Příprava ředící řady testované látky

Postup pro přípravu dvojkové ředící řady testované látky pro bakterie, kvasinky a vláknité houby je identický. Liší se pouze v typu přidávaného růstového média (bakterie – MH bujón, kvasinky a vláknité houby – RPMI médium).

- 1) Testovanou látku jsme rozpustili v DMSO, tak aby první testovaná koncentrace byla $500 \mu\text{mol.l}^{-1}$ a koncentrace DMSO v jamce mikrotitrační destičky nepřesáhla 1 %. Požadovaný objem DMSO jsme si vypočítali z následujícího vzorce:

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

m... navážka testované látky [g]

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

M... molární hmotnost [g]

10^6 ... převod na μl

100... zředění

- 2) Pokud se látka po promíchání na vortexu rozpustila nebo vytvořila homogenní suspenzi, přistoupili jsme k dalšímu kroku. V opačném případě jsme přidali 2., případně 3. ekvivalent rozpouštědla. S každým přidáním ekvivalentu rozpouštědla se koncentrace posunula o jedno ředění dozadu (z $500 \mu\text{mol.l}^{-1}$ na $250 \mu\text{mol.l}^{-1}$,... atd.).
- 3) Do sterilní zkumavky označené č. 1 ($1 = 500 \mu\text{mol.l}^{-1}$) jsme napipetovali 1,98 ml růstového média a přidali 20 μl rozpuštěné testované látky/DMSO.
- 4) Pokud se látka po promíchání na vortexu nevysrážela, přistoupili jsme k dalšímu kroku. Jestliže se vysrážela, přidali jsme 2., případně 3. ekvivalent růstového média. S každým přidáním růstového média se testovaná koncentrace posunula o jedno ředění dozadu (z $500 \mu\text{mol.l}^{-1}$,... atd.).
- 5) Takto jsme získali pracovní roztok 1. testované koncentrace, jenž jsme sterilně přemístili do jamky č. 1 12ti jamkového rezervoáru.

- 6) 10 sterilních zkumavek jsme si označili č. 2 – 11 a připravili si dvojkovou ředící řadu. Do každé zkumavky jsme napipetovali 0,5 ml DMSO. Do první zkumavky (č. 2) jsme dále napipetovali 0,5 ml rozpuštěné testované látky/DMSO, promíchali a 0,5 ml přenesli do zkumavky č. 3, promíchali a 0,5 ml přenesli do zkumavky č. 4,... atd. až po poslední zkumavku č. 11.
- 7) Do jamek 2 – 12 12ti jamkového rezervoáru jsme napipetovali 1,98 ml růstového média a přidali 20 μ l naředěné rozpuštěné testované látky/DMSO z dvojkové ředící řady (ze zkumavky č. 2 do jamky č. 2,... atd.). Do poslední jamky č. 12 jsme přidali, místo testované látky, 20 μ l DMSO.
- Takto jsme získali 2 ml pracovních roztoků s postupně klesajícími koncentracemi (jamky č. 1 – 11) a kontrolní jamku bez testované látky (jamka č. 12) (Tab. 5).

Tabulka 5 12ti jamkový rezervoár – obsah

Jamka č.	Růstové médium [ml]	Roztok testované látky [μ l]	c [μ mol.l ⁻¹]
1	1,98	20	500
2			250
3			125
4			62,5
5			31,25
6			15,625
7			7,813
8			3,906
9			1,953
10			0,977
11			0,488
12		20 DMSO	0

7.2.5 Příprava mikrotitrační destičky

Bakterie

- 1) Pomocí 12ti kanálové pipety jsme napipetovali z rezervoáru 200 μ l připravených testovaných roztoků látky do všech řádků mikrotitrační destičky (jamky s kulatým dnem).
- 2) Do jamek 1. řádku jsme pipetovali 10 μ l suspenze SA, do jamek 2. řádku suspenzi MRSA,... atd. (3. řádek SE, 4. řádek EF, 5. řádek EC, 6. řádek KP, 7. řádek KP ESBL a 8. řádek PA).

Kvasinky a vláknité houby

- 1) Pomocí 12ti kanálové pipety jsme napipetovali z rezervoáru 200 μ l připravených testovaných roztoků látky do sedmi řádků první mikrotitrační destičky a do jednoho řádku destičky druhé (jamky s plochým dnem).
- 2) Do jamek 1. řádku jsme pipetovali 10 μ l suspenze CA, do jamek 2. řádku suspenzi CT,... atd. (3. řádek CK, 4. řádek CG, 5. řádek TA, 6. řádek AF a 7. řádek AC).
- 3) Do jamek řádku druhé destičky jsme pipetovali 10 μ l suspenze TM.

V rámci mikrotitrační destičky jsme tak získaly sloupce s postupně klesajícími koncentracemi testované látky a v každém řádku destičky jiný testovaný kmen.

7.2.6 Inkubace

Mikrotitrační destičku s bakteriálními kmeny jsme přiklopili víčkem a inkubovali v termostatu při teplotě 37 °C po dobu 48 hodin.

Mikrotitrační destičky s kvasinkami a vláknitými houbami jsme přiklopili víčky a inkubovali při teplotě 35 °C. Inkubace první destičky trvala 48 hodin, druhou destičku s dermatofytem TM jsme inkubovali 120 hodin.

7.2.7 Vyhodnocení

Po uplynutí inkubační doby jsme provedli vizuální hodnocení. Nárůst kolonie v jednotlivých jamkách mikrotitrační destičky jsme porovnávali s denzitou v jamce kontroly, kde byl nárůst maximální (100 %).

V případě bakterií jsme výsledky odečítali po 24 a 48 hodinách. Minimální inhibiční koncentrace odpovídala koncentraci jamky, ve které došlo k 95% potlačení růstu kmene (MIC = IC₉₅). Při vizuálním odečtu to znamenalo, že jamka zůstala čirá.

U kvasinek a vláknitých hub jsme výsledky odečítali po 24 a 48 hodinách, výjimkou byl kmen TM na druhé destičce, kde byl odečet proveden po 72 a 120 hodinách. Minimální koncentrace inhibující růst kvasinek odpovídala 80% potlačení růstu kolonie (MIC = IC₈₀), minimální koncentrace inhibující růst vláknitých hub odpovídala 50% potlačení růstu kolonie (MIC = IC₅₀).

7.3 Testované látky

chemické názvy podle (Waisser, 2006)

V rámci rigorózní práce jsme otestovali celkem 35 látek. Jednalo se o karbamáty a benzoáty salicylanilidů, deriváty merkaptobenzothiazolu a deriváty dalších struktur. Na základě společných strukturních znaků jsme je rozdělili do 10 hlavních skupin.

Testované látky byly syntetizovány na Katedře anorganické a organické chemie Farmaceutické fakulty v Hradci Králové (Mgr. Martin Krátký, Ph.D.).

Přehled skupin testovaných látek

Karbamáty salicylanilidů

- 1) 4-chlor-2-[(4'-chlorfenyl) karbamoyl] fenyl karbamáty (Tab. 6)
- 2) 2-[(4'-bromfenyl) karbamoyl]-4-chlorfenyl karbamáty (Tab. 7)
- 3) 4-chlor-2-[(4'-fluorfenyl) karbamoyl] fenyl karbamáty (Tab. 8)
- 4) 2-[[4'-(trifluormethyl) fenyl] karbamoyl]-4-chlorfenyl karbamáty (Tab. 9)
- 5) 2-(fenylkarbamoyl) fenyl karbamáty (Tab. 10)
- 6) Thiokarbamáty salicylanilidů (Tab. 11)

Benzoáty salicylanilidů

- 7) 2-[[4'-(trifluormethyl) fenyl] karbamoyl]-4-chlorfenyl benzoáty (Tab. 12)
- 8) 4-brom-2-[[4'-(trifluormethyl) fenyl] karbamoyl] fenyl benzoáty (Tab. 13)

Deriváty merkaptobenzothiazolu

- 9) Deriváty 2-merkaptobenzothiazolu (Tab. 14)

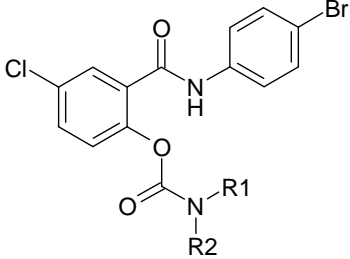
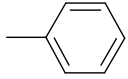
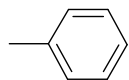
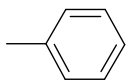
Další struktury

- 10) Deriváty různých struktur (Tab. 15)

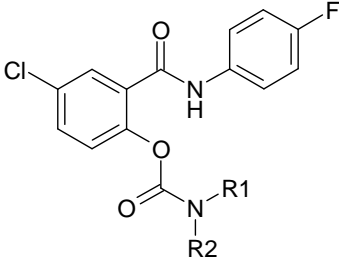
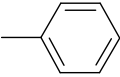
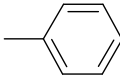
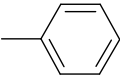
Tabulka 6 4-chlor-2-[(4'-chlorfenyl) karbamoyl] fenyl karbamáty

4-chlor-2-[(4'-chlorfenyl) karbamoyl] fenyl karbamáty			
KÓD	R ¹	R ²	Molek. hmotnost (g/mol)
SAL-1A	-CH ₃	-CH ₃	353,20
SAL-1C	-CH ₃		415,27
SAL-1D			477,34

Tabulka 7 2-[(4'-bromfenyl) karbamoyl]-4-chlorfenyl karbamáty

2-[(4'-bromfenyl) karbamoyl]-4-chlorfenyl karbamáty			
			
KÓD	R ¹	R ²	Molek. hmotnost (g/mol)
SAL-2A	-CH ₃	-CH ₃	397,65
SAL-2C	-CH ₃		459,72
SAL-2D			521,79

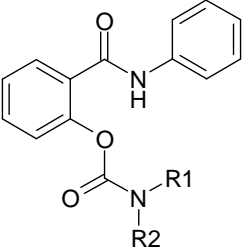
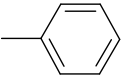
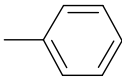
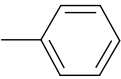
Tabulka 8 4-chlor-2-[(4'-fluorfenyl) karbamoyl] fenyl karbamáty

4-chlor-2-[(4'-fluorfenyl) karbamoyl] fenyl karbamáty			
			
KÓD	R ¹	R ²	Molek. hmotnost (g/mol)
SAL-3A	-CH ₃	-CH ₃	336,75
SAL-3C	-CH ₃		398,81
SAL-3D			460,88

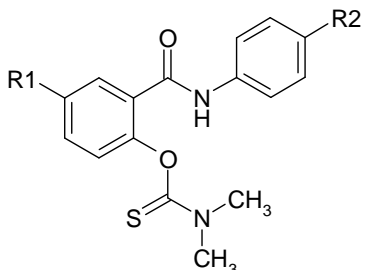
Tabulka 9 2-{{[4'-(trifluormethyl) fenyl] karbamoyl}-4-chlorfenyl karbamáty

2-{{[4'-(trifluormethyl) fenyl] karbamoyl}-4-chlorfenyl karbamáty			
KÓD	R ¹	R ²	Molek. hmotnost (g/mol)
SAL-4C	-CH ₃		448,82
SAL-4D			510,89

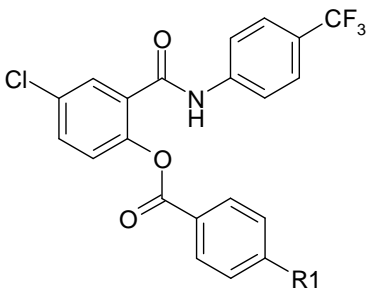
Tabulka 10 2-(fenylkarbamoyl) fenyl karbamáty

2-(fenylkarbamoyl) fenyl karbamáty			
			
KÓD	R ¹	R ²	Molek. hmotnost (g/mol)
SAL-5A	-CH ₃	-CH ₃	284,31
SAL-5C	-CH ₃		346,38
SAL-5D			408,45

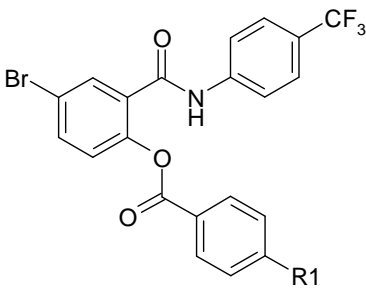
Tabulka 11 Thiokarbamáty salicylanilidů

Thiokarbamáty salicylanilidů			
			
KÓD	R¹	R²	Molek. hmotnost (g/mol)
SAL-1B	-Cl	-Cl	369,27
SAL-2B	-Cl	-Br	413,72
SAL-3B	-Cl	-F	352,81
SAL-4B	-Cl	-CF ₃	402,82
SAL-5B	-H	-H	300,38

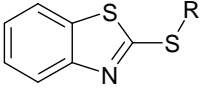
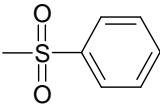
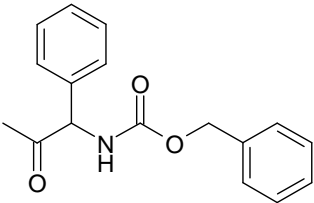
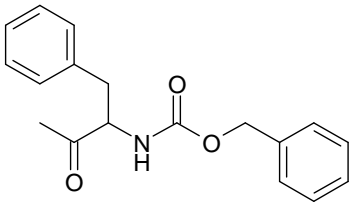
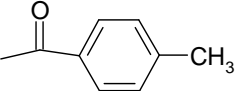
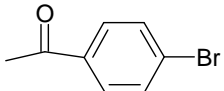
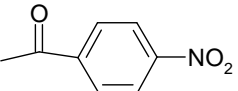
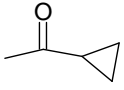
Tabulka 12 2-{{4'-(trifluormethyl) fenyl] karbamoyl}-4-chlorfenyl benzoáty

2-{{4'-(trifluormethyl) fenyl] karbamoyl}-4-chlorfenyl benzoáty		
		
KÓD	R ¹	Molek. hmotnost (g/mol)
MSA-150	-CH ₃	433,81
MSA-153	-COH	447,79

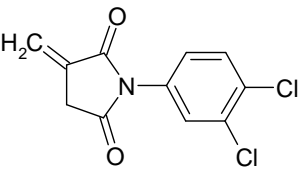
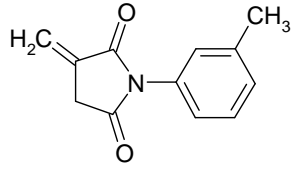
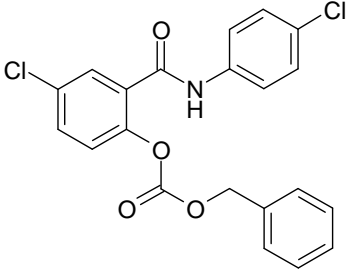
Tabulka 13 4-brom-2-{{[4'-(trifluormethyl) fenyl] karbamoyl} fenyl benzoáty

4-brom-2-{{[4'-(trifluormethyl) fenyl] karbamoyl} fenyl benzoáty		
		
KÓD	R ¹	Molek. hmotnost (g/mol)
MSA-151	-CH ₃	478,26
MSA-154	-COH	492,24

Tabulka 14 Deriváty 2-merkaptobenzothiazolu

Deriváty 2-merkaptobenzothiazolu		
		
KÓD	R	Molek. hmotnost (g/mol)
MBTZ-3	-COCH ₃	209,29
MBTZ-4		307,41
MBTZ-5		434,53
MBTZ-7	-COC(CH ₃) ₃	251,37
MBTZ-8		448,56
MBTZ-11		285,38
MBTZ-12		350,25
MBTZ-13		316,35
MBTZ-14		235,33

Tabulka 15 Deriváty různých struktur

Deriváty různých struktur		
KÓD	STRUKTURNÍ VZOREC	Molek. hmotnost (g/mol)
ITAM-IMIN		256,08
IMIN-mCH ₃		201,22
SAL-1-Bz		416,27

8. Výsledky

Výsledky pro jednotlivé skupiny testovaných látek jsou uvedeny nejprve přehledně v tabulce a následně hodnoceny slovně. Látky byly otestovány v koncentracích **500, 250, 125, 62,5, 31,25, 15,625, 7,813, 3,906, 1,953, 0,977 a 0,488** $\mu\text{mol.l}^{-1}$.

Tučně uvedená čísla v tabulce zvýrazňují koncentraci, při které je testovaná látka ještě účinná (bakterie: MIC = IC₉₅, kvasinky: MIC = IC₈₀, vláknité houby: MIC = IC₅₀). Znak „>” vyjadřuje neúčinnost látky. Názvy testovacích kmenů bakterií, kvasinek a vláknitých hub jsou uvedeny ve zkratkách. Zkratka ID značí inkubační dobu.

8.1 4-chlor-2-[(4'-chlorfenyl) karbamoyl] fenyl karbamáty

Tabulka 16 Antibakteriální MIC

4-chlor-2-[(4'-chlorfenyl) karbamoyl] fenyl karbamátů

KMEN	ID	TEST. LÁTKA (kód) – MIC/IC ₉₅ (μmol.l ⁻¹)		
		SAL-1A	SAL-1C	SAL-1D
SA	24 h	62,5	>125	>125
	48 h	125	>125	>125
MRSA	24 h	62,5	>125	>125
	48 h	125	>125	>125
SE	24 h	125	>125	>125
	48 h	125	>125	>125
EF	24 h	125	>125	>125
	48 h	>125	>125	>125
EC	24 h	>125	>125	>125
	48 h	>125	>125	>125
KP	24 h	>125	>125	>125
	48 h	>125	>125	>125
KP ESBL	24 h	>125	>125	>125
	48 h	>125	>125	>125
PA	24 h	>125	>125	>125
	48 h	>125	>125	>125

Antibakteriální účinek projevila látka SAL-1A. Účinkovala slabě až středně silně vůči všem stafylokokům a po 24 hodinové inkubaci i na EF. Látky SAL-1C a SAL-1D účinek neprojevily (Tab. 16).

Tabulka 17 Antimykotická MIC

4-chlor-2-[(4'-chlorfenyl) karbamoyl] fenyl karbamátů

KMEN	ID	TEST. LÁTKA (kód) – MIC/IC ₈₀ /IC ₅₀ (μmol.l ⁻¹)		
		SAL-1A	SAL-1C	SAL-1D
CA	24 h	>125	>125	>125
	48 h	>125	>125	>125
CT	24 h	>125	>125	>125
	48 h	>125	>125	>125
CK	24 h	>125	>125	>125
	48 h	>125	>125	>125
CG	24 h	>125	>125	>125
	48 h	>125	>125	>125
TA	24 h	>125	>125	>125
	48 h	>125	>125	>125
AF	24 h	>125	>125	>125
	48 h	>125	>125	>125
AC	24 h	>125	>125	>125
	48 h	>125	>125	>125
TM	72 h	31,25	>125	>125
	120 h	31,25	>125	>125

Antimykotickou aktivitu měla pouze látka SAL-1A, působila středně silně na TM. Látky SAL-1C a SAL-1D byly neúčinné (Tab. 17).

Antibakteriální aktivita: SA, MRSA, SE, EF

Nejcitlivější kmen: SA, MRSA

Antimykotická aktivita: TM

Nejcitlivější kmen: TM

8.2 2-[(4'-bromfenyl) karbamoyl]-4-chlorfenyl karbamátů

Tabulka 18 Antibakteriální MIC

2-[(4'-bromfenyl) karbamoyl]-4-chlorfenyl karbamátů

KMEN	ID	TEST. LÁTKA (kód) – MIC/IC ₉₅ (μmol.l ⁻¹)		
		SAL-2A	SAL-2C	SAL-2D
SA	24 h	>500	>500	>500
	48 h	>500	>500	>500
MRSA	24 h	>500	>500	>500
	48 h	>500	>500	>500
SE	24 h	>500	>500	>500
	48 h	>500	>500	>500
EF	24 h	>500	>500	>500
	48 h	>500	>500	>500
EC	24 h	>500	>500	>500
	48 h	>500	>500	>500
KP	24 h	>500	>500	>500
	48 h	>500	>500	>500
KP ESBL	24 h	>500	>500	>500
	48 h	>500	>500	>500
PA	24 h	>500	>500	>500
	48 h	>500	>500	>500

Antibakteriální účinek neprokázala žádná testovaná látka této skupiny (Tab. 18).

Tabulka 19 Antimykotická MIC

2-[(4'-bromfenyl) karbamoyl]-4-chlorfenyl karbamátu

KMEN	ID	TEST. LÁTKA (kód) – MIC/IC ₈₀ /IC ₅₀ (μmol.l ⁻¹)		
		SAL-2A	SAL-2C	SAL-2D
CA	24 h	>125	>125	>125
	48 h	>125	>125	>125
CT	24 h	>125	>125	>125
	48 h	>125	>125	>125
CK	24 h	>125	>125	>125
	48 h	>125	>125	>125
CG	24 h	>125	>125	>125
	48 h	>125	>125	>125
TA	24 h	>125	>125	>125
	48 h	>125	>125	>125
AF	24 h	>125	>125	>125
	48 h	>125	>125	>125
AC	24 h	>125	>125	>125
	48 h	>125	>125	>125
TM	72 h	>125	>125	>125
	120 h	>125	>125	>125

Antimykotický účinek neměla žádná testovaná látka této skupiny (Tab. 19).

Antibakteriální aktivita: –

Nejcitlivější kmen: –

Antimykotická aktivita: –

Nejcitlivější kmen: –

8.3 4-chlor-2-[(4'-fluorfenyl) karbamoyl] fenyl karbamáty

Tabulka 20 Antibakteriální MIC

4-chlor-2-[(4'-fluorfenyl) karbamoyl] fenyl karbamátů

KMEN	ID	TEST. LÁTKA (kód) – MIC/IC ₉₅ (μmol.l ⁻¹)		
		SAL-3A	SAL-3C	SAL-3D
SA	24 h	125	>500	>500
	48 h	>125	>500	>500
MRSA	24 h	>125	>500	>500
	48 h	>125	>500	>500
SE	24 h	>125	>500	>500
	48 h	>125	>500	>500
EF	24 h	125	>500	>500
	48 h	>125	>500	>500
EC	24 h	>125	>500	>500
	48 h	>125	>500	>500
KP	24 h	>125	>500	>500
	48 h	>125	>500	>500
KP ESBL	24 h	>125	>500	>500
	48 h	>125	>500	>500
PA	24 h	>125	>500	>500
	48 h	>125	>500	>500

Ve skupině jsme nezaznamenali žádný výrazný antibakteriální účinek látek. Pouze látka SAL-3A působila po 24 hodinové inkubaci slabě proti SA a EF (Tab. 20).

Tabulka 21 Antimykotická MIC

4-chlor-2-[(4'-fluorfenyl) karbamoyl] fenyl karbamátů

KMEN	ID	TEST. LÁTKA (kód) – MIC/IC ₈₀ /IC ₅₀ (μmol.l ⁻¹)		
		SAL-3A	SAL-3C	SAL-3D
CA	24 h	>500	>125	>125
	48 h	>500	>125	>125
CT	24 h	>500	>125	>125
	48 h	>500	>125	>125
CK	24 h	>500	>125	>125
	48 h	>500	>125	>125
CG	24 h	>500	>125	>125
	48 h	>500	>125	>125
TA	24 h	>500	>125	>125
	48 h	>500	>125	>125
AF	24 h	>500	>125	>125
	48 h	>500	>125	>125
AC	24 h	>500	>125	>125
	48 h	>500	>125	>125
TM	72 h	125	>125	500
	120 h	125	>125	500

Antimykotickou aktivitu vykázaly látky SAL-3A a SAL-3D, a to pouze k TM. Látka SAL-3A měla účinek o něco málo silnější než SAL-3D. Látka SAL-3C neprojevila účinek žádný (Tab. 21).

Antibakteriální aktivita: SA, EF

Nejcitlivější kmen: SA, EF

Antimykotická aktivita: TM

Nejcitlivější kmen: TM

8.4 2-{{[4'-(trifluormethyl) fenyl] karbamoyl}-4-chlorfenyl karbamáty

Tabulka 22 Antibakteriální MIC

2-{{[4'-(trifluormethyl) fenyl] karbamoyl}-4-chlorfenyl karbamátů

KMEN	ID	TEST. LÁTKA (kód) – MIC/IC ₉₅ (μmol.l ⁻¹)	
		SAL-4C	SAL-4D
SA	24 h	>125	>125
	48 h	>125	>125
MRSA	24 h	>125	>125
	48 h	>125	>125
SE	24 h	>125	>125
	48 h	>125	>125
EF	24 h	>125	>125
	48 h	>125	>125
EC	24 h	>125	>125
	48 h	>125	>125
KP	24 h	>125	>125
	48 h	>125	>125
KP ESBL	24 h	>125	>125
	48 h	>125	>125
PA	24 h	>125	>125
	48 h	>125	>125

Látky této skupiny neprojevily žádný antibakteriální účinek (Tab. 22).

Tabulka 23 Antimykotická MIC

2-[[4'-(trifluormethyl) fenyl] karbamoyl]-4-chlorfenyl karbamátů

KMEN	ID	TEST. LÁTKA (kód) – MIC/IC ₈₀ /IC ₅₀ (μmol.l ⁻¹)	
		SAL-4C	SAL-4D
CA	24 h	>125	>125
	48 h	>125	>125
CT	24 h	>125	>125
	48 h	>125	>125
CK	24 h	>125	>125
	48 h	>125	>125
CG	24 h	>125	>125
	48 h	>125	>125
TA	24 h	>125	>125
	48 h	>125	>125
AF	24 h	>125	>125
	48 h	>125	>125
AC	24 h	>125	>125
	48 h	>125	>125
TM	72 h	>125	>125
	120 h	>125	>125

Látky této skupiny neměly žádný antimykotický účinek (Tab. 23).

Antibakteriální aktivita: –

Nejcitlivější kmen: –

Antimykotická aktivita: –

Nejcitlivější kmen: –

8.5 2-(fenylkarbamoyl) fenyl karbamáty

Tabulka 24 Antibakteriální MIC

2-(fenylkarbamoyl) fenyl karbamátů

KMEN	ID	TEST. LÁTKA (kód) – MIC/IC ₉₅ (μmol.l ⁻¹)		
		SAL-5A	SAL-5C	SAL-5D
SA	24 h	>500	>125	>125
	48 h	>500	>125	>125
MRSA	24 h	>500	>125	>125
	48 h	>500	>125	>125
SE	24 h	>500	>125	>125
	48 h	>500	>125	>125
EF	24 h	>500	>125	>125
	48 h	>500	>125	>125
EC	24 h	>500	>125	>125
	48 h	>500	>125	>125
KP	24 h	>500	>125	>125
	48 h	>500	>125	>125
KP ESBL	24 h	>500	>125	>125
	48 h	>500	>125	>125
PA	24 h	>500	>125	>125
	48 h	>500	>125	>125

Antibakteriálně neúčinkovala žádná látka ze skupiny (Tab. 24).

Tabulka 25 Antimykotická MIC

2-(fenyلكarbamoyl) fenyl karbamátů

KMEN	ID	TEST. LÁTKA (kód) – MIC/IC ₈₀ /IC ₅₀ (μmol.l ⁻¹)		
		SAL-5A	SAL-5C	SAL-5D
CA	24 h	>500	>125	>125
	48 h	>500	>125	>125
CT	24 h	>500	>125	>125
	48 h	>500	>125	>125
CK	24 h	>500	>125	>125
	48 h	>500	>125	>125
CG	24 h	>500	>125	>125
	48 h	>500	>125	>125
TA	24 h	>500	>125	>125
	48 h	>500	>125	>125
AF	24 h	>500	>125	>125
	48 h	>500	>125	>125
AC	24 h	>500	>125	>125
	48 h	>500	>125	>125
TM	72 h	>500	>125	>125
	120 h	>500	>125	>125

Antimykoticky se neprojevila žádná látka ze skupiny (Tab. 25).

Antibakteriální aktivita: –

Nejcitlivější kmen: –

Antimykotická aktivita: –

Nejcitlivější kmen: –

8.6 Thiokarbamáty salicylanilidů

Tabulka 26 Antibakteriální MIC

Thiokarbamátů salicylanilidů

KMEN	ID	TESTOVANÁ LÁTKA (kód) – MIC/IC ₉₅ (μmol.l ⁻¹)				
		SAL-1B	SAL-2B	SAL-3B	SAL-4B	SAL-5B
SA	24 h	3,9	0,49	15,62	7,81	500
	48 h	7,81	0,49	31,25	7,81	500
MRSA	24 h	3,9	0,49	31,25	7,81	250
	48 h	7,81	0,49	31,25	7,81	250
SE	24 h	7,81	0,49	31,25	31,25	250
	48 h	31,25	0,49	31,25	31,25	250
EF	24 h	125	>500	>500	>500	500
	48 h	>125	>500	>500	>500	500
EC	24 h	>125	>500	>500	>500	>500
	48 h	>125	>500	>500	>500	>500
KP	24 h	>125	>500	>500	>500	>500
	48 h	>125	>500	>500	>500	>500
KP ESBL	24 h	>125	>500	>500	>500	>500
	48 h	>125	>500	>500	>500	>500
PA	24 h	>125	>500	>500	>500	>500
	48 h	>125	>500	>500	>500	>500

Všechny látky prokázaly antibakteriální aktivitu. Působily na stafylokoky a látky SAL-1B a SAL-5B slabě i na EF. Velmi výrazný antistafylokokový účinek měly látky SAL-2B s hodnotou MIC 0,49 μmol.l⁻¹ a SAL-1B s MIC 3,9 μmol.l⁻¹. Za zmínku stojí i MIC 7,81 μmol.l⁻¹ u látky SAL-4B (Tab. 26).

Tabulka 27 Antimykotická MIC

Thiokarbamátů salicylanilidů

KMEN	ID	TESTOVANÁ LÁTKA (kód) – MIC/IC ₈₀ /IC ₅₀ (μmol.l ⁻¹)				
		SAL-1B	SAL-2B	SAL-3B	SAL-4B	SAL-5B
CA	24 h	>125	>125	>125	>500	500
	48 h	>125	>125	>125	>500	>500
CT	24 h	>125	>125	>125	>500	>500
	48 h	>125	>125	>125	>500	>500
CK	24 h	>125	>125	>125	>500	>500
	48 h	>125	>125	>125	>500	>500
CG	24 h	>125	>125	>125	>500	>500
	48 h	>125	>125	>125	>500	>500
TA	24 h	>125	>125	>125	>500	500
	48 h	>125	>125	>125	>500	>500
AF	24 h	>125	>125	>125	>500	500
	48 h	>125	>125	>125	>500	>500
AC	24 h	>125	>125	>125	>500	>500
	48 h	>125	>125	>125	>500	>500
TM	72 h	1,95	1,95	7,81	500	>500
	120 h	1,95	1,95	7,81	500	>500

Látky SAL-1B, SAL-2B, SAL-3B a SAL-4B působily pouze proti TM, a to poměrně silně (kromě velmi slabého účinku SAL-4B). U látky SAL-5B jsme zaznamenali velmi slabý účinek po 24 hodinové inkubaci na CA, TA a AF (Tab. 27).

Antibakteriální aktivita: SA, MRSA, SE, EF

Nejcitlivější kmen: SA

Antimykotická aktivita: CA, TA, AF, TM

Nejcitlivější kmen: TM

8.7 2-{{[4'-(trifluormethyl) fenyl] karbamoyl}-4-chlorfenyl benzoáty

Tabulka 28 Antibakteriální MIC

2-{{[4'-(trifluormethyl) fenyl] karbamoyl}-4-chlorfenyl benzoátů

KMEN	ID	TEST. LÁTKA (kód) – MIC/IC ₉₅ (μmol.l ⁻¹)	
		MSA-150	MSA-153
SA	24 h	>250	62,5
	48 h	>250	250
MRSA	24 h	>250	125
	48 h	>250	500
SE	24 h	>250	250
	48 h	>250	500
EF	24 h	>250	250
	48 h	>250	500
EC	24 h	>250	>500
	48 h	>250	>500
KP	24 h	>250	>500
	48 h	>250	>500
KP ESBL	24 h	>250	>500
	48 h	>250	>500
PA	24 h	>250	>500
	48 h	>250	>500

Antibakteriální aktivitu měla pouze látka MSA-153, inhibovala růst stafylokoků a EF (Tab. 28).

Tabulka 29 Antimykotická MIC

2-[[4'-(trifluormethyl) fenyl] karbamoyl]-4-chlorfenyl benzoátu

KMEN	ID	TEST. LÁTKA (kód) – MIC/IC ₈₀ /IC ₅₀ (μmol.l ⁻¹)	
		MSA-150	MSA-153
CA	24 h	>250	>125
	48 h	>250	>125
CT	24 h	>250	>125
	48 h	>250	>125
CK	24 h	>250	>125
	48 h	>250	>125
CG	24 h	>250	>125
	48 h	>250	>125
TA	24 h	>250	>125
	48 h	>250	>125
AF	24 h	>250	>125
	48 h	>250	>125
AC	24 h	>250	>125
	48 h	>250	>125
TM	72 h	>250	>125
	120 h	>250	>125

Žádná látka ze skupiny neměla antimykotickou aktivitu (Tab. 29).

Antibakteriální aktivita: SA, MRSA, SE, EF

Nejcitlivější kmen: SA

Antimykotická aktivita: –

Nejcitlivější kmen: –

8.8 4-brom-2-{{[4'-(trifluormethyl) fenyl] karbamoyl} fenyl benzoátů

Tabulka 30 Antibakteriální MIC

4-brom-2-{{[4'-(trifluormethyl) fenyl] karbamoyl} fenyl benzoátů

KMEN	ID	TEST. LÁTKA (kód) – MIC/IC ₉₅ (μmol.l ⁻¹)	
		MSA-151	MSA-154
SA	24 h	>125	62,5
	48 h	>125	250
MRSA	24 h	>125	125
	48 h	>125	250
SE	24 h	>125	250
	48 h	>125	>250
EF	24 h	>125	>250
	48 h	>125	>250
EC	24 h	>125	>250
	48 h	>125	>250
KP	24 h	>125	>250
	48 h	>125	>250
KP ESBL	24 h	>125	>250
	48 h	>125	>250
PA	24 h	>125	>250
	48 h	>125	>250

Antibakteriální aktivitu jsme pozorovali u látky MSA-154. Působila na stafylokoky, účinek na SE se projevil pouze po 24 hodinové inkubaci (Tab. 30).

Tabulka 31 Antimykotická MIC

4-brom-2-{[4'-(trifluormethyl) fenyl] karbamoyl} fenyl benzoátu

KMEN	ID	TEST. LÁTKA (kód) – MIC/IC ₈₀ /IC ₅₀ (μmol.l ⁻¹)	
		MSA-151	MSA-154
CA	24 h	>125	>125
	48 h	>125	>125
CT	24 h	>125	>125
	48 h	>125	>125
CK	24 h	>125	>125
	48 h	>125	>125
CG	24 h	>125	>125
	48 h	>125	>125
TA	24 h	>125	>125
	48 h	>125	>125
AF	24 h	>125	>125
	48 h	>125	>125
AC	24 h	>125	>125
	48 h	>125	>125
TM	72 h	>125	>125
	120 h	>125	>125

Antimykotickou aktivitu neprojevila žádná testovaná látka (Tab. 31).

Antibakteriální aktivita: SA, MRSA, SE

Nejcitlivější kmen: SA

Antimykotická aktivita: –

Nejcitlivější kmen: –

8.9 Deriváty 2-merkaptobenzothiazolu

Tabulka 32 Antibakteriální MIC

Derivátů 2-merkaptobenzothiazolu (1. část)

KMEN	ID	TESTOVANÁ LÁTKA (kód) – MIC/IC ₉₅ (μmol.l ⁻¹)				
		MBTZ-3	MBTZ-4	MBTZ-5	MBTZ-7	MBTZ-8
SA	24 h	500	>125	>125	>500	500
	48 h	>500	>125	>125	>500	>500
MRSA	24 h	500	>125	>125	>500	>500
	48 h	>500	>125	>125	>500	>500
SE	24 h	500	>125	>125	>500	>500
	48 h	>500	>125	>125	>500	>500
EF	24 h	>500	>125	>125	>500	>500
	48 h	>500	>125	>125	>500	>500
EC	24 h	>500	>125	>125	>500	>500
	48 h	>500	>125	>125	>500	>500
KP	24 h	>500	>125	>125	>500	>500
	48 h	>500	>125	>125	>500	>500
KP ESBL	24 h	>500	>125	>125	>500	>500
	48 h	>500	>125	>125	>500	>500
PA	24 h	>500	>125	>125	>500	>500
	48 h	>500	>125	>125	>500	>500

Tabulka 33 Antibakteriální MIC

Derivátů 2-merkaptobenzothiazolu (2. část)

KMEN	ID	TESTOVANÁ LÁTKA (kód) – MIC/IC ₉₅ ($\mu\text{mol.l}^{-1}$)			
		MBTZ-11	MBTZ-12	MBTZ-13	MBTZ-14
SA	24 h	>125	>125	500	>500
	48 h	>125	>125	500	>500
MRSA	24 h	>125	>125	500	>500
	48 h	>125	>125	500	>500
SE	24 h	>125	>125	>500	>500
	48 h	>125	>125	>500	>500
EF	24 h	>125	>125	500	>500
	48 h	>125	>125	>500	>500
EC	24 h	>125	>125	>500	>500
	48 h	>125	>125	>500	>500
KP	24 h	>125	>125	>500	>500
	48 h	>125	>125	>500	>500
KP ESBL	24 h	>125	>125	>500	>500
	48 h	>125	>125	>500	>500
PA	24 h	>125	>125	>500	>500
	48 h	>125	>125	>500	>500

Antibakteriálně aktivní byla látka MBTZ-3, MBTZ-8 a MBTZ-13. Látka MBTZ-3 působila velmi slabě na stafylokoky, ale pouze po 24 hodinové inkubaci. Látka MBTZ-8 působila na SA pouze po 24 hodinové inkubaci. Látka MBTZ-13 projevila účinek k SA, MRSA a po 24 hodinové inkubaci také k EF (Tab. 32 a 33).

Tabulka 34 Antimykotická MIC

Derivátů 2-merkaptobenzothiazolu (1. část)

KMEN	ID	TESTOVANÁ LÁTKA (kód) – MIC/IC ₈₀ /IC ₅₀ (μmol.l ⁻¹)				
		MBTZ-3	MBTZ-4	MBTZ-5	MBTZ-7	MBTZ-8
CA	24 h	125	>125	>125	>500	250
	48 h	500	>125	>125	>500	250
CT	24 h	>500	>125	>125	>500	250
	48 h	>500	>125	>125	>500	250
CK	24 h	500	>125	>125	>500	250
	48 h	>500	>125	>125	>500	500
CG	24 h	500	>125	>125	>500	500
	48 h	>500	>125	>125	>500	500
TA	24 h	500	>125	>125	>500	250
	48 h	500	>125	>125	>500	250
AF	24 h	500	>125	>125	>500	500
	48 h	500	>125	>125	>500	>500
AC	24 h	>500	>125	>125	>500	>500
	48 h	>500	>125	>125	>500	>500
TM	72 h	250	>125	>125	>500	250
	120 h	250	>125	>125	>500	250

Tabulka 35 Antimykotická MIC

Derivátů 2-merkaptobenzothiazolu (2. část)

KMEN	ID	TESTOVANÁ LÁTKA (kód) – MIC/IC ₈₀ /IC ₅₀ ($\mu\text{mol.l}^{-1}$)			
		MBTZ-11	MBTZ-12	MBTZ-13	MBTZ-14
CA	24 h	>125	>125	125	>500
	48 h	>125	>125	125	>500
CT	24 h	>125	>125	125	>500
	48 h	>125	>125	250	>500
CK	24 h	>125	>125	500	>500
	48 h	>125	>125	500	>500
CG	24 h	>125	>125	250	>500
	48 h	>125	>125	500	>500
TA	24 h	>125	>125	250	>500
	48 h	>125	>125	500	>500
AF	24 h	>125	>125	250	>500
	48 h	>125	>125	500	>500
AC	24 h	>125	>125	>500	>500
	48 h	>125	>125	>500	>500
TM	72 h	>125	>125	250	>500
	120 h	>125	>125	500	>500

Antimykotickou aktivitu měly látky MBTZ-3, MBTZ-8 a MBTZ-13. Látka MBTZ-3 jevila účinek k CA, CK a CG (po 24 hod inkubaci), TA, AF a TM. Látka MBTZ-8 působila na všechny kvasinky a vláknité houby kromě AC. Vůči AF byl účinek velmi slabý, a to pouze po 24 hodinové inkubaci. Látka MBTZ-13 působila též na všechny kvasinky a vláknité houby, mimo AC (Tab. 34 a 35).

Antibakteriální aktivita: SA, MRSA, SE, EF

Nejcitlivější kmen: SA

Antimykotická aktivita: CA, CT, CK, CG, TA, AF, TM

Nejcitlivější kmen: CA

8.10 Deriváty různých struktur

Tabulka 36 Antibakteriální MIC

Derivátů různých struktur

KMEN	ID	TEST. LÁTKA (kód) – MIC/IC ₉₅ (μmol.l ⁻¹)		
		ITAM- IMIN	IMIN- mCH ₃	SAL-1- Bz
SA	24 h	250	>500	0,98
	48 h	>500	>500	1,95
MRSA	24 h	250	>500	0,98
	48 h	>500	>500	1,95
SE	24 h	250	>500	0,98
	48 h	>500	>500	1,95
EF	24 h	>500	>500	3,9
	48 h	>500	>500	3,9
EC	24 h	>500	>500	>500
	48 h	>500	>500	>500
KP	24 h	>500	>500	>500
	48 h	>500	>500	>500
KP ESBL	24 h	>500	>500	>500
	48 h	>500	>500	>500
PA	24 h	>500	>500	>500
	48 h	>500	>500	>500

Antibakteriální aktivitu prokázala látka ITAM-IMIN a SAL-1-Bz. Látka ITAM-IMIN působila slabě na stafylokoky, pouze však po 24 hodinové inkubaci. Látka SAL-1-Bz účinkovala velmi silně na stafylokoky a EF. Látka IMIN-mCH₃ účinek neprojevila (Tab. 36).

Tabulka 37 Antimykotická MIC

Derivátů různých struktur

KMEN	ID	TEST. LÁTKA (kód) – MIC/IC ₈₀ /IC ₅₀ (μmol.l ⁻¹)		
		ITAM- IMIN	IMIN- mCH ₃	SAL-1- Bz
CA	24 h	15,62	>125	>125
	48 h	62,5	>125	>125
CT	24 h	125	>125	>125
	48 h	125	>125	>125
CK	24 h	31,25	>125	>125
	48 h	250	>125	>125
CG	24 h	7,81	>125	>125
	48 h	62,5	>125	>125
TA	24 h	7,81	>125	62,5
	48 h	15,62	>125	62,5
AF	24 h	15,62	>125	>125
	48 h	125	>125	>125
AC	24 h	62,5	>125	>125
	48 h	125	>125	>125
TM	72 h	15,62	>125	>125
	120 h	31,25	>125	>125

Antimykotický účinek jsme zaznamenali u látek ITAM-IMIN a SAL-1-Bz. Látka ITAM-IMIN působila vůči všem kvasinkám a vláknitým houbám, nejsilněji však na CG a TA. Látka SAL-1-Bz inhibovala růst pouze u TA. Zcela neúčinná byla látka IMIN-mCH₃ (Tab. 37).

Antibakteriální aktivita: SA, MRSA, SE, EF

Nejcitlivější kmen: SA, MRSA, SE

Antimykotická aktivita: všechny kmeny

Nejcitlivější kmen: TA

9. Diskuze

Náplní mé rigorózní práce bylo otestovat antibakteriální a antimykotický účinek látek, které měly odlišnou, ale i velmi podobnou strukturu. Na základě toho jsem se rozhodla pojmout teoretickou část, týkající se s antibiotik a antimykotik, jako stručný přehled vlastností jednotlivých skupin a uvést vždy základní strukturu látek. Snahou bylo vytvořit přehled struktur užívaných látek, jenž by sloužil k rychlému porovnání se strukturami novými námi testovanými.

V práci jsme testovali látky řazené mezi karbamáty a benzoáty salicylanilidů, deriváty merkaptobenzothiazolu a deriváty dalších struktur. Jednotlivé látky jsme na základě společných struktur rozdělili do 10 skupin. Testování probíhalo na 8 bakteriálních a 8 fungálních kmenech. Jednotlivé kmeny byly vybrány na základě toho, že jsou to častí původci infekčních onemocnění v lidské populaci. Projevují rezistenci k užívané antimikrobiální terapii, působí nozokomiální infekce a je někdy složité najít proti nim vhodnou antimikrobiální léčbu. V rámci skupiny bakterií jsme testovali látky na 4 kmenech grampozitivních koků (SA, MRSA, SE, EF) a 4 kmenech gramnegativních tyček (EC, KP, KP ESBL, PA). Fungální kmeny zastupovalo 5 kmenů kvasinek (CA, CT, CK, CG, TA) a 3 kmeny vláknitých hub (AF, AC, TM).

K testování jsme využili mikrodiluční bujónovou metodu. Je to metoda poměrně rozšířená, rychlá, jednoduchá a nenáročná na vybavení, ať už materiálové, tak přístrojové. Výhodou byla možnost testovat citlivost jednoho kmene vůči více antimikrobním látkám najednou. Dále lze využít možnosti automatizace jednotlivých kroků.

Metoda slouží k poměrně přesnému stanovení kvantitativní citlivosti mikroorganismu k testované látce. Jamky mikrotitrační destičky byly naplněny bujónem, testovanou látkou v klesajících koncentracích a suspenzí testovacího kmene, destička se dala inkubovat, a poté se vizuálně odečítaly výsledky. Koncentrace látky v jamce, která zůstala jako poslední čirá (před jamkou s nárůstem), určila MIC.

Na základě hodnoty MIC jsme si rozdělili látky do 3 skupin, a to:

slabě účinné, MIC – 125, 250, 500 $\mu\text{mol.l}^{-1}$

středně účinné, MIC – 7,813, 15,625, 31,25, 62,5 $\mu\text{mol.l}^{-1}$

silně účinné, MIC – 0,488, 0,977, 1,953, 3,906 $\mu\text{mol.l}^{-1}$

Z výsledků našeho testování jsme stanovili pro každý testovací kmen látku, která na něj působila nejsilněji. Je to látka s nejnižší hodnotou MIC pro daný kmen. V případě bakterií vypadala situace následovně.

- *Staphylococcus aureus* (SA):
SAL-2B z 6. skupiny (thiokarbamáty salicylanilidů), hodnota MIC 0,49 $\mu\text{mol.l}^{-1}$
- *Staphylococcus aureus* methicilin rezistentní (MRSA):
SAL-2B z 6. skupiny (thiokarbamáty salicylanilidů), hodnota MIC 0,49 $\mu\text{mol.l}^{-1}$
- *Staphylococcus epidermidis* (SE):
SAL-2B z 6. skupiny (thiokarbamáty salicylanilidů), hodnota MIC 0,49 $\mu\text{mol.l}^{-1}$
- *Enterococcus faecalis* (EF):
SAL-1-Bz z 10. skupiny (deriváty různých struktur), hodnota MIC 3,9 $\mu\text{mol.l}^{-1}$
- *Escherichia coli* (EC): bez účinku
- *Klebsiella pneumoniae* (KP): bez účinku
- *Klebsiella pneumoniae* ESBL pozitivní (KP ESBL): bez účinku
- *Pseudomonas aeruginosa* (PA): bez účinku

Je patrné, že látka SAL-2B působila nejsilněji na grampozitivní koky SA, MRSA a SE. Tato látka měla nejnižší možnou hodnotu MIC 0,49 $\mu\text{mol.l}^{-1}$, a to odpovídá velmi silnému účinku. Látka SAL-1-Bz účinkovala nejsilněji na EF, podle hodnoty MIC jde ještě o silný účinek. Na EC, KP, KP ESBL a PA neúčinkovala žádná z testovaných látek.

U kvasinek a vláknitých hub byla situace následující.

- *Candida albicans* (CA):
ITAM-IMIN z 10. skupiny (der. různých struktur), hodnota MIC **15,62** $\mu\text{mol.l}^{-1}$ po 24 hod a 62,5 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ po 48 hod inkubaci
- *Candida tropicalis* (CT):
ITAM-IMIN z 10 skupiny (der. různých struktur), hodnota MIC 125 $\mu\text{mol.l}^{-1}$
MBTZ-13 z 9. skupiny (der. 2-merkaptobenzothiazolu), MIC **125** $\mu\text{mol.l}^{-1}$ po 24 hod a 250 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ po 48 hod inkubaci
- *Candida krusei* (CK):
ITAM-IMIN z 10. skupiny (der. různých struktur), hodnota MIC **31,25** $\mu\text{mol.l}^{-1}$ po 24 hod a 250 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ po 48 hod inkubaci
- *Candida glabrata* (CG):
ITAM-IMIN z 10. skupiny (der. různých struktur), hodnota MIC **7,81** $\mu\text{mol.l}^{-1}$ po 24 hod a 62,5 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ po 48 hod inkubaci
- *Trichosporon asahii* (TA):
ITAM-IMIN z 10. skupiny (der. různých struktur), hodnota MIC **7,81** $\mu\text{mol.l}^{-1}$ po 24 hod a 15,62 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ po 48 hod inkubaci
- *Aspergillus fumigatus* (AF):
ITAM-IMIN z 10. skupiny (der. různých struktur), hodnota MIC **15,62** $\mu\text{mol.l}^{-1}$ po 24 hod a 125 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ po 48 hod inkubaci
- *Absidia corymbifera* (AC):
ITAM-IMIN z 10. skupiny (der. různých struktur), hodnota MIC **62,5** $\mu\text{mol.l}^{-1}$ po 24 hod a 125 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ po 48 hod inkubaci
- *Trichophyton mentagrophytes* (TM):
SAL-1B z 6. skupiny (thiokarbamáty salicylanilidů), hodnota MIC 1,95 $\mu\text{mol.l}^{-1}$
SAL-2B z 6. skupiny (thiokarbamáty salicylanilidů), hodnota MIC 1,95 $\mu\text{mol.l}^{-1}$

Zde je jednoznačný účinek látky ITAM-IMIN z 10. skupiny. Působila středně silně na CA, CK, CG, TA, AF a AC. Slabě účinkovala vůči CT. Dále projevila slabý účinek na CT látka MBTZ-13 z 9. skupiny. Nejsilněji působily látky SAL-1B a SAL-2B z 6. skupiny, které měly silný účinek na TM. U látek ITAM-IMIN a MBTZ-13 je patrná kolísavá hodnota MIC po 24 hod a 48 hod inkubaci. Jde zřejmě o projev fungistatického účinku, který se délkou inkubace oslabuje. Hodnota MIC po 24 hod inkubaci tedy není finální, mykoorganismus se po dalších hodinách inkubace ještě množí a MIC se po 48 hod inkubaci (TM 120 hod) posune k vyšší koncentraci.

Jelikož naše testování nebylo automatizované, mohlo při něm dojít s větší pravděpodobností k chybám. Chyba se může vyskytnout prakticky v každém kroku. Ať už se to týká testovaných látek, kmenů, materiálu, metodiky, inkubace či odečtu výsledků. Základní podmínkou naší práce byla sterilita pomůcek, přístrojů, chemikálií a správný způsob pipetování. Jednotlivé chyby se pak mohly týkat následujících bodů:

- **testované látky**- čistota, pokračování v testování i přes vysrážení látky při rozpouštění v DMSO nebo růstovém médiu, rozpuštění ve správném objemu DMSO
- **kultivace kmenů**- nestandardní složení kultivačního růstového média, délka kultivace, teplota při kultivaci, nestandardní kmen
- **příprava suspenzí kmenů**- hustota, stáří používané suspenze, teplota při uchovávání, znečištění, kontaminace jiným kmenem
- **příprava dvojkové ředící řady**- pipetování nesprávného objemu, nesprávného média, přeskočení zkumavky či jamky rezervoáru, nebo naopak pipetování stejného objemu dvakrát do jedné zkumavky či jamky rezervoáru, nestandardní, špatně připravené či uchovávané růstové médium
- **příprava mikrotitrační destičky**- přeskočení jamky, pipetování stejného objemu dvakrát do jedné jamky nebo jamky nesprávné, pipetování špatného objemu
- **inkubace**- délka inkubace, teplota při inkubaci

- **hodnocení**- vizuální hodnocení je subjektivní a relativně nepřesné. Pokud se látka vysráží již na začátku testování v DMSO nebo růstovém médiu a my pokračujeme v testování dále, vede to k negativnímu výsledku. Látky by přitom mohla být účinná a pouze špatně rozpustná. Jde pak o falešně negativní výsledek.

Touto metodou nemůžeme určit 100% hodnotu MIC, protože jde o vizuální odečet výsledků. U bakterií je MIC rovna 95% inhibici nárůstu bakteriální kolonie, což odpovídá poslední čiré jamce. U kvasinek a vláknitých hub je odečet méně přesný. Relativní hodnota MIC kvasinek odpovídá 80% potlačení nárůstu kolonie oproti kontrole, relativní hodnota MIC vláknitých hub dokonce 50% inhibici nárůstu kolonie proti kontrole v poslední jamce řádku. Pro přesnější odečet čirosti či nárůstu v jamce by bylo vhodné použít spektrofotometr a mikrotitrační destičky s plochým dnem jamek.

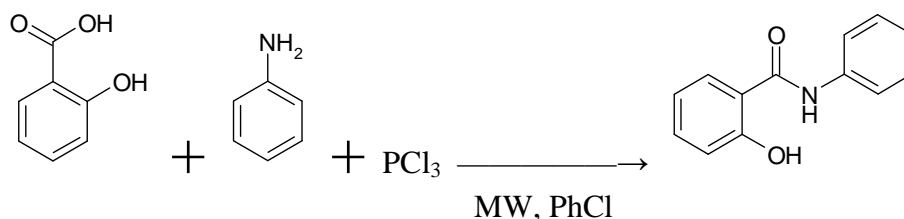
Na Katedře anorganické a organické chemie je uskutečňována syntéza různých antimikrobních látek. Tým kolem Prof. RNDr. Jarmily Vinšové, CSc. a Mgr. Martina Krátkého, Ph.D. se specializuje především na syntézu derivátů benzensulfonamidů a salicylanilidů, syntetizují ale i látky dalších struktur. Jsou poměrně úspěšní, získané informace týkající se syntézy a biologické aktivity salicylanilidových karbamátů a thiokarbamátů byly dokonce finalizovány do publikačního vstupu. Další látky podstupují biologické hodnocení nebo jsou jejich články stále rozepsány (Krátký et al., 2014).

Syntéza derivátů salicylanilidů se stala středem zájmu katedry. Testováním byla zjištěna významná antibakteriální (včetně antimykobakteriální), ale i antimykotická aktivita. Deriváty salicylanilidů dále prokázaly komplexní mechanismus účinku, který působí na úrovni buněčné i molekulární. Mají bakteriostatický účinek na gramnegativní mikroby, na mikroby grampozitivní pak účinek baktericidní. Nejvýznamnějšími deriváty jsou estery salicylanilidů s různými kyselinami, čímž vznikají acetáty, karbamáty, estery s N-chráněnými aminokyselinami. U derivátů salicylanilidů esterového typu byla prokázána perspektivní léčba patogenních hub a bakterií. Jedná se zejména o grampozitivní bakterie (včetně MRSA), dále o atypické a rezistentní kmeny mykobakterií působící tuberkulózu (Krátký et Vinšová, 2011). V naší práci jsme proto

testovali další nově nasyntetizované a různě substituované karbamáty, thiokarbamáty a benzoáty salicylanilidů.

Deriváty salicylanilidů jsme testovali také v diplomové práci. Tehdy se jednalo o látky typu karboxylátů a benzoátů salicylanilidů. U obou skupin jsme shledali poměrně silný účinek, v některých případech i velmi silný, jenž se projevoval hlavně na grampozitivní koky. Tyto látky ukázaly určitý potenciál a budou nadále testovány a zkoumány (Márová, 2012).

Zopakujme si, že salicylanilidy jsou odvozeny od kyseliny salicylové. Ta společně s anilinem vytváří amidy, tzv. salicylanilidy (Obr. 35). Karbamáty jsou pak sloučeniny odvozené od kyseliny karbamové (Obr. 36) Karbamáty salicylanilidů jsou tedy estery salicylanilidů s kyselinou karbamovou (Waisser, 2006).

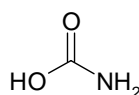


PCl₃... chlorid fosforitý

MW... mikrovlnné ozařování (530 W, 600 rpm, 22 min)

PhCl... chlorbenzen

Obrázek 35 Syntéza salicylanilidů (Krátký et al., 2014)



Obrázek 36 Strukturní vzorec karbamové kyseliny

Karbamáty salicylanilidů v naší práci byly substituovány různými halogeny v poloze 4' anilinového jádra, v poloze 4 jádra salicylové kyseliny se nacházel chlor a vliv substituentů na účinnost jsme pozorovali na aminoskupině karbamové kyseliny. Porovnávali jsme, zda je účinnější substituce alkylem (methyl), arylem (fenyl) nebo jejich kombinace.

První testovaná skupina, 4-chlor-2-[(4'-chlorfenyl) karbamoyl] fenyl karbamáty, nesla v poloze 4' anilinu chlor. U bakterií byla nejvýhodnější substituce aminoskupiny karbamové kyseliny dvěma methyly. U kvasinek a vláknitých hub tomu bylo stejně. Pokud byl na aminoskupině přítomen aspoň jeden fenyl, látky automaticky postrádaly účinek, a to jak na bakterie, tak kvasinky a vláknité huby.

Druhá testovaná skupina, 2-[(4'-bromfenyl) karbamoyl]-4-chlorfenyl karbamáty, nesla na anilinu v poloze 4' brom. Různé substituce aminoskupiny neprojevily účinek na žádné bakterie, kvasinky, ani vláknité houby. Je zřejmé, že pokud byl substituentem v poloze 4' brom, postrádaly látky účinek.

Třetí testovaná skupina, 4-chlor-2-[(4'-fluorfenyl) karbamoyl] fenyl karbamáty, byla substituována na jádře anilinu v poloze 4' fluorem. V případě bakterií byla výhodnější substituce na aminoskupině dvěma methyly. V přítomnosti fenylu se antibakteriální účinek vytratil. U kvasinek a vláknitých hub se účinek projevil při substituci dvěma methyly a dvěma fenylu. Substituce dvěma methyly vykazovala o něco silnější účinek. Kombinace substituentů fenylu a methylu nebyla účinná vůbec.

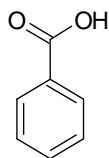
Čtvrtá testovaná skupina, 2-[(4'-(trifluormethyl) fenyl] karbamoyl]-4-chlorfenyl karbamáty, nesla na jádře anilinu v poloze 4' trifluormethylovou skupinu. Účinek vůči bakteriím, kvasinkám a vláknitým houbám neprojevila ani jedna látka. Substituce trifluormethylem nevykázala očekávanou účinnost.

Pátá testovaná skupina, 2-(fenylkarbamoyl) fenyl karbamáty, neměla substituci v poloze 4' anilinu, ale ani v poloze 4 jádra salicylové kyseliny. Na aminoskupině jsme porovnávali účinek methylu a fenylu, ale opět ani jedna látka neprojevila antibakteriální ani antimykotickou aktivitu. Látky bez substituce se z hlediska účinnosti neosvědčily.

Z výsledků je patrné, že účinek projevily následující látky. Byly to látky, které nesly v poloze 4' anilinu chlor nebo flor (brom, trifluormethyl, žádná substituce – bez účinku), byly substituovány v poloze 4 salicylové kyseliny chlorem, na aminoskupině karbamové kyseliny nesly dva methyly, případně 2 fenylu pro antimykotický účinek vůči TM. Celkově se jako nejúčinnější (antibakteriálně i antimykoticky) projevila struktura, substituovaná v poloze 4' a 4 chlorem a nesoucí na aminoskupině dva methyly. S touto strukturou by se tedy mělo dále pracovat a zdokonalit ji k optimálnímu účinku.

Šestou testovanou skupinou byly thiokarbamáty salicylanilidů. Z karbamové kyseliny nám výměnou atomu kyslíku, vázaného dvojnou vazbou na uhlík, za síru vznikla thiokarbamová kyselina. Ta byla na aminoskupině substituována dvěma methyly. Porovnávali jsme účinnost substituentů v poloze 4' anilinu a 4 salicylové kyseliny. U bakterií se nám jako nejvíce účinná projevila látka, jež nesla v poloze 4' brom a v poloze 4 chlor. U kvasinek a vláknitých hub byla neúčinnější také tato kombinace a zhruba stejně účinná i kombinace chloru v obou polohách. Celkově se jako antimikrobiálně neúčinnější projevila substituce polohy 4 chlorem a 4' bromem.

Dále jsme testovali estery salicylanilidů s kyselinou benzoovou (Obr. 37), tzv. benzoáty. Látky nesly v poloze 4' anilinu trifluormethylovou skupinu, v poloze 4 jádra salicylové kyseliny byl substituentem některý z halogenů a hlavní substituce byla provedena v poloze 4 jádra benzoové kyseliny. Substituentem této polohy byl buď methyl, nebo formyl.



Obrázek 37 Strukturní vzorec benzoové kyseliny

Sedmá testovaná skupina, 2-{{[4'-(trifluormethyl) fenyl] karbamoyl}-4-chlorfenyl benzoáty, nesla v poloze 4 salicylové kyseliny chlor a v poloze 4 benzoové kyseliny se nacházel již zmiňovaný methyl, nebo formyl. V případě bakterií se jevila účinnější substituce formylem, látka substituovaná methylem nebyla účinná. Ani jedna z látek neměla antimykotický účinek, kvasinky a vláknité houby byly vůči jejich působení imunní.

Osmá testovaná skupina, 4-brom-2-{{[4'-(trifluormethyl) fenyl] karbamoyl} fenyl benzoáty, nesla v poloze 4 salicylové kyseliny brom, v poloze 4 benzoové kyseliny jsme porovnávali opět účinnost methyly a formylu. Na bakterie působila lépe substituce formylem, substituce methylem byla neúčinná. Na kvasinky a vláknité houby opět nepůsobila ani jedna z testovaných látek.

Z výsledků vyplývá, že testované benzoáty postrádaly zcela antimykotickou aktivitu. Podle hodnot MIC a širšího spektra antibakteriálního účinku se ukázala výhodnější substituce chlorem v poloze 4 salicylové kyseliny a formylem v poloze 4 benzoové kyseliny.

Devátou testovanou skupinou byly deriváty 2-merkaptobenzothiazolu. Porovnávali jsme různé substituce vázané přes atom síry k základní struktuře, kterou byl benzothiazol. Substituentem byly různé karboxylové kyseliny uhlovodíků cyklických, acyklických a aromatických. Reakcí karboxylové kyseliny s thiolovou skupinou, umístěnou v poloze 2 benzothiazolu, vznikly thioestery benzothiazolu s karboxylovými kyselinami. U bakterií se jako nejlepší substituent projevila kyselina ethanová (octová) a 4-nitrobenzoová. U kvasinek a vláknitých hub byla situace stejná, jako další vhodný substituent se ukázala 2-[[[(benzyloxy) karbonyl] amino]-3-fenylpropanová kyselina. Látky této skupiny působily lépe antimykoticky. Vůči kvasinkám a vláknitým houbám měly silnější účinek a širší spektrum působení. Za nejvýhodnější substituci jsme zvolili substituci 4-nitrobenzoovou kyselinou, a to pro bakterie, kvasinky i vláknité huby.

Poslední desátou testovanou skupinou byly deriváty různých struktur. Šlo o zbylé látky, které nebylo možno strukturně zařadit do žádné z předešlých skupin. Stejný strukturní základ měly látky ITAM-IMIN a IMIN-mCH₃. Jejich základem byl 3-methylenpyrrolidin-2,5-dion s navázaným fenylem v poloze 1, jenž byl dále substituován. V případě látky ITAM-IMIN byl substituentem v poloze 1 3',4'-dichlorfenyl, u látky IMIN-mCH₃ to byl 3'-methylfenyl (toluen). Překvapivý účinek projevila látka ITAM-IMIN. Účinkovala částečně na grampozitivní koky, ale především prokázala slabý a středně silný účinek na všechny testovací kmeny kvasinek a vláknitých hub. Oproti tomu látka IMIN-mCH₃ neprojevila účinek ani antibakteriální, ani antimykotický. Poslední látka této skupiny SAL-1-Bz je derivátem odvozeným od salicylanilidů. Jde o ester salicylanilidu s benzyl uhlíčitou kyselinou, tzv. benzyl karbonát salicylanilidu. Samotný salicylanilid byl substituován chlorem v poloze 4' anilinového jádra a v poloze 4 jádra salicylové kyseliny. Tato látka působila velmi silně na grampozitivní koky, středně silný účinek projevila vůči kvasince TA. Na zbylé testovací kmeny však účinek neprokázala.

Je nutné si uvědomit, že cílem našeho testování nebylo najít látku, která by účinkovala současně na bakterie, kvasinky i vláknité houby. Látky takto účinné mají spíše antiseptický až dezinfekční účinek a působí na více druhů mikroorganismů. Naší snahou bylo najít látku s výrazným účinkem konkrétně na bakterie, kvasinky nebo vláknité houby. Měla by to být látka s úzkým spektrem účinku namířeným přímo na určitý kmen. Nejlépe by mělo jít o kmen problematický, rezistentní k antimikrobním látkám a působící nozokomiální nákazy.

Pokud shrneme výsledky působení látek na bakteriální kmeny, dojdeme k závěru, že testované látky účinkovaly pouze na grampozitivní koky. Nepodařilo se nám najít jedinou látku, která by působila na problematické gramnegativní tyčky, především na polyrezistentní KP ESBL a PA.

Velmi pozitivním výsledkem je objevení několika látek majících anti-MRSA a anti-SE aktivitu, a to i velmi silnou. Mnoho látek působilo také na SA. Nejhorší výsledky jsme zaznamenali u EF, ale i přesto jsme našli jednu látku se silným účinkem.

Ve skupině kvasinek a vláknitých hub působilo nejvíce látek, zároveň i nejsilněji, na vláknitou houbu TM. Nejhorší situace byla naopak u vláknité houby AC, na kterou působila jediná testovaná látka a to navíc fungistatickým účinkem, který se délkou inkubace oslabil. Kvasinky rodu *Candida*, kvasinku TA, vláknitou houbu AF ovlivnilo slabým účinkem výjimečně pár látek 9. skupiny, výrazný účinek na ně však prokázala látka ITAM-IMIN z 10. skupiny. Na kvasinku TA působila navíc středně silně i látka SAL-1-Bz z 10. skupiny.

Z výsledků je zřejmé, že látka ITAM-IMIN má velký potenciál v antimykotickém působení. Další zkoumání a obměňování struktury by se mělo zaměřit tedy právě na ni. Jedinou její nevýhodou je fungistatický účinek, jenž se délkou inkubace oslabuje.

10. Závěr

- S využitím mikrodiluční bujónové metody jsme otestovali celkem 35 látek rozdělených na základě společných strukturních znaků do 10 skupin.
- Látky jsme testovali na 8 kmenech bakteriálních a 8 fungálních. Objevili jsme jak látky účinné, tak i neúčinné.
- Nejsilnější antibakteriální účinek jsme zaznamenali u látek 6. skupiny (thiokarbamáty salicylanilidů), a to zejména u látky SAL-2B. Dále projevila velmi silný účinek látka SAL-1-Bz z 10. skupiny (deriváty různých struktur).
- Antibakteriálně zcela neúčinné byly látky 2., 4. a 5. skupiny. Jednalo se o 2-[(4'-bromfenyl) karbamoyl]-4-chlorfenyl karbamáty, 2-[[4'-(trifluormethyl) fenyl] karbamoyl]-4-chlorfenyl karbamáty a 2-(fenylkarbamoyl) fenyl karbamáty.
- Jako nejcitlivější bakteriální kmen se projevila grampozitivní kok SA, látky postrádaly účinek vůči EC, KP, KP ESBL a PA. Spektrum účinku látek zahrnuje tedy pouze grampozitivní koky. Gramnegativních tyčků bylo vůči působení látek imunní.
- Nejsilnější antimykotický účinek jsme prokázali u látek 6. skupiny (thiokarbamáty salicylanilidů), většina látek této skupiny působila pouze na TM, nejsilněji však SAL-1B a SAL-2B. Šířkou spektra účinku na tom byla nejlépe látka ITAM-IMIN z 10. skupiny (deriváty různých struktur), která působila na všechny fungální kmeny.
- Za antimykoticky zcela neúčinné jsme označili látky 2., 4., 5., 7. a 8. skupiny. Jsou to 2-[(4'-bromfenyl) karbamoyl]-4-chlorfenyl karbamáty, 2-[[4'-(trifluormethyl) fenyl] karbamoyl]-4-chlorfenyl karbamáty, 2-(fenylkarbamoyl) fenyl karbamáty, 2-[[4'-(trifluormethyl) fenyl] karbamoyl]-4-chlorfenyl benzoáty a 4-brom-2-[[4'-(trifluormethyl) fenyl] karbamoyl] fenyl benzoáty.
- Nejcitlivějším fungálním kmenem byl dermatofyt TM. Látky ovlivnily společně svými spektry účinku všechny kmeny kvasinek a vláknitých hub, žádný nezůstal imunní.

11. Použitá literatura

- (1) ANDERSON, R. J. *Antibacterial agents: chemistry, mode of action, mechanisms of resistance, and clinical applications*. Chichester, West Sussex, U.K.: John Wiley & Sons, 2012. 363 p. ISBN 978-0-470-97244-1.
- (2) BADDOUR, M. M. *MRSA (methicillin resistant Staphylococcus Aureus) infections and treatment*. New York: Nova Science Publishers, 2010. 128 p. ISBN 978-1-61668-038-1.
- (3) BEDNÁŘ, M. a kol. *Lékařská mikrobiologie*. 1. vydání. Praha: Marvil, 1996. 558 s. ISBN 80-238-0297-6.
- (4) BRYSKIER, A. *Antimicrobial agents: antibacterials and antifungals*. Washington, D.C: ASM Press, 2005. 1426 p. ISBN 978-1-55581-237-9.
- (5) BUCHTA, V. a kol. *Základy mikrobiologie a parazitologie pro farmaceuty*. 1. vydání. Praha: Karolinum, 2002. 193 s. ISBN 80-7184-565-5.
- (6) CALDERONE, R. A., CLANCY, C. J. *Candida and candidiasis*. 2nd ed. Washington, D.C: ASM Press, 2012. 524 p. ISBN 978-1-55581-539-4.
- (7) CERCA, N. et al. Quantitative analysis of adhesion and biofilm formation on hydrophilic and hydrophobic surfaces of clinical isolates of *Staphylococcus epidermidis*. *Res Microbiol*. 2005; 156(4): 506-514.
- (8) CUENCA-ESTRELLA, M. et al. Detection and investigation of invasive mould disease. *J Antimicrob Chemother*. 2011; 66(1): 15-24.
- (9) DAO, CH., LARSEN, R. *Pseudomonas aeruginosa* [online]. Poslední úprava 1/2012. Dostupné z https://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Pseudomonas_aeruginosa. [cit. 3.3.2014]
- (10) DISMUKES, W. E., PAPPAS, P. G., SOBEL, J. D. *Clinical mycology*. Oxford: Oxford University Press, 2003. 519 p. ISBN 0-19-514809-6.

- (11) EMAMI, S. *New quinolones with potential anti-MRSA activity*. New York: Nova Science Publishers, 2010. 110 p. ISBN 978-1-60876-736-6.
- (12) FIDEL, P. L., VAZQUEZ, J. A., SOBEL, J. D. *Candida glabrata: Review of Epidemiology, Pathogenesis, and Clinical Disease with Comparison of C. albicans*. *Clin Microbiol Rev.* 1999; 12(1): 80-96.
- (13) GHAFOR, A., HAY, I. D., REHM, B. H. Role of exopolysaccharides in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation and architecture. *Appl Environ Microbiol.* 2011; 77(15): 5238-5246.
- (14) HARTL, J. a kol. *Farmaceutické chemie IV*. 1. vydání. Praha: Karolinum, 2008. 168 s. ISBN 978-80-246-1169-3.
- (15) HONEYMAN, A., FRIEDMAN, H., BENDINELLI, M. *Staphylococcus aureus infection and disease*. New York: Kluwer Academic, 2002. 351 p. ISBN 0-306-46591-4.
- (16) JULÁK, J. *Úvod do lékařské bakteriologie*. 1. vydání. Praha: Karolinum, 2006. 406 s. ISBN 80-246-1270-4.
- (17) KAR, A. *Pharmaceutical microbiology*. New Delhi: New Age International, 2008. 363 p. ISBN 978-81-224-2867-4.
- (18) KAVANAGH, K. *Fungi: biology and applications*. 2nd ed. Hoboken, N.J.: John Wiley & Sons, 2011. 366 p. ISBN 978-0-470-97710-1.
- (19) KENNETH, T. *Pathogenic E. coli* [online]. Dostupné z http://www.textbookofbacteriology.net/e.coli_4.html. [cit. 26.2.2014]
- (20) KIM, B. H., GADD, G. M. *Bacterial physiology and metabolism*. Cambridge: Cambridge Univ. Press, 2008. 529 p. ISBN 978-0-521-84636-3.
- (21) KRÁTKÝ, M. et al. Synthesis and Biological Activity of New Salicylanilide *N,N*-Disubstituted Carbamates and Thiocarbamates. *Bioorg Med Chem.* 2014; 22(15): 4073-4082.

- (22) KRÁTKÝ, M., VINŠOVÁ, J. Salicylanilide Ester Prodrugs as Potential Antimicrobial Agents – a Review. *Current Pharmaceutical Design*. 2011; 17(32): 3494-3505.
- (23) LINCOVÁ, D. a kol. *Základní a aplikovaná farmakologie*. 2. doplněné a přepracované vydání. Praha: Galén, 2007. 672 s. ISBN 978-80-7262-373-0.
- (24) LOO, A. S., MUHSIN, S. A., WALSH, T. J. Toxicokinetic and mechanistic basis for the safety and tolerability of liposomal amphotericin B. *Expert Opin Drug Saf*. 2013; 12(6): 881-895.
- (25) MALLÁTOVÁ, N. et al. *Testing of micromycets' susceptibility to antifungals in vitro in immunosuppressed patients – expert recommendations with the support of CELL and SLM CLS JEP* [online]. Datum vytvoření 26.10.2011. Dostupné z <http://zdravi.e15.cz/clanek/postgradualni-medicina-priloha/testovani-citlivosti-mikromycet-k-antimykotikum-in-vitro-u-imunosuprimovanych-pacientu-doporuceni-odborniku-s-podporou-cell-a-slm-cls-jep-462246>. [cit. 24.5.2014]
- (26) MÁROVÁ, M. *Vyhodnocení aktivity potenciálně antibiotických látek pomocí mikrodiluční bujónové metody I*. Hradec Králové, 2012. 78 s. Diplomová práce na Farmaceutické fakultě v Hradci Králové na Katedře biologických a lékařských věd. Vedoucí diplomové práce Ing. Lucie Křivčíková.
- (27) microbewiki.kenyon.edu. *Klebsiella pneumoniae* [online]. Poslední úprava 4/2011. Dostupné z https://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Klebsiella_pneumoniae. [cit. 2.3.2014]
- (28) MISHRA, S., AGRAWAL, D. *A concise manual of pathogenic microbiology*. Hoboken, N.J.: Wiley-Blackwell, 2013, 188 p. ISBN 978-1-118-30119-7.
- (29) MURRAY, P. R., BARON, E. J. *Manual of clinical microbiology*. 9th ed. Washington, D.C.: ASM Press, 2007. 2345 p. ISBN 1-55581-371-2.
- (30) MURRAY, P. R., ROSENTHAL, K. S., PFALLER, M. A. *Medical microbiology*. 7th ed. Philadelphia: Elsevier/Saunders, 2013. 874 p. ISBN 978-0-323-08692-9.

- (31) MYLAN PHARMACEUTICALS INC. *Nitrofurantoin Capsules* [online]. Poslední úprava 10/2012. Dostupné z <http://www.drugs.com/pro/nitrofurantoin-capsules.html>. [cit. 18.1.2014]
- (32) NGUYEN, M. T., et al. Orally administered amphotericin B in the treatment of oral candidiasis in HIV-infected patients caused by azole-resistant *Candida albicans*. *AIDS*. 1996; 10(14): 1745-1747.
- (33) NORDMANN, P., CUZON, G., NAAS, T. The real threat of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing bacteria. *Lancet Infect Dis*. 2009; 9(4): 228-236.
- (34) PFALLER, M. et al. Comparison of the Broth Microdilution Methods of the European Committee of Antimicrobial Susceptibility Testing and the Clinical and Laboratory Standards Institute for Testing Itraconazole, Posaconazole, and Voriconazole against *Aspergillus* Isolates. *J Clin Microbiol*. 2011; 49(3): 1110-1112.
- (35) POSTERARO, B. et al. Antifungal Susceptibility Testing: Current Role from the Clinical Laboratory Perspective [online]. *Mediterr J Hematol Infect Dis*. 2014; 6(1). Dostupné z <http://www.mjhid.org/article/view/12938/html>. ISSN 2035-3006. [cit. 24.5.2014]
- (36) pubchem.ncbi.nlm.nih.gov. *Colistin* [online]. Datum vytvoření 16.12.2005. Dostupné z <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary/summary.cgi?cid=5311054>. [cit. 18.1.2014]
- (37) pubchem.ncbi.nlm.nih.gov. *Polymyxin B* [online]. Datum vytvoření 7.3.2006. Dostupné z <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary/summary.cgi?cid=5702105>. [cit. 18.1.2014]
- (38) pubchem.ncbi.nlm.nih.gov. *Rifampin* [online]. Datum vytvoření 26.3.2005. Dostupné z <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary/summary.cgi?cid=5381226>. [cit. 22.1.2014]
- (39) REISS, E., SHADOMY, H., LYON, G. *Fundamental medical mycology*. Hoboken, N.J.: Wiley-Blackwell, 2002. 624 p. ISBN 978-0-470-17791-4.

- (40) RYŠKOVÁ, O. *Základy lékařské mikrobiologie a imunologie*. 1. vydání. Praha: Karolinum, 2008. 132 s. ISBN 978-80-246-0135-9.
- (41) SAMARANAYAKE, Y. H., SAMARANAYAKE, L. P. *Candida krusei: biology, epidemiology, pathogenicity and clinical manifestations of an emerging pathogen*. *J Med Microbiol*. 1994; 41(5): 295-310.
- (42) SCHINDLER, J. *Ze života bakterií*. 1. vydání. Praha: Academia, 2008. 144 s. ISBN 978-80-200-1666-9.
- (43) SKÖLD, O. *Antibiotics and antibiotic resistance*. Hoboken, N.J.: Wiley, 2011. 207 p. ISBN 978-0-470-43850-3.
- (44) SZÉKELYOVÁ, A. *Vyhodnocení aktivity potenciálně antimikrobních látek pomocí mikrodiluční bujónové metody*. Hradec Králové, 2012. 107 s. Rigorózní práce na Farmaceutické fakultě v Hradci Králové na Katedře biologických a lékařských věd. Vedoucí rigorózní práce Mgr. Marcela Vejsová, Ph.D.
- (45) TORRES, A. G. *Pathogenic Escherichia coli in Latin America*. S.I.: Bentham e Books, 2010. 264 p. ISBN 978-1-60805-192-2.
- (46) VOKURKA, M. a kol. *Velký lékařský slovník*. 8. vydání. Praha: Maxdorf, 2008. 1144 s. ISBN 978-80-7345-166-0.
- (47) VOTAVA, M. a kol. *Lékařská mikrobiologie speciální*. 2. přepracované vydání. Brno: Neptun, 2003. 495 s. ISBN 80-902896-6-5.
- (48) VOTAVA, M. *Lékařská mikrobiologie obecná*. 2. přepracované vydání. Brno: Neptun, 2005. 352 s. ISBN 80-86850-00-5.
- (49) WAISSER, K. *Nové české názvosloví organické chemie*. 2. přepracované vydání. Praha: Karolinum, 2006. 178 s. ISBN 80-246-0910-X.
- (50) WALSH, T. J. Trichosporonosis. *Infect Dis Clin North Am*. 1989; 3(1): 43-52.
- (51) WARDAL, E. et al. Abundance and diversity of plasmid-associated genes among clinical isolates of *Enterococcus faecalis*. *Plasmid*. 2013; 70(3): 329-342.

- (52) WHELAN, W. L., et al. Auxotrophic variants of *Torulopsis glabrata*. *FEMS Microbiology Letters*. 1984; 24: 1-4.
- (53) WILKS, D., FARRINGTON, M., RUBENSTEIN, D. *The infectious diseases manual*. 2nd ed. Malden, Mass.: Blackwell Science, 2003. 432 p. ISBN 0-632-06417-X.
- (54) WOLF, D. G., et al. Multidrug-resistant *Trichosporon asahii* infection of nongranulocytopenic patients in three intensive care units. *J Clin Microbiol*. 2001; 39(12): 4420-4425.
- (55) www.biolib.cz. *Biological Library* [online]. Dostupné z <http://www.biolib.cz/cz/taxonposition/id341507> (CA); id364018 (TA); id59617 (AF); id164876 (AC); id363994 (TM). [cit. 16.3.2014]
- (56) www.itest-plus.cz. *ITEST PYR TEST* [online]. Dostupné z <http://www.itest-plus.cz/diagnosticke-pripravky-cz/ostatni-diagnosticke-soupravy-cz/itest-pyr-test-cz>. [cit. 9.2.2014]

12. Seznam obrázků

Obrázek 1	Hroznovité kolonie <i>S. aureus</i>	16
Obrázek 2	<i>E. faecalis</i> zachycen rastrovacím elektronovým mikroskopem.....	19
Obrázek 3	Tyčinkovitý tvar <i>E. coli</i>	20
Obrázek 4	Tyčinkovitý tvar <i>K. pneumoniae</i>	21
Obrázek 5	<i>P. aeruginosa</i> s bičíkem.....	23
Obrázek 6	Chlamydospory <i>C. albicans</i>	26
Obrázek 7	Kvasinka <i>T. asahii</i>	29
Obrázek 8	Konidiofor a konidie <i>A. fumigatus</i>	30
Obrázek 9	Sporangium s endosporami <i>A. corymbifera</i>	31
Obrázek 10	Dermatofyt <i>T. mentagrophytes</i>	32
Obrázek 11	Strukturní vzorec β -laktamového kruhu	33
Obrázek 12	Strukturní vzorec 6-aminopenicilanové kyseliny	33
Obrázek 13	Strukturní vzorec 7-aminocefalosporanové kyseliny.....	34
Obrázek 14	Strukturní vzorec chloramfenikolu	35
Obrázek 15	Základní struktura tetracyklinů	36
Obrázek 16	Strukturní vzorec prolinu	36
Obrázek 17	Strukturní vzorec nitrofurantoinu	37
Obrázek 18	Strukturní vzorec 1,4-dihydro-4-oxochinolin-3-karboxylové kyseliny....	38
Obrázek 19	Základní struktura imidazolů	38
Obrázek 20	4-aminobenzensulfonamidové seskupení	39
Obrázek 21	Strukturní vzorec trimethoprimu.....	39
Obrázek 22	Základní struktura imidazolových antimykotik	41
Obrázek 23	Strukturní vzorec flutrimazolu.....	41
Obrázek 24	Strukturní vzorec klotrimazolu	41
Obrázek 25	Základní struktura triazolových antimykotik.....	42
Obrázek 26	Strukturní vzorec griseofulvinu	42
Obrázek 27	Strukturní vzorec terbinafinu	43
Obrázek 28	Strukturní vzorec naftifinu	43
Obrázek 29	Strukturní vzorec flucytosinu.....	43
Obrázek 30	Strukturní vzorec ciklopiroxu	44
Obrázek 31	Strukturní vzorec amorolfinu	44

Obrázek 32 Diskový difuzní test. Výsledek kultivace <i>E. coli</i> na Mueller-Hinton agaru.	46
Obrázek 33 Testování citlivosti <i>S. aureus</i> na vankomycin s využitím E-testu	48
Obrázek 34 DDST test pro určení ESBL	49
Obrázek 35 Syntéza salicylanilidů	101
Obrázek 36 Strukturní vzorec karbamové kyseliny	101
Obrázek 37 Strukturní vzorec benzoové kyseliny	103

Seznam tabulek

Tabulka 1	Rozdělení testovacích kvasinek a vláknitých hub.....	24
Tabulka 2	Rozdíly mezi dilučními metodikami EUCAST a CLSI pro vláknité houby	51
Tabulka 3	Rozdíly mezi dilučními metodikami EUCAST a CLSI pro kvasinky	51
Tabulka 4	Složení média RPMI-1640 SEVAC	55
Tabulka 5	12ti jamkový rezervoár – obsah	59
Tabulka 6	4-chlor-2-[(4'-chlorfenyl) karbamoyl] fenyl karbamáty	63
Tabulka 7	2-[(4'- bromfenyl) karbamoyl]-4-chlorfenyl karbamáty	64
Tabulka 8	4-chlor-2-[(4'-fluorfenyl) karbamoyl] fenyl karbamáty.....	65
Tabulka 9	2- {[4'-(trifluormethyl) fenyl] karbamoyl}-4-chlorfenyl karbamáty	66
Tabulka 10	2-(fenylkarbamoyl) fenyl karbamáty.....	67
Tabulka 11	Thiokarbamáty salicylanilidů	68
Tabulka 12	2- {[4'-(trifluormethyl) fenyl] karbamoyl}-4-chlorfenyl benzoáty.....	69
Tabulka 13	4-brom-2- {[4'-(trifluormethyl) fenyl] karbamoyl} fenyl benzoáty	70
Tabulka 14	Deriváty 2-merkaptobenzothiazolu	71
Tabulka 15	Deriváty různých struktur.....	72
Tabulka 16	Antibakteriální MIC 4-chlor-2-[(4'-chlorfenyl) karbamoyl] fenyl karbamátů.....	74
Tabulka 17	Antimykotická MIC 4-chlor-2-[(4'-chlorfenyl) karbamoyl] fenyl karbamátů.....	75
Tabulka 18	Antibakteriální MIC -[(4'-bromfenyl) karbamoyl]-4-chlorfenyl karbamátů	76
Tabulka 19	Antimykotická MIC -[(4'-bromfenyl) karbamoyl]-4-chlorfenyl karbamátů	77
Tabulka 20	Antibakteriální MIC 4-chlor-2-[(4'-fluorfenyl) karbamoyl] fenyl karbamátů.....	78
Tabulka 21	Antimykotická MIC 4-chlor-2-[(4'-fluorfenyl) karbamoyl] fenyl karbamátů.....	79
Tabulka 22	Antibakteriální MIC 2- {[4'-(trifluormethyl) fenyl] karbamoyl}-4- chlorfenyl karbamátů	80

Tabulka 23 Antimykotická MIC 2-{[4'-(trifluormethyl) fenyl] karbamoyl}-4-chlorfenyl karbamátů	81
Tabulka 24 Antibakteriální MIC 2-(fenylkarbamoyl) fenyl karbamátů.....	82
Tabulka 25 Antimykotická MIC 2-(fenylkarbamoyl) fenyl karbamátů.....	83
Tabulka 26 Antibakteriální MIC Thiokarbamatů salicylanilidů	84
Tabulka 27 Antimykotická MIC Thiokarbamatů salicylanilidů	85
Tabulka 28 Antibakteriální MIC 2-{[4'-(trifluormethyl) fenyl] karbamoyl}-4-chlorfenyl benzoátů.....	86
Tabulka 29 Antimykotická MIC 2-{[4'-(trifluormethyl) fenyl] karbamoyl}-4-chlorfenyl benzoátů.....	87
Tabulka 30 Antibakteriální MIC 4-brom-2-{[4'-(trifluormethyl) fenyl] karbamoyl} fenyl benzoátů.....	88
Tabulka 31 Antimykotická MIC 4-brom-2-{[4'-(trifluormethyl) fenyl] karbamoyl} fenyl benzoátů.....	89
Tabulka 32 Antibakteriální MIC Derivátů 2-merkaptobenzothiazolu (1. část)	90
Tabulka 33 Antibakteriální MIC Derivátů 2-merkaptobenzothiazolu (2. část)	91
Tabulka 34 Antimykotická MIC Derivátů 2-merkaptobenzothiazolu (1. část).....	92
Tabulka 35 Antimykotická MIC Derivátů 2-merkaptobenzothiazolu (2. část).....	93
Tabulka 36 Antibakteriální MIC Derivátů různých struktur	94
Tabulka 37 Antimykotická MIC Derivátů různých struktur	95