

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

Vyhodnocení aktivity potenciálně antimikrobiálních látek  
pomocí mikrodiluční bujónové metody

rigorózní práce

Konzultant: Mgr. Marcela Vejsová, Ph.D.

Hradec Králové, 2014

Mgr. Radek Navrátil

Charles University in Prague  
Faculty of Pharmacy in Hradec Králové  
Department of biological and medical sciences

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

rigorous thesis

Consultant: Mgr. Marcela Vejsová, Ph.D.

Hradec Králové, 2014

Mgr. Radek Navrátil

„Prohlašuji, že tato rigorózní práce je mým původním autorským dílem a veškeré myšlenky, data a jejich zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpal, řádně cituji. Práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného kvalifikačního titulu.“

Rád bych tímto poděkoval svojí konzultantce Mgr. Marcele Vejsové, PhD. za ochotu, rady a cenné připomínky při sepisování a paní laborantce Idě Dufkové za její vstřícnost a pomoc při laboratorní práci. Velký dík zasluží také moje přítelkyně a rodina za jejich optimismus a motivaci do další práce.

# **Obsah**

1. Abstrakt.....	8
2. Abstract.....	9
3. Seznam použitých zkratk ..... 10	10
4. Zadání – cíl práce .....	12
5. Úvod.....	13
6. Teoretická část.....	14
6.1. Charakteristika bakteriálních testovacích kmenů .....	14
6.1.1. Staphylococcus aureus.....	14
6.1.2. Methicilin-rezistentní Staphylococcus aureus .....	16
6.1.3. Staphylococcus epidermidis .....	17
6.1.4. Enterococcus faecalis .....	19
6.1.5. Escherichia coli.....	21
6.1.6. Klebsiella pneumoniae.....	24
6.1.7. Klebsiella pneumoniae ESBL pozitivní.....	25
6.1.8. Pseudomonas aeruginosa .....	26
6.2. Charakteristika fungálních testovacích kmenů.....	29
6.2.1. Candida albicans .....	29
6.2.2. Candida tropicalis .....	31
6.2.3. Candida krusei.....	31
6.2.4. Candida glabrata.....	32
6.2.5. Trichosporon asahii.....	33
6.2.6. Aspergillus fumigatus.....	34
6.2.7. Absidia corymbifera .....	36
6.2.8. Trichophyton mentagrophytes .....	37
6.3. Metody testování citlivosti k antimikrobiálním látkám.....	40
6.3.1. Faktory ovlivňující testování.....	41

6.3.2. Diskový difúzní test .....	42
6.3.3. Gradientový difúzní test (E-test).....	42
6.3.4. Agarová diluční metoda .....	43
6.3.5. Bujónová diluční metoda.....	44
6.3.6. Automatické testovací systémy.....	45
6.4. Přehled používaných antimikrobiálních látek .....	47
6.4.1. Inhibice syntézy bakteriální buněčné stěny.....	47
6.4.2. Poškození buněčné stěny.....	51
6.4.3. Inhibice syntézy k. tetrahydrolistové.....	51
6.4.4. Interference s bakteriální DNA.....	52
6.4.5. Látky s přímou vazbou na DNA .....	53
6.4.6. Inhibice syntézy RNA.....	54
6.4.7. Inhibice bakteriální proteosyntézy.....	54
6.4.8. Látky vytvářející póry v cytoplazmatické membráně .....	58
6.4.9. Inhibice syntézy ergosterolu .....	59
6.4.10. Zásah do funkcí buněčného jádra.....	60
6.4.11. Inhibice syntézy fungální buněčné stěny .....	61
7. Experimentální část.....	62
7.1. Testovací kmeny .....	62
7.2. Použitý materiál .....	62
7.3. Testované látky.....	63
7.4. Metodika .....	64
7.4.1. Příprava suspenzí testovaných kmenů .....	64
7.4.2. Příprava růstového média.....	64
7.4.3. Příprava ředící řady testované látky.....	64
7.4.4. Příprava mikrotitrační destičky pro bakterie .....	65
7.4.5. Příprava mikrotitrační destičky pro kvasinky a vláknité houby .....	65

7.4.6. Inkubace a vyhodnocení .....	66
7.5. Výsledky.....	67
7.5.1. Deriváty 3-phenyl-4-thioxo-3,4-dihydro-2H-1,3-benzoxazin-2-onu ..	67
7.5.2. Deriváty 3-phenyl-2H-1,3-benzoxazin-2,4(3H)-dithionu .....	70
7.5.3. Deriváty N-benzylsalicylthioamidu .....	73
7.5.4. Deriváty phenylsalicylátu .....	74
7.5.5. Deriváty benzyl N'-(phenylmethylen)hydrazonothiokarbamátu .....	76
7.5.6. Deriváty 2-(5-karboxypentyl)isochinolinium bromidu.....	78
8. Diskuze .....	81
9. Závěr.....	90
10. Seznam obrázků, grafů a tabulek .....	91
11. Literatura.....	93

# **1. Abstrakt**

Mgr. Radek Navrátil

Vyhodnocení aktivity potenciálně antimikrobiálních látek pomocí mikrodiluční bujónové metody

Rigorózní práce

Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Cílem této práce bylo stanovení antibakteriální a antimykotické aktivity 49 látek připravených na Katedře organické a anorganické chemie Farmaceutické fakulty Univerzity Karlovy.

Na základě společných strukturních znaků byly látky rozděleny do šesti skupin a otestovány pomocí mikrodiluční bujónové metody na osmi kmenech bakterií a osmi kmenech kvasinek a vláknitých hub.

Nejvyšší antibakteriální aktivitu vykazala skupina derivátů 3-phenyl-2*H*-1,3-benzoxazin-2,4(3*H*)-dithionu u kmene *Staphylococcus aureus*. Pro mikromycety byly nejaktivnější deriváty N-benzylsalicylthioamidu u *Absidia corymbifera*. Žádná z testovaných látek nebyla účinná na gramnegativní bakterie.

Náhrada oxo skupiny thioxo skupinou v molekule 3-phenyl-4-thioxo-3,4-2*H*-1,3-benzoxazin-2-onu vedla, vyjma *S.aureus*, ke snížení aktivity. Substituce vodíku halogenem v molekule 1,3-benzoxazinu vedla ke zvýšení aktivity.

Pro získání jednoznačných výsledků je třeba dalšího testování.



## **2. Abstract**

Mgr. Radek Navrátil

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

Rigorous thesis

Charles University in Prague, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

The aim of this thesis was to assess the antibacterial and antifungal activity of 49 substances prepared at the Department of organic and Inorganic chemistry, Faculty of Pharmacy of Charles University.

According to their structural characteristics the substances were divided into six groups and tested through the microdilution broth method at eight strains of bacteria and eight strains of pathogenic fungi.

The highest antibacterial activity was observed at the derivatives of 3-phenyl-2*H*-1,3-benzoxazine-2,4(3*H*)-dithione against *Staphylococcus aureus*. The highest antifungal activity was shown by the derivatives of N-benzylsalicylthioamide against *Absidia corymbifera*. None of the tested substances presented efficiency against gramnegative bacteria.

The replacement of the oxo group by thioxo group in molecule of 3-phenyl-4-thioxo-3,4-2*H*-1,3-benzoxazine-2-one led to a reduction of activity with exclusion at *S. aureus*. The replacement of hydrogen by halogene in molecule of 1,3-benzoxazine led to an improvement of activity.

Further testing needs to be carried out to acquire definite results.

### **3. Seznam použitých zkratek**

AC	<i>Absidia corymbifera</i>
AF	<i>Aspergillus fumigatus</i>
AIDS	Acquired Immune Deficiency syndrome
ATB	antibiotikum
ATM	antimykotikum
ATP	adenosintrifosfát
CA	<i>Candida albicans</i>
CFU	colony forming unit
CG	<i>Candida glabrata</i>
CK	<i>Candida krusei</i>
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
CNS	centrální nervová soustava
CT	<i>Candida tropicalis</i>
CTX-M	cefotaximáza M
DMSO	dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonukleová kyselina
EC	<i>Escherichia coli</i>
EF	<i>Enterococcus faecalis</i>
EHEC	enterohemoragická <i>Escherichia coli</i>
EIEC	enteroinvazivní <i>Escherichia coli</i>
EPEC	enteropatogenní <i>Escherichia coli</i>
ESBL	Extended Spectrum $\beta$ -lactamase
ETEC	enterotoxigenní <i>Escherichia coli</i>
EUCAST	European Comitee on Antimicrobial Susceptibility Testing
G <sup>+</sup> , G <sup>-</sup>	grampozitivní, gramnegativní
GIT	gastrointestinální trakt
GXM	glukuronoxylomanan
HIV	Human Immunodeficiency Virus
KP	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
KP-E	<i>Klebsiella pneumoniae</i> ESBL pozitivní

MHB	Mueller-Hintonův bujón
MIC	minimální inhibiční koncentrace
MOPS	3-(N-morpholino)propansulfonová kyselina
MRSA	methicillin rezistentní <i>Staphylococcus aureus</i>
NCCLS	National Comitee for Clinical Laboratory Standards
PA	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
PBP	penicillin-binding protein
PK	plazmakoaguláza
PNAG	poly-N-acetylglukosamin
PP	přirozené peniciliny
RNA	ribonukleová kyselina
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
SA	<i>Staphylococcus aureus</i>
SCC	Staphylococcal Chromosome Casette
SE	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
SSSS	Staphylococcal Scalded Skin Syndrome
TA	<i>Trichosporon asahii</i>
TM	<i>Trichophyton mentagrophytes</i>
TSST	Toxic Shock Syndrome Toxin
VISA	vancomycin-intermediate <i>Staphylococcus aureus</i>
VRE	vankomycin rezistentní <i>Enterococcus</i>
VRSA	vancomycin rezistentní <i>Staphylococcus aureus</i>

## **4. Zadání – cíl práce**

- rešerše literatury
- zvládnutí základních technik v mikrobiologické laboratoři
- vypracování postupu vyhodnocení antimikrobiální aktivity *in vitro* pomocí mikrodiluční bujónové metody
- vlastní experimenty
- zpracování výsledků
- vyhodnocení výsledků, jejich interpretace a diskuze s využitím teoretických a praktických znalostí dané problematiky

## 5. Úvod

Hledání nových, antimikrobiálně účinných, látek je jednou z odpovědí na problém, který s sebou pokrok lékařské vědy paradoxně přináší. Rozvoj orgánových transplantací, operací srdce a mozku, využití imunosupresiv spolu s prodlužováním délky života jedinců s onemocněním AIDS a hematologickými malignitami vedou k prudkému nárůstu počtu imunokompromitovaných pacientů. Tito jsou ohroženi oportunními patogeny jak v komunitě, tak díky častým pobytům v nemocničním prostředí i nozokomiálními nákazami a významně se zvyšuje spotřeba antimikrobiálních látek k jejich léčbě a profylaxi.

Výše uvedené, spolu s masivním využitím antibiotik v živočišné výrobě, neracionální, mnohdy nadbytečnou preskripcí antibiotik a v neposlední řadě i non-compliance samotných pacientů přispívá k celosvětovému nárůstu rezistence. Zejména nozokomiální kmeny jsou díky vysokému selekčnímu tlaku odolné až rezistentní k látkám používaným v klinické praxi a některé multirezistentní patogeny byly pozorovány i v komunitě. Nové látky přinášejí možnosti léčby infekcí těmito kmeny, případnou alternativu k používaným molekulám v případě kontraindikací a vyšší účinnost terapie při menším zatížení pacienta toxicitou.

Vývoj nových antimikrobiálních látek naráží i na neochotu farmaceutického průmyslu zabývat se tímto odvětvím, které má, z finančního hlediska, velmi nejistou prognózu. Z toho důvodu nabývá na významu screening aktivity chemických látek, experimentálně připravených primárně za jiným účelem, který umožní cíleně v budoucnu zaměřovat čas a prostředky pouze na struktury s ověřenou aktivitou.

## **6. Teoretická část**

### **6.1. Charakteristika bakteriálních testovacích kmenů**

#### **6.1.1. Staphylococcus aureus**

*Staphylococcus aureus* (SA) patří mezi nejvirulentnější zástupce rodu *Staphylococcus* (Murray et al., 2009). Řadí se mezi grampozitivní, koaguláza-pozitivní a kataláza-pozitivní bakterie. Podobně jako většina stafylokoků je poměrně rezistentní k fyzikálním vlivům vnějšího prostředí. Odolává zahřátí na 55 °C po dobu 30 minut, vysychání a až 10% koncentraci NaCl, čehož lze s výhodou využít při jeho selektivní izolaci ze silně kontaminovaného materiálu (Bednář et al., 1996). Na pevných půdách tvoří hladké, lesklé, lehce konvexní kolonie, které jsou zbarveny krémově, žlutě až oranžově díky produkci karotenoidních pigmentů. V bujonu vytváří bohatý zákal a sediment (Bednář et al., 1996). V klinickém materiálu se vyskytuje spíše jednotlivě, ve dvojicích a nepravidelných shlucích (Murray et al., 2009).

V zevním okolí se SA vyskytuje jen v okolí člověka a zvířat. Člověk je kolonizován už od prvních dnů života, nejvíce na kůži rukou, periena, kštiny a sliznici dýchacího a zažívacího traktu (Bednář et al., 1996). (Murray et al., 2009) uvádí, že při rutinním vyšetření jej lze prokázat až u 30 % zdravé populace. Vyšší výskyt byl zaznamenán u zdravotnických pracovníků, pacientů s ekzematickým onemocněním a u pravidelných uživatelů jehel. Nutno dodat, že kolonizace zdravý organismus nepoškozuje, a působí jako imunizační stimulus.

SA vytváří celou řadu struktur s antigenní aktivitou, z nichž některé lze s výhodou využít při jeho identifikaci. Jako u všech grampozitivních bakterií je základní komponentou buněčné stěny peptidoglykan, enzymy katalyzující jeho tvorbu se označují jako penicilin vázající proteiny (penicilin-binding proteins, PBP) a jsou místem účinku  $\beta$ -laktámových antibiotik. Po získání genu *mecA* jsou bakterie schopné vytvářet pozměněnou formu proteinu, čímž je podmíněna rezistence např. k methicilinu (Murray et al., 2009). Peptidoglykan sám o sobě má výraznou schopnost stimulovat produkci zánětlivých cytokinů (např. interleukin-6 a tumor nekrotizující faktor- $\alpha$ ) a iniciovat prokoagulační mechanismy (Mattsson et al., 2002). Mezi druhově specifické povrchové antigeny,

kovalentně vázané na peptidoglykan patří protein A a kyselina teichoová. Protein A má schopnost se vázat nespecifickou reakcí na Fc oblast molekuly IgG (kromě podtřídy IgG<sub>3</sub>), má inhibiční efekt na opsoninovou aktivitu séra a antikomplementární a antifagocytární účinky (Gomez et al., 2006). Teichoová kyselina se váže na kyselinu muramovou peptidoglykanové vrstvy a na povrchu buněčné stěny vytváří fágové receptory (Bednář et al., 1996).

Z extracelulárních proteinů jsou významné zejména toxiny, které způsobují některé charakteristické symptomy při infekci.  $\alpha$ -toxin je považován za nejdůležitější a nejúčinnější ve vztahu k poškození tkání. Může být kódován na chromozómu i na plazmidech a je produkován většinou kmenů SA (Murray et al., 2009) Je produkován jako samostatné jednotky, které se vážou na membránové lipidy, kde se spojují v hexamerovou formu s centrálním pórem o průměru 1-2 nm, který vede k úniku intracelulárního obsahu. V nízkých koncentracích je pro účinek vyžadován specifický receptor, ve vyšších koncentracích se váže nespecificky. V lidském organismu jsou k němu citlivé zejména trombocyty a makrofágy (Rohilla, 2010).

$\beta$ -toxin působí jako fosfolipáza C, nejúčinnější je tedy k ovčím a hovězím erytrocytům, které obsahují v povrchové membráně nejvíce sfingomyelinu. Patrně z toho důvodu je jeho produkce charakteristická pro kmeny SA zvířecí provenience (Bednář et al., 1996).  $\epsilon$ -toxin je malý polypeptid jehož nespecifické působení je dáno nikoliv enzymatickým ale detergentním působením na buněčné membrány (Murray et al., 2009).

Toxiny  $\alpha$  až  $\epsilon$  jsou někdy označovány jako hemolyziny, což může být poněkud zavádějící neboť jejich spektrum účinku se nevztahuje pouze na erytrocyty.

Pro SA specifickým proteinem je plazmakoaguláza (PK), která s modifikovaným protrombinem vytváří komplex aktivující fibrinogen na fibrin, což může přispívat k vytváření abscesu. Někteří autoři [např. (Murray et al., 2009)] uvádějí PK jako faktor virulence neboť může chránit buňku před fagocytózou. Sérotypizace PK je jednou z metod pro kontrolu šíření stafylokokových infekcí (Rohilla, 2010). Naproti tomu stafylokináza je schopná rozpouštět fibrinové sraženiny a podpořit tak šíření infekce do ostatních tkání. Produkována je pouze kmeny SA humánního původu (Bednář et al., 1996).

Epidermolytické toxiny se vyskytují přibližně u 5-10 % kmenů SA a poškozují stratum granulosum epidermis což vede ke vzniku intradermálních trhlin vyplněných tkáňovou tekutinou, vystupňování tohoto stavu se označuje jako syndrom opažené kůže (Staphylococcal scalded skin syndrome, SSSS), kdy se povrchová vrstva epidermis odlučuje spontánně pod mírným tlakem prstu (Ladhani et al., 1999). Toxin syndromu toxického šoku (TSST-1) působí v organismu jako superantigen, který se váže na  $\beta_2$  domény makrofágů a V $\beta$  lymfocytů, což vede k nadprodukcí cytokinů a toxickému šokovému syndromu (Bednář et al., 1996).

Enterotoxiny mají také superantigenní aktivitu a pozoruhodnou tepelnou (odolávají varu po dobu 30 minut) a chemickou (odolnost k žaludečním hydrolázám) stálost. Produkovány jsou 30-50 % kmenů a kromě účinků na GIT mohou vyvolat příznaky šoku podobného TSST-1 (Murray et al., 2009).

Problematika antimikrobiální rezistence kmene *Staphylococcus aureus* bude podrobně rozebrána v kapitole 6.1.2.

#### 6.1.2. Methicilin-rezistentní *Staphylococcus aureus*

Kolem 80 % kmenů SA je v současné době rezistentní k penicilinu (Bednář et al., 1996), tato rezistence byla zpozorována v nemocnicích již roku 1942, dva roky po jeho zavedení do klinické praxe (Kolendi, 2010). Podstatou je enzymatická inhibice antibiotika tvorbou enzymu penicilinázy. Informace pro tento typ rezistence může být uložena na plazmidu, což značně přispělo k rychlému rozšíření mezi stafylokoky (Murray et al., 2009). Tento problém řeší semisyntetické peniciliny a kombinace s inhibitory  $\beta$ -laktamáz. Krátce po zavedení methicilinu do praxe v roce 1960, byly izolovány kmeny rezistentní k této látce (Barber, 1961). Dochází u nich k produkci pozměněné formy enzymu peptidoglykan transpeptidázy (PBP2a nebo PBP2'), která má mnohem menší afinitu methicilinu než původní forma. Tato forma je kódována 2,1 kb velkým genem *mecA*, který se nachází v úseku označovaném SCC*mec* (Staphylococcal chromosome cassette *mec*). Existuje sedm hlavních variant SCC*mec*, které se liší velikostí a obsaženými geny (Katayama et al., 2000). Tyto geny, získané např. z plazmidů, mohou spektrum rezistence měnit. V



případě *SCCmec* typ I, IV, V, VI, VII jde pouze o  $\beta$ -laktámová ATB naproti tomu *SCCmec* typu II a III obsahují i rezistence k aminoglykosidům, tetracyklinům, makrolidům, linkosamidům, streptograminu a dokonce i těžkým kovům jako rtuť a kadmium (Ito et al., 2003; Leclercq, 2002; Oliveira et al., 2006; Takano et al., 2008).

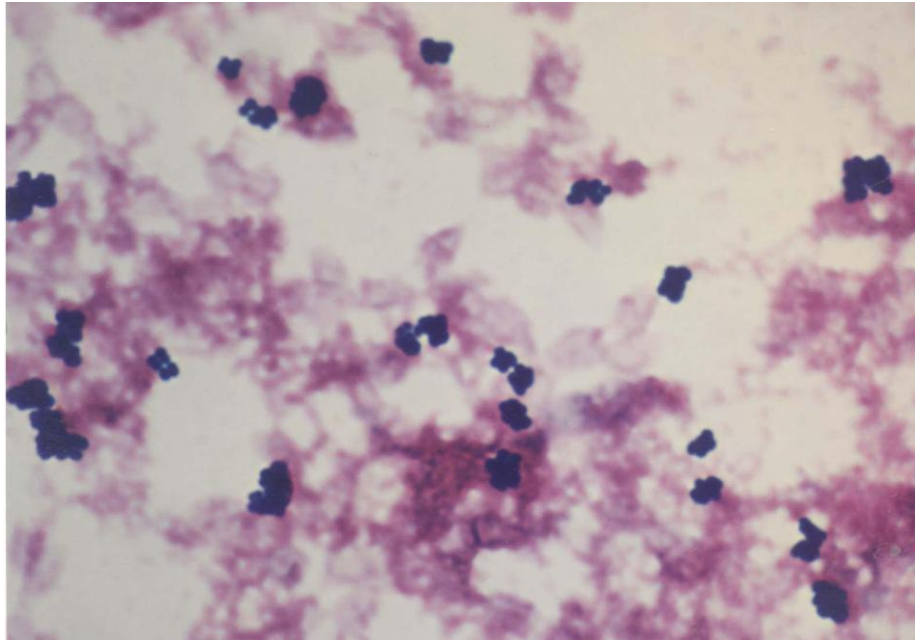
Ačkoliv byl dlouho MRSA považován za převážně nozokomiální patogen, byl roku 2002 pozorován jeho zvýšený výskyt ve vzorcích získaných z komunity. Tyto kmeny se množily mnohem rychleji a byly rezistentní k nižšímu počtu  $\beta$ -laktámů (Okuma et al., 2002). Jejich společným znakem je přítomnost *SCCmec* typu IV, Panton-Valentinova toxinu a zachovaná citlivost k ostatním nebetalaktámovým ATB (Murray et al., 2009). V současnosti přijímaná teorie o původu CA-MRSA (community associated MRSA) předpokládá, že právě menší velikost a relativní stabilita *SCCmec* typu IV usnadnila přenos rezistence pomocí fágů na různé, původně citlivé, kmeny SA (Pan et al., 2005). Nozokomiální kmeny mají ve svém genomu uloženy převážně větší *SCCmec* převážně typu II a III (Rehm a Tice, 2010).

Lékem volby při léčbě infekcí MRSA byly dlouhou dobu glykopeptidy, nicméně již roku 1997 byly zaznamenány případy infekce kmenem se sníženou citlivostí k vankomycinu (Hiramatsu et al., 1997). Tyto kmeny označované jako VISA (vancomycin-intermediate SA) měly výrazně zesílenou buněčnou stěnu, ve které docházelo k zachycení molekul ATB už ve vnějších vrstvách. Dnes jsou takto označovány kmeny, jejichž MIC vankomycinu je 4-8  $\mu\text{g/ml}$ . Objevily se i kmeny s MIC > 16  $\mu\text{g/ml}$  označované jako VRSA (vancomycin-resistant SA), u kterých patrně došlo k přenosu rezistence z enterokoků (CDC, 2002). Byl prokázán *in vitro* přenos genu *vanA*, který vede změnám v syntéze prekurzorů peptidoglykanů, z vankomycin rezistentního *Enterococcus faecalis* na SA (Tenover, 2008).

### 6.1.3. Staphylococcus epidermidis

Na rozdíl od SA, je *S. epidermidis* řazen mezi koaguláza-negativní zástupce rodu *Staphylococcus*. Dominantně se vyskytuje na kůži obličeje, v axilách, interdigitálních prostorech, na končetinách, perineu a sliznici nosohltanu, kde má komenzální charakter. Mimo jiné patří k nejčastějším

kmenům izolovaným z hemokultur, je však nutné vyloučit častou kontaminaci kmeny fyziologické flóry kůže a sliznic (Bednář et al., 1996). Ze všech infekcí způsobených koaguláza-negativními stafylokoky připadá na SE 70-80 % (Kayser et al., 2005).



**Obrázek 1: *Staphylococcus epidermidis*, shluky bakterií v klinickém materiálu**

(převzato z: [http://web.uconn.edu/mcbstaff/graf/Student%20presentations/S%20epidermidis/staph\\_epl4.jpg](http://web.uconn.edu/mcbstaff/graf/Student%20presentations/S%20epidermidis/staph_epl4.jpg))

Nemá tak široké spektrum produkovaných toxinů a faktorů virulence jako SA, což jej činí obtížněji diagnostikovatelným a infekce mají zpočátku spíše chronický charakter s nespecifickými příznaky (Rohilla, 2010). Patogenita SE tkví v jeho schopnosti adherovat k povrchům a vytvářet biofilm. *In vitro* preferuje zejména hydrofobní povrchy. V organismu se váže na proteinovou vrstvu, která se na povrchu vytvoří krátce po zavedení, zejména na fibrinogen, fibronectin a kolagen. Jednotlivé buňky biofilmu jsou zakotveny v matrix, jejíž největší podíl tvoří polysacharid poly-N-acetylglukosamin (PNAG) s monomery propojenými v místech  $\beta$ 1-6 (Otto, 2009). Kromě PNAG buňky produkují také pseudopeptid poly- $\gamma$ -glutamovou kyselinu, která je chrání před fagocytózou neutrofilů a patrně jim umožňuje růst i v prostředí s vysokou koncentrací solí (Kocianova et al., 2005). Extracelulární hmota chrání bakterie před působením antibiotik i nespecificky působících látek např. jodovaného povidonu. Naopak poměrně dobře účinné jsou alkoholy a peroxid vodíku v koncentraci 3% a 5% (Presterl et al., 2007).

Důležitým predisponujícím faktorem pro vznik infekce je přítomnost cizího tělesa. Jedná se zejména předměty z umělých hmot zavedené lékařským zákrokem: katétrů, cévní náhrady, umělé chlopně a klouby, kontinuální peritoneální dialýzy aj. Kontaminující bakterie pocházejí z povrchu kůže a sliznic samotného pacienta nebo ošetřujícího personálu (Bednář et al., 1996). Se zvyšujícím se využitím výše uvedených metod se ze SE stává stále významnější nozokomiální patogen. Nezřídka je třeba vyjmout kontaminovaný materiál z organismu pacienta, jako jediný způsob zvládnutí infekce.

Profil rezistence k antimikrobiálním látkám má SE velmi podobný SA. V některých oblastech, např. USA, je 75 – 90% nemocničních kmenů rezistentních k methicilinu (Diekema et al., 2001). Přenos *mecA* genu kódujícího syntézu pozměněných PBP je teoreticky možný mezi jednotlivými druhy rodu *Staphylococcus* (Bloemendaal et al., 2010). Dále byla pozorována rezistence k fluorochinolonům, sulfonamidům, tetracyklinu, chloramfenikolu, erytromycinu, gentamicinu a vzácně dokonce i k tigecyklinu, linezolidu a streptograminům. Geny pro rezistenci jsou kódovány na plazmidech a multirezistence je pozorována spíše u endemických nozokomiálních kmenů (Rogers et al., 2009). Vzhledem k rozsáhlé kolonizaci lidského organismu SE, by mohlo dojít k vytvoření “rezervoáru“ genů rezistence a jejich přenosem ke vzniku nových rezistentních kmenů zejména v komunitě (Otto, 2009).

Situaci komplikuje také schopnost SE vytvářet biofilm, což může až tisícinásobně zvyšovat odolnost bakterií (Mah a O'Toole, 2001). Jako poměrně účinný byl v těchto případech považován rifampicin, ale kvůli vysokému riziku vzniku rezistence se nedoporučuje jeho užití v monoterapii (Hellmark et al., 2009). Jako nejúčinnější se ukázaly kombinace rifampicin-klindamycin, rifampicin-gentamicin, event. rifampicin-norfloxacin. Užití alternativních látek tigecyklin, linezolid a daptomycin se ukázalo jako nereálné díky nemožnosti dosáhnout potřebné terapeutické koncentrace *in vivo* a jejich zatížení vysokou cenou a toxicitou (Gomes et al., 2012).

#### 6.1.4. Enterococcus faecalis

Rod *Enterococcus* patří mezi grampozitivní, kataláza-negativní bakterie. Dříve byl, díky výše uvedeným vlastnostem a přítomnosti stěnového antigenu

skupiny D, řazen mezi streptokoky. Od roku 1984 tvoří samostatný rod, který v současnosti obsahuje na 38 druhů (Murray et al., 2009), nicméně v 90 % klinických nálezů je identifikován *Enterococcus faecalis*, druhým nejčastějším je potom *E. faecium* s 5-10 % (Kayser et al., 2005).

Kultivačně jsou enterokoky poměrně nenáročné, na rozdíl od streptokoků rostou v rozmezí teplot od 10 °C do 45 °C, daří se jim i při vysokém pH (8,5) a v prostředí s koncentrací NaCl do 6,5%. Dokonce přežívají půlhodinové zahřátí na 60 °C a jsou fakultativně anaerobní (Bednář et al., 1996). Na agaru tvoří šedobílé kolonie většinou bez hemolýzy, případně s  $\alpha$ -hemolýzou. V tekutých půdách i klinickém materiálu se seskupuje do dvojic nebo krátkých řetízků, často mohou připomínat pneumokoky (Murray et al., 2009).

Enterokoky jsou běžnou součástí normální lidské i zvířecí flóry tlustého střeva a lze je prokázat v tenkém střevě a genitálním traktu (Bednář et al., 1996). V dýchacích cestách a na kůži je lze ve vyšší míře nalézt u pacientů, kteří prodělali léčbu širokospektrými ATB (Murray et al., 2009).

Jedná se o klasické oportunní patogeny, jejich patogenita pro zdravého jedince je nízká, byť je schopný adherovat na stěnu buněk a produkovat hemolytické a proteolytické enzymy. Patří však mezi nejčastější původce nozokomiálních infekcí (až 12 % všech případů), zejména smrtelných endokarditid. V součinnosti s ostatními bakteriemi také infikuje pooperační rány v oblasti dutiny břišní (Murray et al., 2009). Do popředí zájmu se dostává díky vzrůstající rezistenci téměř ke všem skupinám ATB.

Enterokoky mají schopnost přijímat kyselinu listovou z okolí, což je činí imunní k účinkům kotrimoxazolu (Chenoweth et al., 1990). Jak *E. faecalis* i *E. faecium* mají přirozenou rezistenci k aminoglykosidům danou mimo jiné sníženou propustností buněčné stěny. Dříve byla proto používána jejich kombinace s  $\beta$ -laktámy nebo vankomycinem (Murray et al., 2009). Častá je také chromozomálně kódovaná produkce enzymu aminoglykosid-6'-acetyl transferázy u *E. faecium* (Bednář et al., 1996) zajišťující vysokou rezistenci ke kanamycinu a tobramycinu. Přímo v chromozómu je také uložena rezistence k  $\beta$ -laktámům pomocí produkce PBP5 (*E. faecium*) nebo PBP4 (*E. faecalis*) s nízkou afinitou (Rice et al., 2001).

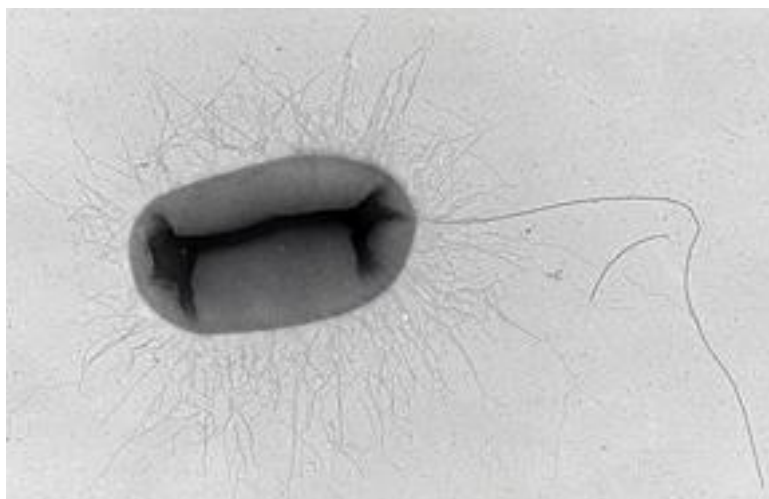
Největším problémem se v současnosti stává rostoucí rezistence ke glykopeptidům, zejména vankomycinu. Ve Spojených státech se přepokládá u až 30 % všech klinických vzorků (Flamm et al., 2012). Enzymatickou záměnou D-ala konce molekuly peptidoglykanu za D-lac nebo D-ser vznikají prekurzory buněčné stěny s 1000 × nižší afinitou k aminoglykosidům. Soubor genů umožňujících tuto změnu je označován jako *van* operon. Nejčastější formy jsou *vanA* (kódující rezistenci k vankomycinu a teikoplaninu), *vanB* (pouze vankomycin) a *vanC* (přirozená rezistence k vankomycinu např. u *E.casseliflavus*) (Gold, 2001). Jejich umístění na plasmidech umožňuje snadný přenos i na jiné druhy bakterií např. stafylokoky (Tenover, 2008). Terapie použitím nových ATB jako je linezolid, kombinace chinupristin-dalfopristin, tigecyklin a jejich kombinací je sice stále poměrně účinná, nicméně už se objevily případy rezistence i k těmto, původně nadějným, látkám (Hollenbeck a Rice, 2012).

#### 6.1.5. Escherichia coli

EC patří do čeledi *Enterobacteriaceae*, morfologicky se jedná o gramnegativní tyčky o rozměrech 2-3  $\mu\text{m}$  × 0,6  $\mu\text{m}$ . Jsou pohyblivé s peritrichózně umístěnými bičičky. Některé typy tvoří pouzdra a jejich kolonie mají hlenovitý charakter (Bednář et al., 1996).

Biochemicky je fakultativně anaerobní, kataláza-pozitivní a oxidáza-negativní se schopností fermentace glukózy a laktózy. Je schopná růst na základních kultivačních půdách s optimem při 37°C. Na MacConkey agaru tvoří růžovofialové kolonie což lze s výhodou využít při diferenciaci od dalších rodů čeledi *Enterobacteriaceae* například *Shigella*, *Salmonella* a *Yersinia* (Murray et al., 2009).

Ve velkých počtech se nachází v tlustém střevě jako běžný komenzál, kde se neprojevuje, dokud nezíská specifické faktory virulence nebo nedojde k jejímu zavlečení mimo střevo. Je původcem více než 80 % infekcí močových cest a velkého počtu gastroenteritid v rozvojových zemích (Murray et al., 2009). Přítomnost EC je základním indikátorem kontaminace vody a potravin fekáliemi (Kayser et al., 2005).



**Obrázek 2: *Escherichia coli***

(převzato z: <http://navymedicine.navylive.dodlive.mil/files/2011/11/ETEC-Electron-Microscopy-for-web.jpg>)

S ostatními členy čeledi *Enterobacteriaceae* sdílí EC hlavní stavební složku buněčné stěny, lipopolysacharidový komplex. Sestává s hydrofilní komponenty, tzv. O specifického polysacharidu jehož změny ve složení slouží k sérotypizaci v rámci rodu. Druhá část, hydrofobní lipid A, se chová jako endotoxin, pokud je uvolněn při lýze buňky (Bednář et al., 1996). Některé enteropatogenní kmeny používají speciální proteinovou strukturu (sekreční systém III. typu), kterou mohou vpravit některé faktory virulence přímo do buněk hostitele (Murray et al., 2009).

EC je původcem až 80% akutních infekcí močových cest. Uplatňují se zejména kmeny schopné adheze k luminu pomocí tzv. P fimbrií. Patogenní kmeny produkují hemolysin HlyA, který rozkládá erythrocyty a další buňky za uvolnění cytokinů a rozvoje zánětu. Zároveň je EC původcem až 15 % nozokomiálních sepsí (Kayser et al., 2005). Podle specifických patogenních mechanismů se intestinální kmeny EC rozdělují do několika typů.

Enteropatogenní (EPEC) forma je nejčastějším původcem novorozeneckých průjmů v rozvojových zemích. Díky přenosu z osoby na osobu může dojít k epidemickému šíření (Murray et al., 2009). V tenkém střevě bakterie adherují na epiteliální buňky ve formě mikrokolonií, dochází k destrukci mikrokloků a alteraci intraluminálního povrchu. Nebyla zde prokázána tvorba enterotoxinů (Bednář et al., 1996). Geny nezbytné pro agregaci a vznik mikrokolonií, kódující tvorbu tzv. bundle forming pili, mohou být přenášeny na plazmidu (Murray et al., 2009).

Enterotoxigenní (ETEC) *E.coli* se vyskytují převážně endemicky v teplých oblastech, kde vyvolávají průjemy hlavně u dětí. Bývají nejčastějšími původci tzv. cestovatelských průjmů (Egypt, Mexiko) a do našich končin jsou pouze zavlečeny (Bednář et al., 1996). Kolonizaci usnadňují proteinové fimbrie, které rozpoznávají druhově specifické glykoproteinové receptory. Za patogenitu jsou zodpovědné zejména dva typy enterotoxinů: termolabilní (TL), který je inaktivován působením 60°C po dobu 30 minut a termostabilní (TS), který vydrží i teploty do 100°C (Kayser et al., 2005).

TL je svojí aktivitou podobný cholera toxinu, stimuluje aktivitu adenylátcyklázy v buněčné membráně, permanentně zvýšená hladina cAMP potom vede ke zvýšení sekrece Cl<sup>-</sup> iontů do lumina tenkého střeva a inhibici absorpce Na<sup>+</sup> což má za následek ztrátu izotonické tekutiny. TS naopak zvyšuje aktivitu transmembránové guanylátcyklázy. Schopnost sekrece TS i TL je na sobě nezávislá a geny mohou být přenášeny na plazmidu (Murray et al., 2009).

Infekce ETEC kmeny se neprojevuje změnami intestinální sliznice a nebyl pozorován ani zánětlivý průběh (Murray et al., 2009).

Enterohemoragická (EHEC) *E.coli* se objevuje i ve vyspělých zemích jako následek konzumace nedostatečně zpracované kontaminované potravy a její přenos je možný z osoby na osobu. Váže se v tlustém střevě mechanismem podobným EPEC a vyznačuje se produkcí toxinu, který se podobá šigelovému (Bednář et al., 1996). Infekce se projevuje hemoragickou kolitidou a může se rozvinout až v hemolyticko-uremický syndrom, kdy poškození glomerulárních endoteliálních buněk vede k aktivaci destiček a depozici trombinu. Následná snížená glomerulární filtrace může vést až k renálnímu selhání. Infekci provází krvavý průjem se silnou bolestí břicha. Geny pro produkci toxinů jsou přenášeny lysogenními bakteriofágy (Murray et al., 2009).

Enteroinvazivní (EIEC) kmeny mohou, podobně jako bakterie rodu *Shigella*, pronikat do buněk sliznice tlustého střeva a tam se množit, za vzniku zánětlivých ulcerací (Kayser et al., 2005)

Někteří autoři rozlišují ještě typ enteroagregativní (EAaggEC) *E.coli*, která je pomocí specifických fimbrií adherovat ke sliznici a sobě navzájem za tvorby biofilmu. Je také schopná produkce toxinu, jež je antigeně podobný TS u ETEC.

EC je primárně citlivá k většině ATB, nicméně u některých nemocničních kmenů bylo pozorováno zvyšování míry rezistence, zejména k širokospektrým látkám (Da Silva a Mendonca, 2012).  $\beta$ -laktámy jsou inaktivovány produkcí  $\beta$ -laktamáz s rozšířeným spektrem (extended-spectrum  $\beta$ -lactamases, ESBL). První vznikly bodovou mutací původních penicilináz TEM a SHV (dále vysvětleno v kapitole 6.1.7), ale od roku 1995 se u EC začínají stále více objevovat nové druhy ESBL označované jako CTX-M s velmi vysokou účinností vůči cefotaximu a 3. generaci cefalosporinů. Geny pro jejich syntézu se nacházejí na vysoce mobilních plazmidech (Bonnet, 2004).

Za sníženou citlivost vůči fluorochinolonům může jednak bodová mutace cílových enzymů (DNA gyrázy a topoizomerázy II) a zvýšená činnost efluxních mechanismů. Zejména druhý způsob je důležitý v případě hydrofilních chinolonů (např. norfloxacin, ciprofloxacin). Nedávno byly objeveny nové efluxní pumpy (např. QepA), kdy geny pro jejich produkci mohly být uloženy na plazmidu (Yamane et al., 2007).

Jednotlivé geny pro rezistenci k ATB bývají u enterobakterií často organizovány do tzv. integronů, samostatných jednotek, které kromě samotných genů obsahují také elementy pro jejich expresi, inzerci nových genů a integraci do „hostitelské DNA“ (Hall a Collis, 1995). Jejich schopnost kumulace genů a schopnost přenosu z nich činí významné faktory pro vývoj multirezistentních kmenů. Byly nalezeny, byť zatím v malé míře, u některých kmenů běžné komenzální flóry získaných ze stolice, přičemž byla sledována rezistence k ampicilinu, kotrimoxazolu, chloramfenikolu a tetracyklinům (Bailey et al., 2010).

#### 6.1.6. Klebsiella pneumoniae

KP je dalším zástupcem čeledi *Enterobacteriaceae*. Jedná se o gramnegativní tyčky, na rozdíl od EC nepohyblivé. Tvoří silné pouzdro sestávající převážně z polysacharidů, což vede k slizovitému vzhledu kolonií a zvyšuje virulenci (Murray et al., 2009).

Její přirozený výskyt v lidském organismu je nejvyšší v respiračním (nosohltan), zažívacím a urogenitálním traktu, přičemž pravděpodobnost nálezu



ve stolici se zvyšuje hospitalizací a užíváním antibiotik. V životním prostředí se vyskytuje běžně i ve vodě (Abbot, 2007).

KP je podmíněně patogenní a u oslabených pacientů je původcem pneumonie spojené s nekrotizací alveolárních prostor a produkcí krvavého sputa (Murray et al., 2009). Je také na 4. místě mezi původci infekcí močových cest a to jak nozokomiálního původu, tak i v komunitě. Infekce mohou přecházet v celkovou sepsi, někteří autoři uvádějí až dvakrát vyšší mortalitu než u grampozitivních organismů (Abbot, 2007).

Problematika citlivosti KP k používaným antimikrobiálním látkám bude podrobněji rozebrána v následující kapitole.

#### 6.1.7. Klebsiella pneumoniae ESBL pozitivní

Schopnost bakterií produkovat enzymy štěpící  $\beta$ -laktámový kruh existovala ještě před uvedením penicilinu do klinické praxe, patrně jako mechanismus kompetice s bakteriemi schopnými produkce antimikrobiálních látek. Roku 1965 byly objeveny u KP a EC dva typy  $\beta$ -laktamázy schopné přenosu na plazmidu, TEM-1 (podle pacientky u níž byl izolován příslušný kmen jménem Temoniera) a SHV-1 (sulfhydryl variable). Překonány byly zavedením cefalosporinů s oxyiminovým postranním řetězcem, cefotaximu, ceftazidimu, ceftriaxonu aj. (Turner, 2005). Roku 1985 byl u KP izolován kmen schopný jejich štěpení, označen jako SHV-2 a je považován za první ESBL (Kliebe et al., 1985). V průběhu 80. a 90. let docházelo k jejich šíření, zejména v jednotkách intenzivní péče. Od roku 2000 jsou pozorovány zejména  $\beta$ -laktamázy typu CTX-M, poněvadž je jejich účinnost mnohem vyšší k cefotaximu než ceftazidimu. Pochází z genomu *Kluyvera spp.*, odkud se pomocí plazmidů dostaly k patogenním enterobakteriím, v současnosti se dělí do pěti hlavních skupin (Rossolini et al., 2008). Prevalence ESBL se velmi liší mezi jednotlivými regiony od 80% v Indii až po 5%-10% v severní Evropě (Hoban et al., 2011).

Ačkoliv CTX-M mohou být inaktivovány inhibitory  $\beta$ -laktamázy, na plazmidu s nimi mohou být uloženy penicilinázy OXA-1, které jsou vůči nim rezistentní. Dlouhá doba užívání karbapenemů pro zvládnutí infekcí KP-E vedla k selekci kmenů schopných jim odolávat. Karbapenemázy se dělí na tři hlavní skupiny s rozdílným spektrem účinku a prevalencí (Livermore, 2012). U čeledi

*Enterobacteriaceae* se nejčastěji vyskytuje KPC schopná inaktivace všech  $\beta$ -laktámových ATB (Nordmann et al., 2009). Druhou skupinou jsou tzv. metalo-karbapenemázy, rozdělené na několik podskupin, schopné plazmidického přenosu (zejména typy VIM a NDM) a zachovanou citlivostí na aztreonam. NDM však často bývá doprovázena 16S rRNA methylázami inaktivujícími většinu aminoglykosidů (Kumarasamy et al., 2010). Třetí je OXA-48, objevená v Turecku roku 2001 a poměrně častá v Evropě, neúčinkující na ceftazidim (Potron et al., 2011).

Kmeny nesoucí geny pro ESBL ve většině případů bývají rezistentní i ostatním skupinám ATB zejména fluorochinolonům a aminoglykosidům. V terapii stále zůstávají účinné látky jako tigecyklin, kolistin a fosfomycin (Livermore, 2012).

Obecně lze pozorovat přesouvání pozornosti z multirezistentních grampozitivních bakterií typu MRSA nebo VRE právě ke gramnegativním. Byl zde zaznamenán rychlejší nárůst míry rezistence a vývoj nových látek zatím nepřinesl očekávaný přínos (Livermore, 2012).

#### 6.1.8. Pseudomonas aeruginosa

PA se řadí mezi gramnegativní, kataláza- i oxidáza-pozitivní a obligátně aerobní bakterie tyčkovitého tvaru nebo s mírným zakřivením (Bednář et al., 1996). Zpravidla dosahují 1,5 – 5  $\mu\text{m}$  na délku, pohyblivost zajišťují polárně umístěné bičíky (Murray et al., 2009).

V přírodě se vyskytuje běžně v půdě, odpadních vodách, v rozkládajícím se organickém materiálu i na vegetaci. V malém množství kolonizuje sliznice u oslabených jedinců. Často je lze nalézt v nemocnicích na místech se zvýšenou vlhkostí (odtoky, toalety atd.) a jednotkách intenzivní péče, kde kontaminuje respirační a dialyzační pomůcky což zvyšuje její prevalenci u nozokomiálních infekcí (Bednář et al., 1996) až na téměř 8 % (Kayser et al., 2005).

Nízké nároky umožňují kultivaci i na základních půdách, při zachovaném přístupu kyslíku s teplotním optimem 30-37°C. Některé kmeny na krevním agaru vytvářejí zónu  $\beta$ -hemolýzy. Tvoří ploché, lesklé, různě zbarvené kolonie díky produkci pigmentů (pyocyanin, fluorescein). V klinickém materiálu se buňky shlukují do párů (Murray et al., 2009).

I přes poměrně širokou škálu produkovaných faktorů virulence je PA primárně oportunním patogenem, zejména jsou ohroženi pacienti s cystickou fibrózou, rozsáhlými popáleninami a dlouhodobě katetrizovaní (Bednář et al., 1996). Specifická pro PE je produkce alginátu, který obaluje celé mikrokolonie a chrání je tak před působením ATB a fagocytózou, geny pro jeho nadprodukcí jsou často nalézány u kmenů kolonizujících pacienty s cystickou fibrózou (Murray et al., 2009).

Nejvýznamějším extracelulárním enzymem je exotoxin A, který má podobné účinky jako toxin produkovaný *Corynebacterium diphtheriae*. Tento termostabilní enzym (ADP ribosyl transferáza) inhibuje translaci inaktivací elongačního faktoru eEF2, což vede k úplné zástavě proteosyntézy (Kayser et al., 2005). Kromě imunosupresivního působení způsobuje nekrózu pokožky při infekci popálenin a poškození rohovky u očních infekcí vedoucím až k ulcerózním ložiskům a ztrátě oka (Murray et al., 2009).

PE produkuje dva typy termolabilní fosfolipázy C, která díky štěpení lipidů a lecitinu napomáhá poškození tkáně. Exoenzymy E a S s cytotoxickou aktivitou způsobují, pomocí změny uspořádání molekul aktinu, vznik pórů v membránách buněk (Kayser et al., 2005).

Rezistence k ATB je velkým problémem, neboť PE je v malé míře přirozeně rezistentní k mnoha skupinám látek. To je dáno jednak produkcí hydrolytických enzymů, sníženou permeabilitou buněčné stěny a aktivitou několika typů efluxních pump (Alvarez-Ortega et al., 2011). Podobně jako někteří zástupci *Enterobacteriaceae* produkuje PE cefalosporinázu AmpC. Pokud je tato produkce dostatečně vysoká, způsobuje rezistenci ke všem  $\beta$ -laktámům (vč. cefepimu) vyjma karbapenemů (Lister et al., 2009). Induktorem pro aktivaci exprese AmpC genů je vazba ATB na PBP (Pfeifle et al., 2000).

Ve vnější buněčné membráně PE se nachází substrátově specifický porin OprD, přes který se do buňky, mimo aminokyselin a peptidů, dostávají také karbapenemová ATB. Snížení jejich počtu, buďto mutací nebo záměrnou down-regulací vede ke snížení citlivosti na tento typ ATB, zejména k imipenemu. Novější látky, např. doripenem jsou tímto méně ovlivněné a mají menší potenciál selekce rezistentních mutantů (Sakyo et al., 2006).

V buněčné stěně PE se může nacházet množství efluxních pump rozdělených podle substrátové specifity a energetických potřeb do pěti skupin. Nejpočetnější je tzv. RND skupina, která odčerpává zejména lipofilní a amfifilní látky (např. chinolonová ATB) z cytoplazmy a periplazmatického prostoru pomocí antiportu s  $H^+$  ionty (Poole, 2000).

Získaná rezistence zahrnuje zejména  $\beta$ -laktamázy typu PSE, OXA a TEM, které však nejsou schopné štěpit monobaktámy a cefalosporiny s rozšířeným spektrem. Metalo-karbapenemázy a KPC zatím nejsou příliš rozšířené (Lister et al., 2009). Nejrozšířenějším typem rezistence k aminoglykosidům jsou enzymy modifikující strukturu ATB fosforylací, acetylací nebo adenylací, které se navíc mohou navzájem doplňovat v případě, že jejich geny sdílí společný transpozón. Prevalence kmenů rezistentních k několika aminoglykosidům je nejvyšší v Latinské Americe (Poole, 2005).

Antibiotická léčba je obtížná a měla by se vždy opírat o stanovení citlivosti konkrétního kmene. U pacientů s cystickou fibrózou se používají inhalační formy tobramycinu, méně často kolistinu, gentamicinu, ceftazidimu (Flume et al., 2007) a nově též aztreonam-lysinu (McCoy et al., 2008) k léčbě iniciální infekce a udržení chronické. Dlouhodobé eradikace však není možné dosáhnout (Hurley et al., 2012).

Vedou se spory ohledně preference monoterapie nebo kombinační léčby. Podle některých autorů by při podezření na infekci PE měla být léčba zahájena dvěma látkami se známým účinkem a po 3-5 dnech by měl být pacient převeden na monoterapii dle výsledků stanovení citlivosti (Bodi a Garnacho, 2007). Nejčastější úvodní kombinace je  $\beta$ -laktám a fluorochinolon nebo aminoglykosid (Micek et al., 2010).

V současnosti se také zaměřuje pozornost na vývoj alternativních metod léčby. Mezi jinými: imunizace protilátkou proti flagellinu, proteinu tvořícím bičíky (Veesenmeyer et al., 2009), využití bakteriofágů (Wright et al., 2009) nebo inhibice efluxních mechanismů (Alibert-Franco et al., 2009).

## 6.2. Charakteristika fungálních testovacích kmenů

### 6.2.1. Candida albicans

Odhaduje se, že CA je původcem až 70 % všech onemocnění lidských pacientů způsobených kandidami (Kayser et al., 2005). Všichni námi testovaní příslušníci rodu *Candida* jsou anaerobní a poměrně nenároční na kultivaci. Na Sabouraudově glukózovém agaru rostou dobře při 37°C i 20°C. Kmeny CA získané z klinického materiálu tvoří smetanově bílé, hladké a vypouklé kolonie s kulatými nebo oválnými buňkami 3-5 μm průměru. Z vnějšího prostředí izolované fenotypy tvoří kolonie matně šedavé s protáhlými blastokonidii. Tvar buněk se může lišit od blastokonidií, přes větvené řetízky tzv. pseudohyfy až po vláknité mnohobuněčné pravé hyfy (Bednář et al., 1996).



**Obrázek 3: *Candida albicans***

(převzato z: [http://simple.wikipedia.org/wiki/File:Candida\\_albicans\\_2.jpg](http://simple.wikipedia.org/wiki/File:Candida_albicans_2.jpg))

Tato schopnost tzv. "fenotypového switchingu" je pro některé kandidy charakteristická. Patrně jde o vlastnost, díky které získávají variabilitu nutnou pro přizpůsobování se různým podmínkám prostředí. Tyto změny jsou reverzibilní a přenášejí se na další generace buněk. Jejich nástup je řízen patrně chromozomálně mechanismem analogickým ke genu SIR2 u *Saccharomyces cerevisiae* (Pérez-Martín et al., 1999).

V lidském organismu se nachází zejména v GIT, méně často také v pochvě, na kůži a pod nehty. Až 50% zdravých jedinců má kandidy jako součást normální ústní flóry. V přírodě se vyskytuje ve vodě i v půdě (Murray et al., 2009).

Ačkoliv je CA převážně oportunním patogenem, oplývá několika mechanismy, které mohou ovlivňovat její virulenci. Adheruje k buňkám i nebiologickým povrchům pomocí mananproteinu, který také tvoří fibrilární vrstvu jako ochranu před fagocytózou (Bednář et al., 1996). Schopnost "switchingu" umožňuje rychlý vznik vláknitých forem, které snáze prorůstají do tkání a unikají imunitním mechanismům. Některé druhy také produkují kyselé proteinázy popř. fosfolipázy (Murray et al., 2009). Fosfolipázová aktivita bývá soustředěna do růstového vrcholu hyfy (Dismukes et al., 2003).

Infekce CA se může pohybovat od superficiálních mykóz kůže a sliznic (nejčastěji dutina ústní, pochva), přes mukokutánní formy s hlubší invazí houby do tkáně, až po formy diseminované hematogenní cestou do vnitřních orgánů (Bednář et al., 1996). Právě kandidová seps s nálezy v plicích, GIT, ledvinách nebo CNS bývá zjištěna v terminálních stádiích těžkých onemocnění. Infekce bývá většinou sekundární u oslabených pacientů, ale byly pozorovány i případy mykózy primární v případě napadení vysoce virulentními kmeny (Murray et al., 2009).

Od svého uvedení v roce 1990 se lékem volby při infekcích *Candida spp.* stává flukonazol. I přes široké použití v léčbě i v profylaxi se dnes průměrná míra rezistence u CA pohybuje okolo 1,4 % všech kmenů testovaných v rámci studie ARTEMIS. U vorikonazolu je ještě nižší a to 1,2 %. Až 63% flukonazol rezistentních CA má sníženou citlivost i k vorikonazolu (Pfaller et al., 2010). Rezistence může nastat: změnou cílového enzymu (sterol-14 $\alpha$ -demethylázy) a snížením jeho afinity k ATM, zvýšenou expresí genů pro membránové transportní proteiny (CDR1/CDR2) nebo genů MDR1 snižujících intracelulární akumulaci (Morschhauser, 2002).

K látkám typu echinokandinů si CA stále zachovává velmi vysokou citlivost, byť byly pozorovány případy mutací genu *fks1*, který kóduje cílový enzym  $\beta$ -1,3-D-glukan syntázu (Messer et al., 2010).

Výrazným trendem je přesun původce infekcí od CA směrem k ostatním druhům rodu *Candida*, zejm. *C.glabrata* a *C.tropicalis* v posledních 10 letech (Pfaller et al., 2010)

### 6.2.2. Candida tropicalis

CT je v současnosti druhým nejčastějším původcem kandidóz mezi tzv. non-albicans druhy (Pfaller et al., 2010). Na agaru tvoří nejčastěji bílé, téměř polokulovitě vyklenuté, lesklé kolonie s krátce vláknitým okrajem. V přírodě se vyskytuje v hnijcím dřevě, kyselém zelí, kefiru, vodě a půdě. U člověka je součástí mikroflóry zejména horní části gastrointestinálního traktu (Fragner, 1992).

Infekce je téměř vždy endogenní, ale byly pozorovány i případy nozokomiální nákazy. Nejnáchylnější jsou zejména pacienti s neutropenií hematologickými malignitami a po transplantaci kostní dřeně (Calderone a Clancy, 2011). Za zmínku stojí také vyšší prevalence CT na novorozeneckých jednotkách intenzivní péče (Roilides et al., 2003).

Invazi do organismu napomáhá jednak produkce aspartylové proteázy, která je vlastní většině příslušníků rodu *Candida* a také kyselá proteázy, tzv. tropiázy, specifické pro CT. Oproti CA non-albicans druhy neprodukuje fosfolipázu (Gokce et al., 2007). Příznaky se liší podle místa a míry napadení od interdigitálních mykóz a paronychii až po diseminované systémové kandidózy (Kothavade et al., 2010).

CT sice vykazuje vyšší celkovou míru rezistence k flukonazolu a vorikonazolu než CA, nicméně citlivost je poměrně vysoká (Pfaller et al., 2010), mechanismem je upregulace efluxních pump (Kothavade et al., 2010). Při selhání léčby nebo relapsu se přechází na echinokandiny nebo amfotericin B, který má ovšem vyšší toxicitu (Murray et al., 2009).

### 6.2.3. Candida krusei

(Pfaller et al., 2010) uvádí CK jako 4. nejčastějšího původce mezi non-albicans druhy, které se začaly prosazovat díky stále častějšímu užívání flukonazolu v praxi.

Průměr kolonií se pohybuje mezi 3-8 mm, nejčastěji mají šedavě krémovou barvu s výrazně zdviženým středem. Od středu k okraji se mohou vyskytovat nepravidelné radiální zářezy. Okraj je nízký, laločnatý, vroubkovaný nebo vláknitý. Nejčastěji se nachází ve vzduchu, jogurtu, nepasterovaném pivu a ovocných šťávách (Fragner, 1992).

Nejvíce ohroženi jsou pacienti s hematologickými malignitami a po transplantaci kostní dřeně. Díky přítomnosti CK v gastrointestinální mikroflóře je většina infekcí endogenního původu (Calderone a Clancy, 2011). Pacienti se systémovou infekcí CK vykazovali dle (Horn et al., 2009) nejvyšší míru mortality ze všech ostatních kandid.

U CK byla pozorována přirozená rezistence k azolovým ATM. Mutací genu *ERG11* vzniká pozměněný, ale stále funkční, enzym lanosterol demethyláza s nižší afinitou k azolům. Spolu se zvýšenou expresí genů CDR1 a CDR2 pro efluxní pumpy (White, 2007) tak vzniká nejnižší citlivost ke flukonazolu ze všech zástupců rodu *Candida*. Nepotvrdily se domněnky o plně zkřížené rezistenci, takže k vorikonazolu si stále zachovává poměrně dobrou citlivost, byť ne tak vysokou jako ostatní zástupci (Pfaller et al., 2010). Velké procento nálezů CK je také rezistentních k amfotericinu B, patrně díky nižšímu obsahu ergosterolu v buněčné membráně (White, 2007).

#### 6.2.4. Candida glabrata

V celosvětovém průměru je CG druhý nejčastější původce kandidóz na světě (Pfaller et al., 2010). Kolonie tvoří bělavě krémové, nízké s hladkým a velmi lesklým povrchem [(Fragner, 1992) uváděno pod synonymem *Torulopsis glabrata*]. Tvoří oválné haploidní buňky a jako jedna z mála kandid nevykazuje dimorfismus (Calderone a Clancy, 2011).

V přírodě se vyskytuje v pomerančové šťávě a pekařském droždí (Fragner, 1992). U člověka tvoří součást přirozené komenzální flóry v ústech. Zejména u diabetiků a HIV-pozitivních pacientů je spolu s CA nejčastějším nálezem (Calderone a Clancy, 2011). Nalézt ji lze i v urogenitálním a gastrointestinálním traktu (Hazen a Howell, 2007).

Velmi dobře, až dvakrát lépe než CA, adhezuje k hydrofobním povrchům jako jsou buněčné epitely nebo zubní náhrady pomocí lektinů. Tyto proteiny jsou kódovány skupinou genů EPA (epithelial adhesin), které bývají ve zvýšené míře aktivovány při urogenitálních infekcích (Calderone a Clancy, 2011). Ze systémových infekcí způsobuje hlavně endokarditidy a meningitidy (Hazen a Howell, 2007).

Obdobně jako CK byla u CG zaznamenána snížená citlivost k flukonazolu, přičemž míra zkřížené rezistence k ostatním azolům



(vorikonazol) byla vůbec nejvyšší ze všech sledovaných kandid. Na druhou stranu bylo pozorováno minimum případů rezistence k amfotericinu B a k echinokandinům (Messer et al., 2009).

#### 6.2.5. Trichosporon asahii

Mezi lety 1990 a 2004 byl, na základě molekulární analýzy, rod *Trichosporon* několikrát rozdělen mezi stále se zvyšující počet druhů. Název *Trichosporon beigelii* byl roku 1994 prohlášen za obsolentní a vyřazen z užívání (Middelhoven et al., 2004). Klinicky nejvýznamějším zástupcem je *T. asahii* a proto byl zařazen mezi testovací kmeny.

Při kultivaci na Sabouraudově dextrózovém agaru rychle tvoří výrazně zvrásněné lesklé kolonie šedé až krémové barvy. Postupem času zráním vysychají a tvoří se na nich povlak. Mikroskopicky vytváří pravé hyfy i pseudohyfy, arthrokonidie i blastokonidie (Dismukes et al., 2003). V přírodě se nachází zejména v půdě, rozkládajícím se dřevě, povrchových vodách a ptačím trusu. U člověka je výjimečně součástí mikrobioty dolní části GIT, horních cest dýchacích a perigenitální oblasti (Chagas-Neto, T. C. et al., 2008).

Infekcí TA jsou nejvíce ohroženi pacienti po orgánové transplantaci, náhradě srdečních chlopní a příjemci protinádorové léčby (Dismukes et al., 2003). Povrchová infekce se označuje jako "bílá piedra", charakteristická je tvorbou bílých měchýřků na zasažených vlasech. Nejčastěji postiženi bývají mladí lidé v teplejším klimatu (Schwartz, 2004). Systémová infekce může postihnout téměř jakýkoliv orgán, až ve třetině případů bývají mezi napadenými plíce, dále hlavně ledviny a oko. Mortalita se pohybuje mezi 60 – 70 % (Dismukes et al., 2003). Zejména v Japonsku se neustále zvyšuje počet pacientů s letními pneumonitidami na základě hypersenzitivní reakce vzniklé opakovanou inhalací arthrokonidií. Významný podíl mezi nálezy má právě *T.asahii* (Sugita et al., 2004).

Buněčná stěna TA obsahuje glukuronoxylomanan (GXM), který může snižovat fagocytární aktivitu monocytů a neutrofilů. Ve vzorcích získaných z klinického materiálu byly pozorovány mnohem vyšší koncentrace GXM v porovnání s kmeny získanými z okolního prostředí. Je zřejmé, že jeho produkce přispívá k šíření infekce a je jedním z faktorů virulence. TA má podobně jako některé kandidy možnost switchingu mezi jednotlivými fenotypy

(Karashima et al., 2002). Častou predispozicí infekce TA je zavedení centrálního žilního nebo peritoneálního katétru díky jeho schopnosti tvorby biofilmu. Už po 4 hodinách inkubace byly na polystyrenu pozorovány mikrokolonie. Jeho struktura je podobná biofilmům tvořeným CA, s vysokým podílem extracelulární polymerní substance, která brání průniku ATM a mnohonásobně tak snižuje citlivost i k novějším látkám např. vorikonazolu (Di Bonaventura et al., 2006).

Léčbou první volby systémových infekcí TA jsou triazolová ATM, vykazují nejnižší hodnoty MIC *in vitro* a nejnižší mortalitu. Vorikonazol, ravukonazol i posakonazol si zachovávají vysokou účinnost i u kmenů resistentních k flukonazolu. Amfotericin B vykazuje *in vitro* široké spektrum MIC a nedostatečnou aktivitu na to, aby mohlo být dosaženo sérových hladin alespoň pro fungistatický účinek (Chagas-Neto, Thomas C. et al., 2009). Své využití nalézá v kombinacích. Naprosto neúčinné se ukázaly být echinokandiny v monoterapii, nicméně mikafungin vykazuje synergický efekt právě s amfotericinem B (Serena et al., 2005).

#### 6.2.6. Aspergillus fumigatus

AF je původcem až 90 % všech aspergilóz ve světovém měřítku. Makroskopicky vytváří šedozelené, vzdušné a chmýřité kolonie (Abbot, 2007). Mycelia jsou tvořena septovanými, stromovitě rozvětvenými hyfami o šířce až 6  $\mu\text{m}$ . Vzdušná část nese konidiofory s řetízkovitě uspořádanými konidii (průměr 2,5-3  $\mu\text{m}$ ) (Murray et al., 2009). Lze jej dobře kultivovat na různých půdách a je schopný růst i za vyšších teplot, až 50°C. Právě tato schopnost jej odlišuje od nepatogenních zástupců *Aspergillus spp.* (Dismukes et al., 2003). V přírodě se AF vyskytuje kosmopolitně jako saprofyt zejména v půdě, hnilé vegetaci, v květináčích a na stavbách. Ke kolonizaci lidského organismu dochází nejčastěji vdechnutím spor a u zdravých jedinců bývá asymptomatická (Murray et al., 2009).

Hlavním rizikovým faktorem pro vznik systémové infekce je neutropenie, dále jsou ohroženi pacienti po transplantacích orgánů a kostní dřeně (kritických je prvních 100 dní po zákroku) (Dismukes et al., 2003). Obstrukční plicní formy se častěji objevují u pacientů s cystickou fibrózou a chronickou bronchitidou (Murray et al., 2009).

Konidie AF mají schopnost vazby na lidský fibrinogen a laminin v bazální membráně alveolů což významně napomáhá kolonizaci. Při růstu hyfy jsou uvolňovány elastázy a kyselé proteázy, které usnadňují invazi do tkání (Murray et al., 2009).

AF je častým původcem tzv. alergické bronchopulmonární aspergilózy s typickými příznaky hypersenzitivity, astmatu, zvýšených hladin IgE, eosinofilie a v krajním případě pneumonie (Murray et al., 2009). Pokud dojde ke kolonizaci např. paranasálních dutin nebo preexistující dutině v plicní tkáni, může vzniknout tzv. aspergilom. Pokud je infekce izolovaná, probíhá zpravidla asymptomaticky (Dismukes et al., 2003). Nejzávažnější formou je invazivní aspergilóza s nekrózou tkáně, kdy při narušení cévního řečiště může dojít k diseminaci a zasažení jakéhokoliv orgánu včetně mozku, srdce a ledvin. Prognóza je velmi špatná a dosahuje až 70% mortality. Jako hraniční mez pro rozvoj infekce je považován pokles počtu neutrofilů pod  $500/\text{mm}^3$  (Murray et al., 2009).

Po 40 let byl standardem léčby systémových aspergilóz amfotericin B ve formě deoxycholátu, nicméně jeho nefrotoxicita brání navyšování dávky a nasazení u pacientů s renálním poškozením. Nástup lipidových formulací umožnil podávání vyšších dávek a snížil toxicitu (Abbot, 2007). K dispozici jsou 3 typy formulací: koloidní disperze (ABCD), lipidový komplex (ABLC), unilamelární liposomy (L-AMB). Jejich nevýhodou je vysoká cena a zůstávají jako látky druhé volby (Walsh et al., 2008).

Flukonazol je u aspergilóz neúčinný a lékem první volby je vorikonazol, který lze podávat p.o. i i.v. Posakonazol a itraconazol jsou využívány hlavně v profylaxi. Echinokandiny, zejm. kaspofungin, jsou používány při neúčinnosti nebo intoleranci konvenční terapie (Walsh et al., 2008).

Výskyt rezistence u AF je poměrně nízký, u amfotericinu B může teoreticky dojít k nadprodukci kataláz ke zmírnění oxidačního stresu a snížení účinnosti léčby. K echinokandinům nebyl registrován žádný klinický případ. Rezistence k azolům (vyjma flukonazolu) je globálně sice ojedinělá, ale je třeba brát ji do úvahy. Např. v Nizozemsku v některých oblastech dosáhla až 10 % (Mayr a Lass-Flörl, 2011). Nejčastěji se jedná o itraconazol, kdy dochází ke zvýšené expresi genů pro efluxní pumpy. U jedinců s mutací genu *CYP51A* pro

lanosterol-14- $\alpha$ -demethylázu bylo také pozorováno snížení citlivosti. Ke strukturně odlišnému vorikonazolu nebyla pozorována zkřížená rezistence (Qiao et al., 2008).

#### 6.2.7. Absidia corymbifera

Rod *Absidia* patří, spolu s několika dalšími, do řádu *Mucorales*, onemocnění se označují jako mukormykózy. Jejich výskyt je poměrně vzácný, ale průběh je díky rychlému postupu velmi často smrtelný (Murray et al., 2009).

Jedná se o vláknité houby s neseptovaným myceliem. V infikované tkáni tvoří deformované nepravidelné hyfy o šířce 4 – 15  $\mu\text{m}$ . Spory bývají uzavřené v kruhovitém sporangiu (Bednář et al., 1996). Na Sabouraudově agaru tvoří šedě až hnědavé nadýchané kolonie (Murray et al., 2009).

V prostředí se vyskytují všude v půdě, často v rozkládajícím se organickém materiálu (potravin, kompost) a dobře snášejí i vyšší teploty (Dismukes et al., 2003).



**Obrázek 4: *Absidia corymbifera***

(převzato z: <http://www.doctorfungus.org/thefungi/img/020mike.jpg>)

AC je typickým oportunním patogenem, k infekci dochází inhalací popř. spolknutím spor nebo zavlečením do rány z kontaminovaného krytí (Murray et al., 2009). Ohroženi jsou pacienti s rozsáhlými popáleninami, po transplantaci kostní dřeně, dekompenzovaní diabetici s acidózou (zejména rhinocerebrální formy) a léčení deferoxaminem. Při acidóze dochází ke snížení efektivity plicních makrofágů, které brání vyklíčení vdechnutých spor a ke zvýšené

dostupnosti sérového železa, jež dokážou houby z řádu *Mucorales* přednostně využít (Dismukes et al., 2003).

Infekce se vyznačují vysokou invazivitou a rychlou diseminací. Díky vysoké afinitě k vaskulárním strukturám prorůstá do lumen a způsobuje trombózy a nekrózy tkáně (Kayser et al., 2005). Nejčastější formy jsou pulmonární a rhinocerebrální s postižením očníce a mozku (Bednář et al., 1996)

Léčba by se měla opírat o včasnou diagnózu a agresivní chirurgické odstranění infikované tkáně. Nejčastěji bývá k léčbě užíván amfotericin B, v případě potřeby vyšších dávek jsou nasazeny lipidové formulace (Dismukes et al., 2003). Z azolů se vorikonazol i flukonazol ukázaly jako zcela neúčinné jak v léčbě, tak i v profylaxi. Itrakonazol vykazuje účinnost srovnatelnou s amfotericinem B. Posakonazol *in vitro* vykazuje aktivitu, nicméně se jedná o záložní terapii a standardně se nevyužívá. Echinokandiny samotné nejsou účinné, ale jako slibné se ukazují v kombinaci s polyeny (Spellberg et al., 2009).

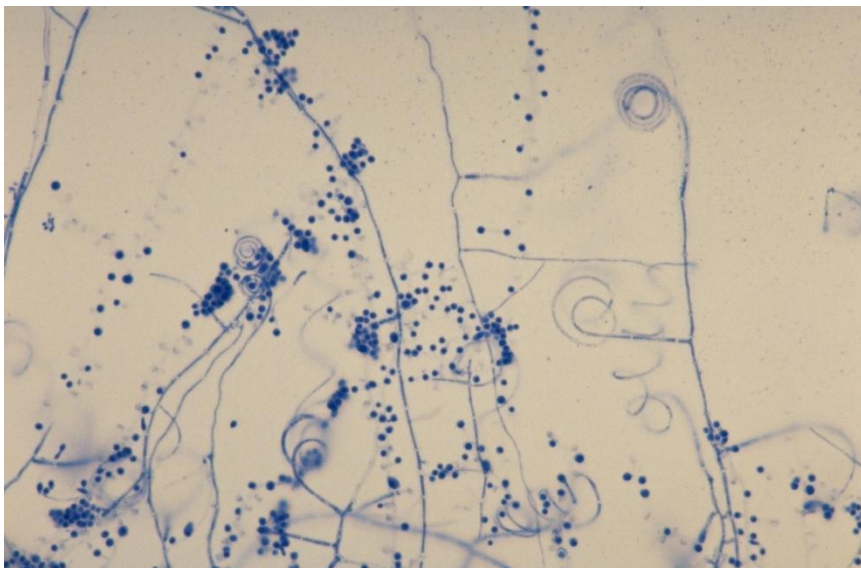
#### 6.2.8. Trichophyton mentagrophytes

Jediný testovaný zástupce tzv. dermatofytů, plísň způsobujících povrchové mykózy kůže a jejích adnex a nepronikají do hlubších tkání.

Patří mezi houby dimorfní. Na Sabouraudově agaru tvoří kolonie s bohatým myceliem bělavé barvy. V klinickém materiálu potom dělené spirální hyfy se specificky hroznovitě umístěnými kulatými mikrokonidii, popř. samostatnými tenkostěnnými makrokonidii (Bednář et al., 1996).

Vyskytuje se celosvětově a podle variety preferuje buď lidské (var. *interdigitale*) nebo zvířecí (var. *mentagrophytes*) hostitele na nichž běžně parazituje. Spolu s *T. rubrum* se podílí až na 90% všech dermatofytóz (Murray et al., 2009).

Schopnost dermatofytů napadat kůži a kožní adnexa je dána schopností rozkládat keratin pomocí keratináz a produkcí mannanů v buněčné stěně, které mají antogenní aktivitu a mohou snižovat buněčnou imunitní odpověď (Dismukes et al., 2003). Přenos je možný mezi jedinci přímo nebo používáním společných prostor a prádla, v šupinách odumřelé kůže mohou přežívat velmi dlouho (Murray et al., 2009). Nenasycené mastné kyseliny v kožním mazu, stejně tak jako progesteron, *in vitro* ukázaly schopnost inhibovat růst dermatofytů (Dismukes et al., 2003).



**Obrázek 5: *Trichophyton mentagrophytes***

(převzato z: [http://timm.main.teikyo-u.ac.jp/pfdb/image/mochizuki\\_t\\_20001106/1536x1024/08.jpg](http://timm.main.teikyo-u.ac.jp/pfdb/image/mochizuki_t_20001106/1536x1024/08.jpg))

Jednotlivé druhy rodu *Trichophyton* preferují při infekci odlišné části těla. TM nejčastěji způsobuje mykózy nohou (*tinea pedis*), trupu (*t. corporis*), třísel (*t. cruris*), kštice (*t. capitis*) a onychomykózy. Častěji dermatofytózami trpí obyvatelé teplejších oblastí. Typickým projevem na kůži je kruhovitě zánětlivé ložisko se šupinatěním, přičemž zánětlivá reakce se ke středu postupně snižuje. Zasažená místa ochlupení a kštice bývají vystouplá, šupinatá a často se objevuje alopecie. Nehty se deformují, ztlušťují a ztrácejí pevnost (Murray et al., 2009). Těžší a akutnější průběh mají infekce zoofilními varietami (Dismukes et al., 2003).

Léčba je u kožních forem nejčastěji topická, imunokompromitovaní pacienti by měli být zaléčeni i systémově, stejně jako zánětlivé případy. Onychomykóza a *tinea capitis* vyžadují celkovou perorální léčbu vždy, místní podání zpravidla vede k relapsům. Jako vhodná terapie první volby se ukazují ekonazol a ciklopirox, které mají zároveň antibakteriální aktivitu, lze ale použít i další azolové deriváty (např. klotrimazol, ketokonazol, ekonazol, oxikonazol) nebo allylaminy (naftifin, terbinafin). Nystatin a topický amfotericin B nemají účinek na dermatofyty (Dismukes et al., 2003). (Murray et al., 2009) uvádí i použití unguentum Whitfield.

K perorální systémové terapii je používán flukonazol, itrakonazol a terbinafin. V menší míře také griseofulvin, který není vhodný u onychomykóz (Murray et al., 2009). Azoly mají široké spektrum lékových interakcí na

cytochromu P-450 (Dismukes et al., 2003). Lékem volby je tedy terbinafin (Chen, S. C. a Sorrell, 2007).

Rezistence na užívané látky se vyskytuje zřídka, ke snížení citlivosti dochází zpravidla po dlouhodobé terapii nebo jejím předčasném ukončení (Chen, S. C. a Sorrell, 2007).

### 6.3. Metody testování citlivosti k antimikrobiálním látkám

S nárůstem rezistence nabývá testování citlivosti stále více na významu jak ve výzkumné, tak zejména klinické praxi. Lékařům umožňuje předvídat reakci patogena na zvolenou látku, zjistit příčinu možného selhání empirické léčby a volbu nejvhodnějšího preparátu. Výzkumníci níže uvedené metody využijí při screeningu nových, potenciálně účinných látek nebo vzájemnému porovnání těch stávajících. Epidemiologům dává možnost pro jednotlivé kmeny vyhodnotit a exaktně popsat míru rezistence a zasadit ji následně do globálního kontextu.

Konečný výsledek testování ovlivňuje celá řada faktorů, které budou dále rozebrány. V USA byla roku 1977 vytvořena Národní komise pro laboratorní a klinické standardy (NCCLS), která se zabývala metodikou sjednocování dosažených výsledků. Od 2005 se změnila na Institut pro klinické a laboratorní standardy (CLSI), který zastřešuje přes 2000 organizací a stejný počet dobrovolníků z celého světa, vydává doporučené postupy pro testování a udává hraniční hodnoty (tzv. breakpoints) ([www.clsi.org](http://www.clsi.org)). V Londýně byla roku 1997 založena Evropská komise pro testování antimikrobiální citlivosti (EUCAST), jejíž metodika vychází z postupů CLSI a která byla využita i v této práci. Přestože výsledky vykazují dobrou intralaboratorní shodu jak v rámci metody jedné organizace, tak mezi i sebou navzájem, neměly by být použity hraniční hodnoty CLSI při interpretaci EUCAST výsledků a naopak (Espinel-Ingroff, Ana V. a Pfaller, 2007).

Výsledky testování se dělí podle hraničních hodnot do tří kategorií ([www.eucast.org](http://www.eucast.org)):

- citlivé organismy – infekce může být léčena běžnou doporučenou dávkou antibiotika
- intermediární – pro úspěšnou terapii je třeba užít vyšších dávek, je-li to možné, popř. se infekce nachází v místě, kde se ATB přirozeně koncentruje, někdy označováno jako citlivý v závislosti na dávce
- rezistentní – nedošlo k inhibici při použití maximálních možných dávek



### 6.3.1. Faktory ovlivňující testování

Zmíněny jsou faktory ovlivňující jak samotný výsledek testování a jeho porovnatelnost, tak i způsob provedení testu (např. volba a počet vybraných látek).

#### 1. Metoda

- Kritéria pro hodnocení: úplná nebo částečná inhibice růstu
- Způsob odečítání výsledku: subjektivní (vizuální) nebo objektivní (spektrofotometrické) (Jílek et al., 2002)
- Požadavky: rychlost provedení, cena, množství otestovaných látek nebo kmenů (Turnidge et al., 2007)

#### 2. Testovaná látka

- Fyzikálně chemické vlastnosti jako rozpustnost, stabilita, formulace účinné látky, míra protonizace, eagle efekt (Jílek et al., 2002)
- Zařazení látek do testování ovlivňuje dostupnost a míra používání, předpokládaný patogen a zamýšlené místo jejich účinku (Turnidge et al., 2007)

#### 3. Testovací systém

- Ovlivnění testované látky a růstu mikroba: rozpouštědlo, pH a složení testovací půdy, teplota a délka inkubace, množství kyslíku

#### 4. Vlastnosti mikroba

- Velikost a hustota inokula, stádium růstové fáze, metoda výsevu (Jílek et al., 2002)
- Místo izolace, nemocniční/komunitní patogen

Zde je třeba zmínit jisté rozdíly mezi testováním bakterií, kvasinek a vláknitých hub. Příčinou je pomalejší rychlost růstu hub, schopnost dimorfních druhů tvořit jednobuněčné i vláknité formy a vlastnost některých antifungálních látek působit částečnou inhibici, kdy je určitý nárůst patrný i při vyšších koncentracích než je MIC (Espinel-Ingroff, Ana V. a Pfaller, 2007). Rozdíly spočívají zejména v odlišném testovacím médiu, délce inkubace a způsobu stanovení MIC. Srovnání poskytuje Tabulka 1.

### 6.3.2. Diskový difúzní test

Principem je impregnace disku z filtračního papíru antimikrobiální látkou o známé koncentraci, která difunduje do agaru na povrchu inokulovaného testovaným kmenem. Okolo disku, položeného na povrch pŕdy, se s postupující vzdáleností koncentrace látky logaritmicky snižuje a vzniká gradient, který brání růstu testovaného mikroba. Vzniká tak zóna inhibice, jejíž průměr odpovídá citlivosti k testované látce (Jorgensen a Turnidge, 2007).

Po inkubaci (obvykle 16-18 hodin) se porovná průměr zón s hodnotami referenčních kmenů a výsledek se interpretuje podle hraničních hodnot jako citlivý, intermediální (resp. citlivý v závislosti na dávce (SDD = susceptible dose dependent) – u někt. antimykotik) nebo rezistentní. Jedná se o kvantitativní metodu, tj. nelze změřit konkrétní hodnotu MIC, nicméně vykazuje dobrou korelaci s *in vivo* výsledky (Jílek et al., 2002). Je možné provést sérii měření, výsledky porovnat s dilučními metodami a zanést do grafu. Při dostatečně širokém souboru kmenů, za využití lineární regrese, lze poměrně přesně určit MIC podle průměru inhibiční zóny (Jorgensen a Turnidge, 2007).

Výhody:

- nízká cena a nároky na materiál, jednoduché provedení a dobrá reprodukovatelnost, lze otestovat velké množství rozličných látek

Nevýhody:

- neposkytuje konkrétní hodnoty MIC, nespolehlivé výsledky u druhů a látek pro které zatím nebyla metoda standardizována a některých specifických případech (Jorgensen a Turnidge, 2007)

### 6.3.3. Gradientový difúzní test (E-test)

Jedná se o modifikaci diskové metody, na agar se přikládá kalibrovaný proužek se stupnicí naimpregnovaný gradientem koncentrací testované látky. Inhibiční zóna tak má tvar kapky, která se proužku dotýká v místě MIC (Jílek et al., 2002).

Výhody:

- jednoduché provedení, možnost testování i méně obvyklých látek a mikrobů, dobrá korelace se standardy

Nevýhody:

- vysoká cena testovacích proužků (Jorgensen a Turnidge, 2007)
- nejednoznačná MIC u některých kvasinek (Jílek et al., 2002)



**Obrázek 6: Příklad provedení E-testu**

(převzato z: <http://www.illexmedical.com/files/products/1318229544p44WG.jpg>)

#### 6.3.4. Agarová diluční metoda

Pro testování se připravují standardní půdy s různou koncentrací rozpuštěné antimikrobiální látky. Na povrch se napipetují suspenze testovacích kmenů a po inkubaci se odečítá růst kolonií. Nejnižší koncentrace látky, na jejíž plotně nebyl pozorován růst, se rovná MIC (Jílek et al., 2002). Velký důraz je zde kladen na pečlivou přípravu inokula. Pro svoji přesnost je, zejména v Evropě, považována za referenční metodu a nachází uplatnění především ve výzkumu (Jorgensen a Turnidge, 2007).

Výhody:

- snazší odečet nárůstu, lze odhalit heterogenitu populace nebo kontaminaci, možnost otestovat velký počet kmenů najednou (Jorgensen a Turnidge, 2007)

Nevýhody

- časová a materiálová náročnost (Jílek et al., 2002)

### 6.3.5. Bujónová diluční metoda

Jedná se o kvantitativní metodu, kdy je hodnocena inhibice růstu mikroba v tekutém médiu s rozpuštěnou testovanou látkou o příslušné koncentraci. Díky širokým možnostem automatizace, usnadnění rutinního testování a snížení materiálové náročnosti se dnes jedná o nejčastěji používané metody (Jorgensen a Turnidge, 2007). Testovaná látka se geometrickou řadou naředí vhodným rozpouštědlem, smísí se s růstovým médiem a inokuluje se příslušným kmenem. Po inkubaci se hodnotí narůst a nejnižší koncentrace bez viditelného růstu je označena jako MIC. Podle způsobu provedení rozdělujeme na 2 typy: makrodiluční a mikrodiluční.

#### Makrodiluční metoda

Množství použitého média je vyšší než 500  $\mu$ l, testování se provádí zpravidla ve zkumavkách

Výhody:

- díky možnosti průběžného měření optické hustoty lze pozorovat kinetiku antimikrobiálního působení, přesnější než mikrodiluční verze

Nevýhody:

- vyšší spotřeba materiálu, pro větší počet kmenů vzrůstá časová náročnost (Jílek et al., 2002)

#### Mikrodiluční metoda

Provádí se v jednorázových mikrotitračních destičkách při řádově nižším množství média (okolo 0,1 ml). Pro automatizaci lze využít odečet MIC spektrofotometricky, vícekanálové pipety a inokulátory. Méně vybavené laboratoře mají možnost použít komerčně předpřipravené sety (Reller et al., 2009).

Výhody:

- finančně úspornější, možnost vysoké míry automatizace a robustnosti, testování relativně velkého počtu kmenů najednou (Jorgensen a Turnidge, 2007)

Nevýhody

- obecně vyšší zatížení relativní chybou (Jílek et al., 2002)

**Tabulka 1: Srovnání metodik mikrodiluční bujónové metody dle EUCAST**

	Bakterie	Kvasinky	Vláknité houby
Médium	Mueller-Hintonův bujón	RPMI s 2% glukózy	RPMI s 2% glukózy
Inokulum	$3 \times 10^5$ - $7 \times 10^5$ CFU/ml	$0.5 \times 10^5$ - $2.5 \times 10^5$ CFU/ml	$1 \times 10^5$ - $2.5 \times 10^5$ CFU/ml
Inkubace	18±2 hodiny	24±2 hodiny	24 <sup>1</sup> -48 hodin
Výsledek	úplná inhibice, MIC <sub>80</sub> <sup>2</sup>	MIC <sub>90</sub> <sup>3</sup> , MIC <sub>50</sub>	úplná inhibice

<sup>1</sup> pro řád *Mucorales*; <sup>2</sup> pro sulfonamidy; <sup>3</sup> pro Amfotericin B

Zpracováno dle dokumentů EUCAST: EDef 7.2, EDef 9.1, Edis 5.1

### 6.3.6. Automatické testovací systémy

V současné době americký Úřad pro potraviny a léčiva (FDA) povoluje použití souprav využívajících mikrodiluční bujónovou metodu od čtyř různých výrobců. Plně automatické provedení rozplnění, inokulace, inkubace a odečtu koncových hodnot umožňuje dosahovat velmi konzistentních a rychlých (zpravidla <16 h) výsledků. Všechny systémy disponují softwarem, který dosažené výsledky vyhodnocuje, zaznamenává do lékových záznamů pacienta a sdílí s dalšími pracovišti. Nevýhodou zůstává relativně vysoká pořizovací cena, neschopnost testovat všechny klinicky významné organismy (*P. aeruginosa*) a obtížná detekce některých specifických fenotypů, např. vankomycin rezistentní enterokoky (Richter a Ferraro, 2007).

- VITEK 1, VITEK 2 (výrobce bioMerieux, USA)

Testování probíhá na plastických kartách se 45 (VITEK 1) nebo 64 (VITEK 2) jamkami. Měření nárůstu se provádí turbidimetricky každých 15 minut. Lze zkoušet maximálně 20 testovaných látek v 1 až 6 ředěních, ze kterých je potom odvozena MIC. Kapacita je zpravidla 60 karet (Richter a Ferraro, 2007).

- MicroScan WalkAway (výrobce Siemens, Německo)

Využívá standardní 96-ti jamkové mikrotitrační destičky. Odečet je turbidimetrický po 24-hodinové inkubaci v konvenčním režimu nebo fluorimetrický po 4,5 a 10 hodinách ve zrychleném režimu. Úpravou destiček lze provádět měření MIC v celém rozsahu koncentrací,

stanovení pouze hraničních hodnot nebo identifikaci (Richter a Ferraro, 2007)

- BD Phoenix (výrobce Becton Dickinson, USA)  
Používají se polystyrenové oboustranné 136-ti jamkové destičky. 51 jamek pro identifikaci a 86 pro testování citlivosti k až 22 látkám. Po inokulaci je přidán redoxní indikátor, metabolická aktivita (růst mikroba) vede k redukci. Nárůst je odečítán kolorimetricky i turbidimetricky po 20 minutách (Richter a Ferraro, 2007)
- Sensititre ARIS 2x (výrobce TREK DS, USA)  
Pracuje s formátem standardních 96-ti jamkových destiček, po 16 a 24 hodinách inkubace se výsledek odečítá fluorimetricky (Richter a Ferraro, 2007)

## 6.4. Přehled používaných antimikrobiálních látek

V této kapitole jsou představeny látky používané k léčbě infekčních onemocnění, rozdělené podle mechanismu účinku.

### 6.4.1. Inhibice syntézy bakteriální buněčné stěny

#### Peniciliny

Vazbou na enzymy PBP inhibují transpeptidázy v buněčné stěně bakterií. Tím nemůže dojít k odštěpení terminálního D-alaninového zbytku a spojování peptidoglykanu, základní složky buněčné stěny, příčnými vazbami. Zároveň aktivují enzymy katalyzující obměnu peptidoglykanu, čímž dochází k lýze a zániku buňky, mají tedy baktericidní efekt, nezávislý na koncentraci (Lincová a Farghalli, 2007).

Peniciliny mají dobrý bezpečnostní profil, rychlý nástup účinku a lze je využívat v monoterapii i kombinacích, nejčastěji s aminoglykosidy (Lincová a Farghalli, 2007).

Existují 3 základní způsoby rezistence vůči penicilinům: zamezení interakce ATB s cílovou strukturou (zejména u  $G^-$  bakterií), změna vazebného místa, produkce hydrolytických enzymů  $\beta$ -laktamáz (Murray et al., 2009).

Použití penicilinových ATB zvyšuje kombinace s inhibitory  $\beta$ -laktamáz. Tyto látky mají jako základ molekuly také  $\beta$ -laktamový kruh, který se při styku s bakteriálním enzymem otevře a ireverzibilně naváže, což vede k jeho inaktivaci. Užívá se k. klavulanová, tazobaktam a sulbaktam. Ten lze samostatně podávat pouze i.v. nicméně po navázání na molekulu ampicilinu vzniká sultamicilin, dobře p.o. vstřebatelné proléčivo, které je štěpeno ve střevní sliznici (Lüllmann et al., 2004).

**Tabulka 2: Přehled penicilinových ATB a jejich spektra účinku**  
dle (Murray et al., 2009)

Název	Zástupci	Spektrum účinku
přirozené peniciliny (PP)	benzylpenicilin, phenoxymethylpenicilin	$\beta$ -hemolytické streptokoky, většina $G^+$ anaerobů
peniciliny odolné vůči penicilinázám	methicilin, oxacilin, cloxacilin, dicloxacilin	jako PP, $\uparrow$ aktivita vůči stafylokokům

širokospektré peniciliny	ampicilin, amoxicilin, karbenicilin, tikarcilin, piperacilin	na G <sup>+</sup> koky jako PP, navíc některé G <sup>-</sup> tyčky
kombinace s inhibitory β-laktamáz	amoxicilin-klavulanát, ampicilin- sulbaktam, tikarcilin-klavulanát, piperacilin-tazobaktam	jako PP, ↑aktivita vůči β- laktamázu produkujícím stafylokokům a vybraným G <sup>-</sup> tyčkám

### Cefalosporiny

Základem jejich molekuly je rovněž β-laktámový kruh, tentokrát však spojený s dihydrothiazinovým cyklem. Pokud je síra nahrazena kyslíkem, označují je někteří autoři jako cefamyciny. Mechanismus účinku je stejný jako u penicilinů (Murray et al., 2009). Podobně sdílejí i dobrý bezpečnostní profil, vyšší je riziko hypersenzitivní reakce (i zkřížené s peniciliny). Nabízejí široké využití v terapii i profylaxi. Zpravidla se rozdělují do čtyř generací. V prvních třech je patrný posun spektra účinnosti od G<sup>+</sup> směrem ke G<sup>-</sup>. Poslední, 4. generace spojuje široké spektrum účinku s vysokou aktivitou proti pseudomonádám. Obecně nejsou cefalosporiny účinné proti *E. faecalis*, *Clostridium difficile*, *Campylobacter jejuni*, listeriím a mykobakteriím (Lincová a Farghalli, 2007).

Rezistence vzniká podobnými mechanismy jako u penicilinů a navíc se přidává aktivní transport z bakteriální buňky (eflux) (Lincová a Farghalli, 2007).

**Tabulka 3: Přehled vybraných zástupců cefalosporinů a jejich spektra účinek**  
dle (Murray et al., 2009)

Název	Zástupci	Spektrum účinku
cefalosporiny s úzkým spektrem	cefazolin(i.v.), cefalexin (p.o.)	na G <sup>+</sup> jako oxacilin, na G <sup>-</sup> výjimečně např. <i>E.coli</i> , <i>Klebsiella</i> spp.
cefalosporiny s rozšířeným spektrem	cefuroxim (i.v.), cefoxitin (i.v.), cefuroxim-axetil (p.o.),	na G <sup>+</sup> jako předchozí, ↑aktivity vůči G <sup>-</sup> včetně <i>Enterobacter</i> spp., <i>Citrobacter</i> spp.



širokospektré cefalosporiny	cefotaxim (i.v.), ceftazidim (p.e.), cefixim (p.o.)	na G <sup>+</sup> jako přechodí, ale ↓aktivita vůči stafylokokům, ↑ aktivity na G <sup>-</sup> a <i>Pseudomonas</i>
širokospektré cefalosporiny s rozšířeným spektrem	cefepim (p.e.), cefpirom (p.e.)	na G <sup>+</sup> jako oxacilin; G <sup>-</sup> i <i>Pseudomonas</i> , <i>Enterobacteriaceae</i>

V tabulce není zahrnut nejnovější zástupce cefalosporinů, ceftarolin, s účinkem zahrnujícím i MRSA a multirezistentní kmeny *S. pneumoniae*. Jeho účinnost je nižší u gramnegativních nefermentujících bakterií a je málo odolný k hydrolýze ESBL. V USA i Evropě byl schválen pro cílenou léčbu komunitní pneumonie a komplikovaných infekcí kůže a měkkých tkání (Chen et al., 2014)

#### Atypické β-laktámy

Základní chemickou strukturou je rovněž β-laktámový kruh, nevyvolávají však zkříženou hypersenzitivní reakci s předchozími skupinami (Lüllmann et al., 2004)

Aztreonam je řazen mezi tzv. monobaktámy. Inhibuje syntézu buněčné stěny vazbou na specifické proteiny. Působí pouze na aerobní G<sup>-</sup> bakterie vůči jejichž β-laktamázám je odolný. Podává se pouze parenterálně (Lincová a Farghalli, 2007).

Karbapenemy naopak disponují velmi širokým spektrem účinku. Vážou se na PBP, indukují chromozomální β-laktamázy, ale vykazují vůči nim dobrou stabilitu. Dobře pronikají do tkání včetně cerebrospinálního moku. Jsou vyhrazeny k léčbě multirezistentních nozokomiálních patogenů a těžkých smíšených infekcí. Podávají se pouze parenterálně. Zástupci: meropenem, ertapenem. Imipenem je v ledvinách inaktivován enzymem dehydropeptidasou I, proto musí být podáván s inhibitorem tohoto enzymu cilastatinem (Lincová a Farghalli, 2007).

#### Glykopeptidy

Syntézu buněčné stěny inhibuje vazbou na její prekurzory, čímž znemožňuje jejich zpracování transpeptidázami a vzájemné propojení s dalšími řetězci. Spektrum účinku zahrnuje pouze grampozitivní bakterie, jejich molekula

je příliš velká pro průchod póry vnější membrány gramnegativních mikrobu (Murray et al., 2009).

Vankomycin je užíván k léčbě těžkých infekcí způsobených stafylokoky a streptokoky rezistentními k  $\beta$ -laktámům. Jeho účinek je bakteriostatický, nezávislý na koncentraci. Podává se intravenózně, kvůli nebezpečí nektrózy nikdy intramuskulárně. Po perorálním podání se vstřebává minimálně, což lze využít při pseudomembranózní kolitidě způsobené *Clostridium difficile* (Lincová a Farghalli, 2007).

Teikoplanin má indikace i spektrum účinku podobné s vankomycinu s vyšší účinností proti enterokokům. U pacientů je lépe tolerován a díky dlouhému biologickému poločasu je možná nižší frekvence dávek (Lincová a Farghalli, 2007).

Nejnovější zástupce telavancin, způsobuje také depolarizaci buněčné membrány s následným vyplavením  $K^+$  iontů a ATP. Tento duální efekt tak zvyšuje baktericidní potenciál a rozšiřuje použití i na vankomycin-rezistentní mikroby (Saravolatz et al., 2009).

Rezistence spočívá v produkci peptidoglykanových prekurzorů, které mají místo D-ala konce D-laktát nebo D-serin a glykopeptidová ATB k nim ztrácí afinitu. Zároveň jsou cíleně odstraňovány ty prekurzory, ke kterým je afinita zachována (Arthur et al., 1996). Objeveno bylo 6 typů, které se vzájemně liší umístěním genů a způsobem regulace jejich exprese. Většina se vztahuje pouze k vankomycinu, nicméně některé i k teikoplaninu (Courvalin, 2006).

### Další látky

Bacitracin inhibuje defosforylaci unde-caprenylfosfátu, transmembránového přenašeče pro stavební jednotky buněčné stěny. Chemicky patří mezi polypeptidy. Spektrum účinku zahrnuje grampozitivní koky a tyčky. V současnosti se podává pouze lokálně, často v kombinaci s neomycinem (Lincová a Farghalli, 2007). Systémově se nevyužívá kvůli vysoké nefrotoxicitě (Lüllmann et al., 2004).

Fosfomycin díky inhibici transferázy potlačuje syntézu peptidoglykanu. Spektrém účinku se podobá ampicilinu, tj. enterobakterie a stafylokoky včetně MRSA. Podává se perorálně i intravenózně (Lüllmann et al., 2004).

S cefalosporiny 3. generace a aminoglykosidy vykazuje synergický efekt (Lincová a Farghalli, 2007).

#### 6.4.2. Poškození buněčné stěny

Polymyxin B a E (kolistin) se řadí mezi bazické polypeptidy, svým povrchově aktivním účinkem snižují permeabilitu cytoplazmatické membrány bakterií (Lüllmann et al., 2004). Působí pouze na gramnegativní mikroby včetně *P. aeruginosa*, kde zůstávají často poslední účinnou volbou. Podávají se lokálně nebo intravenózně, z GIT se nevstřebává (Lincová a Farghalli, 2007).

#### 6.4.3. Inhibice syntézy k. tetrahydrolistové

Sulfonamidy díky strukturní podobnosti s k. *p*-aminobenzoovou kompetují o enzym dihydropteroátsyntetázu. Tím vzniká nedostatek k. tetrahydrolistové a snížení syntézy purinů a tymidinu, které jsou nutné pro syntézu nukleových kyselin. Výsledný efekt je tedy bakteriostatický. Buňky savců k. listovou nesyntetizují, je tak dosaženo potřebné selektivity (Lüllmann et al., 2004).

Synergicky se sulfonamidy působí deriváty 2,4-diaminopyrimidinu trimethoprim a tetroxoprim, které inhibují enzym dihydrofolátreduktázu se stejným výsledným účinkem. Lidské buňky tento enzym využívají také, nicméně bakteriální forma je k působení trimethoprimu mnohem citlivější (Lüllmann et al., 2004).

Samostatně se používá pouze sulfathiazol k topické léčbě. Nejširší využití nachází kotrimoxazol (sulfamethoxazol+trimetoprim), tzv. sekvenční blokáda. Spektrum účinku zahrnuje grampozitivní i gramnegativní bakterie včetně chlamydií, anaerobů, *P. aeruginosa* a *Pneumocystis carinii*. Nejčastěji se používá v profylaxi a léčbě akutních nekomplikovaných infekcí močových cest, pyelonefritidách, infekcí horních cest dýchacích způsobených *H. influenzae* (Lincová a Farghalli, 2007). Vyjma banálních nežádoucích účinků v GIT byly pozorovány závažné kožní reakce jako Stevens-Johnsonův syndrom a změny krevního obrazu (Lüllmann et al., 2004).

Dřívější široké nasazení v praxi se projevuje poměrně vysokou mírou rezistence, která se mezi jednotlivými státy výrazně liší. Její mechanismy zahrnují: snížení koncentrace v buňce omezením permeability a zvýšením efluxní činnosti, změna cílového enzymu bodovou mutací genomu nebo

regulací exprese. Rezistence je navíc poměrně snadno přenosná i na jiné druhy. Dnes jsou sulfonamidy nahrazovány účinnějšími a bezpečnějšími látkami (Eliopoulos a Huovinen, 2001).

#### 6.4.4. Interference s bakteriální DNA

##### Chinolony

Inhibují bakteriální enzymy topoizomerázu II (DNA-gyráza) a IV, které umožňují rozvolnění a zřetězení molekuly DNA při replikaci, rekombinaci a opravách, což vede k rychlému baktericidnímu efektu. DNA-gyráza je místem účinku u gramnegativních bakterií zatímco topoizomeráza IV převažuje u grampozitivních (Murray et al., 2009). Původní nefluorované látky byly účinné pouze na gramnegativní organismy, nicméně s fluorací molekuly se spektrum výrazně rozšířilo na grampozitivní. Novější generace lze použít i na intracelulární patogeny: legionelly, chlamydie a *Mycoplasma pneumoniae* (Lincová a Farghalli, 2007).

Chinolony jsou poměrně dobře snášeny a díky dobrému průniku do tkání, výhodnému dávkování a širokému spektru se hojně využívají v komunitní i nemocniční terapii. Zejména se jedná o infekce močových a dolních dýchacích cest, lehčí až středně těžké infekce kostí, kloubů, kůže a měkkých tkání. K dispozici jsou jak perorální tak i parenterální formy (Lincová a Farghalli, 2007).

Rezistence vzniká třemi základními mechanismy: alterací cílového enzymu, změnou vazebného místa pro ATB a zvýšeným efluxem ATB z buňky. Zejména první dvě možnosti jsou vázané na chromozóm a vznikají pravděpodobně bodovými mutacemi (Hooper, 2001). V menší míře se vyskytuje i produkce inaktivujících enzymů vázaná na plazmidy, nicméně její efekt nabývá významu jen jako umožnění vzniku výše uvedených mechanismů (Briales et al., 2011).

**Tabulka 4: Přehled vybraných zástupců chinolonů a jejich spektra účinku**  
dle (Nyč et al., 2006)

Název	Zástupci	Spektrum účinku
1. generace	k. nalidixová	<i>E. coli</i> a některé G <sup>-</sup> tyčky
Fluorochinolony		
2. generace	ciprofloxacin, ofloxacin, levofloxacin	↑ aktivity vůči G <sup>-</sup> a slabě na G <sup>+</sup>
3. generace	gatifloxacin, sparfloxacin, tosufloxacin	na G <sup>-</sup> jako předchodí, ↑ aktivity vůči G <sup>+</sup> , zejména <i>S. pneumoniae</i> ;
3. generace (pokračování)		
4. generace	moxifloxacin, gemifloxacin	další ↑ aktivity na G <sup>+</sup> (včetně <i>S.pneumoniae</i> ) a některé anaeroby
3. a 4. generace někdy označovány jako „respirační“ fluoroquinolony		

#### 6.4.5. Látky s přímou vazbou na DNA

##### Nitroimidazoly

Na základní molekule imidazolu je substituována nitroskupina, která se po příjmu elektronů redukuje na hydroxylaminovou. Ta přímo poškozuje DNA nebo vytváří komplex, který brání replikaci. Účinek je baktericidní (Lüllmann et al., 2004). Nejpoužívanějším zástupcem je metronidazol, který se po perorálním podání dobře resorbuje a proniká do tkání včetně kostí a cerebrospinální tekutiny. Spektrum účinku zahrnuje pouze anaeroby včetně *Clostridium* spp., prvoky (např. *Trichomonas vaginalis*, giardie), je tak lékem volby u tetanu, bakteriálních vaginóz a pseudomembranózní kolitidy. Použití je topické, lokální i parenterální. Další deriváty s podobnými vlastnostmi jsou tinidazol a ornidazol (Lincová a Farghalli, 2007).

##### Nitrofurantoin

V bakteriích se redukuje na aktivní metabolity, které poškozují DNA. Perorálně se dobře vstřebává, avšak účinné koncentrace vytváří pouze v moči. Spektrum účinku zahrnuje *E. coli*, *Klebsiella* sp., stafylokoky a enterokoky. I

přes časté nežádoucí účinky se využívá v profylaxi a léčbě těžších infekcí močových cest (Lincová a Farghalli, 2007).

#### 6.4.6. Inhibice syntézy RNA

Rifampicin působí inhibici DNA-dependentní RNA-polymerázy, což působí baktericidně na proliferující bakterie. Působí zejména na grampozitivní mikroby a mykobakterie. Pro rychlý rozvoj rezistence se používá především v kombinacích, převážně v terapii tuberkulózy (Lüllmann et al., 2004). Podobné jsou deriváty rifaximin a rifabutin.

#### 6.4.7. Inhibice bakteriální proteosyntézy

##### Makrolidy

Mechanismus účinku spočívá ve vazbě na 50S podjednotku ribozómu, zabránění jeho posunu po mRNA a tím elongaci polypeptidového řetězce. Na rostoucí bakterie má tedy bakteriostatický efekt. Ribozómy vyšších živočišných druhů mají jiné podjednotky (Lüllmann et al., 2004). Mají široké spektrum, kromě grampozitivních a gramnegativních bakterií i anaeroby, intracelulární patogeny a spirochety. Jejich účinek je nezávislý na koncentraci, je třeba udržet hladiny nad MIC po dobu alespoň 50 % dávkovacího intervalu (Lincová a Farghalli, 2007).

Nežádoucí reakce v GIT se projevují spíše u starších látek, které působí agonisticky na motilinových receptorech (Lüllmann et al., 2004). S novějšími deriváty se také snižuje interakční potenciál daný inhibicí cytochromu P450 3A4, která výrazně komplikovala léčbu polypragmatických pacientů (Lincová a Farghalli, 2007).

Rezistence se projevuje zejména methylací 23S rRNA a znemožněním vazby ATB na receptor, popř. mutací a změnou ribozomálních proteinů. Může docházet též k enzymatické inaktivaci esterifikací, fosforylací nebo glykosylací (Murray et al., 2009).

**Tabulka 5. Vybraní zástupci makrolidů, jejich vlastnosti a použití**  
dle (Lincová a Farghalli, 2007)

erythromycin (ERY), spiramycin, josamycin	starší látky, dnes nahrazované modernějšími, vykazují s nimi úplně zkříženou rezistenci
--	--

roxithromycin	lepší absorpce a tolerance než ERY, stejné spektrum
klarithromycin	podobné spektrum jako ERY, do kombinací při eradikaci <i>H.pylori</i> , účinný na mykobakterie
azithromycin	nejlepší průnik do tkání, velmi dlouhý poločas, patří mezi tzv. azalidy, spektrum jako klaritromycin
dirithromycin	zavedený v USA, spektrum jako ERY, ↓účinnost na <i>N. gonorrhoeae</i>

### Látky příbuzné makrolidům

Streptograminy jsou cyklické peptidy, které se vážou na 50S podjednotku ribozómu. Dalfopristin brání elongaci peptidového řetězce a způsobuje změny usnadňující vazbu quinupristinu, který navozuje předčasné uvolnění řetězce z ribozómu. Používají se pouze v kombinaci a jejich použití je vyhrazeno na polyrezistentní grampozitivní koky, např. vankomycin-rezistentní *E. faecium* (Murray et al., 2009).

Ketolidy jsou podobné makrolidům, ketoskupina na C3 jim dává lepší stabilitu v kyselém pH. Jediným zástupcem je telithromycin. Nevztahuje se na něj zkřížená rezistence na makrolidy a má *in vitro* vyšší aktivitu na grampozitivní koky (Lincová a Farghalli, 2007).

Oxazolidinony díky vazbě na 50S podjednotku ribozómu mění vazebné místo pro tRNA a brání spojení obou podjednotek, inhibují tak samotnou iniciaci proteosyntézy. V současnosti je schválen pouze linezolid, který si díky unikátnímu mechanismu zachovává účinnost i na multirezistentní grampozitivní bakterie, pro jejichž infekce je také rezervován (Murray et al., 2009).

Linkosaminy, linkomycin a jeho chlorovaný derivát klindamycin, se mechanismem i spektrem účinku podobají erythromycinu, sdílejí i zkříženou rezistenci. Lépe však pronikají do tkání a působí na anaeroby (Lüllmann et al., 2004).

### Tetracykliny

Mechanismus účinku spočívá ve vazbě na 30S podjednotku, kde brání navázání tRNA na komplex mRNA-ribozóm. Účinek je tedy bakteriostatický a není závislý na koncentraci, nýbrž na délce expozice (Lüllmann et al., 2004).

Antimikrobiální spektrum je široké, zahrnuje grampozitivní i gramnegativní bakterie. Tetracykliny se osvědčily v léčbě infekcí způsobených mykoplazmaty, chlamydiemi, rickettsiemi a borelióze. Mnoho kmenů je však rezistentních (Lincová a Farghalli, 2007).

Rezistence vzniká sníženou penetrací do buňky, aktivním efluxem, alterací cílového místa nebo enzymatickou modifikací antibiotika. Může se také vyskytovat syntéza proteinů analogických s elongačními faktory, které sice nebrání vazbě ATB k ribozómu, ale proteosyntéza není narušena. Mutace v genu pro jeden z membránových porinů může také způsobit poměrně nízkou úroveň rezistence, nicméně ta se zpravidla týká i mnoha ostatních látek (např.  $\beta$ -laktámy, chinolony, chloramfenikol) (Murray et al., 2009).

Jediným u nás registrovaným zástupcem je doxycyklin, patrně díky nejvýhodnějším vlastnostem z celé skupiny: dlouhý poločas, lipofilita, menší ovlivnění absorpce potravou a dobrý průnik do tkání (Lincová a Farghalli, 2007). Dalšími zástupci jsou tetracyklin a minocyklin (Murray et al., 2009)

Podobnou strukturu a mechanismus účinku sdílí novější glycylycykliny se zatím jediným zástupcem tigecyklinem, který zůstává rezervován pro závažné multirezistentní infekce (Yahav et al., 2011).

### Aminoglykosidy

Základ molekuly jsou glykosidicky připojené aminocukry k hexózovému jádru, až na výjimky se jedná o trisacharidy. Jako hydrofilní látky špatně pronikají biologickými membránami. Mechanismus účinku spočívá v ireverzibilní vazbě k receptoru na 30S podjednotce ribozómu, kde blokuje vazbu aminoacyl-tRNA na akceptorové místo mRNA (Lincová a Farghalli, 2007). Následkem toho vznikají, při dostatečné koncentraci ATB, aberantní proteiny, které se zabudovávají do buněčných struktur a způsobují funkční poruchy. Efekt aminoglykosidů je tedy baktericidní a závislý na koncentraci (Lüllmann et al., 2004).

Antimikrobiální spektrum zahrnuje některé grampozitivní, ale zejména gramnegativní bakterie včetně *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter* sp. Jelikož je průnik aminoglykosidů přes membránu aerobní, na energii závislý proces, neúčinkují na anaeroby a v prostředí bez kyslíku (abscesy). Pro použití



u gram pozitivních bakterií je třeba jejich kombinace s látkami inhibujícími syntézu buněčné stěny ( $\beta$ -laktámy, vankomycin) (Murray et al., 2009).

Mechanismy rezistence jsou známy čtyři: změna vazebného místa na ribozómu, snížený příjem ATB do buňky, zvýšený eflux a enzymatická modifikace (Murray et al., 2009). Právě ta je zdaleka nejrozšířenější a zahrnuje acetylaci, adenylaci nebo fosforylaci. Geny pro produkci potřebných enzymů mohou být šířeny i na plasmidech. Eflux je pozorován poměrně zřídka a výhradně u gramnegativních kmenů. Změna permeability membrány je nejčastější u *Pseudomonas aeruginosa* a zpravidla se vztahuje na všechny aminoglykosidy. Alterace vazebného místa je významná pouze u streptomycinu (Mingeot-Leclercq et al., 1999).

**Tabulka 6: Vybraní zástupci aminoglykosidů**

dle (Lincová a Farghalli, 2007) a (Lüllmann et al., 2004)

Pro systémové použití	
streptomycin	dnes hlavně léčba tuberkulózy, v kombinaci s ampicillinem na streptokoky a enterokoky
gentamicin	užití na infekce $G^-$ tyčkami s rezistencí na méně toxická ATB, brucelózy a tularémie
tobramycin	podobný gentamicinu, lepší účinnost na <i>P. aeruginosa</i>
netilmicin	výhodné dávkování, odolný proti degradujícím enzymům
amikacin	nejširší spektrum z aminoglykosidů, rezervován pro kmeny rezistentní ke gentamicinu, ↓ účinnost, nutnost vyšších dávek
isepamicin	nejnovější, vlastnosti podobné amikacinu, odolný k acetylačním enzymům
Pouze k lokálnímu použití	
neomycin, paromomycin	topické podání na kůži a oko, perorálně se nevstřebávají, využití k dekolonizaci střeva
kanamycin	pouze oční podání

Podobným mechanismem účinku jako aminoglykosidy disponuje spektinomycin, amincyklitol, užívaný v léčbě gonokokových infekcí u pacientů alergických na cefalosporiny nebo fluorochinolony (Lincová a Farghalli, 2007).

## Chloramfenikol

Reverzibilně se váže na 50S podjednotku ribozómu, kde inhibuje enzym peptidyltransferázu a brání připojení přivedené aminokyseliny na prodlužující se řetězec. Jeho efekt je bakteriostatický (Murray et al., 2009). Široké spektrum zahrnuje většinu grampozitivních i gramnegativních mikrobů včetně rickettsií a chlamydií. Díky výskytu aplastické anémie (cca 1:30000) je považován za málo bezpečný a není látkou první volby. Jeho derivát tiamfenikol se už nepoužívá (Lincová a Farghalli, 2007).

Nejčastějším mechanismem rezistence je plazmidicky přenosná produkce acetyl-transferázy. Acetylací 3-hydroxyskupiny v molekule vzniká produkt neschopný vazby na ribozóm. Méně častá je snížená permeabilita membrány gramnegativních kmenů, ke které dochází díky chromozomální mutaci genů pro porinové proteiny (Murray et al., 2009).

### 6.4.8. Látky vytvářející póry v cytoplazmatické membráně

#### Polyeny

Společně se s ergosterolem začleňují do cytoplazmatické membrány za vzniku hydrofilního póru. Dochází tak k úniku iontů a intracelulárního obsahu, narušení homeostázy buňky a jejímu zániku (Lüllmann et al., 2004). Mají schopnost vazby i na cholesterol, ale v mnohem menší míře. Působí také poškození samotné membrány vlivem oxidačního stresu a vzniku volných radikálů. Celkový účinek je tedy fungicidní (Murray et al., 2009).

Široké spektrum účinku zahrnuje většinu kandid, aspergily, kryptokoky i *Histoplasma capsulatum* aj. Rezistence se vyskytuje v relativně malé míře, zpravidla k ní dochází díky snížení obsahu ergosterolu v membráně (Murray et al., 2009). Může být zkřížená mezi jednotlivými zástupci (Lincová a Farghalli, 2007).

Nejznámějším zástupcem je amfotericin B, lék volby při mukormykózách. Často bývá využíván i u invazivních infekcí jinými fungálními patogeny. Nejčastěji se podává intravenózně, perorálně se nevstřebává. Nejmarkantnějším nežádoucím účinkem je jeho nefrotoxicita, která omezuje možnosti jeho nasazení a akutní příznaky spojené s infuzí (horečka, myalgie). Lze jej používat v kombinacích s flucytosinem, rifampicinem, popř.

tetracyklinem. Nefrotoxicitu eliminují moderní lipidové formulace amfotericinu B, jejichž cena je však několikanásobně vyšší (Lincová a Farghalli, 2007).

Další zástupci natamycin a nystatin se používají pouze lokálně (Lüllmann et al., 2004).

#### 6.4.9. Inhibice syntézy ergosterolu

##### Azolová antimykotika

Mechanismem jejich účinku je inhibice lanosterol 14- $\alpha$ -demethylázy, cytochrom P-450 dependentního enzymu, který katalyzuje přeměnu lanosterolu na ergosterol. Ten je nejvýznamnější steroidní složkou buněčné membrány hub. Účinek je především fungistatický, u některých látek až fungicidní. U dimorfních hub blokuje přeměnu z kvasinkové do myceliální formy. U některých zástupců jsou popisovány i další účinky (Lincová a Farghalli, 2007). Rozdělujeme je dle chemické struktury na deriváty imidazolu a triazolu.

Spektrum účinku zahrnuje zejména *Candida* spp., *Histoplasma capsulatum*, dermatofyty (*Trichophyton* spp, *Epidermophyton* spp.). Na kryptokoky je účinek nestabilní a na aspergily působí pouze novější triazolové látky (Lincová a Farghalli, 2007).

Díky širokému využití azolových ATM k terapii i profylaxi, dochází k celosvětovému prudkému nárůstu rezistence. Hlavními mechanismy jsou zvýšená exprese efluxních pump a cílového enzymu, popř. bodová mutace genů pro jeho produkci (Espinel-Ingroff, A., 2008).

**Tabulka 7: Vybraní zástupci azolových ATM a jejich použití**  
dle (Murray et al., 2009) a (Lincová a Farghalli, 2007)

Imidazoly	
mikonazol, ketokonazol	dříve i systémové užití, dnes pouze topicky, široké spektrum, četné interakce přes cytochrom P450
ekonazol, klotrimazol, bifonazol	pouze topické užití, léčba dermatofytóz a kandidóz
Triazoly	
flukonazol	<i>p.o.</i> a <i>i.v.</i> podání, nejlepší bezpečnostní profil, neúčinnost na aspergily a <i>C.krusei</i> , snížená účinnost na některé non-albicans druhy, dobrá na kryptokoky a dermatofyty, proniká do CNS, často i v profylaxi

itrakonazol	<i>p.o.</i> a <i>i.v.</i> podání, široké spektrum, odvozen od ketokonazolu, interakce na CYP 3A4, proměnlivá biol. dostupnost
vorikonazol	<i>p.o.</i> a <i>i.v.</i> , široké spektrum vč. flukonazol-rezistentních kandid, použití u invazivní aspergilózy, průnik do CNS
posakonazol, ravukonazol	<i>p.o.</i> , široké spektrum vč. zygomycet a <i>C. krusei</i> , vysoká účinnost

### Další látky

Alylaminy inhibují skvalenepoxidázu, kdy kromě nedostatku ergosterolu dochází ke kumulaci skvalenů a fungicidnímu efektu. Jedná se o vysoce lipofilní a keratofilní látky, dobře se resorbují a kumulují v kůži a jejích adnexech. Primární užití je v léčbě dermatofytóz a kandidóz (i flukonazol-rezistentní kmeny). Terbinafin lze užívat perorálně, naftifin pouze topicky (Lincová a Farghalli, 2007).

Amorolfin je fungicidní morfolinový derivát, který inhibuje demethylanosterolreduktázu. Dobře prostupuje do hmoty nehtu a jeho výhradní užití spočívá v léčbě mykóz nehtů způsobených vláknitými houbami ve formě laku. (Lüllmann et al., 2004).

#### 6.4.10. Zásah do funkcí buněčného jádra

Flucytosin (5-fluorocytosin) působí jako antimetabolit. Je aktivně transportován do buňky, kde deaminací enzymem adenosindeaminázou, vzniká vlastní účinná látka 5-fluorouracil. Ten je inkorporován do RNA a inhibuje tak syntézu nukleových kyselin, může také přímo antagonizovat cytosin. Jeho účinek je fungistatický (Lincová a Farghalli, 2007). Spektrum účinku je úzké, zahrnuje zejména kandidy, *C. neoformans* a některé dermatofyty. Neúčinkuje na aspergily. V monoterapii se nevyužívá, ačkoliv dobře proniká do tělních tekutin. Právě nutnost intracelulární konverze je jedním z hlavních mechanismů rezistence ke flucytosinu, dalším je snížený příjem přes plazmatickou membránu (Murray et al., 2009). Nejčastěji se kombinuje s amfotericinem B, který patrně zvyšuje permeabilitu membrány, nicméně bývá vytlačován triazolovými deriváty (Lüllmann et al., 2004). V ČR není registrován.

Griseofulvin působí denaturaci mikrotubulárního aparátu buňky, což vede k zástavě mitózy snížením kontraktility proteinů dělicího vřeténka. Jeho spektrum je úzké, neboť zahrnuje pouze dermatofyty. Jeho vlastnosti a snášenlivost nijak nepřekonávají azolová ATM, jedinou výhodou může být velmi nízká míra rezistence, která není zkřížená s ostatními látkami (Lincová a Farghalli, 2007).

Ciklopirox je látka k lokálnímu použití s fungicidním účinkem a velmi širokým spektrem čítajícím i některé bakterie. Dobře penetruje i do silně zrohovatělé kůže a nehtů (Lincová a Farghalli, 2007).

#### 6.4.11. Inhibice syntézy fungální buněčné stěny

Echinokandiny inhibují syntézu 1,3- $\beta$ -glukanu, který je významnou složkou buněčné stěny některých druhů hub. Ta bez něj ztrácí své osmotické schopnosti, což vede k zániku buňky. Spektrum je poměrně široké, dobře působí na kandidy, aspergily a kožní patogeny, včetně flukonazol-rezistentních kmenů. Naopak nepůsobí na zygomycety a *Trichosporon* spp. (Murray et al., 2009). Podání je pouze parenterální, v monoterapii nebo v kombinaci s amfotericinem B nebo azoly (Lincová a Farghalli, 2007).

Rezistence k echinokandinům je u kvasinek a patrně i aspergilů, dána mutací genu *fks1*, který kóduje jeden z proteinů komplexu 1,3- $\beta$ -glukansyntázy, ve kterém se nachází jejich vazebné místo. Tato rezistence je zkřížená pro všechny látky skupiny, nicméně se zatím jedná o poměrně vzácný jev. *In vitro* bylo citlivých 99,6 % testovaných vzorků *Candida* spp. Byl u nich také pozorován "eagle efekt", kdy u vzorků rostoucích při značně vyšších koncentracích než MIC došlo k velmi rychlé náhradě chybějícího 1,3- $\beta$ -glukanu chitinem (Espinel-Ingroff, A., 2008).

Všechny tři v současnosti používané látky oplývají podobným spektrem účinku. Kaspofungin, mikafungin i anidulafungin se užívají k léčbě, popř. prevenci invazivních kandidóz, v případě kaspofunginu i aspergilóz, které nereagují na jinou léčbu (Murray et al., 2009).

## **7. Experimentální část**

### **7.1. Testovací kmeny**

#### 1. Bakterie

- *Staphylococcus aureus* CCM 4516/08
- *Staphylococcus aureus* methicilin rezistentní H 5996/08
- *Staphylococcus epidermidis* H 6966/08
- *Enterococcus faecalis* J14365/08
- *Escherichia coli* CCM 4517
- *Klebsiella pneumoniae* D 11750/08
- *Klebsiella pneumoniae* ESBL pozitivní J 14368/08
- *Pseudomonas aeruginosa* CCM 1961

#### 2. Kvasinky a vláknité houby

- *Candida albicans* ATCC 44859
- *Candida tropicalis* 156
- *Candia krusei* E28
- *Candia glabrata* 20/l
- *Trichosporon asahii* 1188
- *Aspergillus fumigatus* 231
- *Absidia corymbifera* 272
- *Trichophyton mentagrophytes* 445

### **7.2. Použitý materiál**

#### 1. Pomůcky

- automatické pipety, mikrotitrační destičky, 12ti jamkové rezervoáry na média, Bürkerovy komůrky, očkovací kličky, zkumavky

#### 2. Přístrojové vybavení

- laminární box, denzitometr, vortex, mikroskop

#### 3. Chemikálie

- 3-(N-morfolino) propansulfonová kyselina (MOPS), dimethylsulfoxid (DMSO), glukóza, hydroxid sodný (NaOH), sterilní voda

#### 4. Růstová média

- RPMI 1640 s glutaminem – pro kvasinky a vláknité houby
  - složení viz. Tabulka 8
- Sabouraudův agar
  - složení: pepton 10g/l, dextróza 40 g/l, agar 15 g/l
  - sterilizován v autoklávu při 121°C po dobu 15 minut
- Mueller-Hintonův bujón (MHB) – pro bakterie
  - složení: pepton 17 g/l, hovězí výtažek 2g/l, škrob 1,5 g/l

**Tabulka 8: Složení média RPMI-1640 SEVAC 5x koncentrovaného**  
(hodnoty v gramech na 1000ml média)

Dusičnan vápenatý tetrahydrát	0,5	L-prolin	0,1
Chlorid draselný	2,0	L-serin	0,15
Hydrogen fosforečnan sodný dihydrát	5,015	L- reonin	0,1
Síran hořečnatý heptahydrát	0,5	L-tyrosin	0,1
Chlorid sodný	30,0	L-tryptofan	
L-arginin hydrochlorid	1,21	L-valin	0,1
L-asparagin monohydrát	0,27	Biotin	0,001
L-cystin	0,25	Kyanokobalamin	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 <sub>2</sub> O	0,102	K. <i>p</i> -aminobenzoová	0,005
L-hydroxyprolin	0,1	Nikotinamid	0,005
L-isoleucin	0,25	D-Ca-Pantohenát	0,00235
Kyselina L- asparagová	0,1	Pyridoxin hydrochlorid	0,005
Kyselina L- glutamová	0,1	Riboflavin	0,001
L-leucin	0,25	Thiamin hydrochlorid	0,005
L-lysin hydrochlorid	0,2	Glukóza	10,0
L-methionin	0,075	Fenolčerveň	0,05
L-phenylalanin	0,075		

### 7.3. Testované látky

Přijato bylo 49 vzorků, připravených na Katedře organické a anorganické chemie Farmaceutické fakulty Univerzity Karlovy. Na základě společných strukturálních znaků byly vzorky rozděleny do šesti skupin.

Deriváty:

1. 3-phenyl-4-thioxo-3,4-dihydro-2*H*-1,3-benzoxazin-2-onu
2. 3-phenyl-2*H*-1,3-benzoxazin-2,4(3*H*)-dithionu
3. *N*-benzylsalicylthioamidu
4. phenylsalicylátu
5. benzyl-*N*-(phenylmetylen)hydrazonothiokarbamátu
6. 2-(5-karboxypentyl)isochinolinium bromidu

## 7.4. Metodika

### 7.4.1. Příprava suspenzí testovaných kmenů

1. Do sterilních zkumavek jsme napipetovali 3 ml sterilní vody.
2. Z kultur narostlých na živném agaru jsme odebrali část kolonie a pomocí vortexu resuspendovali v příslušné zkumavce označené typem kmenu.
3. Hustota inokula jsme u bakterií upravili pomocí denzitometru na 0,5 stupňů McFarlanda. U hub jsme z každé zkumavky odebrali 12  $\mu\text{l}$  pro stanovení hustoty Bürkerovou komůrkou. Optimální hodnota byla v rozmezí  $1,0 - 2,5 \times 10^5$  CFU/ml.
4. Při dodržení postupu přípravy je možné inokula použít po dobu 14 dní, za podmínky jejich uchování při teplotě  $2 - 8^\circ\text{C}$ .

### 7.4.2. Příprava růstového média

1. Ke 4 dílům MOPS s 1% glukózy jsme přidali 1 díl RPMI 1640, konečný objem a přesná množství byla dána předpokládanou spotřebou.
2. Pomocí NaOH jsme upravili pH na hodnotu 6,5-7,9.

### 7.4.3. Příprava ředící řady testované látky

1. Navážku jsme rozpustili v příslušném objemu DMSO (vzorec pro výpočet uveden níže) tak, aby první testovaná koncentrace byla  $500 \mu\text{mol.l}^{-1}$  a zároveň koncentrace DMSO v jamce nepřesáhla 1%. Údaje o navážce a molekulové hmotnosti byly dodány společně s testovanou látkou.
2. Pokud nedošlo k rozpuštění látky nebo vzniku homogenní suspenze, přidali jsme 2. případně 3.ekvivalent rozpouštědla. Každým přidáním ekvivalentu se posouvá 1.testovaná koncentrace o 1 ředění dozadu.
3. Při zjištění rozpustnosti zkoušené látky v růstovém médiu jsme do sterilní zkumavky č.1 napipetovali 1,98 ml média (MHB pro bakterie, RPMI pro houby) a 20  $\mu\text{l}$  roztoku z předchozího kroku. Pokud nedošlo ke vzniku sraženiny nebo se vytvořila homogenní suspenze, přemístili jsme pracovní roztok do jamky č.1 12ti jamkového rezervoáru. V případě, že se látka



v médiu vysrážela, přidali jsme 2. případně 3. ekvivalent a došlo k posunutí první testované koncentrace dozadu.

4. Do sterilních zkumavek 2-11 jsme připravili dvojkovou ředící řadu: do každé zkumavky jsme napipetovali 0,5 ml DMSO, do zkumavky č.2 jsme přenesli 0,5 ml roztoku testované látky, po důkladném promíchání jsme 0,5 ml přenesli do zkumavky č.3. Obdobně se pokračovalo až do zkumavky č.11.
5. Do každé z jamek 12ti jamkového rezervoáru jsme napipetovali 1,98 ml růstového média a 20 µl naředěného roztoku zkoušené látky z příslušných zkumavek 2-11. Do jamky č.12 jsme přidali pouze 20 µl DMSO neboť slouží jako kontrola.

Vzorec pro výpočet objemu DMSO

$$V_{\text{DMSO}} = \frac{m \times 10\,000\,000 \text{ (převod na } \mu\text{l)}}{c \times M \times 100 \text{ (zakoncentrování)}} = x \mu\text{l DMSO}$$

m...navážka testované látky (g)

c....první testovaná koncentrace = 500 µmol.l<sup>-1</sup>

M...molekulová hmotnost

#### 7.4.4. Příprava mikrotitrační destičky pro bakterie

1. Pomocí 12ti kanálové pipety jsme přenesli z rezervoáru 200 µl zásobního roztoku do všech řádků mikrotitrační destičky.
2. Do řádků označených A-F jsme napipetovali 10 µl připravených suspenzí jednotlivých kmenů bakterií.

#### 7.4.5. Příprava mikrotitrační destičky pro kvasinky a vláknité houby

1. Z rezervoáru jsme přenesli 200 µl zásobního roztoku pouze do 7 řádků na první destičce a do tolika řádků na druhé destičce, kolik jsme měli testovaných látek.
2. Do řádků na první destičce označených A-E jsme po 10 µl pipetovali suspenze prvních sedmi kmenů. Všechny řádky druhé destičky byly inokulovány pouze kmenem TM.

#### 7.4.6. Inkubace a vyhodnocení

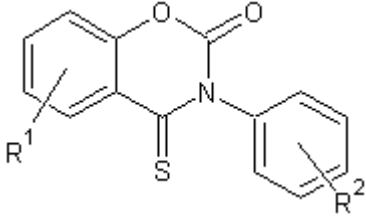
1. Destičky jsme přiklopili víčkem a inkubovali v termostatu při 35°C. Odečet MIC jsme prováděli po 24 a 48 hodinách. Destička s kmenem TM byla odečítána po 72 a 120 hodinách.
2. Po uplynutí stanovené doby jsme porovnávali nárůst kolonií v jamkách oproti kontrole.
3. Minimální inhibiční koncentrace (MIC) odpovídala jamce, ve které došlo k alespoň 80% potlačení růstu kolonií (MIC = IC<sub>80</sub>). Pouze v případě vláknitých hub byla za MIC považována už 50% inhibice kontroly (MIC = IC<sub>50</sub>).

## 7.5. Výsledky

Aktivita testovaných látek byla zkoušena v rozsahu koncentrací od 500  $\mu\text{mol.l}^{-1}$  do 0,488  $\mu\text{mol.l}^{-1}$  připravených dvojkovou ředící řadou. Odečtené hodnoty MIC jsou zvýrazněny tučně. Každé dosažené hodnotě MIC jsme přiřadili bodové hodnocení podle klíče: 500  $\mu\text{mol.l}^{-1}$  = 1 bod, 250  $\mu\text{mol.l}^{-1}$  = 2 body, atd. až po 0,488  $\mu\text{mol.l}^{-1}$  = 11 bodů (vysvětleno v diskuzi).

### 7.5.1. Deriváty 3-phenyl-4-thioxo-3,4-dihydro-2H-1,3-benzoxazin-2-onu

Tabulka 9: Strukturální vzorce derivátů 3-phenyl-4-thioxo-3,4-dihydro-2H-1,3-benzoxazin-2-onu

			
Kód látky	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	Mr
<b>T6149</b>	6-Br	ethyl	362,25
<b>T6145</b>	6-Cl	ethyl	317,03
<b>T6146</b>	7-Cl	ethyl	317,03
<b>T6009</b>	6-Br	isopropyl	376,27
<b>T6187</b>	6-Cl	isopropyl	331,8
<b>T6007</b>	7-Cl	isopropyl	331,8
<b>T6247</b>	6-F	isopropyl	315,4
<b>T6286</b>	7-CH <sub>3</sub>	isopropyl	311,4
<b>T6015</b>	6-Cl	sek-butyl	345,8
<b>T6189</b>	7-Cl	sek-butyl	345,8
<b>T6288</b>	7-CH <sub>3</sub>	sek-butyl	325,4
<b>T6251</b>	7-F	sek-butyl	329,4
<b>T6151</b>	6-Cl	butyl	345,8
<b>T6259</b>	6-Cl	terc-butyl	345,8
<b>T6257</b>	6-F	terc-butyl	329,4
<b>T6290</b>	6-CH <sub>3</sub>	terc-butyl	325,4

Látka **T6247** se srážela v růstových médiích a nebyla dále testována.

**Tabulka 10: Výsledky testování derivátů 3-phenyl-4-thioxo-3,4-dihydro-2H-1,3-benzoxazin-2-onu; bakterie - 1. část**

KMEN (kód)		TESTOVANÁ LÁTKA (kód) –MIC/IC <sub>80</sub> (μmol.l <sup>-1</sup> )									
		T6149	T6145	T6146	T6009	T6187	T6007	T6286	T6015	T6189	T6288
SA	24h	7,81	1,95	1,95	0,98	3,9	1,95	>125	1,95	1,95	>125
	48h	31,25	3,9	3,9	1,95	3,9	1,95	>125	1,95	1,95	>125
MRSA	24h	15,62	1,95	1,95	0,98	1,95	1,95	>125	0,98	1,95	>125
	48h	31,25	3,9	3,9	0,98	3,9	1,95	>125	1,95	1,95	>125
SE	24h	7,81	31,25	125	1,95	1,95	1,95	>125	1,95	1,95	>125
	48h	31,25	31,25	>125	1,95	3,9	3,9	>125	1,95	3,9	>125
EF	24h	125	125	125	15,62	3,9	15,62	>125	3,9	3,9	>125
	48h	>125	>125	>125	>125	3,9	>125	>125	15,62	31,25	>125
EC	24h	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>250	>125	>125
	48h	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>250	>125	>125
KP	24h	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>250	>125	>125
	48h	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>250	>125	>125
KP-E	24h	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>250	>125	>125
	48h	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>250	>125	>125
PA	24h	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>250	>125	>125
	48h	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>250	>125	>125

**Tabulka 11: Výsledky testování derivátů 3-phenyl-4-thioxo-3,4-dihydro-2H-1,3-benzoxazin-2-onu; bakterie - 2. část**

KMEN (kód)		TESTOVANÁ LÁTKA (kód) –MIC/IC <sub>80</sub> (μmol.l <sup>-1</sup> )									
		T6251	T6151	T6259	T6257	T6290					Součet
SA	24h	1,95	7,81	1,95	3,9	125					106
	48h	1,95	7,81	1,95	7,81	125					100
MRSA	24h	1,95	0,49	0,49	3,9	125					113
	48h	3,9	0,98	0,95	3,9	125					105
SE	24h	7,81	0,98	1,95	3,9	1,95					103
	48h	15,62	0,98	1,95	3,9	31,25					94
EF	24h	3,9	15,62	7,81	15,62	>125					72
	48h	15,62	>250	62,5	125	>125					32
EC	24h	>500	>250	>250	>125	>125					
	48h	>500	>250	>250	>125	>125					
KP	24h	>500	>250	>250	>125	>125					
	48h	>500	>250	>250	>125	>125					
KP-E	24h	>500	>250	>250	>125	>125					
	48h	>500	>250	>250	>125	>125					
PA	24h	>500	>250	>250	>125	>125					
	48h	>500	>250	>250	>125	>125					

Celá 1. skupina vykazovala, s výjimkou látek **T6149** a **T6290**, velmi silný účinek na stafylokoky, který se výrazně nezměnil s délkou inkubace. **T6187**, **T6015** a **T6189** působily silně i na EF. Žádná z látek nebyla účinná na gramnegativní bakterie. **T6286** a **T6288** se srážely v testovacím médiu, nicméně se podařilo vytvořit homogenní suspenzi.

Tabulka 12: Výsledky testování derivátů 3-phenyl-4-thioxo-3,4-dihydro-2H-1,3-benzoxazin-2-onu; houby - 1. část

KMEN (kód)		TESTOVANÁ LÁTKA (kód) –MIC/IC <sub>80</sub> /IC <sub>50</sub> (μmol.l <sup>-1</sup> )									
		T6149	T6145	T6146	T6009	T6187	T6007	T6286	T6015	T6189	T6288
<b>CA</b>	24h	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>250	>500	>125
	48h	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>250	>500	>125
<b>CT</b>	24h	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>250	>500	>125
	48h	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>250	>500	>125
<b>CK</b>	24h	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>250	>500	>125
	48h	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>250	>500	>125
<b>CG</b>	24h	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>250	>500	>125
	48h	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>250	>500	>125
<b>TA</b>	24h	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>250	>500	>125
	48h	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>250	>500	>125
<b>AF</b>	24h	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>250	<b>250</b>	>125
	48h	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>250	>500	>125
<b>AC</b>	24h	<b>0,98</b>	<b>0,98</b>	<b>0,98</b>	<b>1,95</b>	<b>0,98</b>	<b>0,98</b>	>125	<b>7,81</b>	<b>0,98</b>	<b>1,95</b>
	48h	<b>0,98</b>	<b>0,98</b>	<b>0,98</b>	<b>1,95</b>	<b>1,95</b>	<b>0,98</b>	>125	<b>125</b>	<b>3,9</b>	<b>15,62</b>
<b>TM</b>	72h	>125	<b>7,81</b>	<b>3,9</b>	<b>1,95</b>	<b>7,81</b>	<b>3,9</b>	>125	<b>3,9</b>	<b>3,9</b>	>125
	120h	>125	<b>7,81</b>	<b>3,9</b>	<b>1,95</b>	<b>7,81</b>	<b>3,9</b>	>125	<b>3,9</b>	<b>3,9</b>	>125

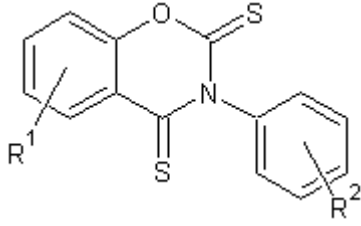
Tabulka 13: Výsledky testování derivátů 3-phenyl-4-thioxo-3,4-dihydro-2H-1,3-benzoxazin-2-onu; houby - 2. část

KMEN (kód)		TESTOVANÁ LÁTKA (kód) –MIC/IC <sub>80</sub> /IC <sub>50</sub> (μmol.l <sup>-1</sup> )									
		T6251	T6151	T6259	T6257	T6290					Součet
<b>CA</b>	24h	>500	>250	<b>125</b>	>125	>125					3
	48h	>500	>250	>250	>125	>125					
<b>CT</b>	24h	>500	>250	>250	>125	>125					
	48h	>500	>250	>250	>125	>125					
<b>CK</b>	24h	<b>250</b>	>250	<b>125</b>	>125	>125					5
	48h	>500	>250	>250	>125	>125					
<b>CG</b>	24h	>500	>250	>250	>125	>125					
	48h	>500	>250	>250	>125	>125					
<b>TA</b>	24h	<b>31,25</b>	>250	<b>125</b>	<b>125</b>	>125					11
	48h	<b>62,5</b>	>250	>250	>125	>125					4
<b>AF</b>	24h	>500	>250	<b>125</b>	>125	>125					5
	48h	>500	>250	>250	>125	>125					
<b>AC</b>	24h	>500	<b>0,98</b>	<b>0,98</b>	<b>3,9</b>	>125					113
	48h	>500	<b>15,62</b>	<b>1,95</b>	<b>15,62</b>	>125					96
<b>TM</b>	72h	<b>15,62</b>	<b>3,9</b>	<b>1,95</b>	<b>7,81</b>	>125					85
	120h	<b>15,62</b>	<b>3,9</b>	<b>1,95</b>	<b>7,81</b>	>125					85

Celý soubor látek vykazoval velmi silný účinek pouze na kmeny TM a zejména AC, pokles aktivity po 48 hodinách inkubace byl mírný. Nejúčinnější látkou byla **T6295**. Ojedinelý slabý účinek na ostatní kmeny odezněl po 48 hodinách inkubace s výjimkou **T6251**. **T6290** a **T6286** byly neaktivní.

## 7.5.2. Deriváty 3-phenyl-2H-1,3-benzoxazin-2,4(3H)-dithionu

Tabulka 14: Strukturní vzorce derivátů 3-phenyl-2H-1,3-benzoxazin-2,4(3H)-dithionu

			
Kód látky	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	Mr
<b>T6150</b>	6-Br	ethyl	378,3
<b>T6147</b>	6-Cl	ethyl	333,9
<b>T6148</b>	7-Cl	ethyl	333,9
<b>T6010</b>	6-Br	isopropyl	392,3
<b>T6188</b>	6-Cl	isopropyl	347,9
<b>T6008</b>	7-Cl	isopropyl	347,9
<b>T6248</b>	6-F	isopropyl	331,4
<b>T6287</b>	7-CH <sub>3</sub>	isopropyl	327,5
<b>T6012</b>	6-Br	sek-butyl	406,4
<b>T6016</b>	6-Cl	sek-butyl	361,9
<b>T6190</b>	7-Cl	sek-butyl	361,9
<b>T6289</b>	7-CH <sub>3</sub>	sek-butyl	341,5
<b>T6252</b>	7-F	sek-butyl	345,5
<b>T6152</b>	6-Cl	butyl	361,9
<b>T6260</b>	6-Cl	terc-butyl	361,9
<b>T6244</b>	7-Cl	terc-butyl	361,9
<b>T6258</b>	6-F	terc-butyl	345,5
<b>T6291</b>	7-CH <sub>3</sub>	terc-butyl	341,5

Látky **T6260**, **T6258** a **T6291** se vysrážely v obou růstových médiích a nemohly tedy být dále testovány.

Tabulka 15: Výsledky testování derivátů 3-phenyl-2H-1,3-benzoxazin-2,4(3H)-dithionu; bakterie - 1. část

KMEN (kód)		TESTOVANÁ LÁTKA (kód) –MIC/IC <sub>80</sub> (μmol.l <sup>-1</sup> )									
		T6150	T6147	T6148	T6010	T6188	T6008	T6248	T6287	T6012	T6016
SA	24h	3,9	7,81	3,9	1,95	0,98	1,95	1,95	1,95	0,98	1,95
	48h	3,9	7,81	3,9	1,95	1,95	1,95	3,9	62,5	0,98	1,95
MRSA	24h	1,95	3,9	7,81	1,95	0,98	3,9	15,62	7,81	1,95	1,95
	48h	3,9	7,81	15,62	7,81	3,9	15,62	31,25	62,5	1,95	1,95
SE	24h	1,95	15,62	31,25	3,9	1,95	3,9	15,62	15,62	1,95	1,95
	48h	3,9	15,62	>500	7,81	15,62	31,25	62,5	>125	1,95	3,9
EF	24h	7,81	31,25	125	31,25	15,62	62,5	62,5	>125	15,62	31,25
	48h	125	125	>500	>125	>125	>500	>125	>125	>125	>125
EC	24h	>125	>250	>500	>125	>125	>500	>125	>125	>125	>125
	48h	>125	>250	>500	>125	>125	>500	>125	>125	>125	>125
KP	24h	>125	>250	>500	>125	>125	>500	>125	>125	>125	>125
	48h	>125	>250	>500	>125	>125	>500	>125	>125	>125	>125
KP-E	24h	>125	>250	>500	>125	>125	>500	>125	>125	>125	>125
	48h	>125	>250	>500	>125	>125	>500	>125	>125	>125	>125
PA	24h	>125	>250	>500	>125	>125	>500	>125	>125	>125	>125
	48h	>125	>250	>500	>125	>125	>500	>125	>125	>125	>125

Tabulka 16: Výsledky testování derivátů 3-phenyl-2H-1,3-benzoxazin-2,4(3H)-dithionu; bakterie - 2. část

KMEN (kód)		TESTOVANÁ LÁTKA (kód) –MIC/IC <sub>80</sub> (μmol.l <sup>-1</sup> )							Součet
		T6190	T6289	T6252	T6152	T6244			
SA	24h	0,98	>250	1,95	3,9	>125			115
	48h	1,95	>250	1,95	3,9	>125			108
MRSA	24h	0,98	>250	1,95	3,9	>125			109
	48h	1,95	>250	3,9	3,9	>125			94
SE	24h	1,95	>250	7,81	1,95	>125			100
	48h	7,81	>250	15,62	3,9	>125			74
EF	24h	7,81	>250	3,9	31,25	>125			65
	48h	125	>250	15,62	>500	>125			15
EC	24h	>250	>250	>500	>500	>125			
	48h	>250	>250	>500	>500	>125			
KP	24h	>250	>250	>500	>500	>125			
	48h	>250	>250	>500	>500	>125			
KP-E	24h	>250	>250	>500	>500	>125			
	48h	>250	>250	>500	>500	>125			
PA	24h	>250	>250	>500	>500	>125			
	48h	>250	>250	>500	>500	>125			

Látky 2. skupiny vykázaly velmi silný účinek na stafylokoky, zejména SA a MRSA, kde byl pozorován i nejnižší pokles aktivity při inkubaci. **T6252** dosáhla středně silného účinku i na EF, který byl málo citlivý k látkám této skupiny. Nejúspěšnější látkou byla **T6190** s nejnižšími MIC a účinkem i na EF. Gramnegativní bakterie nebyly vůbec ovlivněny. **T6289** a **T6244** byly neúčinné.

Tabulka 17: Výsledky testování derivátů 3-phenyl-2H-1,3-benzoxazin-2,4(3H)-dithionu; houby - 1.část

KMEN (kód)		TESTOVANÁ LÁTKA (kód) –MIC/IC <sub>80</sub> IC <sub>50</sub> (μmol.l <sup>-1</sup> )									
		T6150	T6147	T6148	T6010	T6188	T6008	T6248	T6287	T6012	T6016
<b>CA</b>	24h	>125	>250	>125	>250	<b>62,5</b>	>500	>125	>125	>125	>125
	48h	>125	>250	>125	>250	>125	>500	>125	>125	>125	>125
<b>CT</b>	24h	>125	>250	>125	>250	>125	>500	>125	>125	>125	>125
	48h	>125	>250	>125	>250	>125	>500	>125	>125	>125	>125
<b>CK</b>	24h	>125	>250	>125	>250	>125	>500	>125	>125	>125	>125
	48h	>125	>250	>125	>250	>125	>500	>125	>125	>125	>125
<b>CG</b>	24h	>125	>250	>125	>250	>125	>500	>125	>125	>125	>125
	48h	>125	>250	>125	>250	>125	>500	>125	>125	>125	>125
<b>TA</b>	24h	>125	>250	>125	>250	>125	>500	>125	>125	>125	>125
	48h	>125	>250	>125	>250	>125	>500	>125	>125	>125	>125
<b>AF</b>	24h	>125	>250	>125	>250	>125	>500	>125	>125	>125	>125
	48h	>125	>250	>125	>250	>125	>500	>125	>125	>125	>125
<b>AC</b>	24h	<b>31,25</b>	<b>62,5</b>	<b>0,98</b>	<b>15,62</b>	<b>15,62</b>	<b>250</b>	<b>31,25</b>	>125	>125	>125
	48h	<b>31,25</b>	<b>62,5</b>	<b>0,98</b>	>250	<b>15,62</b>	>500	<b>125</b>	>125	>125	>125
<b>TM</b>	72h	>125	<b>125</b>	>125	<b>15,62</b>	<b>15,62</b>	>500	<b>15,62</b>	>125	>125	>125
	120h	>125	<b>125</b>	>125	<b>62,5</b>	<b>15,62</b>	>500	<b>31,25</b>	>125	>125	>125

Tabulka 18: Výsledky testování derivátů 3-phenyl-2H-1,3-benzoxazin-2,4(3H)-dithionu; houby - 2.část

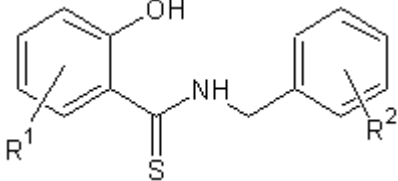
KMEN (kód)		TESTOVANÁ LÁTKA (kód) –MIC/IC <sub>80</sub> IC <sub>50</sub> (μmol.l <sup>-1</sup> )							Součet	
		T6190	T6289	T6252	T6152	T6244				
<b>CA</b>	24h	>250	>250	>500	>250	>125				4
	48h	>250	>250	>500	>250	>125				
<b>CT</b>	24h	>250	>250	>500	>250	>125				
	48h	>250	>250	>500	>250	>125				
<b>CK</b>	24h	>250	>250	>500	>250	>125				
	48h	>250	>250	>500	>250	>125				
<b>CG</b>	24h	>250	>250	>500	>250	>125				
	48h	>250	>250	>500	>250	>125				
<b>TA</b>	24h	>250	>250	<b>500</b>	>250	>125				1
	48h	>250	>250	>500	>250	>125				
<b>AF</b>	24h	>250	>250	>500	>250	>125				
	48h	>250	>250	>500	>250	>125				
<b>AC</b>	24h	>250	>250	>500	>250	>125				38
	48h	>250	>250	>500	>250	>125				28
<b>TM</b>	72h	>250	>250	<b>31,25</b>	>250	>125				26
	120h	>250	>250	<b>62,5</b>	>250	>125				22

Testované látky vykazovaly středně silný účinek pouze na AC a některé i na TM. Jedinou výjimkou byla **T6188**, která po 24 hodinách potlačila růst CA a **T6252** se slabým účinkem na TA. Nejúspěšnější látkou byla **T6148** se silným účinkem na AC. Polovina celého souboru neinhibovala růst bakterií vůbec.



### 7.5.3. Deriváty N-benzylsalicylthioamidu

Tabulka 19: Strukturní vzorce derivátů N-benzylsalicylthioamidu

			
Kód látky	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	Mr
<b>T5623</b>	3-Cl, 5-Cl	3-Cl, 4-Cl	381,11
<b>T5611</b>	H	H	243,33

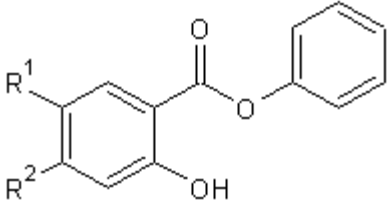
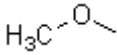
Tabulka 20: Výsledky testování derivátů N-benzylsalicylthioamidu; houby

KMEN (kód)		TESTOVANÁ LÁTKA (kód) –MIC/IC <sub>80</sub> IC <sub>50</sub> (μmol.l <sup>-1</sup> )								Součet
		T5623	T5611							
<b>CA</b>	24h	125	125							6
	48h	250	500							3
<b>CT</b>	24h	500	500							2
	48h	500	500							2
<b>CK</b>	24h	62,5	250							6
	48h	250	250							4
<b>CG</b>	24h	500	500							2
	48h	>500	500							1
<b>TA</b>	24h	15,62	62,5							10
	48h	62,5	62,5							8
<b>AF</b>	24h	31,25	125							8
	48h	31,25	250							7
<b>AC</b>	24h	7,81	7,81							14
	48h	7,81	15,62							13
<b>TM</b>	72h	1,95	15,62							15
	120h	3,9	31,25							12

U těchto látek byla testována pouze antimykotická aktivita. Obě dosáhly alespoň slabého účinku v celém spektru testovacích kmenů. U TB a AC dokonce středně silného a v případě **T5623** i velmi silného u kmene *Trichophyton mentagrophytes*.

### 7.5.4. Deriváty phenylsalicylátu

Tabulka 21: Strukturní vzorce derivátů phenylsalicylátu

			
Kód látky	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	Mr
<b>T6262</b>	H		244,25
<b>T6264</b>	Br	H	293,12
<b>T6265</b>	H	Cl	248,67
<b>T6267</b>	F	H	232,21
<b>T6271</b>	H	CH <sub>3</sub>	228,25

Tabulka 22: Výsledky testování derivátů phenylsalicylátu; bakterie

KMEN (kód)	TESTOVANÁ LÁTKA (kód) –MIC/IC <sub>80</sub> (μmol.l <sup>-1</sup> )										
	T6262	T6264	T6265	T6267	T6271					Součet	
<b>SA</b>	24h	>500	>500	>500	>500	>500					
	48h	>500	>500	>500	>500	>500					
<b>MRSA</b>	24h	>500	>500	>500	>500	>500					
	48h	>500	>500	>500	>500	>500					
<b>SE</b>	24h	>500	>500	>500	>500	>500					
	48h	>500	>500	>500	>500	>500					
<b>EF</b>	24h	>500	>500	>500	>500	>500					
	48h	>500	>500	>500	>500	>500					
<b>EC</b>	24h	>500	>500	>500	>500	>500					
	48h	>500	>500	>500	>500	>500					
<b>KP</b>	24h	>500	>500	>500	>500	>500					
	48h	>500	>500	>500	>500	>500					
<b>KP-E</b>	24h	>500	>500	>500	>500	>500					
	48h	>500	>500	>500	>500	>500					
<b>PA</b>	24h	>500	>500	>500	>500	>500					
	48h	>500	>500	>500	>500	>500					

Žádná ze zkoušených látek nevykázala schopnost inhibovat růst u žádného z testovacích kmenů.

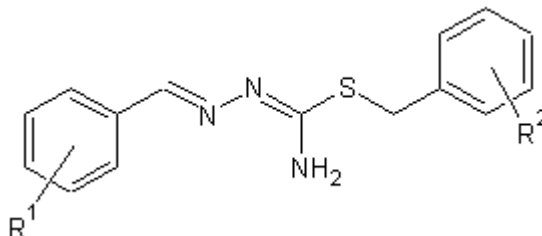
Tabulka 23: Výsledky testování derivátů phenylsalicylátu; houby

KMEN (kód)		TESTOVANÁ LÁTKA (kód) –MIC/IC <sub>80</sub> IC <sub>50</sub> (μmol.l <sup>-1</sup> )									
		T6262	T6264	T6265	T6267	T6271					Součet
<b>CA</b>	24h	>500	>500	>500	>500	>500					
	48h	>500	>500	>500	>500	>500					
<b>CT</b>	24h	>500	>500	>500	>500	>500					
	48h	>500	>500	>500	>500	>500					
<b>CK</b>	24h	>500	>500	>500	>500	>500					
	48h	>500	>500	>500	>500	>500					
<b>CG</b>	24h	>500	>500	>500	>500	>500					
	48h	>500	>500	>500	>500	>500					
<b>TA</b>	24h	>500	>500	>500	>500	>500					
	48h	>500	>500	>500	>500	>500					
<b>AF</b>	24h	>500	>500	>500	>500	>500					
	48h	>500	>500	>500	>500	>500					
<b>AC</b>	24h	>500	>500	>500	>500	>500					
	48h	>500	>500	>500	>500	>500					
<b>TM</b>	72h	<b>500</b>	>500	>500	>500	<b>250</b>					3
	120h	<b>500</b>	>500	>500	>500	>500					1

Pouze látka **T6262** dosáhla slabého účinku v případě TM. **T6271** si svoji aktivitu neudržela po celou dobu inkubace.

### 7.5.5. Deriváty benzyl-N'-(phenylmetylen)hydrazonothiokarbamátu

Tabulka 24: Strukturní vzorce derivátů benzyl-N'-(phenylmetylen)hydrazonothiokarbamátu

			
Kód látky	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	Mr
<b>T6193</b>	2-OH	3-Cl	319,82
<b>T6090</b>	2-OH, 5-Cl	3-Cl	354,26
<b>T6186</b>	2-OH	2-Cl	319,82
<b>T6235</b>	H	H	269,37

Tabulka 25: Výsledky testování derivátů benzyl-N'-(phenylmetylen)hydrazonothiokarbamátu; bakterie

KMEN (kód)		TESTOVANÁ LÁTKA (kód) –MIC/IC <sub>80</sub> (μmol.l <sup>-1</sup> )								Součet
		T6193	T6090	T6186	T6235					
<b>SA</b>	24h	>500	>500	>500	<b>500</b>					1
	48h	>500	>500	>500	>500					
<b>MRSA</b>	24h	>500	>500	>500	>500					
	48h	>500	>500	>500	>500					
<b>SE</b>	24h	>500	>500	>500	>500					
	48h	>500	>500	>500	>500					
<b>EF</b>	24h	>500	>500	>500	>500					
	48h	>500	>500	>500	>500					
<b>EC</b>	24h	>500	>500	>500	>500					
	48h	>500	>500	>500	>500					
<b>KP</b>	24h	>500	>500	>500	>500					
	48h	>500	>500	>500	>500					
<b>KP-E</b>	24h	>500	>500	>500	>500					
	48h	>500	>500	>500	>500					
<b>PA</b>	24h	>500	>500	>500	>500					
	48h	>500	>500	>500	>500					

Žádná z látek nebyla dostatečně aktivní ve zkoušeném rozmezí koncentrací.

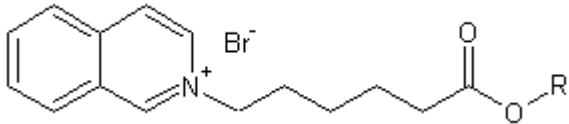
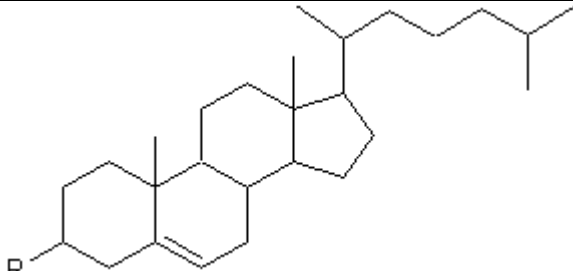
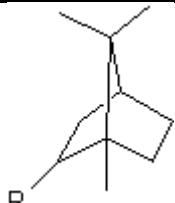
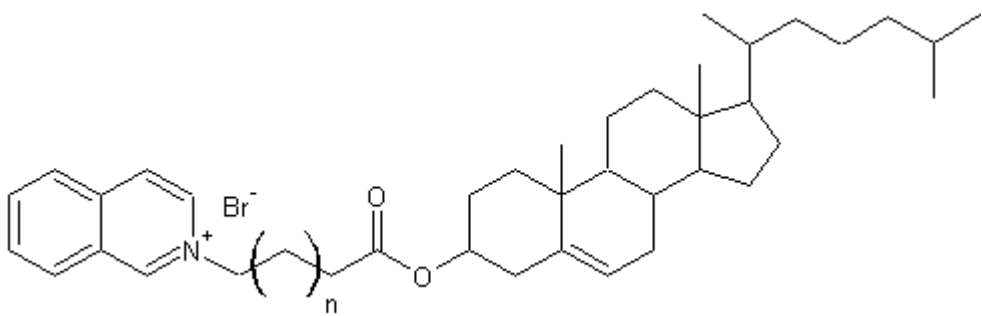
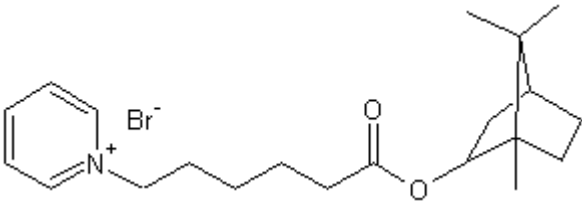
**Tabulka 26: Výsledky testování derivátů benzyl-N'-(phenylmetylen)hydrazonothiokarbamátu; houby**

KMEN (kód)		TESTOVANÁ LÁTKA (kód) –MIC/IC <sub>80</sub> IC <sub>50</sub> (μmol.l <sup>-1</sup> )								Součet
		T6193	T6090	T6186	T6235					
<b>CA</b>	24h	>500	>500	>250	<b>250</b>					2
	48h	>500	>500	>250	>500					
<b>CT</b>	24h	>500	>500	>250	>500					
	48h	>500	>500	>250	>500					
<b>CK</b>	24h	>500	>500	>250	>500					
	48h	>500	>500	>250	>500					
<b>CG</b>	24h	>500	>500	>250	>500					
	48h	>500	>500	>250	>500					
<b>TA</b>	24h	>500	>500	<b>250</b>	<b>250</b>					4
	48h	>500	>500	>250	>500					
<b>AF</b>	24h	>500	>500	>250	>500					
	48h	>500	>500	>250	>500					
<b>AC</b>	24h	>500	>500	>250	<b>500</b>					1
	48h	>500	>500	>250	<b>500</b>					1
<b>TM</b>	72h	<b>250</b>	>500	<b>250</b>	<b>500</b>					5
	120h	>500	>500	>250	<b>500</b>					1

Z celého souboru si pouze **T6235** dokázala zachovat po celou dobu inkubace alespoň slabý účinek na kmeny AC a TM.

### 7.5.6. Deriváty 2-(5-karboxypentyl)isochinolinium bromidu

Tabulka 27: Strukturní vzorce derivátů 2-(5-karboxypentyl)isochinolinium bromidu

Deriváty 2-(5-karboxypentyl)isochinolinium bromidu		
		
Kód látky	R	Mr
<b>T6183</b>	 <p><i>R- zde označuje místo napojení na hlavní skelet</i></p>	691,40
<b>T6279</b>	 <p><i>R- zde označuje místo napojení na hlavní skelet</i></p>	459,18
<b>T6272</b>		
	 <p style="text-align: right;"><i>n=13</i></p>	Mr= 831,6
<b>T6277</b>		
		Mr= 409,1

Látku **T6272** se nepodařilo rozpustit v DMSO ani za pomoci ultrazvuku, nemohla tedy být dále testována.

**Tabulka 28: Výsledky testování derivátů 2-(5-karboxypentyl)isochinolinium bromidu; bakterie**

KMEN (kód)		TESTOVANÁ LÁTKA (kód) –MIC/IC <sub>80</sub> (μmol.l <sup>-1</sup> )								
		T6183	T6279	T6277						Součet
SA	24h	62,5	7,81	125						14
	48h	125	7,81	125						13
MRSA	24h	125	15,62	250						11
	48h	125	15,62	250						11
SE	24h	125	15,62	125						12
	48h	125	15,62	125						12
EF	24h	125	31,25	250						10
	48h	125	31,25	250						10
EC	24h	>125	500	>500						1
	48h	>125	>500	>500						
KP	24h	>125	>500	>500						
	48h	>125	>500	>500						
KP-E	24h	>125	>500	>500						
	48h	>125	>500	>500						
PA	24h	>125	>500	>500						
	48h	>125	>500	>500						

Všechny testované látky vykázaly alespoň slabý účinek na všechny z grampozitivních testovacích kmenů, navíc s minimálním poklesem aktivity během doby inkubace. Nejúspěšnější byla **T6279**, která dosáhla středně silného účinku na G<sup>+</sup> kmeny a jako jediná ze všech vzorků i slabé aktivity u EC, byť pouze po 24 hodinách inkubace.

Tabulka 29: Výsledky testování derivátů 2-(5-karboxypentyl)isochinolinium bromidu; houby

KMEN (kód)		TESTOVANÁ LÁTKA (kód) –MIC/IC <sub>80</sub> IC <sub>50</sub> (μmol.l <sup>-1</sup> )								Součet
		T6183	T6279	T6277						
CA	24h	31,25	7,81	500						13
	48h	125	15,62	500						10
CT	24h	15,62	15,62	62,5						16
	48h	15,62	31,25	125						14
CK	24h	>125	31,25	250						7
	48h	>125	62,5	250						6
CG	24h	15,62	31,25	250						13
	48h	31,25	31,25	250						12
TA	24h	31,25	125	>500						8
	48h	31,25	125	>500						8
AF	24h	125	125	>500						6
	48h	>125	125	>500						3
AC	24h	125	62,5	>500						7
	48h	125	62,5	>500						7
TM	72h	15,62	62,5	500						11
	120h	31,25	62,5	500						10

Testované látky, s výjimkou nejméně účinné **T6277**, byly aktivní v celém spektru kmenů. Nejúspěšnější **T6279**, dosáhla středně silného účinku na rod *Candida* i vláknité houby AC a TM.



## **8. Diskuze**

Pro screening citlivosti mikroorganismů k velkým souborům experimentálně připravených látek v podmínkách naší laboratoře je mikrodiluční bujónová metoda nejvhodnější díky snadnému provedení, nízké materiálové náročnosti a dobré reprodukovatelnosti. Do budoucna by bylo možné zařadit použití vícekanálových nebo automatických systémů zejména při fázi samotné inokulace jednotlivých jamek, která byla z celého procesu přípravy mikrotitrační destičky časově nejnáročnější a hrozilo riziko zanesení chyby vynecháním nebo vícenásobným inokulováním jedné jamky.

Při testování byla nezbytná reprodukovatelnost a porovnatelnost výsledků zajištěna použitím metodiky vycházející z mezinárodně uznávaných a využívaných standardů. Naším základem byly doporučené postupy (DP) CLSI (dokument M27-A3) a EUCAST. Využili jsme je, s jistými obměnami, pro bakterie, kvasinky i vláknité houby. Hustota inokula, obohacení RPMI o 1% glukózy a využití mikrotitračních destiček s plochým dnem pro mikromycety se blíží spíše metodice užívané EUCAST. Naopak vizuální odečet MIC u testovacích kmenů kvasinek je využíván spíše v postupech CLSI. Pro testování antibakteriální aktivity námi použitý postup poměrně dobře koreluje s DP jak CLSI tak i EUCAST. V zájmu sjednocení podmínek jsou i bakteriální a kvasinkové kmeny inkubovány 48 hodin, přestože DP vyžadují pouze 24 hodin. Zároveň nám delší inkubace poskytuje údaje o změnách aktivity v průběhu času. Námi provedené úpravy by neměly mít zásadní vliv na validitu získaných dat, neboť obě metody vykazují navzájem dobrou korelaci (Espinell-Ingroff, A. et al., 2005).

Z testování jsme získali údaje o aktivitě 44 experimentálně připravených látek vůči 16 kmenům bakterií, kvasinek a vláknitých hub. Pro usnadnění vyhodnocování bylo každé dosažené hodnotě MIC přiřazeno bodové hodnocení (viz. Tabulka 30). Umožnilo nám tak pozorovat, které kmeny byly nejcitlivější k působení testovaných látek a také vzájemně porovnat aktivitu jednotlivých skupin.

**Tabulka 30: Rozdělení zjištěných hodnot MIC do skupin a přiřazení bodového hodnocení**

MIC ( $\mu\text{mol.l}^{-1}$ )	500	250	125	62,5	31,25	15,625	7,813	3,906	1,953	0,977	0,488
Body	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
	Slabě účinné			Středně účinné				Silně účinné			

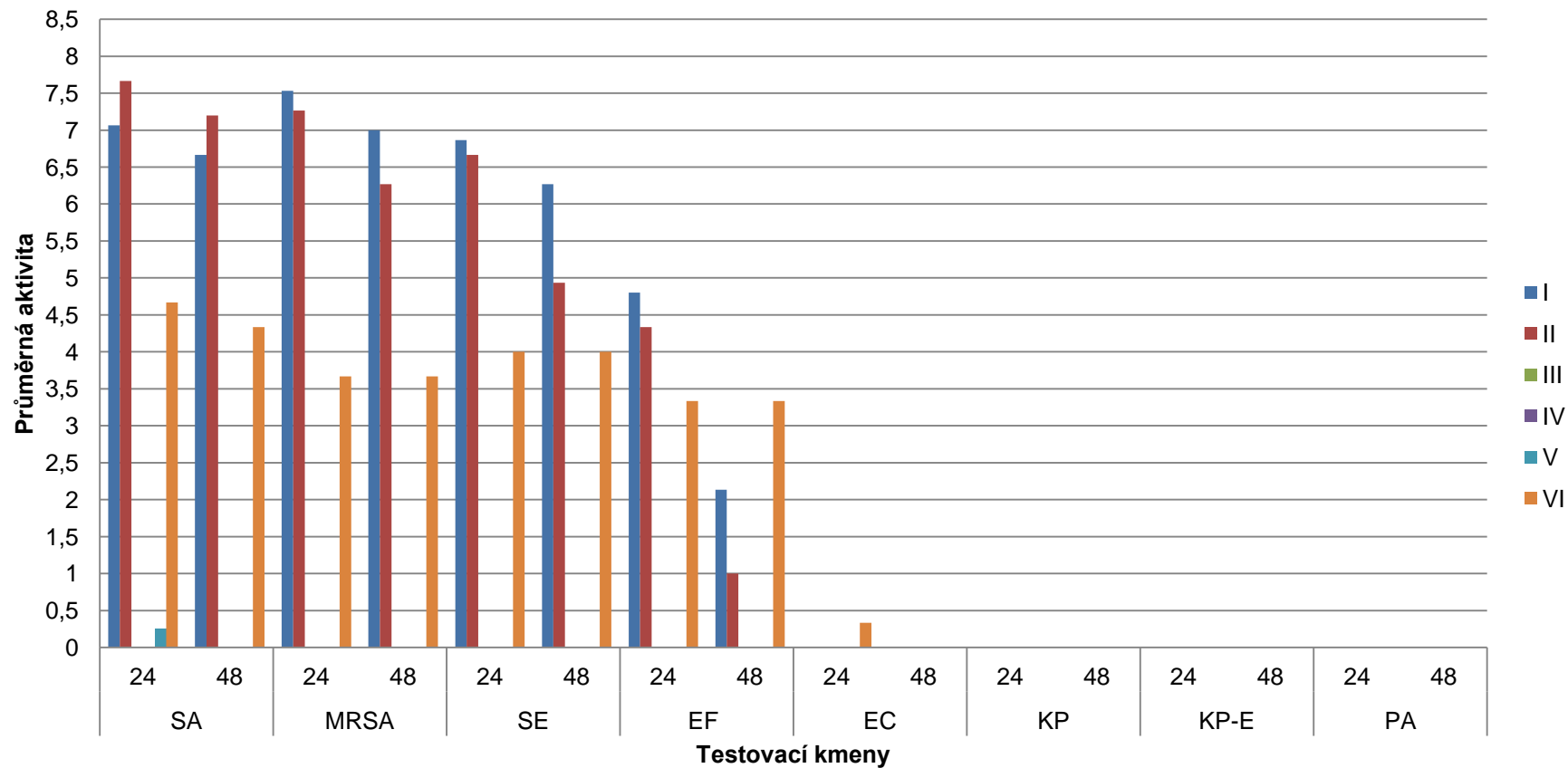
Pro vzájemné porovnávání aktivity mezi skupinami byl celkový součet bodů pro každý kmen vydělen počtem testovaných látek ve skupině. Takto byly zohledněny jak dosažené hodnoty MIC, tak i počet látek. Také jsme rozlišili jednotlivé doby odečtů MIC, aby byl znázorněn i případný pokles aktivity.

V případě bakteriálních kmenů dosáhla nejlepšího účinku z hlediska aktivity skupina **II.** u kmene *S. aureus*. Pokud posuzujeme spektrum účinnosti, byla neúspěšnější skupina **VI.** Ta sice nedosáhla takových výsledků jako ostatní, ale byla neúčinnější na kmen EF a je zajímavé, že v ní docházelo k nejmenšímu poklesu aktivity v průběhu inkubace. Žádná z testovaných látek nedosáhla relevantního účinku na gramnegativní bakterie. Z grampozitivních byly k působení testovaných látek nejcitlivější stafylokoky.

U kmenů kvasinek a vláknitých hub byla neúčinnější skupina **III.** na kmen *A. corymbifera* a kterou jsme vyhodnotili i jako skupinu s nejširším spektrem účinku. Na kvasinky ovšem dosahovala pouze slabé účinnosti, zde byla aktivnější skupina **VI.**, která naopak nedosáhla tak dobrých výsledků u vláknitých hub. Nejodolnějším kmenem byla *Candida krusei*, nejcitlivější k působení zkoušených látek se naopak ukázal *Trichophyton mentagrophytes*. V celkovém pohledu byly látky aktivnější na vláknité houby.

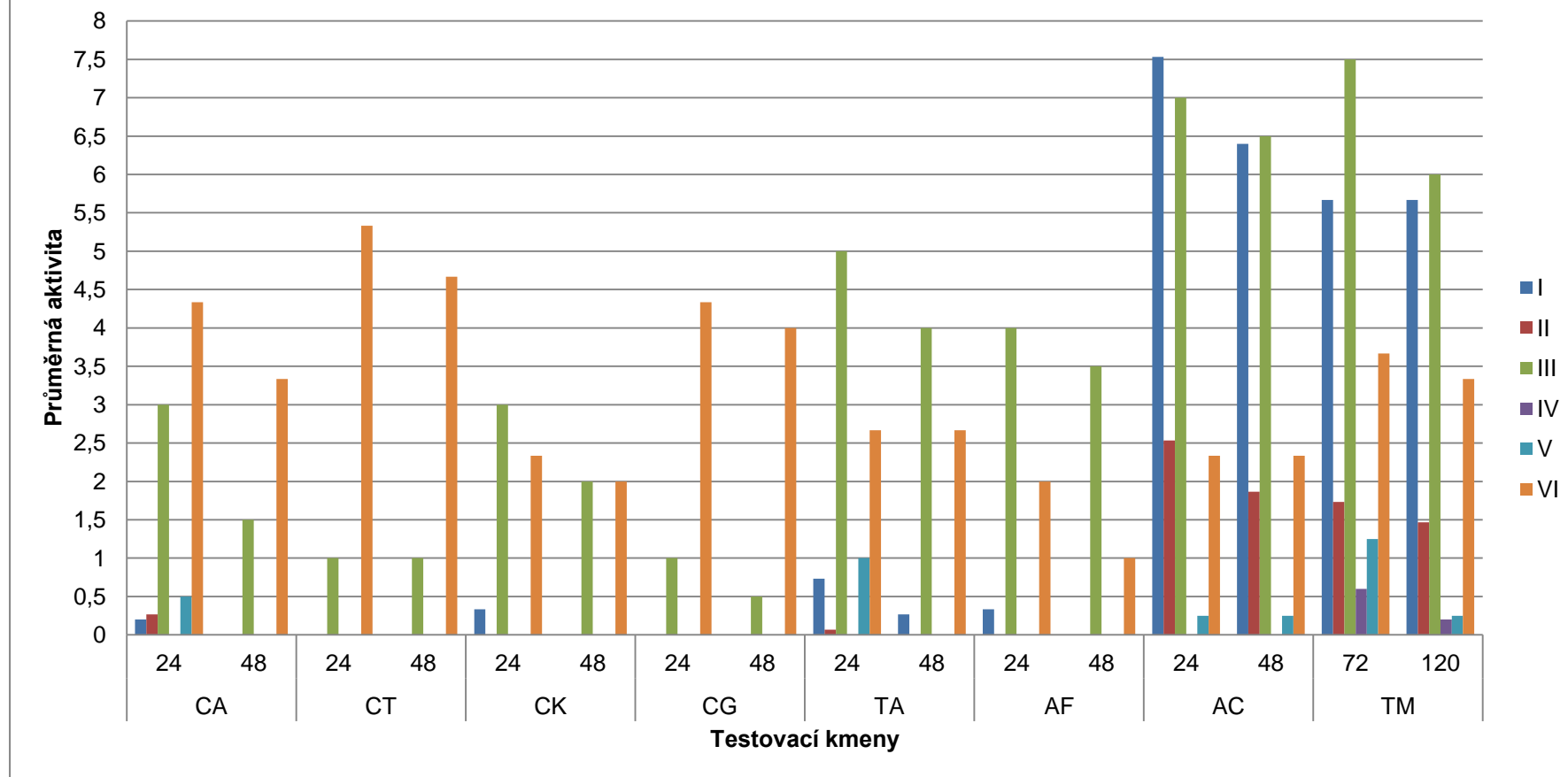
Z hlediska možného využití v klinické praxi je výhodná určitá selektivita účinku testovaných látek. Zde se jeví zajímavě zejména skupina **II.** s relativně vysokou antibakteriální aktivitou omezenou na  $G^+$  kmény a poměrně slabým účinkem na kvasinky a vláknité houby.

## Porovnání aktivity jednotlivých skupin na bakterie



Graf 1: Srovnání antibakteriální aktivity jednotlivých skupin testovaných látek

## Porovnání aktivity jednotlivých skupin na mikromycety



Graf 2: Srovnání antimykotické aktivity jednotlivých skupin testovaných látek

Ve skupině **I.** byly pro bakterie nejúčinnějšími látkami **T6151**, **T6259**, **T6015** a **T6009**. Všechny byly velmi silně aktivní alespoň na jeden z kmenů. První dvě jmenované dokonce i v nejnižší sledované koncentraci. Zde se otevírá prostor pro další zkoumání, zda by jejich aktivita přetrvala i při nižších koncentracích než  $0,488 \mu\text{mol.l}^{-1}$ . První tři látky měly na benzenové části benzoxazinového skeletu navázaný chlor v poloze 6 a jako substituent  $R^2$  butyl. Do tohoto vzorce nám však nezapadá **T6009** s 6-bromem a isopropylem.

Pro mikromycety byly nejúčinnější látky **T6146**, **T6007** a **T6259**, která navíc dosáhla slabého účinku i u kvasinek. Jednoznačně nejlepších výsledků bylo dosaženo u kmene *A. corymbifera*. I v případě mikromycet dosahují látky s navázaným chlorem na benzenové části mírně lepších výsledků než zbytek souboru. Nejméně účinnou látkou byla v obou případech **T6286**, dále **T2688** u bakterií a **T6290** u hub, které nevykázaly aktivitu na žádný testovaný kmen, popř. výrazně slabší než zbytek souboru. V tomto případě je společným znakem methylová skupina navázaná na benzenové části základního skeletu. Jedním z možných směrů do budoucna by mohlo být cílené ověření výše zmíněných doměnek na širším souboru.

Tyto látky byly připraveny za účelem hledání potenciálně účinných antituberkulotik pracovní skupinou prof. Waissera, který se touto problematikou dlouhodobě zabývá. Nejúspěšnější látkou z hlediska antimykobakteriálního působení byla vyhodnocena **T6009** jejíž aktivita byla srovnatelná s isoniazidem, a která dosáhla výborných výsledků i v naší práci. Značná cytotoxicita bohužel limituje možnosti jejího využití v budoucnu (Waisser et al., 2008).

Ve skupině **II.** dosáhly nejlepšího účinku na bakterie látky **T6190**, **T6012** a **T6188**. Všechny tři měly alespoň u jednoho z kmenů MIC  $0.977 \mu\text{mol.l}^{-1}$ . **T6252** kromě dobrého účinku na stafylokoky ukázala i středně silný účinek na *E. faecalis* a byla tak vyhodnocena jako látka s nejširším spektrem ze souboru. Zde se již substituce chlorem na benzenové části benzoxazinového skeletu bezpodmínečně neprojevuje zvýšením účinku, neboť ze 4 nejlépe hodnocených látek jsou chlorované pouze 2, jedna substituovaná fluorem a jedna bromem. Látky **T6289** a **T6244** nevykázaly žádný účinek na žádný z bakteriálních kmenů. Obecně byl celý soubor dobře účinný na stafylokoky, nicméně pouze 4 látky i na EF a většinou velmi slabě.

V případě mikromycet byla zdaleka nejúčinnější **T6148**, která inhibovala růst AC i při koncentraci 0,977  $\mu\text{mol.l}^{-1}$ . Nejlepší spektrum měla **T6188**, díky středně silné aktivitě i na TM. Obě dvě látky mají také navázaný chlor na benzoxazinu. Relevantního účinku na jiné kmeny než AC a TM se nepodařilo dosáhnout a téměř polovina souboru nebyla aktivní vůbec.

(Székelyová, 2012) ve svojí práci testovala několik látek na bázi 1,3-benzoxazin-2,4(H)-dithionu. Žádná neměla halogenovaný benzoxazinový skelet a jejich účinnost je v porovnání s našimi vzorky výrazně nižší. Pouze látka RAM 413 s chlorem navázaným na 3-phenylu dosáhla velmi silného účinku (MIC 3,9  $\mu\text{mol.l}^{-1}$ ) na *S. aureus*. V případě mikromycet se podařilo dosáhnout pouze MIC 62,5  $\mu\text{mol.l}^{-1}$  látce RAM 411u AC, která byla nejcitlivější k působení těchto látek i v naší práci.

Antimykobakteriálně nejúčinnější látkou této skupiny byla, v práci prof. Waissera, vyhodnocena **T6010**, která v naší práci dosáhla v rámci souboru pouze průměrných výsledků. Její cytotoxicita byla bohužel ještě vyšší než u jejího analoga ze skupiny I. (Waisser et al., 2008).

V případě antimykobakteriálně působících látek vede náhrada jedné oxo skupiny thioxo skupinou v molekule 1,3-benzoxazin-2,4-dionu k signifikantnímu zvýšení aktivity (Waisser et al., 2010), náhrada druhé thioxo skupiny aktivitu zvyšuje pouze nepatrně (Petrliková et al., 2011a). Při vzájemném srovnání skupin I. a II. lze pozorovat v grafu 1 u všech kmenů bakterií (vyjma SA) mírné snížení aktivity. V případě mikromycet, viz graf 2, je pokles mnohem výraznější, na téměř třetinovou hodnotu. V našem případě tedy zavedení další thioxo skupiny vedlo ke snížení aktivity. Zajímavé by bylo porovnání aktivity našich látek s jejich analogy s 1,3-benzoxazin-2,4-dionem jako základem molekuly. Podobné látky, s benzylem místo phenylu v poloze 3, byly sice připraveny, bohužel nejsou údaje o jejich aktivitě vůči bakteriím nebo mikromycetám (Waisser et al., 2003a).

Skupina **III.** obsahovala pouze 2 látky, které byly navíc testovány pouze na kmenech mikromycet. Obě byly aktivní v celém spektru kmenů. Lze pozorovat celkově vyšší hodnoty MIC u kvasinek, zejména *C. glabrata* se ukázala být velice odolnou. Lepších výsledků látky dosáhly u vláknitých hub, nejméně citlivým byl *A. fumigatus*. Ve struktuře je patrná silná substituce

chlorem u **T5623**, která sice na kvasinky dosáhla velmi podobných výsledků jako **T5611**, ale u vláknitých hub došlo k výraznému zvýšení aktivity u AF a TM.

Velký soubor látek na bázi N-benzylsalicylthioamidu připravila (Petrlíková et al., 2010a) a byla testována jejich aktivita na bakteriální kmeny. Všechny dosáhly účinku srovnatelného s molekulami užívanými v klinické praxi a který byl omezen pouze na grampozitivní kmeny. Naše dvě látky zahrnuté nebyly a tak lze o jejich antibiotickém účinku pouze spekulovat. Bylo zjištěno, že substituce halogenem na benzylu vedla ke zvýšení aktivity. Nejlepších výsledků dosáhl 5-brom-N-(4'-brombenzyl)salicylthioamid (Petrlíková et al., 2010a). Dá se tedy předpokládat, že vyšší aktivitu u bakterií by vykazala **T5623**.

Naše dvě látky doplňují rozsáhlý soubor, který otestovala (Petrlíková et al., 2010b) na antimykotickou aktivitu. Také v tomto případě byl mezi nejúspěšnějšími látkami 5-brom-N-(4'-brombenzyl)salicylthioamid s hodnotami MIC mezi 0.98 - 31.25  $\mu\text{mol.l}^{-1}$  v celém spektru testovacích kmenů. Naše testovaná **T5623** má na rozdíl od ostatních látek souboru dvojitou substituci halogenem na benzenovém jádře v salicylové části molekuly a její aktivita nedosahuje nejúspěšnějších látek. Lze se tedy domnívat, že pouze jeden halogenový substituent je z hlediska účinku optimální, ale je třeba tuto hypotézu ověřit.

Také tuto skupinu intenzivně zkoumal (Doležal et al., 2009) z hlediska potenciálně antimykobakteriálního účinku. Obě námi testované látky nicméně dosáhly pouze průměrného výsledku.

Skupina **IV.** je další z derivátů k. salicylové, jejichž aktivita byla testována v rámci naší práce. Žádná z látek nedokázala potlačit růst bakterií ani v nejvyšší sledované koncentraci. Vyjma velmi slabé aktivity látek **T6262**, **T6271** u TM nebyla pozorována inhibice růstu ani u mikromycet. Obě látky měly v pozici 3 na benzenu v salicylové části molekuly navázaný methyl, popř. metoxyl. Bylo by třeba otestovat širší soubor látek na potvrzení této hypotézy.

Také (Waisser et al., 2012) při hledání nových antituberkulotik na bázi phenylsalicylátu vyhodnotil jako nejúspěšnější látku **T6262**. Byla mj. testována antimykotická aktivita souboru látek na bázi salicylanilidů vzniklých záměnou hydroxyskupiny na karboxylu za aminoskupinu. Jejich účinnost byla výrazně lepší zejména na dermatofyty. Nejúspěšnější látky dosáhly MIC 3,91  $\mu\text{mol.l}^{-1}$  a

v obou případech byla salicylová část molekuly substituována alespoň dvěma atomy halogenu. V případě kvasinek nedošlo k takto markantnímu zvýšení účinnosti, vyjma dvou výše zmíněných vzorků byla MIC snížena nejvýše o dvě ředění (Waisser et al., 2003b). V budoucnu by bylo zajímavé otestovat tyto dvě skupiny i na bakteriálních kmenech a zjistit, zda by došlo ke zvýšení aktivity v případě salicylanilidů.

Skupina **V.** se ukázala naprostou neúčinnou na bakteriální kmeny. V případě mikromycet si jediné **T6235** dokázala uchovat aktivitu po celou sledovanou dobu inkubace u AC a TM, nicméně MIC byla pouze  $500 \mu\text{mol.l}^{-1}$ .

(Petrliková et al., 2011b) ve svojí práci zjistila, že substituce halogenem na benzylu vede ke zvýšení antimykobakteriální aktivity. Náš výsledek s touto hypotézou nekoreluje, nicméně testovaný soubor je příliš malý. Do budoucna by bylo nutné jej rozšířit a zahrnout analogicky substituované látky salicylaldehydů i benzaldehydů pro vzájemné srovnání účinnosti. Soubor látek, který testovala (Cardia et al., 2000) měl benzaldehydovou část molekuly nahrazenou vícečetným cykloalkylidem. Také tyto vzorky vykázaly téměř nulovou antimykotickou aktivitu, nicméně v případě bakterií byla naměřena vysoce selektivní účinnost vůči *Streptococcus agalactiae*, který nepatří mezi naše testovací kmeny.

Skupina **VI.** vykázala slabý až střední účinek na grampozitivní kmeny. Nejnižších hodnot MIC dosáhla **T6279** u *S. aureus*, ale i u zbytku kmenů výrazně překonala ostatní látky. Vyjma slabého účinku na EC po 24 hodinách inkubace se žádné z látek nepodařilo inhibovat růst gramnegativních kmenů. Z bakterií byl nejcitlivějším kmenem právě SA.

V případě mikromycet byla také nejúčinnější **T6279**, nejnižší MIC  $15,62 \mu\text{mol}^{-1}$  dosáhla u *C. albicans*. **T6277** byla pouze slabě účinná, nicméně její účinnost byla selektivní na kvasinky. K působení látek této skupiny byla nejvíce citlivá *C. tropicalis*.

Z hlediska struktury je skupina **VI.** poněkud heterogenní. Jednu část molekuly tvoří isochinolin (u **T6277** pyridin), druhá část sestává z alifatického kruhu: pro látky **T6279** a **T6277** je to 1,7,7-trimethylbicyklo[2.2.1]heptan, pro **T6183** a **T6272** cholestan s dvojnou vazbou mezi C10 a C11. Obě části jsou spojeny karboxypentylovým řetězcem. Pouze v případě **T6272** tento řetězec



obsahuje 13 uhlíků, což je patrně důvod špatné rozpustnosti látky v testovacích médiích. Z hlediska účinnosti se jeví, na základě výsledků látky **T6279**, optimální kombinace isochinolinium bromidu a 1,7,7-trimethylbicyklo[2.2.1]heptanového kruhu. Obě látky s isochinolinem jsou účinnější než jedna zbývající s pyridiniem. Z takto malého souboru však nelze vyvozovat vztahy mezi strukturou a aktivitou.

Námi testovaná skupina **VI.** doplňuje soubor velmi podobných látek, který zkoumala (Székelyová, 2012). Heterocyklická část molekuly je tvořena isochinolinem, popř. pyridinem s methylovou substitucí. Alkoholickou část esteru tvoří široká škála substituentů: 1,7,7-trimethylbicyklo[2.2.1]heptan, menthol, geraniol a kondenzovaný 5-ti četný cyklus podobný steroidům. Jejich aktivita se přibližně podobá našim látkám skupiny **IV.** Nejnižších MIC na  $G^+$  bakterie dosáhla látka s isochinolinem a steroidní alkoholickou částí. Výrazným rozdílem je aktivita některých látek i na  $G^-$  bakterie, které se v našem souboru nepodařilo dosáhnout, bohužel neoplývají žádným společným strukturním znakem, který by se dal v budoucnu sledovat. Antimykotická aktivita, stejně jako v naší skupině, koreluje do značné míry s účinností na bakterie.

Látku **T6279** by bylo vhodné otestovat alespoň v tripletu pro potvrzení její aktivity. Jako jeden ze směrů budoucího výzkumu by bylo možné sledovat vliv délky spojovacího řetězce na aktivitu.

Cílem této práce je zejména screening potenciální antimikrobiální a antimykotické aktivity chemických látek připravených primárně za jiným účelem. Podařilo se nám najít několik skupin s vysokou antibakteriální i antimykotickou aktivitou a naznačit možné směry pro další vývoj. Námi získané výsledky je třeba chápat v první řadě jako orientační a vyžadující potvrzení provedením dalších testů. Umožňují však nasměrovat pozornost ke konkrétním perspektivním skupinám, popř. konkrétním látkám. V této fázi se lze jen dohadovat o tom, zda se některé podaří najít cestu ke klinickému využití.

## 9. Závěr

- Pomocí mikrodiluční bujónové metody jsme otestovali 49 látek na osmi kmenech bakterií a osmi kmenech mikromycet. Látky byly rozděleny podle společných strukturních znaků do šesti skupin.
- Pro bakteriální kmeny vykazala nejvyšší aktivitu skupina derivátů 3-phenyl-2H-1,3-benzoxazin-2,4(3H)-dithionu u *Staphylococcus aureus*.
- Pro mikromycety byly nejaktivnější deriváty N-benzylsalicylthioamidu u *Absidia corymbifera*.
- Nejširší spektrum účinku na bakterie měla skupina derivátů phenylsalicylátu, pro mikromycety to byly deriváty N-benzylsalicylthioamidu.
- Náhrada oxo skupiny thioxo skupinou v molekule 3-phenyl-4-thioxo-3,4-2H-1,3-benzoxazin-2-onu vedla, vyjma *S.aureus*, ke snížení aktivity.
- Substituce vodíku halogenem v molekule 1,3-benzoxazinu vedla ke zvýšení aktivity.

## **10. Seznam obrázků, grafů a tabulek**

Obrázek 1: Staphylococcus epidermidis, shluky bakterií v klinickém materiálu

Obrázek 2: Escherichia coli

Obrázek 3: Candida albicans

Obrázek 4: Absidia corymbifera

Obrázek 5: Trichophyton mentagrophytes

Obrázek 6: Příklad provedení E-testu

Graf 1: Srovnání antibakteriální aktivity jednotlivých skupin testovaných látek

Graf 2: Srovnání antimykotické aktivity jednotlivých skupin testovaných látek

Tabulka 1: Srovnání metodik mikrodiluční bujónové metody dle EUCAST

Tabulka 2: Přehled penicilinových ATB a jejich spektra účinku

Tabulka 3: Přehled vybraných zástupců cefalosporinů a jejich spektra účinek

Tabulka 4: Přehled vybraných zástupců chinolonů a jejich spektra účinku

Tabulka 5: Vybraní zástupci makrolidů, jejich vlastnosti a použití

Tabulka 6: Vybraní zástupci aminoglykosidů

Tabulka 7: Vybraní zástupci azolových ATM a jejich použití

Tabulka 8: Složení média RPMI-1640 SEVAC 5x koncentrovaného

Tabulka 9: Strukturní vzorce derivátů 3-phenyl-4-thioxo-3,4-dihydro-2H-1,3-benzoxazin-2-onu

Tabulka 10: Výsledky testování derivátů 3-phenyl-4-thioxo-3,4-dihydro-2H-1,3-benzoxazin-2-onu; bakterie - 1. část

Tabulka 11: Výsledky testování derivátů 3-phenyl-4-thioxo-3,4-dihydro-2H-1,3-benzoxazin-2-onu; bakterie - 2. část

Tabulka 12: Výsledky testování derivátů 3-phenyl-4-thioxo-3,4-dihydro-2H-1,3-benzoxazin-2-onu; houby - 1. část

Tabulka 13: Výsledky testování derivátů 3-phenyl-4-thioxo-3,4-dihydro-2H-1,3-benzoxazin-2-onu; houby - 2. část

Tabulka 14: Strukturní vzorce derivátů 3-phenyl-2H-1,3-benzoxazin-2,4(3H)-dithionu

- Tabulka 15: Výsledky testování derivátů 3-phenyl-2H-1,3-benzoxazin-2,4(3H)-dithionu; bakterie - 1. část
- Tabulka 16: Výsledky testování derivátů 3-phenyl-2H-1,3-benzoxazin-2,4(3H)-dithionu; bakterie - 2. část
- Tabulka 17: Výsledky testování derivátů 3-phenyl-2H-1,3-benzoxazin-2,4(3H)-dithionu; houby - 1. část
- Tabulka 18: Výsledky testování derivátů 3-phenyl-2H-1,3-benzoxazin-2,4(3H)-dithionu; houby - 2. část
- Tabulka 19: Strukturní vzorce derivátů N-benzylsalicylthioamidu
- Tabulka 20: Výsledky testování derivátů N-benzylsalicylthioamidu; houby
- Tabulka 21: Strukturní vzorce derivátů phenylsalicylátu
- Tabulka 22: Výsledky testování derivátů phenylsalicylátu; bakterie
- Tabulka 23: Výsledky testování derivátů phenylsalicylátu; houby
- Tabulka 24: Strukturní vzorce derivátů benzyl-N'-(phenylmethylen)hydrazonothiokarbamátu
- Tabulka 25: Výsledky testování derivátů benzyl-N'-(phenylmethylen)hydrazonothiokarbamátu; bakterie
- Tabulka 26: Výsledky testování derivátů benzyl-N'-(phenylmethylen)hydrazonothiokarbamátu; houby
- Tabulka 27: Strukturní vzorce derivátů 2-(5-karboxypentyl)isochinolinium bromidu
- Tabulka 28: Výsledky testování derivátů 2-(5-karboxypentyl)isochinolinium bromidu; bakterie
- Tabulka 29: Výsledky testování derivátů 2-(5-karboxypentyl)isochinolinium bromidu; houby
- Tabulka 30: Rozdělení zjištěných hodnot MIC do skupin a přiřazení bodového hodnocení

## 11. Literatura

1. ABBOT, S. L. Klebsiella, Enterobacter, Citrobacter, Serratia, Plesiomonas, and Other Enterobacteriaceae. In *Manual of Clinical Microbiology*, 9th Edition. Washington, DC, USA: ASM Press, 2007. vol. 1, ch. 45, s. 698-715.
2. ALIBERT-FRANCO, S., PRADINES, B., MAHAMOUD, A., et al. Efflux mechanism, an attractive target to combat multidrug resistant Plasmodium falciparum and Pseudomonas aeruginosa. *Curr Med Chem*. 2009, vol. 16, no. 3, s.301-17. 0929-8673 (Print) 0929-8673 (Linking)
3. ALVAREZ-ORTEGA, C., WIEGAND, I., OLIVARES, J., et al. The intrinsic resistome of Pseudomonas aeruginosa to beta-lactams. *Virulence*. 2011, vol. 2, no. 2, s.144-6. 2150-5608 (Electronic) 2150-5594 (Linking)
4. ARTHUR, M., REYNOLDS, P. a COURVALIN, P. Glycopeptide resistance in enterococci. *Trends In Microbiology*. 1996, vol. 4, no. 10, s.401-407. 0966-842X
5. BAILEY, J. K., PINYON, J. L., ANANTHAM, S., et al. Commensal Escherichia coli of healthy humans: a reservoir for antibiotic-resistance determinants. *J Med Microbiol*. 2010, vol. 59, no. Pt 11, s.1331-9. 1473-5644 (Electronic) 0022-2615 (Linking)
6. BARBER, M. Methicillin-resistant staphylococci. *J Clin Pathol*. 1961, vol. 14, no. s.385-93. 0021-9746 (Print) 0021-9746 (Linking)
7. BEDNÁŘ, M., FRAŇKOVÁ, V., SCHINDLER, J., et al. *Lékařská mikrobiologie*. 1.vydání. Praha: Marvil, 1996. 558 s.
8. BLOEMENDAAL, A. L. A., BROUWER, E. C. a FLUIT, A. C. Methicillin resistance transfer from Staphylococcus epidermidis to methicillin-susceptible Staphylococcus aureus in a patient during antibiotic therapy. *Plos One*. 2010, vol. 5, no. 7, s.e11841-e11841. 1932-6203
9. BODI, M. a GARNACHO, J. Pseudomonas aeruginosa: combined treatment vs. monotherapy. *Med Intensiva*. 2007, vol. 31, no. 2, s.83-7. 0210-5691 (Print) 0210-5691 (Linking)
10. BONNET, R. Growing group of extended-spectrum beta-lactamases: the CTX-M enzymes. *Antimicrob Agents Chemother*. 2004, vol. 48, no. 1, s.1-14. 0066-4804 (Print) 0066-4804 (Linking)
11. BRIALES, A., RODRIGUEZ-MARTINEZ, J. M., VELASCO, C., et al. In vitro effect of qnrA1, qnrB1, and qnrS1 genes on fluoroquinolone activity against isogenic Escherichia coli isolates with mutations in gyrA and parC. *Antimicrob Agents Chemother*. 2011, vol. 55, no. 3, s.1266-9. 1098-6596 (Electronic) 0066-4804 (Linking)

12. CALDERONE, R. A. a CLANCY, C. J. *Candida and Candidiasis*. 2nd Edition. Washington, DC, USA: ASM Press, 2011. 9781555817176
13. CARDIA, M. C., BEGALA, M., DELOGU, A., et al. Synthesis and antimicrobial activity of novel arylideneisothiosemicarbazones. *Il Farmaco*. 2000, vol. 55, no. 2, s.93-98. 0014-827X
14. CDC Vancomycin-resistant Staphylococcus aureus--Pennsylvania, 2002. *MMWR. Morbidity And Mortality Weekly Report*. 2002, vol. 51, no. 40, s.902-902. 0149-2195
15. COURVALIN, P. Vancomycin Resistance in Gram-Positive Cocci. *Clinical Infectious Diseases*. 2006, vol. 42, no. Supplement 1, s.S25-S34.
16. DA SILVA, G. J. a MENDONCA, N. Association between antimicrobial resistance and virulence in Escherichia coli. *Virulence*. 2012, vol. 3, no. 1, s.1-11. 21505594
17. DI BONAVENTURA, G., POMPILIO, A., PICCIANI, C., et al. Biofilm formation by the emerging fungal pathogen Trichosporon asahii: development, architecture, and antifungal resistance. *Antimicrob Agents Chemother*. 2006, vol. 50, no. 10, s.3269-76. 0066-4804 (Print) 0066-4804 (Linking)
18. DIEKEMA, D. J., PFALLER, M. A., SCHMITZ, F. J., et al. Survey of infections due to Staphylococcus species: frequency of occurrence and antimicrobial susceptibility of isolates collected in the United States, Canada, Latin America, Europe, and the Western Pacific region for the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 1997-1999. *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication Of The Infectious Diseases Society Of America*. 2001, vol. 32 Suppl 2, no. s.S114-S132. 1058-4838
19. DISMUKES, W. E., PAPPAS, P. G. a SOBEL, J. D. *Clinical Mycology*. Cary, NC, USA: Oxford University Press, 2003. 9780195148091, 9781423745808
20. DOLEŽAL, R., WAISSER, K., PETRLÍKOVÁ, E., et al. N-benzylsalicylthioamides: highly active potential antituberculotics. *Arch Pharm (Weinheim)*. 2009, vol. 342, no. 2, s.113-9. 1521-4184 (Electronic) 0365-6233 (Linking)
21. ELIOPOULOS, G. M. a HUOVINEN, P. Resistance to Trimethoprim-Sulfamethoxazole. *Clinical Infectious Diseases*. 2001, vol. 32, no. 11, s.1608-1614.
22. ESPINEL-INGROFF, A. Mechanisms of resistance to antifungal agents: yeasts and filamentous fungi. *Rev Iberoam Micol*. 2008, vol. 25, no. 2, s.101-6. 1130-1406 (Print) 1130-1406 (Linking)
23. ESPINEL-INGROFF, A., BARCHIESI, F., CUENCA-ESTRELLA, M., et al. International and multicenter comparison of EUCAST and CLSI M27-A2

broth microdilution methods for testing susceptibilities of *Candida* spp. to fluconazole, itraconazole, posaconazole, and voriconazole. *J Clin Microbiol.* 2005, vol. 43, no. 8, s.3884-9. 0095-1137 (Print) 0095-1137 (Linking)

24. ESPINEL-INGROFF, A. V. a PFALLER, M. A. Susceptibility Test Methods: Yeasts and Filamentous Fungi. In *Manual of Clinical Microbiology*, 9th Edition. Washington, DC, USA: ASM Press, 2007. vol. 2, ch. 131, s. 1972-1986.
25. FLAMM, R. K., FARRELL, D. J., MENDES, R. E., et al. LEADER Surveillance program results for 2010: an activity and spectrum analysis of linezolid using 6801 clinical isolates from the United States (61 medical centers). *Diagnostic Microbiology & Infectious Disease.* 2012, vol. 74, no. 1, s.54-61. 07328893
26. FLUME, P. A., O'SULLIVAN, B. P., ROBINSON, K. A., et al. Cystic fibrosis pulmonary guidelines: chronic medications for maintenance of lung health. *Am J Respir Crit Care Med.* 2007, vol. 176, no. 10, s.957-69. 1535-4970 (Electronic) 1073-449X (Linking)
27. FRAGNER, P. *Určování kvasinek z lidského organismu.* 1. vydání. Praha: Academia, 1992. 84 80-200-001-9
28. GOKCE, G., CERIKCIOGLU, N. a YAGCI, A. Acid proteinase, phospholipase, and biofilm production of *Candida* species isolated from blood cultures. *Mycopathologia.* 2007, vol. 164, no. 6, s.265-269. 0301-486X
29. GOLD, H. S. Vancomycin-Resistant Enterococci: Mechanisms and Clinical Observations. *Clinical Infectious Diseases.* 2001, vol. 33, no. 2, s.210. 10584838
30. GOMES, F., TEIXEIRA, P., CERI, H., et al. Evaluation of antimicrobial activity of certain combinations of antibiotics against in vitro *Staphylococcus epidermidis* biofilms. *The Indian Journal Of Medical Research.* 2012, vol. 135, no. 4, s.542-547. 0971-5916
31. GOMEZ, M. I., O'SEAGHDHA, M., MAGARGEE, M., et al. *Staphylococcus aureus* protein A activates TNFR1 signaling through conserved IgG binding domains. *J Biol Chem.* 2006, vol. 281, no. 29, s.20190-6. 0021-9258 (Print) 0021-9258 (Linking)
32. HALL, R. M. a COLLIS, C. M. Mobile gene cassettes and integrons: capture and spread of genes by site-specific recombination. *Mol Microbiol.* 1995, vol. 15, no. 4, s.593-600. 0950-382X (Print) 0950-382X (Linking)
33. HAZEN, K. C. a HOWELL, S. A. *Candida*, *Cryptococcus*, and Other Yeasts of Medical Importance. In *Manual of Clinical Microbiology*, 9th Edition. Washington, DC, USA: ASM Press, 2007. vol. 2, ch. 19, s. 1762-1788.

34. HELLMARK, B., UNEMO, M., NILSDOTTER-AUGUSTINSSON, A., et al. Antibiotic susceptibility among *Staphylococcus epidermidis* isolated from prosthetic joint infections with special focus on rifampicin and variability of the *rpoB* gene. *Clinical Microbiology And Infection: The Official Publication Of The European Society Of Clinical Microbiology And Infectious Diseases*. 2009, vol. 15, no. 3, s.238-244. 1469-0691
35. HIRAMATSU, K., ARITAKA, N., HANAKI, H., et al. Dissemination in Japanese hospitals of strains of *Staphylococcus aureus* heterogeneously resistant to vancomycin. *Lancet*. 1997, vol. 350, no. 9092, s.1670-3. 0140-6736 (Print) 0140-6736 (Linking)
36. HOBAN, D. J., NICOLLE, L. E., HAWSER, S., et al. Antimicrobial susceptibility of global inpatient urinary tract isolates of *Escherichia coli*: results from the Study for Monitoring Antimicrobial Resistance Trends (SMART) program: 2009-2010. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2011, vol. 70, no. 4, s.507-11. 1879-0070 (Electronic) 0732-8893 (Linking)
37. HOLLENBECK, B. L. a RICE, L. B. Intrinsic and acquired resistance mechanisms in enterococcus. *Virulence*. 2012, vol. 3, no. 5, s.421-433. 21505594
38. HOOPER, D. C. Emerging mechanisms of fluoroquinolone resistance. *Emerg Infect Dis*. 2001, vol. 7, no. 2, s.337-41. 1080-6040 (Print) 1080-6040 (Linking)
39. HORN, D. L., NEOFYTOS, D., ANAISSIE, E. J., et al. Epidemiology and outcomes of candidemia in 2019 patients: data from the prospective antifungal therapy alliance registry. *Clin Infect Dis*. 2009, vol. 48, no. 12, s.1695-703. 1537-6591 (Electronic) 1058-4838 (Linking)
40. HURLEY, M. N., CAMARA, M. a SMYTH, A. R. Novel approaches to the treatment of *Pseudomonas aeruginosa* infections in cystic fibrosis. *Eur Respir J*. 2012, vol. 40, no. 4, s.1014-23. 1399-3003 (Electronic) 0903-1936 (Linking)
41. CHAGAS-NETO, T. C., CHAVES, G. M. a COLOMBO, A. L. Update on the genus *Trichosporon*. *Mycopathologia*. 2008, vol. 166, no. 3, s.121-32. 0301-486X (Print) 0301-486X (Linking)
42. CHAGAS-NETO, T. C., CHAVES, G. M., MELO, A. S. A., et al. Bloodstream Infections Due to *Trichosporon* spp.: Species Distribution, *Trichosporon asahii* Genotypes Determined on the Basis of Ribosomal DNA Intergenic Spacer 1 Sequencing, and Antifungal Susceptibility Testing. *Journal of Clinical Microbiology*. 2009, vol. 47, no. 4, s.1074-1081.
43. CHEN, HON, P. Y. a HSU, L. Y. Ceftaroline-An Anti-MRSA Cephalosporin and Its Implications for Singapore. *Ann Acad Med Singapore*. 2014, vol. 43, no. 3, s.177-86. 0304-4602 (Print), 0304-4602 (Linking)



44. CHEN, S. C. a SORRELL, T. C. Antifungal agents. *Med J Aust.* 2007, vol. 187, no. 7, s.404-9. 0025-729X (Print) 0025-729X (Linking)
45. CHENOWETH, C. E., ROBINSON, K. A. a SCHABERG, D. R. Efficacy of ampicillin versus trimethoprim-sulfamethoxazole in a mouse model of lethal enterococcal peritonitis. *Antimicrobial Agents And Chemotherapy.* 1990, vol. 34, no. 9, s.1800-1802. 0066-4804
46. ITO, T., OKUMA, K., MA, X. X., et al. Insights on antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* from its whole genome: genomic island SCC. *Drug Resist Updat.* 2003, vol. 6, no. 1, s.41-52. 1368-7646 (Print) 1368-7646 (Linking)
47. JÍLEK, P., BUCHTA, V., KUBANOVÁ, P., et al. *Úvod do mikrobiologických vyšetřovacích metod ve zdravotnictví.* 1. vydání. Praha: Karolinum, 2002. 104 s. 80-246-0459-0
48. JORGENSEN, J. H. a TURNIDGE, J. D. Susceptibility Test Methods: Dilution and Disk Diffusion Methods. In *Manual of Clinical Microbiology (9th Edition)*, Washington, DC, USA: ASM Press, 2007.
49. KARASHIMA, R., YAMAKAMI, Y., YAMAGATA, E., et al. Increased release of glucuronoxylomannan antigen and induced phenotypic changes in *Trichosporon asahii* by repeated passage in mice. *J Med Microbiol.* 2002, vol. 51, no. 5, s.423-32. 0022-2615 (Print) 0022-2615 (Linking)
50. KATAYAMA, Y., ITO, T. a HIRAMATSU, K. A new class of genetic element, staphylococcus cassette chromosome mec, encodes methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2000, vol. 44, no. 6, s.1549-55. 0066-4804 (Print) 0066-4804 (Linking)
51. KAYSER, F. H., BIENZ, K. A., ECKERT, J., et al. *Medical Microbiology.* 10th German Edition. Stuttgart: Thieme, 2005. 698 3-13-131991-7
52. KLIEBE, C., NIES, B. A., MEYER, J. F., et al. Evolution of plasmid-coded resistance to broad-spectrum cephalosporins. *Antimicrob Agents Chemother.* 1985, vol. 28, no. 2, s.302-7. 0066-4804 (Print) 0066-4804 (Linking)
53. KOCIANOVA, S., CUONG, V., YUFENG, Y., et al. Key role of poly- $\gamma$ -DL-glutamic acid in immune evasion and virulence of *Staphylococcus epidermidis*. *Journal of Clinical Investigation.* 2005, vol. 115, no. 3, s.688-694. 00219738
54. KOLENDI, C. L. *Methicillin-resistant Staphylococcus Aureus (MRSA) : Etiology, At-risk Populations and Treatment.* Nova Science Publishers, 2010. 9781607413981, 9781614702436
55. KOTHAVADE, R. J., KURA, M. M., VALAND, A. G., et al. *Candida tropicalis*: its prevalence, pathogenicity and increasing resistance to

- fluconazole. *J Med Microbiol.* 2010, vol. 59, no. Pt 8, s.873-80. 1473-5644 (Electronic) 0022-2615 (Linking)
56. KUMARASAMY, K. K., TOLEMAN, M. A., WALSH, T. R., et al. Emergence of a new antibiotic resistance mechanism in India, Pakistan, and the UK: a molecular, biological, and epidemiological study. *Lancet Infect Dis.* 2010, vol. 10, no. 9, s.597-602. 1474-4457 (Electronic) 1473-3099 (Linking)
57. LADHANI, S., JOANNOU, C. L., LOCHRIE, D. P., et al. Clinical, microbial, and biochemical aspects of the exfoliative toxins causing staphylococcal scalded-skin syndrome. *Clin Microbiol Rev.* 1999, vol. 12, no. 2, s.224-42. 0893-8512 (Print) 0893-8512 (Linking)
58. LECLERCQ, R. Mechanisms of resistance to macrolides and lincosamides: nature of the resistance elements and their clinical implications. *Clin Infect Dis.* 2002, vol. 34, no. 4, s.482-92. 1537-6591 (Electronic) 1058-4838 (Linking)
59. LINCOVÁ, D. a FARGHALLI, H. *Základní a aplikovaná farmakologie*. Druhé, doplněné a přepracované vydání. Praha: Galén, 2007. 672 s. 978-80-7262-373-0
60. LISTER, P. D., WOLTER, D. J. a HANSON, N. D. Antibacterial-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: clinical impact and complex regulation of chromosomally encoded resistance mechanisms. *Clin Microbiol Rev.* 2009, vol. 22, no. 4, s.582-610. 1098-6618 (Electronic) 0893-8512 (Linking)
61. LIVERMORE, D. M. Current epidemiology and growing resistance of gram-negative pathogens. *Korean J Intern Med.* 2012, vol. 27, no. 2, s.128-42. 2005-6648 (Electronic) 1226-3303 (Linking)
62. LÜLLMANN, H., MOHR, K. a WEHLING, M. *Farmakologie a toxikologie*. 2. české vydání. Praha: Grada Publishing a.s., 2004. 728 s. 80-247-0836-1
63. MAH, T. F. a O'TOOLE, G. A. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. *Trends In Microbiology.* 2001, vol. 9, no. 1, s.34-39. 0966-842X
64. MATTSSON, E., HERWALD, H., BJORCK, L., et al. Peptidoglycan from *Staphylococcus aureus* induces tissue factor expression and procoagulant activity in human monocytes. *Infect Immun.* 2002, vol. 70, no. 6, s.3033-9. 0019-9567 (Print) 0019-9567 (Linking)
65. MAYR, A. a LASS-FLORL, C. Epidemiology and antifungal resistance in invasive Aspergillosis according to primary disease: review of the literature. *Eur J Med Res.* 2011, vol. 16, no. 4, s.153-7. 0949-2321 (Print) 0949-2321 (Linking)
66. MCCOY, K. S., QUITTNER, A. L., OERMANN, C. M., et al. Inhaled aztreonam lysine for chronic airway *Pseudomonas aeruginosa* in cystic

fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 2008, vol. 178, no. 9, s.921-8. 1535-4970 (Electronic) 1073-449X (Linking)

67. MESSER, S. A., JONES, R. N., MOET, G. J., et al. Potency of anidulafungin compared to nine other antifungal agents tested against *Candida* spp., *Cryptococcus* spp., and *Aspergillus* spp.: results from the global SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (2008). *J Clin Microbiol.* 2010, vol. 48, no. 8, s.2984-7. 1098-660X (Electronic) 0095-1137 (Linking)
68. MESSER, S. A., MOET, G. J., KIRBY, J. T., et al. Activity of contemporary antifungal agents, including the novel echinocandin anidulafungin, tested against *Candida* spp., *Cryptococcus* spp., and *Aspergillus* spp.: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (2006 to 2007). *J Clin Microbiol.* 2009, vol. 47, no. 6, s.1942-6. 1098-660X (Electronic) 0095-1137 (Linking)
69. MICEK, S. T., WELCH, E. C., KHAN, J., et al. Empiric combination antibiotic therapy is associated with improved outcome against sepsis due to Gram-negative bacteria: a retrospective analysis. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010, vol. 54, no. 5, s.1742-8. 1098-6596 (Electronic) 0066-4804 (Linking)
70. MIDDELHOVEN, W. J., SCORZETTI, G. a FELL, J. W. Systematics of the anamorphic basidiomycetous yeast genus *Trichosporon* Behrend with the description of five novel species: *Trichosporon vadense*, *T. smithiae*, *T. dehoogii*, *T. scarabaeorum* and *T. gamsii*. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2004, vol. 54, no. Pt 3, s.975-86. 1466-5026 (Print) 1466-5026 (Linking)
71. MINGEOT-LECLERCQ, M. P., GLUPCZYNSKI, Y. a TULKENS, P. M. Aminoglycosides: activity and resistance. *Antimicrob Agents Chemother.* 1999, vol. 43, no. 4, s.727-37. 0066-4804 (Print) 0066-4804 (Linking)
72. MORSCHHAUSER, J. The genetic basis of fluconazole resistance development in *Candida albicans*. *Biochim Biophys Acta.* 2002, vol. 1587, no. 2-3, s.240-8. 0006-3002 (Print) 0006-3002 (Linking)
73. MURRAY, P. R., ROSENTHAL, K. S. a PFALLER, M. A. *Medical microbiology.* 6th Edition. Philadelphia: Mosby Elsevier, 2009. 947 s. 978-0-323-05470-6
74. NORDMANN, P., CUZON, G. a NAAS, T. The real threat of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing bacteria. *Lancet Infect Dis.* 2009, vol. 9, no. 4, s.228-36. 1474-4457 (Electronic) 1473-3099 (Linking)
75. NYČ, O., URBÁŠKOVÁ, P., V.MAREŠOVÁ, et al. Konsensus používání antibiotik III. Chinolony. *Farmakoterapeutické informace.* 2006, vol. 11, no. 12, s.1-4. 1211-0647
76. OKUMA, K., IWAKAWA, K., TURNIDGE, J. D., et al. Dissemination of new methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones in the community. *J Clin*

- Microbiol.* 2002, vol. 40, no. 11, s.4289-94. 0095-1137 (Print) 0095-1137 (Linking)
77. OLIVEIRA, D. C., MILHEIRICO, C. a DE LENCASTRE, H. Redefining a structural variant of staphylococcal cassette chromosome mec, SCCmec type VI. *Antimicrob Agents Chemother.* 2006, vol. 50, no. 10, s.3457-9. 0066-4804 (Print) 0066-4804 (Linking)
  78. OTTO, M. Staphylococcus epidermidis - the 'accidental' pathogen. *Nature Reviews Microbiology.* 2009, vol. 7, no. 8, s.555-567. 17401526
  79. PAN, E. S., DIEP, B. A., CHARLEBOIS, E. D., et al. Population dynamics of nasal strains of methicillin-resistant Staphylococcus aureus--and their relation to community-associated disease activity. *J Infect Dis.* 2005, vol. 192, no. 5, s.811-8. 0022-1899 (Print) 0022-1899 (Linking)
  80. PÉREZ-MARTÍN, J., URÍA, J. A. a JOHNSON, A. D. Phenotypic switching in *Candida albicans* is controlled by a SIR2 gene. *EMBO J.* 1999, vol. 18, no. 9, s.2580-2592. 0261-4189
  81. PETRLÍKOVÁ, E., WAISSER, K., BUCHTA, V., et al. N-Benzylsalicylthioamides as novel compounds with promising antimycotic activity. *Bioorg Med Chem Lett.* 2010b, vol. 20, no. 15, s.4535-8. 1464-3405 (Electronic) 0960-894X (Linking)
  82. PETRLÍKOVÁ, E., WAISSER, K., DOLEŽAL, R., et al. Antimycobacterial 3-phenyl-4-thioxo-2H-1,3-benzoxazine-2(3H)-ones and 3-phenyl-2H-1,3-benzoxazine-2,4(3H)-dithiones substituted on phenyl and benzoxazine moiety in position 6. *Chemical Papers.* 2011a, vol. 65, no. 3, s.352-366. 0366-6352
  83. PETRLÍKOVÁ, E., WAISSER, K., HEINISCH, L., et al. New S-benzylisothiosemicarbazones with antimycobacterial activity. *Folia Microbiol (Praha).* 2011b, vol. 56, no. 1, s.10-2. 1874-9356 (Electronic) 0015-5632 (Linking)
  84. PETRLÍKOVÁ, E., WAISSER, K., JÍLEK, P., et al. Antibacterial activity of N-benzylsalicylthioamides. *Folia Microbiol (Praha).* 2010a, vol. 55, no. 5, s.418-21. 1874-9356 (Electronic) 0015-5632 (Linking)
  85. PFALLER, M. A., DIEKEMA, D. J., GIBBS, D. L., et al. Results from the ARTEMIS DISK Global Antifungal Surveillance Study, 1997 to 2007: a 10.5-year analysis of susceptibilities of *Candida* Species to fluconazole and voriconazole as determined by CLSI standardized disk diffusion. *J Clin Microbiol.* 2010, vol. 48, no. 4, s.1366-77. 1098-660X (Electronic) 0095-1137 (Linking)
  86. PFEIFLE, D., JANAS, E. a WIEDEMANN, B. Role of penicillin-binding proteins in the initiation of the AmpC beta-lactamase expression in

- Enterobacter cloacae. *Antimicrob Agents Chemother.* 2000, vol. 44, no. 1, s.169-72. 0066-4804 (Print) 0066-4804 (Linking)
87. POOLE, K. Efflux-mediated resistance to fluoroquinolones in gram-negative bacteria. *Antimicrob Agents Chemother.* 2000, vol. 44, no. 9, s.2233-41. 0066-4804 (Print) 0066-4804 (Linking)
88. POOLE, K. Aminoglycoside resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005, vol. 49, no. 2, s.479-87. 0066-4804 (Print) 0066-4804 (Linking)
89. POTRON, A., KALPOE, J., POIREL, L., et al. European dissemination of a single OXA-48-producing *Klebsiella pneumoniae* clone. *Clin Microbiol Infect.* 2011, vol. 17, no. 12, s.E24-6. 1469-0691 (Electronic) 1198-743X (Linking)
90. PRESTERL, E., SUCHOMEL, M., EDER, M., et al. Effects of alcohols, povidone-iodine and hydrogen peroxide on biofilms of *Staphylococcus epidermidis*. *The Journal Of Antimicrobial Chemotherapy.* 2007, vol. 60, no. 2, s.417-420. 0305-7453
91. QIAO, J., LIU, W. a LI, R. Antifungal resistance mechanisms of *Aspergillus*. *Nihon Ishinkin Gakkai Zasshi.* 2008, vol. 49, no. 3, s.157-63. 1882-0476 (Electronic) 0916-4804 (Linking)
92. REHM, S. J. a TICE, A. *Staphylococcus aureus*: methicillin-susceptible *S. aureus* to methicillin-resistant *S. aureus* and vancomycin-resistant *S. aureus*. *Clin Infect Dis.* 2010, vol. 51 Suppl 2, no. s.S176-82. 1537-6591 (Electronic) 1058-4838 (Linking)
93. RELLER, L. B., WEINSTEIN, M., JORGENSEN, J. H., et al. Antimicrobial Susceptibility Testing: A Review of General Principles and Contemporary Practices. *Clinical Infectious Diseases.* 2009, vol. 49, no. 11, s.1749-1755.
94. RICE, L. B., CARIAS, L. L., HUTTON-THOMAS, R., et al. Penicillin-binding protein 5 and expression of ampicillin resistance in *Enterococcus faecium*. *Antimicrobial Agents And Chemotherapy.* 2001, vol. 45, no. 5, s.1480-1486. 0066-4804
95. RICHTER, S. S. a FERRARO, M. J. Susceptibility Testing Instrumentation and Computerized Expert Systems for Data Analysis and Interpretation. In *Manual of Clinical Microbiology (9th Edition)*, Washington, DC, USA: ASM Press, 2007.
96. ROGERS, K. L., FEY, P. D. a RUPP, M. E. Coagulase-negative staphylococcal infections. *Infectious Disease Clinics Of North America.* 2009, vol. 23, no. 1, s.73-98. 1557-9824
97. ROHILLA, A. *Handbook of Bacteriology*. Delhi: Oxford Book Co, 2010. 9789380179476, 9781441652744

98. ROILIDES, E., FARMAKI, E., EVDORIDOU, J., et al. *Candida tropicalis* in a neonatal intensive care unit: epidemiologic and molecular analysis of an outbreak of infection with an uncommon neonatal pathogen. *J Clin Microbiol.* 2003, vol. 41, no. 2, s.735-41. 0095-1137 (Print) 0095-1137 (Linking)
99. ROSSOLINI, G. M., D'ANDREA, M. M. a MUGNAIOLI, C. The spread of CTX-M-type extended-spectrum beta-lactamases. *Clin Microbiol Infect.* 2008, vol. 14 Suppl 1, no. s.33-41. 1198-743X (Print) 1198-743X (Linking)
100. SAKYO, S., TOMITA, H., TANIMOTO, K., et al. Potency of carbapenems for the prevention of carbapenem-resistant mutants of *Pseudomonas aeruginosa*: the high potency of a new carbapenem doripenem. *J Antibiot (Tokyo).* 2006, vol. 59, no. 4, s.220-8. 0021-8820 (Print) 0021-8820 (Linking)
101. SARAVOLATZ, L. D., STEIN, G. E. a JOHNSON, L. B. Telavancin: a novel lipoglycopeptide. *Clin Infect Dis.* 2009, vol. 49, no. 12, s.1908-14. 1537-6591 (Electronic), 1058-4838 (Linking)
102. SERENA, C., PASTOR, F. J., GILGADO, F. L., et al. Efficacy of Micafungin in Combination with Other Drugs in a Murine Model of Disseminated Trichosporonosis. *Antimicrobial Agents And Chemotherapy.* 2005, vol. 49, no. 2, s.497-502.
103. SCHWARTZ, R. A. Superficial fungal infections. *Lancet.* 2004, vol. 364, no. 9440, s.1173-82. 1474-547X (Electronic) 0140-6736 (Linking)
104. SPELLBERG, B., WALSH, T. J., KONTOYIANNIS, D. P., et al. Recent advances in the management of mucormycosis: from bench to bedside. *Clin Infect Dis.* 2009, vol. 48, no. 12, s.1743-51. 1537-6591 (Electronic) 1058-4838 (Linking)
105. SUGITA, T., IKEDA, R. a NISHIKAWA, A. Analysis of Trichosporon isolates obtained from the houses of patients with summer-type hypersensitivity pneumonitis. *J Clin Microbiol.* 2004, vol. 42, no. 12, s.5467-71. 0095-1137 (Print) 0095-1137 (Linking)
106. SZÉKELYOVÁ, A. Vyhodnocení aktivity potenciálně antimikrobních látek pomocí mikrodiluční bujónové metody. Rigorózní práce. Hradec Králové: Univerzita Karlova v Praze. 2012. 107 s. Konzultant Mgr. Marcela Vejsová, PhD.
107. TAKANO, T., HIGUCHI, W., ZARAKET, H., et al. Novel characteristics of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains belonging to multilocus sequence type 59 in Taiwan. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008, vol. 52, no. 3, s.837-45. 0066-4804 (Print) 0066-4804 (Linking)

108. TENOVER, F. C. Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*: a perfect but geographically limited storm? *Clin Infect Dis*. 2008, vol. 46, no. 5, s.675-677. 1537-6591
109. TURNER, P. J. Extended-spectrum beta-lactamases. *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication Of The Infectious Diseases Society Of America*. 2005, vol. 41 Suppl 4, no. s.S273-S275. 1537-6591
110. TURNIDGE, J. D., FERRARO, M. J. a JORGENSEN, J. H. Susceptibility Test Methods: General Considerations. In *Manual of Clinical Microbiology (9th Edition)*, Washington, DC, USA: ASM Press, 2007.
111. VEESSEMEYER, J. L., HAUSER, A. R., LISBOA, T., et al. *Pseudomonas aeruginosa* virulence and therapy: evolving translational strategies. *Crit Care Med*. 2009, vol. 37, no. 5, s.1777-86. 1530-0293 (Electronic) 0090-3493 (Linking)
112. WAISSER, K., MATYK, J., KUNEŠ, J., et al. Highly active potential antituberculotics: 3-(4-alkylphenyl)-4-thioxo-2H-1,3-benzoxazine-2(3H)-ones and 3-(4-alkylphenyl)-2H-1,3-benzoxazine-2,4(3H)-dithiones substituted in ring-B by halogen. *Arch Pharm (Weinheim)*. 2008, vol. 341, no. 12, s.800-3. 1521-4184 (Electronic) 0365-6233 (Linking)
113. WAISSER, K., NOVOTNÁ, E., KUNEŠ, J., et al. Phenyl salicylates - a new group of potential antituberculotics. *Ceska Slov Farm*. 2012, vol. 61, no. 6, s.282-4. 1210-7816 (Print) 1210-7816 (Linking)
114. WAISSER, K., PEŘINA, M., KUNEŠ, J., et al. 3-Benzyl-2H-1,3-benzoxazine-2,4(3H)-diones, a new group of antimycobacterial compounds against potentially pathogenic strains. *Il Farmaco*. 2003a, vol. 58, no. 11, s.1137-1149. 0014-827X
115. WAISSER, K., PEŠINA, M., HOLÝ, P., et al. Antimycobacterial and Antifungal Isosters of Salicylamides. *Archiv der Pharmazie*. 2003b, vol. 336, no. 6-7, s.322-335. 1521-4184
116. WAISSER, K., PETRLÍKOVÁ, E., PEŘINA, M., et al. A note to the biological activity of benzoxazine derivatives containing the thioxo group. *Eur J Med Chem*. 2010, vol. 45, no. 7, s.2719-25. 1768-3254 (Electronic) 0223-5234 (Linking)
117. WALSH, T. J., ANAISSIE, E. J., DENNING, D. W., et al. Treatment of aspergillosis: clinical practice guidelines of the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis*. 2008, vol. 46, no. 3, s.327-60. 1537-6591 (Electronic),1058-4838 (Linking)
118. WHITE, T. C. Mechanisms of Resistance to Antifungal Agents. In *Manual of Clinical Microbiology (9th Edition)*, Washington, DC, USA: ASM Press, 2007.

119. WRIGHT, A., HAWKINS, C. H., ANGGARD, E. E., et al. A controlled clinical trial of a therapeutic bacteriophage preparation in chronic otitis due to antibiotic-resistant *Pseudomonas aeruginosa*; a preliminary report of efficacy. *Clin Otolaryngol.* 2009, vol. 34, no. 4, s.349-57. 1749-4486 (Electronic)  
1749-4478 (Linking)
120. [WWW.CLSI.ORG](http://WWW.CLSI.ORG) dostupné z: <http://www.clsi.org/about-clsi/clsi-resources/faqs/general-faqs/> (online) poslední úprava: 2.11.2013 citováno: 2.11.2013
121. [WWW.EUCAST.ORG](http://WWW.EUCAST.ORG) dostupné z: <http://www.srga.org/Eucastwt/eucastdefinitions.htm> (online) poslední úprava: 12.7.2006 citováno: 7.11.2013
122. YAHAV, D., LADOR, A., PAUL, M., et al. Efficacy and safety of tigecycline: a systematic review and meta-analysis. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy.* 2011, vol. 66, no. 9, s.1963-1971.
123. YAMANE, K., WACHINO, J., SUZUKI, S., et al. New plasmid-mediated fluoroquinolone efflux pump, QepA, found in an *Escherichia coli* clinical isolate. *Antimicrob Agents Chemother.* 2007, vol. 51, no. 9, s.3354-60. 0066-4804 (Print) 0066-4804 (Linking)