

Univerzita Karlova v Praze

Farmaceutická fakulta

Katedra biologických a lékařských věd

Vyhodnocení aktivity potenciálně antibakteriálních látek
pomocí mikrodiluční bujonové metody

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: Mgr. Marcela Vejsová, Ph.D.

Hradec Králové 2016

Magdaléna Andělová

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

datum

podpis

Chtěla bych poděkovat paní Mgr. Marcele Vejsové, Ph.D. za vedení diplomové práce a poskytování užitečných informací a rad.

Dále bych ráda poděkovala paní Idě Dufkové za pomoc při experimentální části práce a panu PharmDr. Mgr. Martinovi Krátkému, Ph.D. za poskytování informací o strukturách testovaných látek.

Abstrakt

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

Kandidát: Magdaléna Andělová

Školitel: Mgr. Marcela Vejsová, Ph.D.

Název diplomové práce: Vyhodnocení aktivity potenciálně antibakteriálních látek pomocí mikrodiluční bujonové metody

Cíl práce

Cílem této diplomové práce bylo vyhodnocení aktivity potenciálně antimikrobních látek. Objevování nových antibakteriálních látek je jednou z nejdůležitějších činností na poli farmaceutického průmyslu, především z důvodu neustále se zvyšující bakteriální rezistence.

Metody

Látky byly testovány pomocí mikrodiluční bujonové metody. Metoda byla zvolena z důvodu snadného provedení a nižší nákladnosti. Veškeré kroky včetně vyhodnocení probíhaly ručně.

Výsledky

Látky byly rozděleny dle jejich chemické struktury. Jako nejúčinnější se projevila skupina salicylanilidových derivátů. Zbylé skupiny inhibovaly růst bakterií velmi slabě, popřípadě byly neúčinné. U každého bakteriálního kmene byly vyhodnoceny látky, které na něj působily.

Závěr

Na základě výsledků byl zvolen nejvíce citlivý bakteriální kmen a bakteriální kmen, který vykazoval největší rezistenci. Nejcitlivěji reagoval na testované látky bakteriální kmen *Staphylococcus aureus*. Největší rezistenci projevovat bakteriální kmen *Klebsiella pneumoniae*. V kapitole diskuze je na základě chemické struktury uvažováno o příčinách účinnosti nebo neúčinnosti jednotlivých skupin látek.

Abstract

Charles University in Prague
Faculty of pharmacy in Hradec Králové
Department of Biological and Medical science

Candidate: Magdaléna Andělová

Supervisor: Mgr. Marcela Vejsová, Ph.D.

Name of diploma thesis: Evaluation of activity of potential antibacterial substances through of the use microdilution broth method

Background

Aim of this diploma work was research of activity of potential antimicrobial substances. Research of antibacterial substances is one of the most important factor in pharmaceutical industry. The main reason is being the never stopping growth of bacterial resistance.

Methods

The microdilution broth method was used to test the substances. This method was used because of low difficulty and low cost. All the steps including the final analysing was done by hand.

Results

The substances were divided in groups depending their chemical structure. The most effective was the salicylanilide derivatives group. The other groups inhibited growth of bacteria very little or were non-functional. In case of every bacterial stems were analysed all substances which were effective.

Conclusion

Depending on the results the most sensitive and the most resistant bacterial stem were chosen. The most sensitive reaction on tested substances had bacterial stem *Staphylococcus aureus*. The *Klebsiella pneumoniae* stem was reaching the most resistance. Reasons of effectivity or non effectivity of all groups of substances are talked about in discussion chapter.

Seznam zkratk

CNS	centrální nervová soustava
DMSO	dimethylsulfoxid
EC	<i>Escherichia coli</i>
EF	<i>Enterococcus faecalis</i>
ESBL	extended specter beta-lactamase (širokospektré betalaktamázy)
IC	inhibiční koncentrace
IN	inkubační doba
KP	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
KP ESBL	<i>Klebsiella pneumoniae</i> ESBL pozitivní
MH	Mueller-Hintonův bujón
MIC	minimální inhibiční koncentrace
MRSA	Methicillin rezistentní <i>Staphylococcus aureus</i>
PA	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
SA	<i>Staphylococcus aureus</i>
SE	<i>Staphylococcus epidermidis</i>

Obsah

1 Úvod	9
2 Zadání diplomové práce – cíl práce	10
3 Teoretická část.....	11
3.1 Bakteriologie.....	11
3.1.1 Historie bakteriologie	11
3.1.2 Stavba bakteriální buňky	12
3.1.3 Tvary bakteriálních buněk	15
3.2 Bakteriální kmeny použité v praktické části.....	17
3.2.1 <i>Staphylococcus aureus</i>	17
3.2.2 Methicilin rezistentní <i>Staphylococcus aureus</i>	18
3.2.3 <i>Staphylococcus epidermidis</i>	19
3.2.4 <i>Enterococcus faecalis</i>	19
3.2.5 <i>Escherichia coli</i>	20
3.2.6 <i>Klebsiella pneumoniae</i>	20
3.2.7 <i>Klebsiella pneumoniae</i> ESBL	21
3.2.8 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	22
3.3 Protimikrobní látky a procesy.....	23
3.3.1 Dekontaminační procesy	23
3.3.2 Antibiotika	24
3.4 Vyšetření citlivosti bakterií.....	29
Diluční test v bujonu.....	29
Diskový difúzní test.....	30
Diluční test v agaru	30
E-test.....	30
4 Praktická část.....	32
4.1 Použitý materiál.....	32
4.2 Výsledky.....	36

4.2.1 Rozdělení jednotlivých skupin látek dle chemické struktury	36
4.2.2 Rozdělení jednotlivých účinných látek dle jejich působení na bakteriální kmeny	51
5 Diskuze.....	59
6 Závěr	64
7 Seznam literatury	67

1 Úvod

V dnešní době je vývoj nových antimikrobních látek stále hlavní součástí práce na poli farmaceutického průmyslu. Nemocniční infekce, které jsou způsobeny stále se zvyšující odolností některých bakteriálních kmenů, představují velkou zátěž v oblasti zdravotní péče. Dle National Healthcare Safety Network, která shromažďovala informace o původcích nozokomiálních infekcí, bylo zjištěno, že v letech 2009 - 2010 až 40 % těchto infekcí bylo způsobeno gramnegativními bakteriemi včetně druhu *Pseudomonas aeruginosa* nebo rodu *Enterobacter*.

Stále se zvyšující rezistence bakterií vůči stávajícím antimikrobním látkám vede k vývoji a testování stovek potenciálně účinných molekul. I přes tuto snahu se do registrace v posledních letech dostává pouze několik nových molekul se selektivním účinkem na konkrétní skupinu bakterií. Problém představují především gramnegativní bakterie, které mají proti grampozitivním složitější strukturu buněčné stěny (Amin; Deruelle, 2016 [online]).

V této diplomové práci byly testovány nově syntetizované látky, které byly vyvinuty na Katedře farmaceutické chemie a Katedře anorganické a organické chemie na Farmaceutické fakultě. K testování byla použita mikrodiluční bujónová metoda a výsledky testování nám ukazují, které molekuly jsou účinné a mohly by v budoucnu posloužit jako podklad pro vývoj nových léčiv.

K testování potenciálně antimikrobních látek byly použity bakteriální druhy *Staphylococcus aureus*, Methicilin rezistentní *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella pneumoniae* ESBL pozitivní a *Pseudomonas aeruginosa*.

2 Zadání diplomové práce – cíl práce

Vyhodnocení aktivity potenciálně antibakteriálních látek pomocí mikrodiluční bujonové metody

- Zvládnutí základních mikrobiologických technik v laboratoři
- Rešerše literatury
- Vypracování postupu vyhodnocení antibakteriální aktivity pomocí mikrodiluční bujonové metody
- Vlastní experimenty
- Zpracování výsledků, jejich interpretace s využitím teoretických a praktických znalostí dané problematiky

3 Teoretická část

3.1 Bakteriologie

Bakterie jsou jednobuněčné organizmy, patřící mezi Prokaryota. Od dob objevu bakterií se bakteriologie, věda zabývající se studiem bakterií, neustále rozvíjela. Během této doby se člověku dostalo množství informací nejen o vzhledu bakteriální buňky, ale také o jejich prospěšnosti, nebo patogenitě. Dnes tak víme, i díky významnému rozvoji elektronové mikroskopie to, že buňka bakterií a sinic se výrazně odlišuje od buněk všech ostatních. Hlavní rozdíl je v jednodušší strukturní organizaci jádra buňky. Tento rozdíl vymezil dvě ohraničené taxonomické jednotky. *Procaryotae*, do které patří pouze bakterie a sinice, a druhá *Eucaryotae*, do které se řadí všechny ostatní vyšší organizmy (Julák, 2006).

3.1.1 Historie bakteriologie

Bakterie byly objeveny před zhruba 340 lety holandským vědcem Antoni van Leeuwenhoekem. V roce 1673 Leeuwenhoek publikoval první dopis, kde informoval tehdejší vědecký svět o svém mikroskopu a o svých prvních pozorováních. Téměř celý svůj život zasvětil studiu tzv. *animalcula* ve vodě, což byli prvoci, plísňe, bakterie, ale i další objekty, jako červené krvinky nebo spermatozoidy. Další pozorování bylo podmíněno vyvinutím výkonného mikroskopu, k němuž došlo až v 19. století. Významnou osobností v historii bakteriologie se stal Luis Pasteur. Tento německý přírodovědec zásadním způsobem objasnil vztahy mezi mikroorganizmy a procesy kvašení, dále například dokázal existenci života bez vzduchu.

Důkazy o tom, že bakterie mohou působit jako původci některých nemocí, přinesl Robert Koch. Pomocí svého vybavení zahrnujícího i mikroskop, soustředil svoji pozornost na antrax a tyčinky pozorovatelné v krvi nemocných zvířat. Kritéria, která použil pro odlišení původních bakterií, jsou dnes známa jako Kochovy postuláty. Koch mohl svoje důkazy obhájit i díky dvěma novým metodám. První

z nich bylo pěstování bakterie na zpevněném živném médiu, na kterém se růst jedné bakterie projevuje makroskopicky jako kolonie. Druhou metodou byla vizualizace bakterie pod mikroskopem barvením. V roce 1882 se tak podařil Kochovi velký objev v identifikaci původce tuberkulózy *Mycobacterium tuberculosis*. K rozvoji bakteriologie v době zlatého věku přispěl například i dánský mikrobiolog Christian Gram a mnoho dalších vědců, díky kterým je nám dnes dobře známo mnoho poznatků o bakteriích (Kaprálek, 1999).

3.1.2 Stavba bakteriální buňky

Bakteriální buňka se liší od rostlinné a živočišné buňky jednodušší vnitřní strukturou. Základní složku, rozpustnou cytoplazmu, doplňují čtyři hlavní struktury a to jádro, ribozomy, cytoplazmatická membrána a buněčná stěna. Vnitřek bakteriální buňky je tvořen jediným, membránami nedělitelným prostorem. Velikostně je bakteriální buňka také řádově menší než buňka živočišná, lze ji srovnat s velikostí mitochondrie. Typická velikost bakteriální buňky jsou 1-2 mikrometry, ale rozsah může kolísat v závislosti na konkrétním bakteriálním druhu.

Prvkové a molekulové složení se významně neliší od buňky eukaryotní. Nejobsáhlejší zastoupení má uhlík, který tvoří asi 50 % sušiny bakteriální buňky, dále kyslík, který je zastoupen asi v 20 %, dusík v 15 % a vodík v 8 %. Společně s dalšími prvky, které jsou zastoupeny v menší míře, vytvářejí makromolekuly a metabolické intermediáty. Z nich mají největší zastoupení bílkoviny, deoxyribonukleové kyseliny, lipidy, peptidoglykan, glykogen. Tyto molekuly vytvářejí jednotlivé, níže uvedené, součásti buňky (Kaprálek, 1999).

Jádro

Jádro (nukleotid) bakteriální buňky zaujímá asi 15 % objemu buňky. Na rozdíl od jádra eukaryotní buňky není od cytoplazmy odděleno membránou, nemá stálý tvar a molekulárně je to jediná do kruhu uzavřená dvojšroubovice DNA. Za fyziologických podmínek je kovalentně do kruhu uzavřená DNA ve vynucené konformaci zvané

superhelicitu. V jádru bakterií je uložena genetická informace buňky. DNA je rozdělena do funkčních jednotek - genů. Jádro bakterií obsahuje asi 3500 genů.

Cytoplazma

Cytoplazma je viskózní rozpustná hmota, která zcela vyplňuje vnitřní prostor bakteriální buňky. Cytoplazma obsahuje více než 50 % všech proteinů buňky, které mají z velké části enzymatickou funkci. Uskutečňuje se zde mnoho biochemických dějů, jako je například glykolýza nebo pentózový cyklus.

Ribozomy

Bakteriální ribozom je součástí buňky, skládá se ze dvou podjednotek, 30S a 50S. Tyto dvě podjednotky se skládají v jednu velkou podjednotku 70S. Jeho hlavní funkcí je, že slouží jako povrch pro molekulu mRNA. Tato molekula mRNA, která nese genetickou informaci, se poté na ribozomu překládá do primární struktury bílkovin. Ribozomy se v bakteriální buňce nacházejí volně v cytoplazmě nebo v oblasti jádra, kde nasedají na vzniklou mRNA a ihned ji překládají. Pokud jsou součástí cytoplazmatické membrány, tak zde syntetizují proteiny, které jsou poté do této membrány zakomponovány.

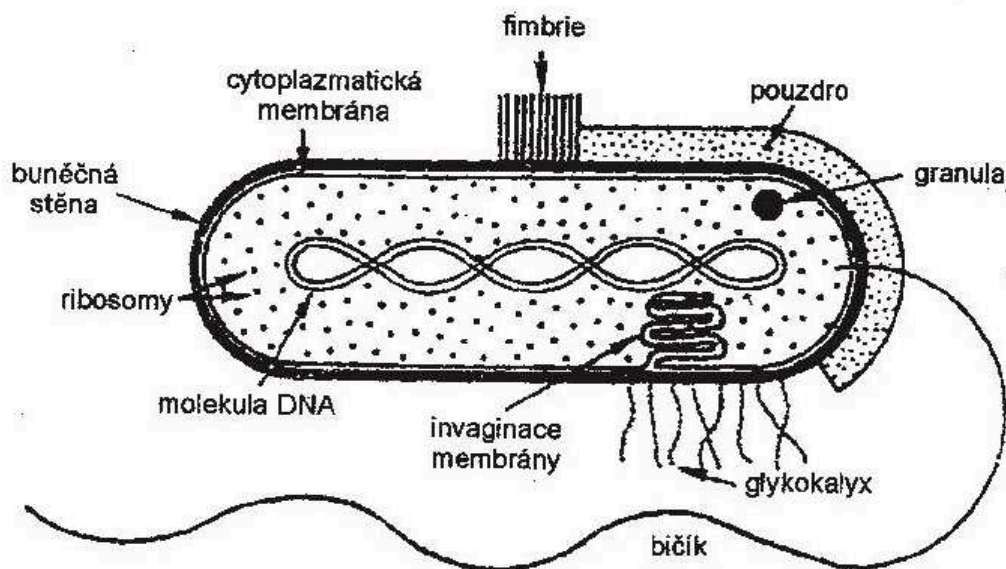
Cytoplazmatická membrána

U bakterií je to jediná vnitřní biologická membrána, která obklopuje povrch cytoplazmy. Jsou zde lokalizovány buněčné děje a funkce, které jinde probíhat nemohou. Je složena z dvojité vrstvy fosfolipidů, na jejichž obou stranách jsou vázány hydrofóbními nebo elektrostatickými silami bílkoviny.

Buněčná stěna

Roli buněčného skeletu hraje právě bakteriální stěna. Je to pevný útvar, který uděluje buňce tvar a mechanicky ji chrání. Stěna uděluje bakterii odolnost

chemickou, odolnost proti záření, proti vyschnutí a současně kompenzuje značný osmotický přetlak panující uvnitř buňky. Bakterie lze rozdělit do skupin podle složení bakteriální stěny. Rozeznáváme grampozitivní a gramnegativní bakterie. U první skupiny je bakteriální stěna složena vrstvou peptidoglykanu, který je protkaný řetízky teichoové kyseliny. U druhé skupiny je bakteriální stěna složitější. Kromě peptidoglykanu obsahuje na vnější straně fosfolipidy a bílkoviny a v nich zakotvené lipoproteiny a lipopolysacharidy. Mechanicky je křehčí, ale odolnější proti chemickým vlivům (Kaprálek, 1999).



Obr. 1 Stavba bakteriální buňky (Kaprálek, 1999)

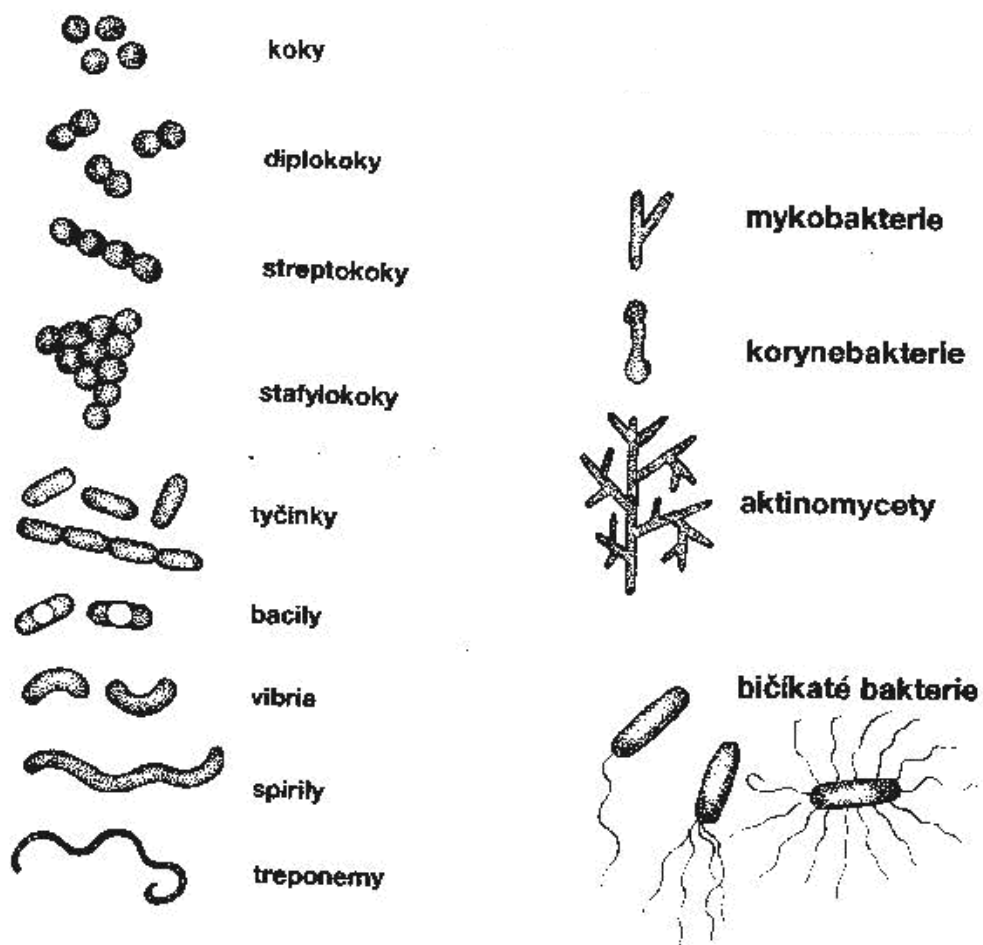
Právě na rozdílném složení buněčné stěny je založeno základní barvení v bakteriologii, Gramovo barvení. Tuto metodu vyvinul dánský vědec Christian Gram v roce 1884. Jedná se o několik kroků, během nichž dojde nejprve, po fixaci vzorku, k primárnímu barvení krystalovou violetí, po kterém jsou všechny bakterie modré. Následuje moření Lugolovým jodovým roztokem. Po odbarvení alkoholem či acetonem zůstanou grampozitivní bakterie modré, zatímco gramnegativní se odbarví. Nakonec se gramnegativní bakterie obarví např. zředěným karbolfuchsinem do růžového zbarvení. Tato barvicí odpověď je založena na rozdílném chemickém a strukturním složení buněčné stěny obou druhů bakterií.

V závislosti na bakteriálním druhu pak mohou bakterie obsahovat další části jako je například pouzdro, bičík nebo fimbrie (Kaprálek, 1999).

3.1.3 Tvary bakteriálních buněk

Bakteriální buňky mohou mít různé tvary. Podle tvaru rozeznáváme

- a) bakterie kulovitého tvaru neboli koky. Tyto bakterie bývají různým způsobem uspořádány. Uspořádáním do dvojic se vytváří diplokoky, řetízky koků se nazývají streptokoky, hrozníčkovitě uspořádané koky jsou stafylokoky. Z bakterií používaných v praktické části se mezi koky řadí *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* a *Enterococcus faecalis*.
- b) bakterie tyčinkovitého tvaru neboli tyčinky. I tato skupina může vytvářet po spojení dvojice nebo řetízky. Uvnitř buněk tyčinkovitých bakterií se mohou nacházet kulovitá tělíska nazývaná endospory. Tyto struktury mohou odolávat vysokým teplotám a dezinfekčním prostředkům a působit tak jako nebezpečné patogeny. Bakterie tyčinkovitého tvaru používané v praktické části byly *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* a *Klebsiella pneumoniae*.
- c) zakřivené bakterie. Jedná se o tyčinkovité bakterie, které mohou být jednou nebo několikrát zakřiveny. Bakterie zakřivené do tvaru rohlíku se nazývají vibria, bakterie zvlněné se nazývají spirily, spirálně zatočené spirochety.
- d) větvcí se bakteriální buňky. Některé bakteriální buňky jsou svým tvarem rozvětvené, rozeznáváme aktinomycety, což jsou úplně větvcí se buňky, a částečně se větvcí mykobakterie (Rosypal, 1994).



Obr. 2 Tvary bakteriálních buněk (Rosypal, 1994)

3.2 Bakteriální kmeny použité v praktické části

Rod *Staphylococcus*

Do rodu *Staphylococcus* bylo zařazeno kolem 40 druhů a poddruhů, z nichž pouze některé se uplatňují v humánní medicíně. Z hlediska patogenity mají pro člověka největší význam koaguláza-pozitivní *S. aureus* a koaguláza negativní *S. epidermidis*.

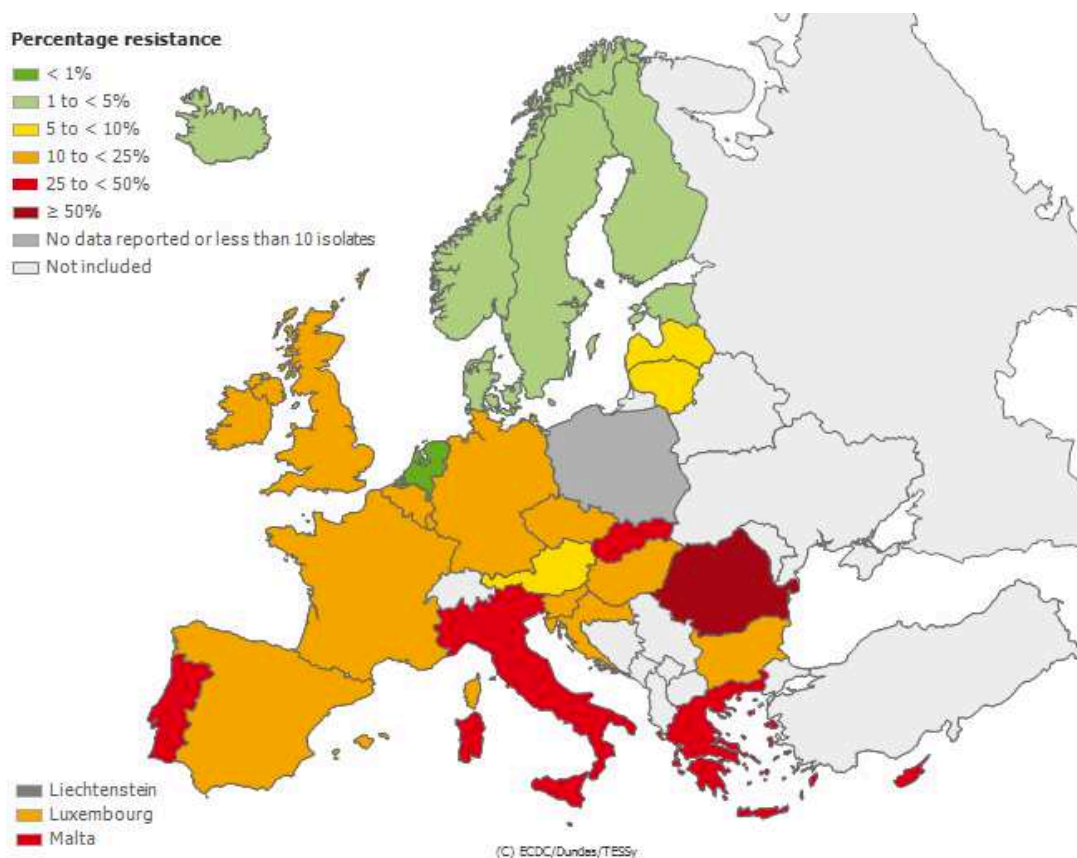
Stafylokoky jsou charakterizovány jako grampozitivní, nesporulující, nepohyblivé a většinou neopouzdržené sférické koky o průměru asi 1 μm . Vyskytují se jednotlivě, ve dvojicích a v nepravidelných shlucích nebo v hrozníčcích. Jejich vlastností je vyšší míra rezistence vůči nepříznivým vlivům zevního prostředí, což umožňuje jejich osídlení v kožních oblastech (Bednář et al., 1996).

3.2.1 *Staphylococcus aureus*

Řadí se mezi biochemicky neaktivnější bakteriální druhy. Produkuje řadu komplexních látek buněčné stěny, exoenzymů a toxinů, z nichž mnohé se uplatňují jako faktory virulence. Je dobře adaptovaný na kolonizaci kůže a sliznic a spolu se streptokoky patří mezi nejčastější původce pyogenních infekcí (abscesy, folikulitidy, impetiga, ranné infekce) nebo intoxikací člověka a zvířat (Kluytmans et al., 1997). Lidský organizmus je i přesto vůči stafylokokové infekci poměrně odolný. K onemocnění dochází zpravidla při oslabení organismu nebo infekcí velkou dávkou kmene. To může být nebezpečné zejména pro pacienty po úrazu, chirurgickém zákroku nebo s imunologickou nedostatečností. Mezi onemocnění způsobené tímto druhem patří například stafylokoková enterotoxikóza (vznikající po požití potravy kontaminované enterotoxinem B), sinusitida, bronchopneumonie, sepse, osteomyelitida nebo endokarditida. Citlivost vykazují vůči polosyntetickým peniciláza-rezistentním penicilinům, nebo kombinacím penicilinu s inhibitory betalaktamáz (Jindrák et al., 2014).

3.2.2 Methicilin rezistentní *Staphylococcus aureus*

Jedná se o kmeny rezistentní k antibiotiku methicilinu, resp. v České republice registrovanému oxacilinu. Jejich frekvence mezi kmeny *S. aureus* nemocničního původu se pohybuje od 5 do 15 %. Na základě mutace *mecA* genů dochází v membránách stafylokokových buněk k expresi zvláštní penicilin vázající bílkoviny, která má značně sníženou afinitu k penicilinovým antibiotikům. Tyto MRSA kmeny se vyskytují jak v zdravotnických zařízeních jako původci nebezpečných nozokomiálních infekcí, tak komunitně. Jsou pravidelně multirezistentní k řadě antibiotik a proto představují vážný terapeutický problém u infikovaných pacientů. V současné době je lékem na infekce způsobené tímto druhem linezolid a vankomycin (Hal van J., Fowler, 2013 [online]). Vankomycin má proti linezolidu více nežádoucích účinků, například nefrotoxicitu (Wunderink et al., 2012 [online]).



Obr. 3 Podíl rezistentních MRSA v jednotlivých zemích

(http://ecdc.europa.eu/en/healthtopics/antimicrobial_resistance/database/Pages/map_reports.aspx)

3.2.3 *Staphylococcus epidermidis*

Jedná se o bakteriální druh, který se u člověka dominantně vyskytuje na kůži obličeje, v podpaží a tříslech, na perineu, na končetinách a na sliznici nosohltanu (Chessa et al., 2015 [online]). Je to typický oportunní patogen, který napadá oslabené pacienty po různých úrazech, chirurgických zákrocích, popáleninách nebo imunosupresivní pacienty. Důležitým faktorem pro vznik infekce je také přítomnost umělého povrchu např. katétru, cévní náhrady nebo umělé chlopně, kdy bakterie adherují na povrchu a vytvářejí biofilm, který zabraňuje průniku antibiotik (Büttner et al., 2015 [online]). Díky tomu může poté dojít k chronickému zaplavení organismu stafylokoky, které mohou způsobovat sepse, endokarditidy nebo infekce močových cest. Onemocnění vyvolaná tímto druhem jsou tedy často získána z nemocničního prostředí a mají multirezistenci k antibiotikům v dokonce větším rozsahu než je tomu u *S. aureus*.

3.2.4 *Enterococcus faecalis*

Jedná se grampozitivní koky ve dvojicích a krátkých řetězcích, které zahrnují 12 druhů, z nichž nejdůležitější pro člověka jsou *E. faecalis*, *E. faecium* a *E. durans*. Jsou důležitou součástí normální mikroflóry v tlustém střevě a také se mohou vyskytnout i ve střevě tenkém, na kůži, v genitálním traktu nebo ojediněle v horních cestách dýchacích. Enterokoky patří mezi oportunní patogeny, kdy mohou působit jako původci infekcí močových a žlučových cest nebo gynekologických a pooperačních infekcí. V současné době je druh *Enterococcus faecalis* považován za druhý nejčastější patogen, který způsobuje infekce močových cest a infekce chirurgických ran (Cafini et al., 2015 [online]). Rezistence na dříve často používaná glykopeptidová antibiotika narůstá, především u nozokomiálních infekcí.

Rod *Escherichia*

Rod *Escherichia* zahrnuje 7 druhů, z nichž nejvýznamnější *Escherichia coli*, je jednou z nejlépe prostudovaných bakterií a modelovým organismem pro nejrůznější pokusy např. v mikrobiologii. Rod *Escherichia* patří do čeledi Enterobacteriaceae, které se vyskytují v lidském střevě i v okolním prostředí (Bednář et al., 1996).

3.2.5 *Escherichia coli*

E. coli je gramnegativní tyčka se zaoblenými konci, která se pohybuje pomocí bičíků. Většina kmenů je pro hostitele nejen neškodná, ale dokonce prospěšná, neboť například v tlustém střevě dodává vitamín K a chrání zažívací trakt před patogenními bakteriemi (Pharma-reports, 2012). Je to běžný komenzál tlustého střeva, který může v určitých případech vyvolat dva typy onemocnění. Extraintestinální onemocnění zahrnují převážně infekce močových cest, septická onemocnění, infekce ran, jsou vyvolány převážně komenzálními sérotypy a infekce je často endogenní. Infekce močových cest jsou v současné době způsobeny až v 95 % uropatogenním druhem *E. coli* (Subashchandrabose et al., 2015 [online]). Druhým typem jsou pak infekce v intestinálním traktu provázené průjmy, které jsou způsobeny enteropatogenními druhy *E. coli*, produkující např. toxiny. Tato průjmová onemocnění způsobují velkou úmrtnost, především u dětí mladších pěti let (Croxen et al., 2013 [online]).

Komunitní kmeny *E. coli* jsou primárně citlivé na většinu antibiotik, ale nemocniční kmeny mohou vykazovat vysoký stupeň rezistence včetně produkce širokospektrých betalaktamáz.

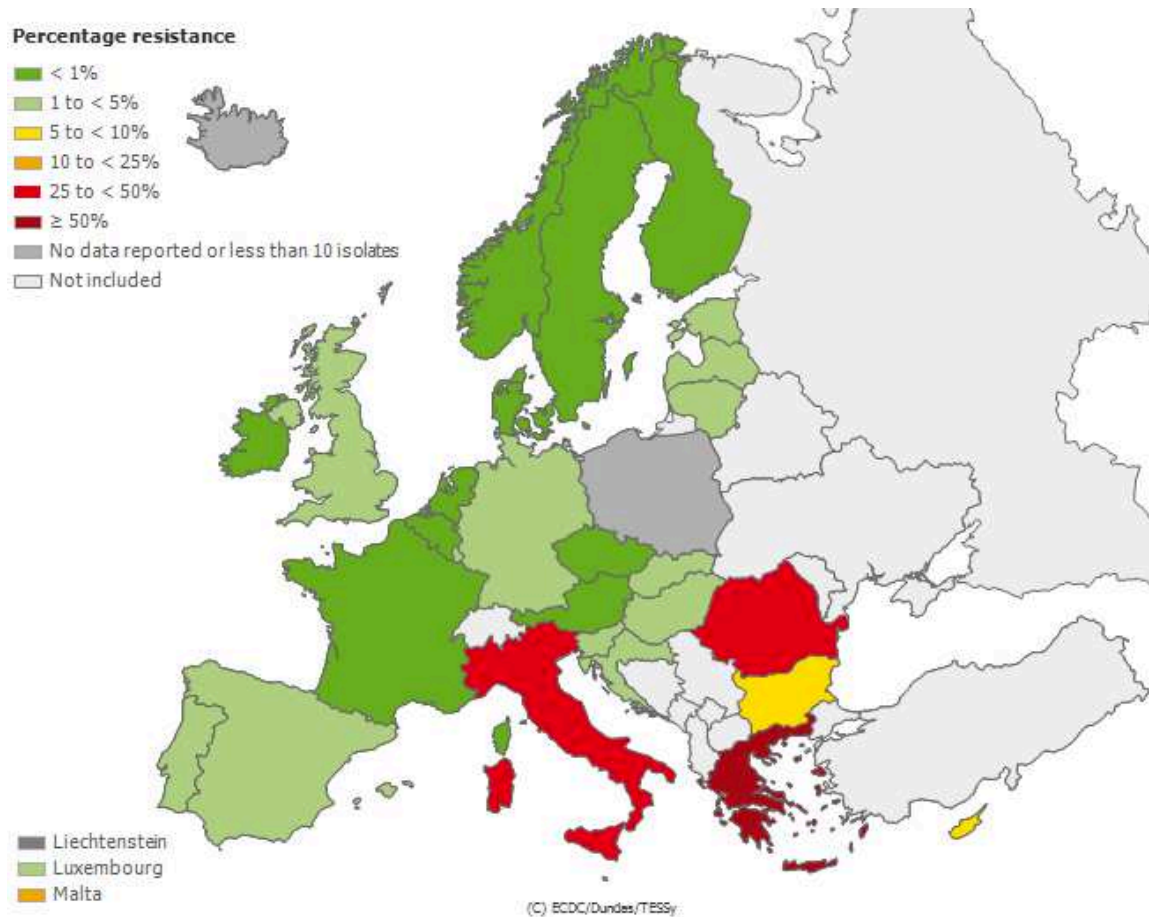
Rod *Klebsiella*

Klebsiely jsou nepohyblivé gramnegativní tyčky opouzdřené polysacharidovým pouzdem. Nalézají se v zažívacím traktu, v dýchacích cestách, v půdě a ve vodě. Jsou podmíněně patogenní, uplatňují se u nozokomiálních infekcí (Bednář et al., 1996).

3.2.6 *Klebsiella pneumoniae*

Jedná se o hlavní druh z rodu *Klebsiella*, který se vyskytuje běžně v tenkém střevě, ale velmi dobře přežívá i v okolním prostředí, kde je častým zdrojem infekcí. Způsobuje, stejně jako *E. coli*, močové infekce, a dále nozokomiální infekce, zejména pneumonie, sepse, meningitidy u novorozenců. Většinou jsou citlivé ke gentamicinu a cefalosporinům třetí generace, ale stále přibývá rezistentních kmenů. Dnes se tak

objevuje multirezistence na penicilin, cefalosporiny první a druhé generace, monobaktamy i polymyxiny, zejména u druhů, které mají schopnost produkovat širokospektrné betalaktamázy případně karbapenamázy (Gaspar et al., 2015 [online]).



Obr. 4 Podíl KP rezistentních na karbapenamázy v jednotlivých zemích (http://ecdc.europa.eu/en/healthtopics/antimicrobial_resistance/database/Pages/map_reports.aspx)

3.2.7 *Klebsiella pneumoniae* ESBL pozitivní

Některé druhy rodu *Klebsiella* mohou produkovat takzvané širokospektré betalaktamázy, což jsou enzymy, které hydrolyzují peniciliny, cefalosporiny všech generací a monobaktamy. Tyto ESBL (z anglického extended spectre beta-lactamases) enzymy otevírají beta-laktamový kruh a tím deaktivují příslušné antibiotické látky. Mikroby, které disponují vlastností produkovat tyto enzymy, jsou

pak nebezpečné, dostanou-li se do respiračního traktu, močového traktu a především do krevního řečiště, kde se pomnoží a způsobí infekce.

Nebezpečí rovněž představují tzv. karbapenamázy, enzymy produkované čeledí Enterobacteriaceae. Tyto enzymy snižují účinek karbapenemů, které se často používají jako rezervní antibiotika. V tomto případě pak musí být pacient umístěn v izolaci a musí se dodržovat striktní bariérový režim (Nordmann et al., 2009).

Rod *Pseudomonas*

Rod *Pseudomonas* jsou striktně aerobní, rovné nebo mírně zahnuté gramnegativní tyčinky pohybující se pomocí bičků. Mají respirační metabolismus, nefermentují sacharidy. Běžně se vyskytují ve volné přírodě, v odpadních vodách, ve střevním traktu zvířat i člověka. Pro lékařskou mikrobiologii je nejdůležitějším druhem *Pseudomonas aeruginosa* (Bednář et al., 1996).

3.2.8 *Pseudomonas aeruginosa*

Typický zástupce rodu *Pseudomonas* je významný patogen, který je častou příčinou nemocničních infekcí. Kolonizuje sliznice, hlavně respirační trakt a močové cesty, je také značnou příčinou infekcí u pacientů se sníženou imunitou. Velmi významnou vlastností *Pseudomonas aeruginosa* je její schopnost přijímat od ostatních bakterií informace o rezistenci, což může často komplikovat terapii. Výběr antibiotik je omezen jak primární tak sekundární rezistencí. V současnosti se uplatňuje terapie piperacilinem, v závažnějších případech ho lze kombinovat s gentamycinem nebo amikacinem. Jako alternativu lze použít cefalosporin třetí generace, ceftazidim nebo cefalosporin čtvrté generace, cefepin, popřípadě karbapenemy. Při neúčinnosti těchto léčiv se užívá kolistin (Jindrák et al., 2014).

3.3 Protimikrobní látky a procesy

3.3.1 Dekontaminační procesy

Bakterie jsou v našem okolí všudypřítomné, jsou nezbytnou součástí přirozených procesů nejen ve vztahu ke člověku, ale také všude v přírodě. Přes toto obecné pravidlo je někdy nutné mikroorganismy z určitých míst odstranit, nebo alespoň jejich výskyt eliminovat.

Dekontaminace je široký pojem, který zahrnuje soubor metod a postupů vedoucích k částečnému nebo úplnému odstraňování mikroorganismů. Můžeme zde zařadit postupy s menší účinností jako je mechanické odstraňování pomocí horké vody a povrchově aktivních látek. Jako protikladný postup lze zařadit proces sterilizace, což je úplné odstraňování všech životaschopných forem za použití fyzikálních nebo chemických prostředků. Spolehlivost sterilizačních postupů udává tzv. hladina sterilizační jistoty, která udává pravděpodobnost výskytu nesterilních položek v souboru sterilizovaných předmětů. Podle dosaženého účinku rozlišujeme dva typy procesů. První proces způsobuje zastavení růstu a množení mikrobů a má účinek bakteriostatický. Účinek baktericidní bakterie přímo usmrcuje (Julák, 2006).

Pro přehlednost se metody dekontaminace dělí na

a) fyzikální metody. Tyto procesy zahrnují především působení tepla, filtraci, různé druhy elektromagnetického záření a změny osmotického tlaku.

b) chemické metody. Zde je zahrnut rozsáhlý sortiment prostředků, které se liší složením i mechanismem působení. Jejich účinnost závisí také na koncentraci dané látky, na době působení a na teplotě. Tyto metody se užívají především tam, kde fyzikální metody nelze použít, např. k sterilizaci termolabilních látek včetně živých tkání. Mezi často používané patří organické kyseliny, manganistan draselný, peroxid

vodíku, jod, alkoholy, formaldehyd, barviva a mnoho dalších sloučenin (Melicherčíková, 2015).

3.3.2 Antibiotika

Bakterie jsou všudypřítomné organizmy, které mohou v závislosti na bakteriálním druhu a na konkrétním stavu jedince vyvolat bakteriální infekce. Lidský organizmus se často těmto infekcím ubrání díky reakcím imunitního systému bez zjevných známek onemocnění. Některé z těchto infekcí však mohou u hostitele způsobit příznaky, které vyžadují zásah pomocí protiinfekčních látek. Mezi tyto protiinfekční látky lze zařadit dvě skupiny, a to antibiotika, dříve produkty organismů, dnes je však řada z nich vyráběna polysynteticky nebo synteticky, a druhá skupina nazývaná chemoterapeutika, již plně syntetizovaná léčiva. Obě skupiny působí buď mechanismem baktericidním, kdy jsou mikroby usmrcovány, nebo bakteriostaticky, kdy je růst a množení mikrobů zastavováno.

B-laktamy

Skupina, jejímž prototypem je penicilin, zahrnuje celou řadu derivátů, jejichž společná struktura je betalaktamový kruh, na který jsou navázané různé substituenty. Podle povahy substituentů se tato rozsáhlá skupina dělí do dalších podskupin. Klasické peniciliny se dělí na dvě skupiny dle odolnosti vůči kyselému prostředí v žaludku. Acidolabilní, které lze podávat injekčně, zastupuje například benzylpenicilin. Pro perorální podání lze použít fenoxymethylpenicilin. Obě dvě skupiny působí dobře na řadu grampozitivních i gramnegativních bakterií. Další významné deriváty zahrnují aminopeniciliny, karboxypeniciliny. Obecně mají peniciliny nízkou toxicitu, nejvýznamnější je alergická reakce, která může u citlivých jedinců vyústit až v anafylaktický šok.

Druhá skupina betalaktamů zahrnuje cefalosporiny, které se dělí do pěti generací. Tyto skupiny antibiotik mají široké spektrum účinku, které se liší dle generace. První dvě skupiny jsou účinné zejména na grampozitivní bakterie. Třetí

generace působí na gramnegativní druhy a dvě nejnovější generace mají široké spektrum účinku na obě dvě skupiny bakterií včetně druhů *Pseudomonas aeruginosa* a MRSA. Jejich toxicita a případné vedlejší negativní účinky jsou nižší než u klasických penicilinů (Lincová, 2007).

Mezi skupinu betalaktamů se řadí i tzv. atypické betalaktamy. Do této skupiny patří karbapenemy a monobaktamy, které lze využít jako rezervní antibiotika v případě, kdy jsou předchozí skupiny betalaktamů neúčinné nebo jsou špatně snášeny. Ze skupiny monobaktamů je dnes jediným klinicky využívaným zástupcem aztreonam, který má účinek na aerobní gramnegativní bakterie. Naproti tomu karbapenemy mají ze všech betalaktamů nejširší spektrum účinku a hodí se tak k terapii nemocničních a život ohrožujících infekcí. Mezi zástupce patří imipenem, meropenem a ertapenem (Lüllmann et al., 2012).

Tetracykliny

Deriváty tetracyklinů mají obecně velmi široké spektrum účinku nejen na bakterie, ale i na některé prvoky. Nevýhodou terapie tetracykliny jsou ovšem časté vedlejší nežádoucí účinky, což je dáno potlačením nejen patogenů, ale i fyziologické mikroflóry. Výsledkem jsou časté gastrointestinální potíže (Chopra et al., 2001). Nepříznivě ovlivňují také osteosyntézu a žlutě zbarvují zuby, tudíž se nemůžou podávat těhotným ženám a dětem do 18 let. U nás se používá především doxycyklin a semisyntetický derivát tigecyklin (Hynie, 2003).

Chloramfenikoly

V praxi se dnes používá především derivát izolovaný ze streptomycet, chloramfenikol, který má široké spektrum účinku na řadu aerobních a anaerobních bakterií. Pro svoji vysokou toxicitu se ovšem používá pouze v indikovaných případech. Jeho hlavní užití je léčba infekcí CNS, například bakteriální meningitidy (Hynie, 2003).

Aminoglykosidy

Jedná se o skupinu širokospektrých antibiotik s rychlým baktericidním účinkem, které jsou vhodné pro léčbu sepsí a závažných orgánových infekcí. Chemicky se jedná o oligosacharidy složené z neobvyklých aminoglykosidů, jejichž hlavním zástupcem jsou amikacin a gentamycin. Podávají se pouze parenterálně z důvodu nevstřebatelnosti po perorálním podání a jsou dobře účinná na aerobní gramnegativní bakterie, dále na stafylokoky a mykobakterie. Nejvýznamnější vedlejší účinky zahrnují neurotoxicitu, nefrotoxicitu a ototoxicitu, která může vést až k hluchotě. Řada látek s touto strukturou má lokální použití (Hynie, 2003).

Makrolidy

Základem jejich struktury je makrocyklus, na který jsou vázány neobvyklé monosacharidy. Základní derivát, erytromycin, lze podávat perorálně a jeho spektrum účinku je podobné penicilinu. Z vedlejších účinků se často objevují gastrointestinální potíže, po dlouhodobém podávání může dojít k hepatotoxicitě nebo ototoxicitě. Dnes se uplatňují novější deriváty s výhodnějšími vlastnostmi a nižším výskytem nežádoucích účinků. Mezi tyto látky patří klaritromycin a azitromycin, u kterých se může objevit průjem, nevolnost a bolesti břicha (Piscitelli et al., 1992).

Linkosamidy

Základem jejich struktury je prolin, na kterém je navázán aminocukr. V praxi se používají především dva deriváty, linkomycin a klindamycin. Dobře účinkují na grampozitivní bakterie, mimo enterokoků. Výhodou je malá toxicita, nejčastěji se vyskytuje průjem (Hynie, 2003).

Polypeptidy

Do skupiny polypeptidových antibiotik patří látky, které se pro značnou toxicitu užívají především lokálně. Z této skupiny se používají polymyxiny, které působí na většinu gramnegativních bakterií, především v ušních a očních kapkách. V systémové

terapii se uplatňuje kolistin, léčí se jím infekce vyvolané druhem *Pseudomonas aeruginosa*. Nevýhodou přípravků je značná nefrotoxicita a špatná pronikavost do tkání (Hynie, 2003).

Glykopeptidy

Skupina baktericidních antibiotik, které se používají především na infekce způsobené grampozitivními bakteriemi. Základní glykopeptidové antibiotikum z této skupiny, vankomycin, se používá při léčbě infekcí vyvolaných rezistentními stafylokoky, enterokoky nebo *Clostridium difficile*. Nežádoucí účinky zahrnují vysokou nefrotoxicitu, neurotoxicitu a ototoxicitu. Druhý glykopeptid, teikoplanin, je svým spektrem účinku podobný vankomycinu, jeho výhodou je lepší snášenlivost a menší toxicita (Hynie, 2003).

Chinolony a fluorchinolony

Jedná se o rozsáhlou skupinu syntetických antibiotik, které se dělí na starší, nefluorované chinolony, které se dnes uplatňují už jenom pouze u močových infekcí. Novější skupiny, fluorchinolony, jsou účinnější i méně toxické než klasické chinolony. Obecně mají nižší toxicitu a širší spektrum účinku zahrnující grampozitivní i gramnegativní bakterie, dále mykoplazmata, chlamydie a částečně i aerobní bakterie. Z nežádoucích účinků jsou významné gastrointestinální potíže, fototoxicita, někdy i neurologické a hematologické poruchy. Mezi často používané zástupce patří norfloxacin, ciprofloxacin a ofloxacin. Nevýhodou je stále narůstající rezistence, která je dána, mimo jiné, i častým užíváním těchto léčiv (Hynie, 2003).

Sulfonamidy

Tyto širokospektrá, bakteriostaticky působící chemoterapeutika zahrnují látky působící jak místním tak systémovým účinkem. První skupinu zahrnuje sulfathiazol, sulfadiazin a sulfacetamid, které mají význam při léčbě infikovaných popálenin a bércových vředů. Ze systémových sulfonamidů má dnes největší uplatnění

kotrimoxazol, což je kombinace sulfametoxazolu s trimetoprimem, který lze použít u pacientů s močovými nebo respiračními infekcemi (Hynie, 2003).

3.4 Vyšetření citlivosti bakterií

Ke zjištění, zda je mikrob citlivý ke konkrétní látce nebo skupině látek, nám slouží různé metody, které lze rozdělit na kvalitativní a kvantitativní. Kvantitativně je citlivost přímo vyjádřena minimální inhibiční koncentrací, nebo nepřímo, průměrem inhibiční zóny kolem disku. Minimální inhibiční koncentrace je pojem, který vyjadřuje nejnižší koncentraci antibiotika v živné půdě, která zamezí viditelný nárůst naočkované kultury. Tato koncentrace se vyjadřuje v $\mu\text{g/ml}$.

Popis metod stanovující citlivosti bakterií k antimikrobním látkám

Diluční test v bujonu

Bujonový test se provádí v polystyrénových mikrotitračních destičkách s dvanácti sloupci a osmi řadami jamek. Pro jedno antibiotikum se používá osm různých koncentrací, které se připraví dvojnásobným ředěním základního antibiotika. Po inkubaci se odečítá růst proti kontrole. Dilučním testem se zjišťuje tzv. minimální inhibiční koncentrace (MIC), což je minimální koncentrace antibiotika, která se porovnává s tzv. breakpointem. Breakpoint (hraniční koncentrace) pro jednotlivá antibiotika v $\mu\text{g/ml}$ kategorizuje konkrétní mikrob na citlivý nebo rezistentní. MIC odpovídá první nezakalené jamce (nejnižšímu ředění antibiotika, kde není viditelný růst). Výhody tohoto testu spočívají v možnosti otestování antimikrobní látky k několika různým bakteriálním druhům nebo (častěji) otestování citlivosti jednoho mikroba k více antibiotikům zároveň. Nevýhodou je případné hodnocení bakteriální kontaminace. Tento test byl používán při zjišťování MIC v této diplomové práci (Schindler, 2010).

Diskový difúzní test

Správný výsledek tohoto testu závisí na mnoha faktorech, proto musí být postup přísně standardizován. Tento test se provádí na tak zvaném MH (Mueller – Hinton) agaru, nalitém do Petriho misky. PH půdy je 7,2 – 7,4. K očkování se využívají suspenze bakterií čtyř nebo pěti kolonií ve fyziologickém roztoku, které se porovnávají se zákalovým standardem, který odpovídá koncentraci 10^8 CFU/ml nebo se zákal měří pomocí denzitometru. Očkuje se rovnoměrným rozetřením suspenze vatovým tamponem po povrchu plotny. Na naočkovanou plotnu se nanese šest disků s předepsaným množstvím antibiotika. Nechá se inkubovat 18 - 24 hodin. Poté se měří průměry inhibičních zón (IZ). V závislosti na velikosti IZ v mm se mikrob kategorizuje jako citlivý, rezistentní nebo intermediárně citlivý k testovanému antibiotiku dle tabulkových hodnot. Odečet IZ se provádí vizuálně nebo pomocí automatických čtecích a vyhodnocovaných systémů. Výhodou tohoto testu je jednoduchost provedení, cenová dostupnost a možnost vyhodnotit některé fenomény rezistence (Schindler, 2010).

Diluční test v agaru

I v tomto testu se používají Petriho misky, ve kterých je vylit agar s příměsí antibiotika s různou koncentrací. Na jednu plotnu se bodově naočkuje 30 až 40 kmenů najednou. Po inkubaci se odečítá růst kolonie. Plotna, kde se již neobjevuje růst, obsahuje MIC antibiotika. Interpretuje se dle tabulek. Metoda pro svou technickou náročnost není vhodná pro rutinní praxi a používá se především v referenčních laboratořích. Výhodou tohoto testu je otestování vyššího počtu kmenů k jednomu antibiotiku (Bednář et al., 1996).

E-test

Tento test se někdy nazývá také gradientová difúzní metoda na agaru. Provádí se tak, že se na agar přiloží proužek, který je napuštěný rostoucí koncentrací antibiotika. Po přilnutí se difúzí vytvoří kontinuální gradient antibiotika podél proužku a kolmo od něj. Vytvořená inhibiční zóna má tvar protáhlé kapky. V místě, kde zóna protíná E-testový proužek, odečítáme hodnotu MIC. Výhodou tohoto testu je

jednoduchá manipulace a snadné provedení. Nevýhodou je poměrně vysoká cena (Bednář et al., 1996).

4 Praktická část

4.1 Použitý materiál

Pomůcky:

Sterilní mikrotitrační destičky s víčky, mikropipety, sterilní špičky, dvanácti jamkový rezervoár na médium, sterilní zkumavky, stojánky na zkumavky, očkovací kličky

Přístroje:

Laminární box, termostat, denzitometr, vortex

Testované kmeny bakterií a jejich zkratky:

Staphylococcus aureus **SA**

Staphylococcus aureus – methicilin rezistentní **MRSA**

Staphylococcus epidermidis **SE**

Enterococcus faecalis **EF**

Escherichia coli **EC**

Klebsiella pneumoniae **KP**

Klebsiella pneumoniae ESBL pozitivní **KP ESBL**

Pseudomonas aeruginosa **PA**

Testované koncentrace látky v $\mu\text{mol.l}^{-1}$:

500; 250; 125; 62,5; 31,25; 15,625; 7,813; 3,906; 1,953; 0,977; 0,488

Testované látky:

1. Salicylanilidové *N*-monosubsituované a *N,N*-disubsituované karbamáty a thiokarbamáty
2. Sulfonamidové močoviny
3. Amidy odvozené od sulfathiazolu
4. Deriváty rhodaninu
5. Deriváty nitrobenzamidů a derivátů močoviny

Vlastní postup:

1. Příprava suspenzí testovaných kmenů bakterií
2. Příprava ředící řady testované látky
3. Pipetování do destičky
4. Vyhodnocení

1. Příprava suspenzí testovaných kmenů bakterií

Všechny bakteriální kmeny mají svoji sterilní zkumavku, která je označena zkratkou testovaného kmene. Do každé této zkumavky napipetujeme 3 ml sterilní vody. Poté z kultury bakterií, které narostly na živném agaru, odebereme malou část kolonie a resuspendujeme ji ve sterilní vodě ve zkumavce. Zkumavku poté promícháme na vortexu a změříme hustotu suspenze, která odpovídá 0,5 stupňů McFarlanda.

2. Příprava ředící řady testované látky

Navážku testované látky rozpustíme v objemu DMSO tak, aby první testovaná koncentrace byla $500 \mu\text{mol.l}^{-1}$ a zároveň koncentrace DMSO v jamce nepřesáhla 1 %. K výpočtu objemu DMSO používáme vzorec

$$V_{\text{DMSO}} = m / c \times M \times 100$$

kde m značí navážku testované látky v gramech, c je první testovaná koncentrace $500 \mu\text{mol.l}^{-1}$ a M je molární hmotnost testované látky. Pokud se testovaná látka v DMSO vysráží nebo se nerozpustí, přidáme druhý, popřípadě třetí ekvivalent rozpouštědla. Každým přidáním rozpouštědla se tak posouvá první testovaná koncentrace o jedno, popřípadě dvě ředění dozadu.

Do sterilní zkumavky, kterou si označíme číslem jedna, napipetujeme 1,98 ml růstového média a přidáme 20 μl rozpuštěné testované látky. Promícháme na vortexu a zkontrolujeme, zda se látka v růstovém médiu nevysrážela. Pokud k vysrážení nedošlo, přistoupíme k dalšímu kroku. Pokud došlo k vysrážení, k látce přidáme druhý, popřípadě třetí ekvivalent růstového média. Každým přidáním ekvivalentu růstového média se posouvá první testovaná koncentrace o jedno ředění dozadu. Tímto se získá pracovní roztok první testované koncentrace, který sterilně přemístíme do první jamky dvanácti jamkového rezervoáru.

Do dalších deseti sterilních zkumavek, které si označíme čísly 2 - 11, si připravíme dvojkovou ředící řadu testované látky v DMSO, nejprve do každé zkumavky napipetujeme 0,5 ml DMSO. Do první zkumavky, která je označená číslem 2 si napipetujeme 0,5 ml testované látky rozpuštěné v DMSO, řádně promícháme a přeneseme 0,5 ml do zkumavky číslo 3, následuje přenesení 0,5 ml do zkumavky číslo 4, tento postup pokračuje až po zkumavky číslo 11.

Do jamek číslo 2 – 12 dvanácti jamkového rezervoáru napipetujeme 1,98 ml růstového média a přidáme 20 μl naředěné testované látky (tzn. ze zkumavky číslo 2 do jamky číslo 2 atd.). Do poslední jamky rezervoáru přidáme 20 μl samotného DMSO, tato jamka slouží jako kontrola. V každé jamce rezervoáru tak získáme 20 ml pracovního roztoku s příslušnou koncentrací testované látky a jednu jamku jako kontrolu.

3. Pipetování do destičky

Nejdříve si nachystáme destičku, kde si jednotlivé řádky označíme zkratkami bakteriálních kmenů. Mikrotitrační destička je složena z osmi řádků a dvanácti sloupců. Každý bakteriální kmen má tak svůj řádek s příslušnými koncentracemi testované látky. Pomocí dvanácti kanálové pipety napipetujeme 200 μl příslušného zásobního roztoku do všech řádků jedné

mikrotitrační destičky. Poté do každé jamky jednoho řádku napipetujeme 10 μ l připravené suspenze bakteriálního druhu.

Po napipetování všech suspenzí do příslušných řádků destičku přikryjeme víčkem a necháme inkubovat v termostatu při teplotě 35° C.

4. Vyhodnocení

Po uplynutí inkubační doby, která je 24h a 48h, hodnotíme nárůst v jamkách. Koncentrace látky, která inhibuje růst bakterie, odpovídá jamce, ve které dojde k potlačení růstu bakterie o 95 %.

4.2 Výsledky

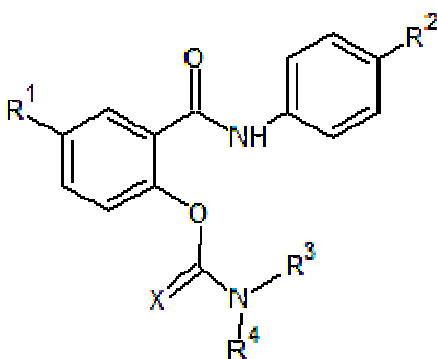
V rámci této diplomové práce bylo celkem hodnoceno 58 látek z pěti různých skupin. Látky z každé skupiny jsou rozděleny do tabulek a následně je zhodnocena jejich účinnost.

4.2.1 Rozdělení jednotlivých skupin látek dle chemické struktury

Testované látky byly rozděleny podle jejich chemické struktury do pěti skupin. Následně byla testována MIC dle výše uvedeného postupu.

1. Salicylanilidové N-monosubstituované deriváty a N,N-disubstituované karbamáty a thiokarbamáty

Tato skupina obsahovala největší množství testovaných látek, proto jsou jednotlivé látky pro větší přehlednost rozděleny do skupin po pěti. Celkem bylo v této skupině otestováno 35 látek.



Tabulka 1 Salicylanilidové deriváty

Kód látky	R ¹	R ²	R ³	R ⁴	X
SAL-1E	Cl	Cl	pentan-1,5-diyl		O
SAL-1F	Cl	Cl	3-oxapentan-1,5-diyl		O
SAL-1J	Cl	Cl	ethyl	fenyl	O
SAL-1K	Cl	Cl	methyl	benzyl	O
SAL-1L	Cl	Cl	H	3-fenylpropyl	O

KMEN	ID	TESTOVANÁ LÁTKA				
		SAL-1E	SAL-1F	SAL-1J	SAL-1K	SAL-1L
SA	24h	>125	>125	3,9	125	15,62
	48h	>125	>125	15,62	125	15,62
MRSA	24h	>125	>125	1,95	>125	15,62
	48h	>125	>125	3,9	>125	15,62
SE	24h	>125	>125	15,62	>125	125
	48h	>125	>125	15,62	>125	125
EF	24h	>125	>125	>500	>125	62,5
	48h	>125	>125	>500	>125	62,5
EC	24h	>125	>125	>500	>125	62,5
	48h	>125	>125	>500	>125	62,5
KP	24h	>125	>125	>500	>125	62,5
	48h	>125	>125	>500	>125	62,5
KP-E	24h	>125	>125	>500	>125	62,5
	48h	>125	>125	>500	>125	62,5
PA	24h	>125	>125	>500	>125	62,5
	48h	>125	>125	>500	>125	62,5

Z první skupiny salicylanilidových derivátů prokázala nejvyšší účinnost látka SAL-1J proti kmenům SA, MRSA a SE. Další účinná látka, SAL-1L, vykazovala středně silnou účinnost nebo slabou účinnost proti všem testovaným kmenům. Velmi nízkou účinnost vykazovala také látka SAL-1K proti kmenu SA, která se ovšem rozpouštěla až po přidání druhého ekvivalentu rozpouštědla.

Tabulka 2 Salicylanilidové deriváty

Kód látky	R ¹	R ²	R ³	R ⁴	X
SAL-1M	Cl	Cl	H	3-fenylpropyl	O
SAL-1N	Cl	Cl	H	4-fenylbutyl	O
SAL-2F	Cl	Br	3-oxapentan-1,5-diyl		O
SAL-2J	Cl	Br	ethyl	fenyl	O
SAL-2K	Cl	Br	methyl	benzyl	O

KMEN	ID	TESTOVANÁ LÁTKA				
		SAL-1M	SAL-1N	SAL-2F	SAL-2J	SAL-2K
SA	24h	1,95	7,81	>125	3,9	1,95
	48h	7,81	15,62	>125	3,9	1,95
MRSA	24h	3,9	3,9	>125	7,81	7,81
	48h	3,9	7,81	>125	7,81	7,81
SE	24h	7,81	7,81	>125	15,62	15,62
	48h	31,25	31,25	>125	15,62	15,62
EF	24h	>500	>125	>125	>125	>125
	48h	>500	>125	>125	>125	>125
EC	24h	>500	>125	>125	>125	>125
	48h	>500	>125	>125	>125	>125
KP	24h	>500	>125	>125	>125	>125
	48h	>500	>125	>125	>125	>125
KP-E	24h	>500	>125	>125	>125	>125
	48h	>500	>125	>125	>125	>125
PA	24h	>500	>125	>125	>125	>125
	48h	>500	>125	>125	>125	>125

Z druhé skupiny salicylanilidových derivátů se prokázaly jako účinné čtyři testované látky. První z nich, SAL-1M, se jako jediná rozpouštěla ve výchozí koncentraci rozpouštědla a byla středně účinná na první tři testované kmeny. Další tři účinné látky SAL-1N, SAL-1K a SAL-1J se rozpouštěly až ve druhém ekvivalentu rozpouštědla. Jejich účinnost je vykazována jako středně účinná na prvních třech testovaných kmenech.

Tabulka 3 Salicylanilidové deriváty

Kód látky	R ¹	R ²	R ³	R ⁴	X
SAL-1H	Cl	Cl	ethyl	ethyl	O
SAL-1I	Cl	Cl	ethyl	ethyl	S
SAL-2H	Cl	Br	ethyl	ethyl	O
SAL-2I	Cl	Br	ethyl	ethyl	S
SAL-3H	Cl	F	ethyl	ethyl	O

KMEN	ID	TESTOVANÁ LÁTKA				
		SAL-1H	SAL-1I	SAL-2H	SAL-2I	SAL-3H
SA	24h	500	>500	15,62	3,9	1,95
	48h	500	>500	15,62	3,9	1,95
MRSA	24h	>500	>500	15,62	7,81	7,81
	48h	>500	>500	15,62	7,81	7,81
SE	24h	250	500	15,62	15,62	15,62
	48h	250	500	15,62	15,62	15,62
EF	24h	>500	>500	>500	>500	>500
	48h	>500	>500	>500	>500	>500
EC	24h	>500	>500	>500	>500	500
	48h	>500	>500	>500	>500	500
KP	24h	>500	>500	>500	>500	500
	48h	>500	>500	>500	>500	500
KP-E	24h	>500	>500	>500	>500	500
	48h	>500	>500	>500	>500	500
PA	24h	>500	>500	>500	>500	500
	48h	>500	>500	>500	>500	500

Z třetí skupiny salicylanilidových derivátů se jako neúčinnější jeví látky SAL-2I, SAL-3H. Obě tyto látky vykazují středně silnou účinnost na kmeny SA, MRSA a SE, přičemž látky SAL-3H vyazuje ještě velmi slabou účinnost na kmeny EC, KP, KP-E. Dále mají slabou účinnost na kmen SE látky SAL-1H, SAL-1I.

Tabulka 4 Salicylanilidové deriváty

Kód látky	R ¹	R ²	R ³	R ⁴	X
SAL-3I	Cl	F	ethyl	ethyl	S
SAL-4H	Cl	CF ₃	ethyl	ethyl	O
SAL-4I	Cl	CF ₃	ethyl	ethyl	S
SAL-5H	H	H	ethyl	ethyl	O
SAL-5I	H	H	ethyl	ethyl	S

KMEN	ID	TESTOVANÁ LÁTKA				
		SAL-3I	SAL-4H	SAL-4I	SAL-5H	SAL-5I
SA	24h	31,25	>500	62,5	500	31,25
	48h	31,25	>500	62,5	500	31,25
MRSA	24h	>500	>500	500	>500	250
	48h	>500	>500	500	>500	250
SE	24h	31,25	500	62,5	250	31,25
	48h	31,25	500	62,5	250	31,25
EF	24h	>500	>500	>500	>500	>500
	48h	>500	>500	>500	>500	>500
EC	24h	>500	>500	>500	>500	500
	48h	>500	>500	>500	>500	500
KP	24h	>500	>500	>500	>500	500
	48h	>500	>500	>500	>500	500
KP-E	24h	>500	>500	>500	>500	500
	48h	>500	>500	>500	>500	500
PA	24h	>500	250	>500	>500	500
	48h	>500	250	>500	>500	500

Z čtvrté skupiny salicylanilidových derivátů vykazuje několik látek středně silnou nebo slabou účinnost. Za středně účinné jsou považovány látky SAL-3I, SAL-4I a SAL-5I. První z uvedených látek je účinná pouze na kmeny SA a SE. Podobnou účinnost na kmeny SA a SE má ještě látka SAL-5I, která dále vykazuje slabou účinnost na ostatní kmeny kromě EC. Látka SAL-4I má nízkou účinnost proti kmenům SA a SE a velmi nízkou účinnost proti kmenu MRSA.

Tabulka 5 Salicylanilidové deriváty

Kód látky	R ¹	R ²	R ³	R ⁴	X
SAL-3F	Cl	F	3-oxapentan-1,5-diyl		O
SAL-3G	Cl	F	butan-1,4-diyl		O
SAL-3J	Cl	F	ethyl	fenyl	S
SAL-3K	Cl	F	methyl	benzyl	O
SAL-4E	Cl	CF ₃	pentan-1,5-diyl		S

KMEN	ID	TESTOVANÁ LÁTKA				
		SAL-3F	SAL-3G	SAL-3J	SAL-3K	SAL-4E
SA	24h	>125	>125	125	31,25	>125
	48h	>125	>125	125	31,25	>125
MRSA	24h	>125	>125	125	31,25	>125
	48h	>125	>125	125	31,25	>125
SE	24h	>125	>125	>250	31,25	>125
	48h	>125	>125	>250	31,25	>125
EF	24h	>125	>125	>250	>250	>125
	48h	>125	>125	>250	>250	>125
EC	24h	>125	>125	>250	>250	>125
	48h	>125	>125	>250	>250	>125
KP	24h	>125	>125	>250	>250	>125
	48h	>125	>125	>250	>250	>125
KP-E	24h	>125	>125	>250	>250	>125
	48h	>125	>125	>250	>250	>125
PA	24h	>125	>125	>250	>250	>125
	48h	>125	>125	>250	>250	>125

Z páté skupiny salicylanilidových derivátů vykazovala středně silnou účinnost na první tři testované kmeny pouze jedna látka, a to SAL-3K. Další látkou z této skupiny vykazující nízkou účinnost proti kmenům SA a MRSA byla SAL-3J.

Tabulka 6 Salicylanilidové deriváty

Kód látky	R ¹	R ²	R ³	R ⁴	X
SAL-4J	Cl	CF ₃	ethyl	fenyl	O
SAL-4M	Cl	CF ₃	H	4-fenylbutyl	O
SAL-4N	Cl	CF ₃	H	1-fenylethyl	O
SAL-5E	H	H	pentan-1,5-diyl		O
SAL-5G	H	H	butan-1,4-diyl		O

KMEN	ID	TESTOVANÁ LÁTKA				
		SAL-4J	SAL-4M	SAL-4N	SAL-5E	SAL-5G
SA	24h	3,9	0,98	125	>500	125
	48h	3,9	0,98	125	>500	125
MRSA	24h	15,62	1,95	125	>500	>500
	48h	15,62	1,95	125	>500	>500
SE	24h	31,25	3,9	125	>500	500
	48h	31,25	3,9	125	>500	500
EF	24h	>250	125	125	>500	>500
	48h	>250	125	125	>500	>500
EC	24h	>250	>125	>250	>500	>500
	48h	>250	>125	>250	>500	>500
KP	24h	>250	>125	>250	>500	>500
	48h	>250	>125	>250	>500	>500
KP-E	24h	>250	>125	>250	>500	>500
	48h	>250	>125	>250	>500	>500
PA	24h	>250	>125	>250	>500	>500
	48h	>250	>125	>250	>500	>500

Šestá skupina salicylanilidových derivátů obsahuje opět několik účinných látek. Jako neúčinnější se jeví látky SAL-4J a SAL-4M. Obě látky vykazují vysokou účinnost proti bakteriálnímu kmenu SA. Látka SAL-4M navíc vykazuje vysokou účinnost proti kmenům MRSA a SE a nízkou účinnost proti kmenu EF. Tato látka se rozpouštěla až po přidání druhého ekvivalentu rozpouštědla. Další látky vykazující slabou účinnost jsou SAL-4N a SAL-5G.

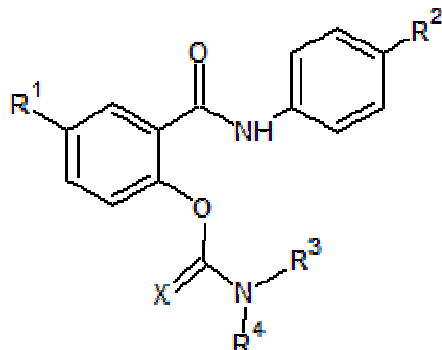
Tabulka 7 Salicylanilidové deriváty

Kód látky	R ¹	R ²	R ³	R ⁴	X
SAL-5J	H	H	ethyl	fenyl	O
SAL-5K	H	H	methyl	benzyl	O
SAL-5L	H	H	H	3-fenylpropyl	O
SAL-5M	H	H	H	4-fenylbutyl	O
SAL-5N	H	H	H	1-fenylethyl	O

KMEN	ID	TESTOVANÁ LÁTKA				
		SAL-5J	SAL-5K	SAL-5L	SAL-5M	SAL-5N
SA	24h	250	>500	31,25	>500	250
	48h	250	>500	31,25	>500	250
MRSA	24h	250	>500	62,5	>500	250
	48h	250	>500	62,5	>500	250
SE	24h	125	>500	125	>500	500
	48h	125	>500	125	>500	500
EF	24h	>250	>500	>125	>500	>500
	48h	>250	>500	>125	>500	>500
EC	24h	>250	>500	>125	>500	>500
	48h	>250	>500	>125	>500	>500
KP	24h	>250	>500	>125	>500	>500
	48h	>250	>500	>125	>500	>500
KP-E	24h	>250	>500	>125	>500	>500
	48h	>250	>500	>125	>500	>500
PA	24h	>250	>500	>125	>500	>500
	48h	>250	>500	>125	>500	>500

Poslední skupina salicylanilidových derivátů obsahuje pouze jednu středně účinnou látku, to je SAL-5L. Tato látka vykazuje účinnost na kmeny SA, MRSA a SE. Mezi další látky, které vykazují slabou účinnost proti výše jmenovaným bakteriálním kmenům, se řadí SAL-5J a SAL-5N.

Některé látky z výše uvedené skupiny se nerozpouštěly ani po přidání druhého ekvivalentu rozpouštědla nebo se v daném rozpouštědle srážely. Tyto látky tudíž nemohly být testovány. Přehled těchto látek uvádí tabulka 8.

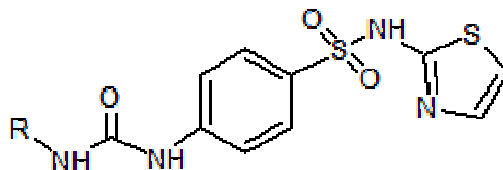


Tabulka 8 Salicylanilidové deriváty

Kód látky	R1	R2	R3	R4	X
SAL-1G	Cl	Cl	butan-1,4-diyl		O
SAL-2E	Cl	Br	pentan-1,5-diyl		O
SAL-2G	Cl	Br	butan-1,4-diyl		O
SAL-3E	Cl	F	pentan-1,5-diyl		O
SAL-4F	Cl	CF ₃	3-oxapentan-1,5-diyl		O
SAL-4G	Cl	CF ₃	butan-1,4-diyl		O
SAL-4K	Cl	CF ₃	methyl	benzyl	O
SAL-4L	Cl	CF ₃	H	3-fenylpropyl	O
SAL-5F	H	H	3-oxapentan-1,5-diyl		O

2. Sulfonamidové močoviny

Celkem bylo v této skupině testováno 15 látek, přičemž obecně vykazovaly nízkou účinnost.



Tabulka 9 Sulfonamidové močoviny

Kód látky	R
STZ-Cy	cyklohexyl
STZ-Phe	fenyl
STZ-Ben	benzyl
STZ-PhEt	fenethyl
STZ-Ada	adamantan-1-yl

KMEN	ID	TESTOVANÁ LÁTKA				
		STZ-Cy	STZ-Phe	STZ-Ben	STZ-PhEt	STZ-Ada
SA	24h	500	>500	>500	250	>500
	48h	>500	>500	>500	250	>500
MRSA	24h	250	>500	>500	250	>500
	48h	500	>500	>500	250	>500
SE	24h	500	>500	>500	>500	>500
	48h	500	>500	>500	>500	>500
EF	24h	>500	>500	>500	>500	>500
	48h	>500	>500	>500	>500	>500
EC	24h	>500	>500	>500	>500	>500
	48h	>500	>500	>500	>500	>500
KP	24h	>500	>500	>500	>500	>500
	48h	>500	>500	>500	>500	>500
KP-E	24h	>500	>500	>500	>500	>500
	48h	>500	>500	>500	>500	>500
PA	24h	500	>500	>500	>500	>500
	48h	>500	>500	>500	>500	>500

Ze skupiny sulfonamidových močoviny se jako nejúčinnější prokázala látka STZ-PhEt proti kmenům SA, MRSA. Dále nízkou účinností vykazovala látka STZ-Cy na kmene SA, MRSA, SE a PA, u kmene SA a PA ovšem pouze po době inkubace 24 hodin.

Tabulka 10 Sulfonamidové močoviny

Kód látky	R
STZ-U-1	methyl
STZ-2	ethyl
STZ-3	propyl
STZ-4	butyl
STZ-5	pentyl

KMEN	ID	TESTOVANÁ LÁTKA				
		STZ-U-1	STZ-2	STZ-3	STZ-4	STZ-5
SA	24h	125	>500	>500	250	>500
	48h	125	>500	>500	250	>500
MRSA	24h	125	>500	>500	500	>500
	48h	125	>500	>500	500	>500
SE	24h	250	>500	>500	>500	>500
	48h	250	>500	>500	>500	>500
EF	24h	>500	>500	>500	>500	>500
	48h	>500	>500	>500	>500	>500
EC	24h	>500	>500	>500	>500	>500
	48h	>500	>500	>500	>500	>500
KP	24h	>500	>500	>500	>500	>500
	48h	>500	>500	>500	>500	>500
KP-E	24h	>500	>500	>500	>500	>500
	48h	>500	>500	>500	>500	>500
PA	24h	500	>500	>500	>500	>500
	48h	>500	>500	>500	>500	>500

Další látky ze skupiny sulfonamidových močovín vykazovaly podobný výsledek. Nízkou účinnost měly látky STZ-U-1 a STZ-4 proti kmenům SA a MRSA, STZ-U-1 navíc proti kmenu SE. Ostatní látky byly neúčinné.

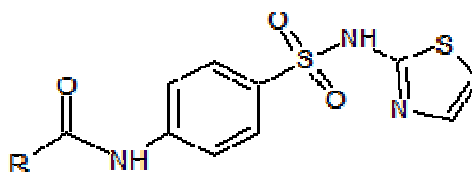
Tabulka 11 Sulfonamidové močoviny

Kód látky	R
STZ-6	hexyl
STZ-7	heptyl
STZ-8	oktyl
STZ-9	nonyl
STZ-10	decyl

KMEN	ID	TESTOVANÁ LÁTKA				
		STZ-6	STZ-7	STZ-8	STZ-9	STZ-10
SA	24h	>500	>500	>500	500	>500
	48h	>500	>500	>500	500	>500
MRSA	24h	>500	>500	>500	500	>500
	48h	>500	>500	>500	500	>500
SE	24h	>500	>500	>500	>500	>500
	48h	>500	>500	>500	>500	>500
EF	24h	>500	>500	>500	>500	>500
	48h	>500	>500	>500	>500	>500
EC	24h	>500	>500	>500	>500	>500
	48h	>500	>500	>500	>500	>500
KP	24h	>500	>500	>500	>500	>500
	48h	>500	>500	>500	>500	>500
KP-E	24h	>500	>500	>500	>500	>500
	48h	>500	>500	>500	>500	>500
PA	24h	>500	>500	>500	>500	>500
	48h	>500	>500	>500	>500	>500

Látky z poslední tabulky této skupiny byly otestovány jako neúčinné. Velmi nízkou účinností na kmeny SA a MRSA vykazuje pouze látka STZ-9.

3. Amidy odvozené od sulfathiazolu



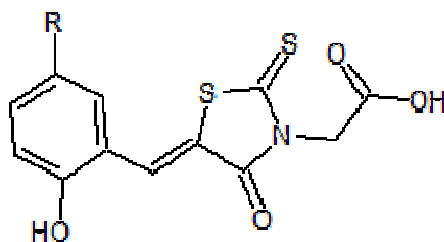
Tabulka 12 Amidy odvozené od sulfathiazolu

Kód látky	R
STZ-IN	pyridin-4-yl
STZ-NI	pyridin-3-yl
STZ-PZ	pyridin-2-yl

KMEN	ID	TESTOVANÁ LÁTKA		
		STZ-IN	STZ-NI	STZ-PZ
SA	24h	62,5	>500	>500
	48h	250	>500	>500
MRSA	24h	>500	>500	>500
	48h	>500	>500	>500
SE	24h	250	>500	500
	48h	250	>500	>500
EF	24h	>500	>500	>500
	48h	>500	>500	>500
EC	24h	>500	>500	>500
	48h	>500	>500	>500
KP	24h	>500	>500	>500
	48h	>500	>500	>500
KP-E	24h	>500	>500	>500
	48h	>500	>500	>500
PA	24h	>500	>500	>500
	48h	>500	>500	>500

Z této skupiny byli testováni pouze tři zástupci. Jako nejúčinnější se jevila látka STZ-IN, která vykazovala středně silnou účinnost na kmen SA, ovšem pouze po době inkubace 24 hodin. Po 48 hodinách se jevila pouze jako slabě účinná. Tato látka vykazovala také slabou účinnost proti kmenu SE. Velmi nízká účinnost byla zaznamenána také u látky STZ-PZ proti kmenu SE po době inkubace 24 hodin.

4. Deriváty rhodaninu



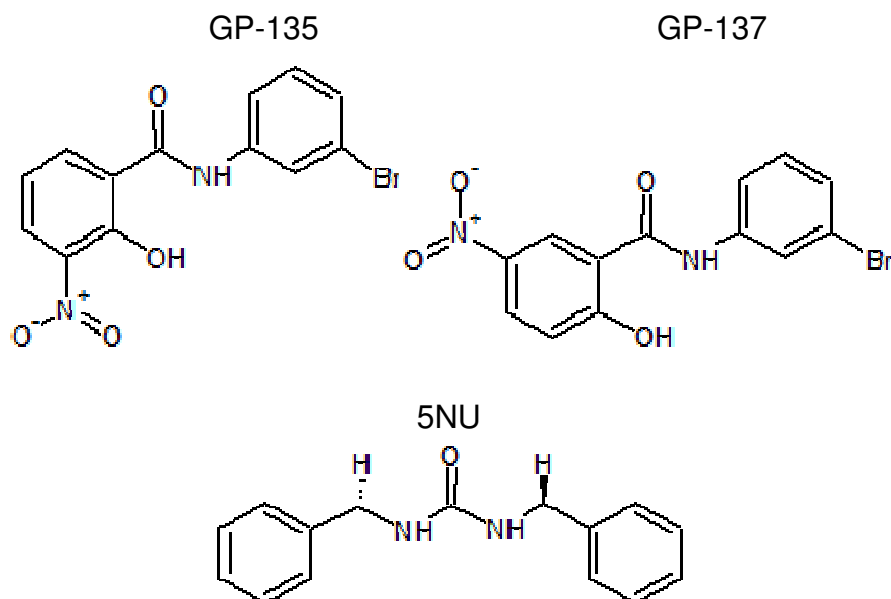
Tabulka 13 Deriváty rhodaninu

Kód látky	R
TZK-4	Cl
TZK-5	Br

KMEN	ID	TESTOVANÁ LÁTKA	
		TKZ-4	TKZ-5
SA	24h	250	250
	48h	250	250
MRSA	24h	125	125
	48h	125	125
SE	24h	62,5	62,5
	48h	62,5	62,5
EF	24h	15	500
	48h	500	500
EC	24h	500	500
	48h	>500	500
KP	24h	>500	>500
	48h	>500	>500
KP-E	24h	>500	>500
	48h	>500	>500
PA	24h	>500	>500
	48h	>500	>500

Z této skupiny byly testovány pouze dvě látky, a to TZK- 4 a TZK- 5. Jako účinnější se stala látka TKZ-4, která jako první látka ze všech skupin vykazovala středně silnou účinnost proti kmenu EF po době inkubace 24 hodin, dále vykazovala slabou účinnost na kmeny SA, MRSA, a SE. Látka TZK-5 má podobnou účinnost, hlavní rozdíl je nízká účinnosti proti kmenům EF a EC.

5. Deriváty nitrobenzamidů a derivát močoviny



Tabulka 14 Deriváty nitrobenzamidů a derivát močoviny

KMEN	ID	TESTOVANÁ LÁTKA		
		GP-135	GP-137	5NU
SA	24h	>500	250	>125
	48h	>500	250	>125
MRSA	24h	>500	250	>125
	48h	>500	250	>125
SE	24h	>500	500	>125
	48h	>500	500	>125
EF	24h	>500	>500	>125
	48h	>500	>500	>125
EC	24h	>500	>500	>125
	48h	>500	>500	>125
KP	24h	>500	>500	>125
	48h	>500	>500	>125
KP-E	24h	>500	>500	>125
	48h	>500	>500	>125
PA	24h	>500	>500	>125
	48h	>500	>500	>125

Z poslední skupiny se jako slabě účinná jevila látka GP-137 na kmeny SA, MRSA a SE. Zbylé dvě látky nejevily žádnou účinnost, přičemž látka 5NU, se rozpouštěla až po přidání druhého ekvivalentu rozpouštědla.

4.2.2 Rozdělení jednotlivých účinných látek dle jejich působení na bakteriální kmeny

Bakteriální kmeny se liší svojí citlivostí vůči testovaným látkám. Následující tabulky (tabulka 15 - 22) uvádějí přehled všech látek, které působily na konkrétní bakteriální kmeny. Látky jsou rozděleny dle MIC a doby inkubace.

1. *Staphylococcus aureus*

Tento bakteriální kmen vykazoval nejvyšší citlivost vůči testovaným látkám.

Tabulka 15 Látky působící na kmen *Staphylococcus aureus*

<i>Staphylococcus aureus</i>										
ID	MIC									
	0,98	1,95	3,9	7,81	15,62	31,25	62,5	125	250	500
24hod	SAL-4M	SAL-1M	SAL-1J	SAL-1N	SAL-1L	SAL-3I	SAL-4I	SAL-1K	SAL-5N	SAL-1H
		SAL-2K	SAL-2J		SAL-2H	SAL-5I	STZ-IN	SAL-3J	SAL-5J	SAL-5H
		SAL-3H	SAL-2I			SAL-3K		SAL-4N	STZ-Phe	STZ-Cy
			SAL-4J			SAL-5L		SAL-5G	STZ-4	STZ-9
							STZ-U-1	TKZ-4		
								TKZ-5		
								GP-137		
48hod	SAL-4M	SAL-2K	SAL-2J	SAL-1M	SAL-1L	SAL-3I	SAL-4I	SAL-1K	SAL-5N	SAL-1H
		SAL-3H	SAL-2I		SAL-1J	SAL-5I		SAL-3J	SAL-5J	SAL-5H
			SAL-4J		SAL-1L	SAL-3K		SAL-4N	STZ-Phe	STZ-9
			SAL-2I		SAL-1N	SAL-5L		SAL-5G	STZ-4	
			SAL-4J		SAL-2H			STZ-U-1	STZ-IN	
					SAL-2H				TKZ-4	
									TKZ-5	
								GP-137		

Z tabulky je patrné, že látka, která působila nejvyšším účinkem na tento bakteriální kmen, byla látka SAL-4M. Mezi další látky, které vykazovaly proti tomuto kmeni vysokou účinnost, byly látky SAL-1M (po době inkubace 48 hodin látka působila už jen jako středně účinná), SAL-2K a SAL-3H.

2. Methicilin rezistentní *Staphylococcus aureus*

Tabulka 16 Látky působící na kmen Methicilin rezistentní *Staphylococcus aureus*

Methicilin rezistentní <i>Staphylococcus aureus</i>										
ID	MIC									
	0,98	1,95	3,9	7,81	15,62	31,25	62,5	125	250	500
24hod	SAL-1J	SAL-1M	SAL-2J	SAL-1L	SAL-3K	SAL-5L	SAL-3J	SAL-5I	SAL-4I	
	SAL-4M	SAL-1N	SAL-2K	SAL-2H			SAL-4N	SAL-5J	STZ-4	
			SAL-2I	SAL-4J			STZ-U-1	SAL-5N	STZ-9	
			SAL-3H				TKZ-4	STZ-Cy		
48hod	SAL-4M	SAL-1J	SAL-1N	SAL-1L	SAL-3K	SAL-5L	SAL-3J	SAL-5I	SAL-4I	
		SAL-1M	SAL-2J	SAL-2H			SAL-4N	SAL-5J	STZ-Cy	
			SAL-2K	SAL-4J			SZU-U-1	SAL-5N	STZ-4	
			SAL-2I				TKZ-4	STZ-PhEt	STZ-9	
		SAL-3H				TKZ-5	GP-137			

Nejvyšší účinnost proti kmenu MRSA vykazovaly látky SAL-1J a SAL-1M, obě tyto látky vykazovaly silnou účinnost po celou dobu inkubace. Další látka, která se prokazuje silnou účinností je látka SAL-1M.

3. *Styphylococcus epidermidis*

Tabulka 17 Látky působící na kmen *Staphylococcus epidermidis*

<i>Staphylococcus epidermidis</i>										
ID	MIC									
	0,98	1,95	3,9	7,81	15,62	31,25	62,5	125	250	500
24hod		SAL-4M	SAL-1M	SAL-1J	SAL-3I	SAL-4I	SAL-1L	SAL-1H	SAL-1I	
			SAL-1N	SAL-2J	SAL-5I	TKZ-4	SAL-4N	SAL-5H	SAL-4H	
				SAL-2K	SAL-3K	TKZ-5	SAL-5J	STZ-U-1	SAL-5G	
				SAL-2H	SAL-4J		SAL-5L	STZ-IN	SAL-5N	
				SAL-2I					STZ-Cy	
				SAL-3H					STZ-PZ	
48hod		SAL-4M		SAL-1J	SAL-1M	SAL-4I	SAL-1L	SAL-1H	SAL-1I	
				SAL-2J	SAL-1N	TKZ-4	SAL-4N	SAL-5H	SAL-4H	
				SAL-2K	SAL-3I	TKZ-5	SAL-5J	STZ-U-1	SAL-5G	
				SAL-2H	SAL-5I		SAL-5L	STZ-IN	SAL-5N	
				SAL-2I	SAL-3K				STZ-Cy	
				SAL-3H	SAL-4J					

Kmen SE vykazoval citlivost vůči poměrně velkému množství testovaných látek. Většina těchto látek ovšem vykazovala pouze slabou nebo středně silnou účinnost. Největší účinnost vykazoval kmen SE vůči látce SAL-4M, a to po celou dobu inkubace.

4. *Enterococcus faecalis*

Tabulka 18 Látky působící na kmen *Enterococcus faecalis*

<i>Enterococcus faecalis</i>										
ID	MIC									
	0,98	1,95	3,9	7,81	15,62	31,25	62,5	125	250	500
24hod					TKZ-4			SAL-1L	SAL-4M	TKZ-5
								SAL-4N		
48hod							SAL-1L	SAL-4M	TKZ-4	
								SAL-4N	TKZ-5	

Z tabulky je zřejmé, že tento bakteriální kmen vykazoval citlivost pouze proti několika látkám. Nejsilněji působila látka TKZ-4, ovšem pouze po době inkubace 24 hodin. Další látky už působily pouze jako slabě nebo středně silně účinné.

5. *Escherichia coli*

Tabulka 19 Látky působící na kmen *Escherichia coli*

<i>Escherichia coli</i>										
ID	MIC									
	0,98	1,95	3,9	7,81	15,62	31,25	62,5	125	250	500
24hod							SAL-1L			SAL-3H SAL-5I TKZ-4 TKZ-5
48hod							SAL-1L			SAL-3H SAL-5I TKZ-5

Bakteriální kmen EC vykazoval středně silnou účinnost proti jediné látce, a to SAL-1L. Zbylé látky vykazovaly pouze velmi slabou účinnost, přičemž látka TKZ-4 pouze po době inkubace 24 hodin.

6. *Klebsiella pneumoniae*

Tabulka 20 Látky působící na kmen *Klebsiella pneumoniae*

<i>Klebsiella pneumoniae</i>										
ID	MIC									
	0,98	1,95	3,9	7,81	15,62	31,25	62,5	125	250	500
24hod							SAL-1L			SAL-3H SAL-5I
48hod							SAL-1L			SAL-3H SAL-5I

Tento bakteriální kmen vykazoval středně silnou účinnost proti látce SAL-1L. Další dvě látky vykazovaly velmi slabou účinnost po celou dobu inkubace. Celkově bakteriální kmen KP vykazoval rezistenci vůči testovaným látkám.

7. *Klebsiella pneumoniae* ESBL

Tabulka 21 Látky působící na kmen *Klebsiella pneumoniae* ESBL

<i>Klebsiella pneumoniae</i> ESBL										
ID	MIC									
	0,98	1,95	3,9	7,81	15,62	31,25	62,5	125	250	500
24hod							SAL-1L			SAL-3H SAL-5I
48hod							SAL-1L			SAL-3H SAL-5I

Tento bakteriální kmen vykazoval stejnou citlivost vůči látkám jako bakteriální kmen KP. Celkově tento kmen vykazoval rezistenci k testovaným látkám.

8. *Pseudomonas aeruginosa*

Tabulka 22 Látky působící na kmen *Pseudomonas aeruginosa*

<i>Pseudomonas aeruginosa</i>										
ID	MIC									
	0,98	1,95	3,9	7,81	15,62	31,25	62,5	125	250	500
24hod							SAL-1L			SAL-3H SAL-5I STZ-Cy STZ-U-1
48hod							SAL-1L			SAL-3H SAL-5I

Bakteriální kmen PA vykazoval citlivost pouze k látce SAL-1L, tato účinnost byla středně silná po celou dobu inkubace. Mezi další látky, které ovšem vykazovaly pouze velmi nízkou účinnost lze zařadit SAL-3H a SAL-3I. Látky STZ-Cy a STZ-U-1 vykazovaly velmi nízkou účinnost pouze po dobu inkubace 24 hodin.

5 Diskuze

Vývoj nových antimikrobních látek je stále jeden z nejdůležitějších bodů v oblasti farmaceutického výzkumu. Antibiotika v léčbě infekčních nemocí přinesly obrovský pokrok do oblasti medicíny a farmacie. V dnešní době se ovšem setkáváme s mnoha problémy, které souvisejí s léčbou pomocí těchto látek. Často nevhodná preskripce ze strany lékařů a pacientovo nerespektování dávkovacího režimu při užívání těchto látek má za následek narůstající antimikrobiální rezistenci, která se v posledních letech stává globálním problémem. Tato antimikrobiální rezistence se rozšiřuje nejen u starších kategorií těchto látek, ale ohroženy jsou i nejnovější skupiny antibiotik. Z evolučního hlediska se tak projevuje adaptabilita bakterií na měnící se podmínky prostředí a toto působení antibiotik jim umožňuje vývoj nových obranných mechanismů, které eliminují účinek léků a zajišťují jejich přežití. Zpomalení stále narůstající bakteriální rezistence se tak snaží řešit například farmaceutické firmy nebo zdravotnické organizace v podobě kampaní, které mají zvyšovat povědomí široké veřejnosti o správném užívání antibakteriálních látek (Dostál, 2012 [online]).

V posledních letech přesto vývoj nových antimikrobních látek stagnuje a nedostává se takových výsledků, které by problém budoucnosti antibakteriální léčby řešily. Vysoké náklady, nižší atraktivita z ekonomického pohledu oproti jiným skupinám léčiv, i rozšiřující se mechanismy vzniku rezistence bakterií nám tak pravděpodobně nebudou přinášet nová léčiva a maximální obezřetnost při indikaci, výběru správného léku a užívání budou zcela neodmyslitelnou nutností (Nyč, 2007, [online]).

V rámci této diplomové práce byly testovány nově syntetizované molekuly, to znamená molekuly s novou strukturou. Testování těchto potenciálně účinných látek proti jednotlivým bakteriálním kmenům je ovšem teprve první krok ve vývoji nové látky, která by se v budoucnosti mohla stát užívaným léčivem (Spellberg, 2014 [online]). Pokud by se některá testovaná látka ukázala jako velmi účinná proti konkrétnímu testovanému bakteriálnímu kmenu, její cesta může skončit v následných fázích vývoje, kdy se tato látka prokáže jako zcela nevhodná z důvodu toxicity nebo farmakokinetiky. To má za následek, že pouze zlomek látek z tisíce vyvinutých projde preklinickým testováním do dalších fází vývoje, kdy bude možné použití u člověka.

Tímto způsobem se nakonec registrovaným léčivem stane asi jen jedna látka z deseti tisíc.

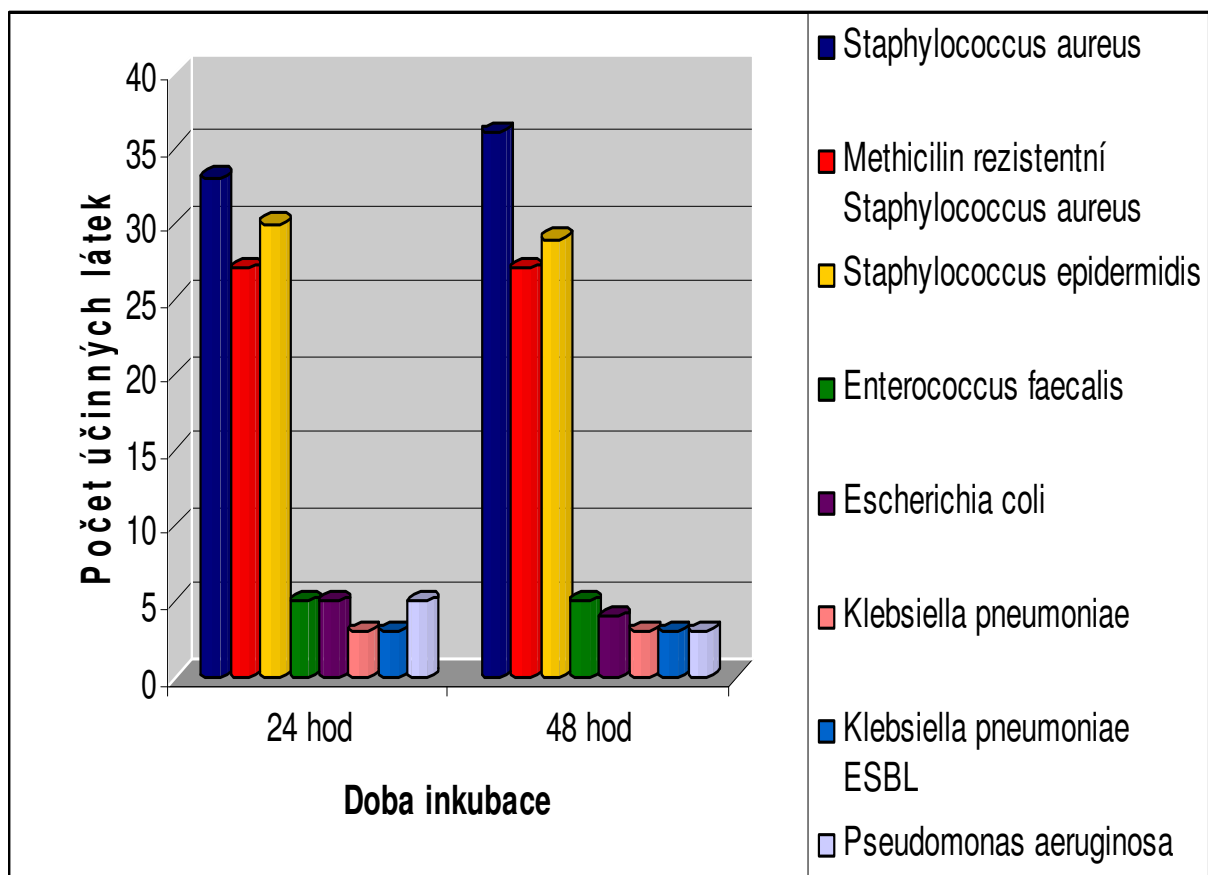
Látky v této práci byly testovány pomocí mikrodiluční bujónové metody. Metoda byla zvolena z důvodu jednoduchého provedení a nižší nákladnosti. Veškeré kroky byly prováděny ručně, obtížně by se tak rozpoznávala případná kontaminace. Také výsledné odečítání probíhalo pouze vizuálně. Všechny tyto případy tak mohly vést k nepřesným výsledkům.

Bakteriální kmeny, vůči kterým probíhalo testování, byly vybrány tak, aby pokryly široké spektrum původců častých bakteriálních onemocnění, včetně nozokomiálních infekcí. Každý bakteriální kmen byl citlivý k určitému množství testovaných látek. Bakteriální kmen, který byl citlivý k největšímu množství testovaných látek, označujeme jako nejvíce citlivý. Bakteriální kmen, který byl k testovaným látkám odolný, označujeme jako nejvíce rezistentní kmen. Větší citlivost proti testovaným látkám vykazovaly obecně grampozitivní bakterie. Tento fakt bude pravděpodobně souviset se stavbou bakteriální stěny, kde grampozitivní bakterie mají oproti gramnegativním bakteriím mnohem jednodušší strukturu, například chybějící vnější fosfolipidovou vrstvu.

V tomto testování se nejvíce citlivým stal bakteriální kmen *Staphylococcus aureus*, který byl citlivý téměř k polovině testovaných látek, přičemž osm látek vykazovalo velmi silnou účinnost. Další z kmenů, který vykazoval citlivost k dvaceti sedmi testovaným látkám, byl Methicilin rezistentní *Staphylococcus aureus*. Tyto dva bakteriální kmeny, které jsou příčinou častých nozokomiálních infekcí, byly součástí studie, během které byly testovány dvě anthelmintické, salicylanilidové látky, niklosamid a oxyklozanid. Obě látky vykazovaly proti těmto bakteriálním kmenům aktivitu a budou tak zahrnuty do dalších studií pro léčbu stafylokokových infekcí (Rajamuthian et al., 2015 [online]).

Vysokou citlivost vykazuje i další grampozitivní bakterie *Staphylococcus epidermidis*. Nejvyšší rezistenci vykazoval kmen *Klebsiella pneumoniae* a *Klebsiella pneumoniae* ESBL. Tyto gramnegativní bakterie vykazují dlouhodobě nejvyšší rezistenci vůči zavedeným antibiotikům, to je dáno jejich schopností rychlé adaptace na nová antibiotika produkcí účinných širokospektrých betalaktamáz.

Následující graf 1 zobrazuje počet účinných látek vůči jednotlivým bakteriálním kmenům. Z grafu je patrné, že gramnegativní bakterie vykazovaly rezistenci vůči testovaným látkám.



Graf 1 Počet účinných látek na jednotlivé bakteriální kmeny

Všechny látky byly rozděleny do skupin podle jejich chemické struktury. Každá skupina má tak stejnou základní strukturu a liší se obměnami některých substituentů. Pomocí odlišností těchto substituentů tak můžeme posuzovat, proč některá látka účinkuje a jiná naopak nepůsobí vůbec. Skupiny, ve kterých jsme testovaly pouze několik málo látek, a které působily proti bakteriálním kmenům slabě, nám tak nepřinesly dostatečné informace o účinnosti struktury. Z těchto skupin tak nemůžeme vyhodnotit, které substituenty by mohly vykazovat účinnost proti jednotlivým bakteriálním kmenům. Z tohoto hlediska se nejúčinnější stala skupina salicylanilidových derivátů. Z hlediska počtu testovaných látek byla tato skupina největší, tudíž jsme zde mohli sledovat účinnost jedné podobné struktury, kdy jeden substituent mohl zapříčinit vysokou, popřípadě žádnou účinnost vůči testovaným

kmenům. Látky z této skupiny, které vykazovaly velmi vysokou účinnost, mají společný objemný substituent vázaný na dusíku. Většina těchto látek měla na dusíku navázaný benzyl nebo fenyl, popřípadě 3-fenylpropyl nebo 3-fenylbutyl. Společným znakem bylo také navázání halogenů na základním skeletu, konkrétně se jednalo o chlór nebo o bróm, vysokou účinnost u dvou látek prokázal také navázaný 3-fluormethyl na základním skeletu. Další látka, která se jevila jako velmi účinná, byla ze skupiny thiokarbamátů, kde na dusíku byly navázány dva ethyly a další substituenty na základní struktuře byl atom chlóru a atom brómu. V porovnání s touto strukturou se ovšem další látka, lišící se v navázání dvou atomů chlóru, jevila jako neúčinná. Pro jednoznačnější výsledek, který by vypovídal o účinnosti této struktury, by bylo potřebné opakovat testování. Látka, která byla účinná, ovšem svoji strukturou odlišná, byla látka SAL-5L, kde na základní struktuře nebyly navázány žádné atomy halogenů. Shodný znak je přítomnost 4-fenylbutylu na atomu dusíku. Další látky ze skupiny thiokarbamátů, které vykazovaly už jenom středně silnou účinnost, měly jako společný znak navázání dvou různých halogenů na základním skeletu, a to chloru a fluoru, popřípadě chloru a 3-fluormethylu.

V roce 2013 byla provedena studie, která se zabývala antibakteriální a antifungální aktivitou derivátů salicylanilid 4-(3-fluormethyl) benzoanů. Tyto látky prokázaly významnou aktivitu proti bakteriálnímu kmenu *Mycobacterium tuberculosis* a rezistentním kokům, včetně kmene MRSA, kdy docházelo k inhibici mykobakteriální isocitrát-lyázy (Krátký et al., 2013 [online]).

Látky ze skupiny sulfonamidových močovín vykazovaly obecně velmi nízkou nebo žádnou účinnost. Látka s největší účinností, STZ-U-1, se od ostatních liší tím, že na močovinu zde není navázán objemný substituent.

Ze skupiny amidů odvozených od sulfathiazolu se nejvíce účinná stala látka STZ-IN. Tato látka se od ostatních svojí strukturou neliší zásadním způsobem, proto by pro jednoznačnější výsledky bylo zapotřebí testování většího množství struktur, které by se mohly lišit navázáním dalších substituentů.

Skupina derivátů rhodaninu, kde byly testovány dvě podobné látky, dopadla v testování účinnosti podobně. Obě látky působí na stejné bakteriální kmeny v podobných koncentracích. Zásadní rozdíl představuje středně silná účinnost látky

TKZ-4 proti bakteriálnímu kmenu *Enterococcus faecalis*. Tento rozdíl mohl být způsoben lidským faktorem.

Látky z poslední skupiny se jeví obecně jako nečinné. Pouze látka GP-137 vykazovala velmi nízkou účinnost, oproti látce sobě podobné, se lišila v navázání nitroskupiny.

6 Závěr

1. Testování látek probíhalo pomocí mikrodiluční bujonové metody. Látky byly rozděleny dle jejich chemické struktury, přičemž několik látek nemohlo být testováno pro svoji nerozpustnost.

2. Po vyhodnocení MIC se jako nejúčinnější stala skupina salicylanilidových derivátů, tato skupina bylo rovněž nejobsáhlejší, tudíž jsme zde mohli porovnat mnoho struktur lišících se v navázání rozdílných substituentů v různých polohách. Některé látky z této skupiny inhibovaly růst bakteriálních kmenů již při velmi nízkých koncentracích.

3. Ostatní skupiny se jevily jako slabě účinné nebo neúčinné. Z těchto dalších skupin by ovšem bylo zapotřebí otestování většího množství rozdílných struktur.

4. Po vyhodnocení citlivosti a rezistence jednotlivých bakteriálních kmenů se jako nejvíce citlivý vůči testovaným látkám stal kmen *Staphylococcus aureus* a Methicilin rezistentní *Staphylococcus aureus*. Vysokou míru rezistence vykazovaly gramnegativní bakteriální kmeny, u kterých se tak potvrdil dlouhodobý problém s odolností proti současným a nově se vyvíjejícím antimikrobním látkám.

5. Pro každý bakteriální kmen byly vyhodnoceny látky účinné dle MIC a doby inkubace.

6. Účinnost jednotlivých látek byla odhadována dle jejich chemické struktury. Látky byly mezi sebou v rámci skupiny porovnávány, a dle jejich rozdílných substituentů bylo posuzováno, zda mohl konkrétní substituent zapříčinit účinnost této látky.

7. Nejúčinnější testovanou skupinou se staly salicylanilidové deriváty. Několik těchto látek vykazovalo velmi vysokou účinnost, tyto látky měly společné znaky ve struktuře.

- Přítomnost objemného substituentu navázaného na aminoskupině, tento substituent byl benzyl nebo fenyl, popřípadě 3-fenylpropyl nebo 3-fenylbutyl. Jako nevhodné se ukázalo být navázání ethylů nebo pentylů. Tyto struktury byly většinou neúčinné nebo pouze velmi slabě účinné.
- Společný znak pro účinné látky byl navázaný halogen na základním skeletu. Jednalo se o chlór, brom nebo 3-fluormethyl. Základní skelet bez navázaného halogenu nevykazoval účinnost, výjimkou byla jediná látka, která měla s ostatními účinnými látkami jiný společný znak, a to přítomnost 3-fenylpropylu navázaného na aminoskupině.
- U skupiny thiokarbamátů byla pro účinek nezbytná přítomnost dvou různých halogenů navázaných na základní skelet. Pokud zde byly navázány dva stejné halogeny, struktura neúčinkovala.

Seznam obrázků

Obr. 1 Stavba bakteriální buňky

Obr. 2 Tvary bakteriálních buněk

Obr. 3 Podíl rezistentních MRSA v jednotlivých zemích

Obr. 4 Podíl KP rezistentních na karbapenemázy v jednotlivých zemích

Seznam tabulek

Tab. 1 – 8 Salicylanilidové deriváty

Tab. 9 – 11 Sulfonamidové močoviny

Tab. 12 Amidy odvozené od sulfathiazolu

Tab. 13 Deriváty rhodaninu

Tab. 14 Deriváty nitrobenzamidů a derivátů močoviny

Tab. 15 Látky působící na *Staphylococcus aureus*

Tab. 16 Látky působící na Methicilin rezistentní *Staphylococcus aureus*

Tab. 17 Látky působící na *Staphylococcus epidermidis*

Tab. 18 Látky působící na *Enterococcus faecalis*

Tab. 19 Látky působící na *Escherichia coli*

Tab. 20 Látky působící na *Klebsiella pneumoniae*

Tab. 21 Látky působící na *Klebsiella pneumoniae* ESBL

Tab. 22 Látky působící na *Pseudomonas aeruginosa*

Seznam grafů

Graf 1 Počet účinných látek na jednotlivé bakteriální kmeny

7 Seznam literatury

AMIN, Alphes; DERUELLE, Denis. *Healthcare-associated infections, infection control and the potential of new antibiotics in development in the USA*, Vystaveno 6.2015. Dostupné z: www.futuremedicine.com/doi/full/10.2217/fmb.15.33

BEDNÁŘ, Marek; FRAŇKOVÁ, Věra; SCHINDLER, Jiří; SOUČEK, Andrej; VÁVRA, Jiří. *Lékařská mikrobiologie: Bakteriologie, virologie, parazitologie*. 1. vydání. Praha: Marvil, 1996. 558 s.

BÜTTNER, Henning et al., *Structural basis of Staphylococcus epidermidis biofilm formation: mechanisms and molecular interactions*, Vystaveno 2.2015. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4330918/>

CAFINI, Fabio et al., *Genotypic and phenotypic diversity in Enterococcus faecalis: is agar invasion a pathogenicity score?*, Vystaveno 4.2015. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25904518>

CHESSA, Daniela et al., *An overview of Staphylococcus epidermidis and Staphylococcus aureus with a focus on developing countries*, Vystaveno 6.2015. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26142662>

CHOPRA, Ian; ROBERTS, Marilyn, *Tetracycline Antibiotics: Mode of Action, Applications, Molecular Biology and Epidemiology of Bacterial Resistance*. Vystaveno 6.2001. Dostupné z: <http://mibr.asm.org/content/65/2/232.short>

CROXEN, A. Matthew; et al., *Recent Advances in Understanding Enteric Pathogenic Escherichia coli*, Vystaveno 10.2013. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3811233/>

DOSTÁL, Václav. *Antibiotická rezistence v populaci vybraných běžných patogenů* [online]. Vystaveno 15.10.2012. Dostupné z: <http://www.tribune.cz/clanek/28183-antibioticka-rezistence-v-populaci-vybranych-beznych-patogenu>

GASPAR, Gilberto Gamberk et al., *Induction and nosocomial dissemination of carbapenem and polymyxin-resistant Klebsiella pneumoniae*, Vystaveno 6.2015. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26132495>

HAL van J., Sebastian; FOWLER G., Vance, *Is It Time to Replace Vancomycin in the Treatment of Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus Infections?*, Vystaveno 3.2013. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3658366/>

HYNIE, Sixtus. *Speciální farmakologie Díl VII/B Protiinfekční léčiva*; 1. vydání. Praha: Univerzita Karlova v Praze, Karolinum, 2003. 240 s.

JINDRÁK, Vlastimil et al., *Antibiotická politika a prevence infekcí nemocnici*, 1. vydání. Nakladatelství Mladá fronta, edice Aeskulap, 2014. 712 s.

JULÁK, Jaroslav. *Úvod do lékařské bakteriologie*. 1. vydání. Praha: Univerzita Karlova v Praze, Karolinum, 2006. 404 s.

KAPRÁLEK, František. *Základy bakteriologie*. 1. vydání. Praha: Univerzita Karlova v Praze, Karolinum, 1999. 241 s.

KLUYTMANS, Jan et al., *Nasal carriage of Staphylococcus aureus: epidemiology, underlying mechanisms, and associated risks*. Vystaveno 6.1997. Dostupné z: <http://cmr.asm.org/content/10/3/505.full.pdf+html>

KRÁTKÝ, Martin et al., *Antibacterial Activity of Salicylanilide 4-(Trifluoromethyl)benzoates*, Vystaveno 3.2013. Dostupné z: <http://www.mdpi.com/1420-3049/18/4/3674/htm>

LINCOVÁ, Dagmar; FARGHALI, Hassan et al., *Základní a aplikovaná farmakologie*. 2.vydání. Praha: Galén, 2007. 672 s.

LÜLLMANN, Heinz; MOHR, Klaus; HEIN, Lutz. *Barevný atlas farmakologie*. 4. vydání. Praha: Grada, 2012. 384 s.

MELICHERČÍKOVÁ, Věra. *Sterilizace a dezinfekce*. 2. vydání. Praha: Galén, 2015. 174 s.

NORDMANN, Patrice et al., *The real threat of Klebsiella pneumoniae carbapenemase-producing bacteria* [online]. Vystaveno 4.2009. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1473309909700544>

NYČ, Otakar. *Potřeba a perspektiva nových antibiotik* [online]. Vystaveno 10.2007. Dostupné z: <http://www.remedia.cz/Okruhy-temat/Mikrobiologie-a-infekcni-choroby/Potreba-a-perspektivy-novych-antibiotik/8-1c-iu.magarticle.aspx>

PISCITELLI, Stephen C. et al., *Clarithromycin and azithromycin: new macrolide antibiotics*, Vystaveno 2.1992. Dostupné z: <http://europepmc.org/abstract/med/1312921>

RAJAMUTHIAN, Rajmohan. *Repurposing Salicylanilide Anthelmintic Drugs to Combat Drug Resistant Staphylococcus aureus* [online]. Vystaveno 21.4.2015. Dostupné z: <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0124595>

ROSPAL, Stanislav. *Bakteriologie a virologie*. 1. vydání. Praha: Scienta, 1994. 68 s.

SCHINDLER, Jiří. *Mikrobiologie pro studenty zdravotnických oborů*. 1. vydání. Praha: Grada, 2010. 224 s.

SPELLBERG, Brad. *The future of antibiotics*, Vystaveno 27.6.2014. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4075146/>

SUBASHCHANDRABOSE, Sargurunathan et al., *Virulence and Fitness Determinants of Uropathogenic Escherichia coli*, Vystaveno 8.2015. Dostupné z <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4566162/>

WUNDERINK, Richard D. et al., *Linezolid in Methicilin-rezistant Staphyloccocus aureus nozocomial pneumonia: A randomized, controlled study*. Vystaveno 12.1.2012. Dostupné z: <https://cid.oxfordjournals.org/content/54/5/621.full>