

**UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE**

**2. LÉKAŘSKÁ FAKULTA**

**Monika Nešáková**

**Stanovení vankomycinu a jeho  
termodegradací produktů pomocí  
HPLC**

*bakalářská práce*

**Praha 2014**

Autor práce: **Monika Nešáková**

Vedoucí práce: **Ing. Eva Klapková, Ph.D.**

Oponent práce: **Ing. Karel Kotačka, Ph.D.**

Datum obhajoby: **2014**

## Bibliografický záznam

NEJEDLÍKOVÁ, Monika. *Stanovení vankomycinu a jeho termodegradací produktů pomocí HPLC*. Praha: Univerzita Karlova v Praze, 2. lékařská fakulta, Ústav lékařské chemie a klinické biochemie, 2014. Vedoucí bakalářské práce Ing. Eva Klapková, Ph.D.

## Anotace

Cílem této bakalářské práce bylo zavést a validovat metodu pro stanovení vankomycinu a jeho termodegradací produktů pomocí vysokouhyné kapalinové chromatografie s detekcí pomocí detektoru diodového pole. Tato metoda, na rozdíl od imunochemických metod, dokáže spolehlivě detekovat a rozlišit termodegradací produkty vankomycinu, které postrádají potěbnou léčebnou účinnost a při dlouhodobém podávání vankomycinu i při renální insuficienci dochází k jejich hromadění v těle.

Dalším cílem této práce bylo monitorování koncentračního profilu uvolnění vankomycinu a jeho termodegradací produktů z lokálních nosičů antibiotik, která se využívají při složitých ortopedických operacích jako prevence vzniku závažných infekcí vyvolaných *Staphylococcus aureus*. Bylo porovnáno uvolnění vankomycinu *in vitro* ze dvou různých kostních cementů, z kostních těpek a ze syntetického kostního těpu. Cílem bylo zjistit, zda se z daných materiálů uvolní takové množství vankomycinu, které zajistí dlouhodobou vysohou lokální koncentraci vankomycinu, není-li MIC vankomycin-rezistentních kmenů *Staphylococcus aureus* (VRSA).

## Klíčová slova

vankomycin, methicillin-rezistentní *Staphylococcus aureus* (MRSA), HPLC, lokální nosiče antibiotik, kostní cement, kostní těpy

## Annotation

The aim of this bachelor thesis was to introduce and validate the method for the determination of vancomycin and its crystalline degradation products by high performance liquid chromatography with detection by diode-array detector. This method is able to reliably detect and distinguish the crystalline degradation products of vancomycin, which lack the necessary therapeutic effect. The long-term using of vancomycin or renal insufficiency lead to their accumulation in the patient's body.

Another target of this bachelor thesis was to monitor the release profile of vancomycin concentration and its crystalline degradation products from local carrier of antibiotics that are used in some complicated orthopedic surgeries such as prevention of inflammatory infections caused by *Staphylococcus aureus*. We compared *in vitro* release of vancomycin from two bone grafts, two different bone cements and from one synthetic bone graft. The aim was to determine if the examine material releases the quantity of vancomycin, which ensure the long-term local concentrations of vancomycin higher than is the MIC of vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* (VRSA).

## Keywords

**vancomycin, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA), HPLC, local carriers of antibiotics, bone cement, bone grafts**

## Prohlášení

Prohláším, že jsem bakalářskou práci zpracovala samostatně pod vedením Ing. Evy Klapkové, Ph.D., uvedla jsem všechny použité literární a odborné zdroje a dodržovala zásady vdecké etiky. Dále prohlašuji, že stejná práce nebyla použita k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze dne

**Monika Nešková**

í í í í í í í í í í í í í í ..

## **Podkování**

Především bych chtěla podkovat mé školitelce Ing. Evu Klapkové, Ph.D., za odborné vedení, pomoc, podporu a cenné rady, které mi po celou dobu vedení mé práce poskytovala. Mé díky patří i MUDr. Pavlu Melicheríkovi, Ph.D., za pomoc při provádění pokusů. Dále bych chtěla podkovat úsekové laborantce Václava Havránkové za pomoc a podporu, vrchní laborantce Mgr. Martinu Bunešové, MBA a Ústavu lékařské chemie a klinické biochemie FN Motol za umožnění měření.

## Obsah

ÚVOD .....	7
<b>1 TEORETICKÁ ČÁST .....</b>	<b>8</b>
1.1 VANKOMYCIN .....	8
1.1.1 Historie .....	8
1.1.2 Obecná charakteristika .....	9
1.1.3 Farmakokinetika .....	13
1.1.4 Nefádnoucí účinky .....	16
1.1.5 Vznik rezistence .....	17
1.1.6 Stanovení .....	19
1.2 METHICILIN-REZISTENTNÍ STAPHYLOCOCCUS AUREUS (MRSA) .....	26
1.2.1 Staphylococcus aureus .....	26
1.2.2 Vznik MRSA a mechanismus rezistence .....	30
1.2.3 Nosokomiální infekce a jejich prevence .....	31
1.3 APLIKACE VANKOMYCINU V LOKÁLNÍCH NOSIČÍCH UŽÍVANÝCH V ORTOPEDII .....	33
1.3.1 Kostní cement .....	33
1.3.2 Kostní štěpy .....	35
1.3.3 Actifuse .....	35
1.4 CHIRURGICKÉ VÝKONY V ORTOPEDII VYUŽÍVAJÍCÍ LOKÁLNÍ APLIKACI VANKOMYCINU .....	37
1.4.1 Reimplantace endoprotézy kyčelního kloubu .....	37
1.4.2 Reimplantace endoprotézy kolenního kloubu .....	37
1.4.3 Zakrývání defektů na kosti lebky .....	38
<b>2 CÍLE .....</b>	<b>39</b>
<b>3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST .....</b>	<b>40</b>
3.1 PŘÍSTROJE, CHEMIKÁLIE A POMŮCKY .....	40
3.1.1 Přístroje .....	40
3.1.2 Pomůcky a materiál .....	41
3.1.3 Chemikálie .....	41
3.1.4 Příprava reagensů a vzorků .....	42
3.1.5 HPLC analýza .....	46
<b>4 VÝSLEDKY A DISKUSE .....</b>	<b>47</b>
4.1 VALIDACE METODY .....	47
4.1.1 Kalibrace .....	47
4.1.2 Opakovatelnost .....	49
4.1.3 Reprodukovatelnost .....	52
4.1.4 Správnost (bias) .....	55
4.1.5 Mez detekce .....	55

---

4.1.6	Výtřnost.....	56
4.1.7	Robustnost.....	56
4.2	TESTOVÁNÍ UVOLNĚNÍ VANKOMYCINU A JEHO TERMODEGRADACÍH PRODUKTŮ Z RŮZNÝCH TYPŮ NOSIČŮ VANKOMYCINU .....	58
4.2.1	Pokus číslo 1 o Kost .....	59
4.2.2	Pokus číslo 2 o Palacos.....	61
4.2.3	Pokus číslo 3 o Copal .....	63
4.2.4	Pokus číslo 4 o Actifuse.....	64
4.2.5	Pokus číslo 5 o Kost .....	66
	<b>ZÁVĚR.....</b>	<b>69</b>
	<b>REFERENČNÍ SEZNAM.....</b>	<b>70</b>
	<b>SEZNAM ZKRATEK .....</b>	<b>76</b>



## Úvod

Vankomycin je glykoproteinové antibiotikum určené k léčbě těžkých bakteriálních infekcí způsobených gram-pozitivními koky, především patogenními kmeny *Staphylococcus aureus*. Do popředí ufvání se vankomycin dostal koncem 20. století, kdy byl ve světě zaznamenán markantní nárůst výskytu MRSA, který vykazoval vůči vankomycinu vysokou senzitivitu. Po dlouhou dobu si na něj bakteriální stafylokokové kmeny nedokázaly vytvořit rezistenci, ale během posledních let se začaly objevovat i případy nálezů MRSA rezistentních i na nízké hladiny koncentrací vankomycinu. Dnes se vankomycin běžně používá k léčbě stafylokokových infekcí i endokarditid, infekcí kostí a kloubů i jako prevence infekčních komplikací při rozsáhlých ortopedických operacích, jako je například výměna kyčelní nebo kolenní endoprotézy.

Při výskytu cizího tělesa v těle roste riziko vzniku infekce, protože Stafylokoky velice snadno osidlují tyto umělé povrchy a utvářejí biofilm. Pokud je kloubní endoprotéza osídlena Stafylokoky, znamená to vážné komplikace, které jsou indikací k další výměně endoprotézy, což je sám o sobě velice invazivní a těžký chirurgický výkon, který znamená velkou zátěž pro lidský organismus. Je proto nutné zajistit spolehlivou prevenci vzniku takové komplikace, což umožní užití tzv. lokálních nosičů antibiotik (vankomycinu), které zajistí kontinuální uvolňování vankomycinu v místě umělé kloubní náhrady a okolní tkáni tak, aby byla lokální koncentrace vankomycinu dostatečně vysoká a přesahovala MIC i vankomycin-rezistentních kmenů MRSA.

*Staphylococcus aureus* je velmi odolný vůči vnějšnému prostředí, přežívá v přítomnosti vysokých teplot, desinfekčních prostředků a je odolný k vyschnutí. Působí i osidluje sliznice a kůže lidí a zvířat. MRSA, jako původce nozokomiálních infekcí, představuje velký problém dnešního zdravotnictví. Mnozí se v nemocničním prostředí, především na méně přístupných místech, kde se neprovádí pravidelné desinfekce a sterilizace - ve vtracích -achtách a klimatizacích. Většinou je přítomen v prostředí nemocničního personálu. Nozokomiální nákazy kmeny MRSA zhoršují klinický stav pacienta, prodlužují dobu hospitalizace a zvyšují morbiditu a mortalitu. Četnost jejich výskytu nozokomiálních nákaz je proto hlavním kritériem posuzování kvality nemocniční péče.

# 1 TEORETICKÁ ČÁST

## 1.1 VANKOMYCIN

### 1.1.1 Historie

Vankomycin byl poprvé izolován v roce 1953, kdy Edmund Carl Kornfeld, organický chemik farmaceutické společnosti Eli Lilly, zkoumal vzorek pěstovaný z bornejské dřeviny. V pěstování objevil dosud neznámý bakteriální kmen Aktinobakterií, konkrétně druh *Streptomyces orientalis*, který produkoval substance jevící antibiotické vlastnosti, pojmenoval ji sloučenina 05865 [22, 24, 25, 30, 39].

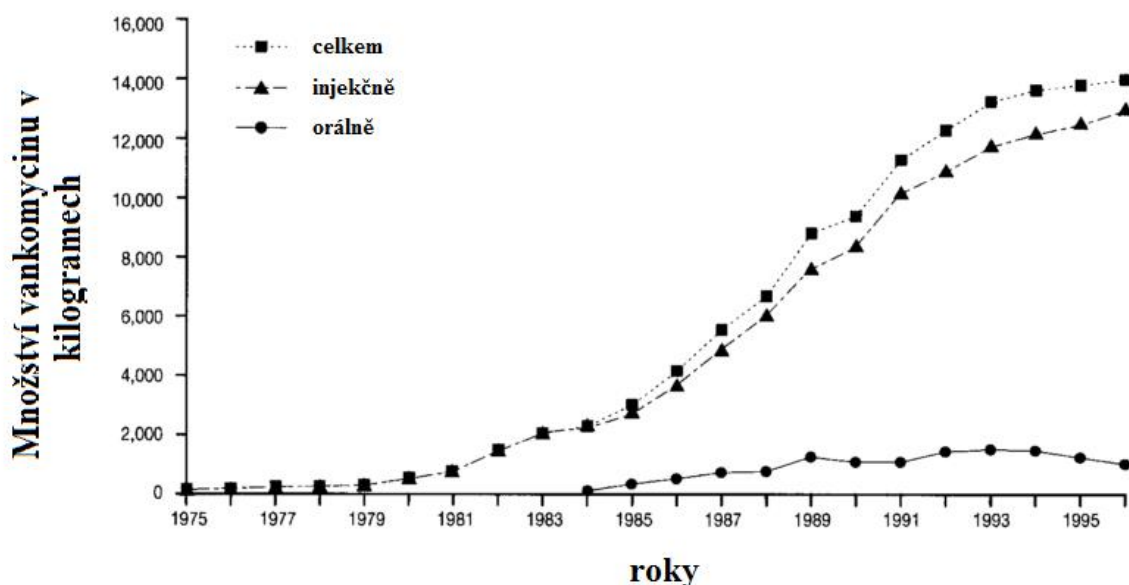
Následovala série testů, kdy bylo pomocí pasážování různých bakterií na pevných s obsahem této sloučeniny zjištěno, že sloučenina má baktericidní účinky na gram-pozitivní bakterie včetně penicilin-rezistentních Stafylokoků a na některé anaerobní bakterie včetně *Clostridium difficile*. Testy také ukázaly, že si Stafylokoky během pasážování nedovedly vytvořit rezistenci vůči této sloučenině.

První izolované formy měly čistotu pouze 82 %, byla u nich potvrzena ototoxicita a nefrotoxicita a byly nazvány šMississippijské bahno kvůli jejich hnědé barvě [24,25,30, 39]. Bylo třeba získat preparát s větší čistotou, proto se z precipitace s kyselinou pikrovou přešlo na čištění průchodem přes ionexovou pryskyřici. Touto úpravou vznikla čistší sloučenina určená pro další klinické studie. Získala také nový název šVankomycin odvozený od slova šVanquish ve významu špřemoci [25, 30].

Byly provedeny série pokusů na zvířatech, které nenaznačovaly tomu, že by podávání vankomycinu mohlo být nebezpečné u lidí. Vankomycin byl experimentálně podán několika pacientům s těžkými bakteriálními infekcemi, u nichž selhala veškerá předchozí léčba, pacientem s endokarditidou a pacientem s rozvinutou rezistencí k penicilinům. Záznamy o úspěšné léčbě byly v roce 1958 předloženy společnosti US Food and Drug Administration, která podávání vankomycinu bezprostředně schválila kvůli nárůstu penicilin-rezistentních Stafylokoků. Vankomycin byl tak poprvé uveden na trh společností Eli Lilly pod názvem šVancocin [24, 39].

Od 50. do 70. let 20. století byl vankomycin lékem poslední volby. Byl vyhrazený pouze pro pacienty s alergií na  $\beta$ -laktamová antibiotika, pro pacienty s rozvinutou rezistencí vůči penicilinům a pacienty s těžkými bakteriálními infekcemi, u nichž veškerá předchozí léčba selhala [25,30, 34].

Koncem 20. století se ale vankomycin díky rapidnímu nárůstu methicilin-rezistentních kmenů *Staphylococcus aureus* (MRSA) dostal do popředí a používal se stále častěji [27, 28].

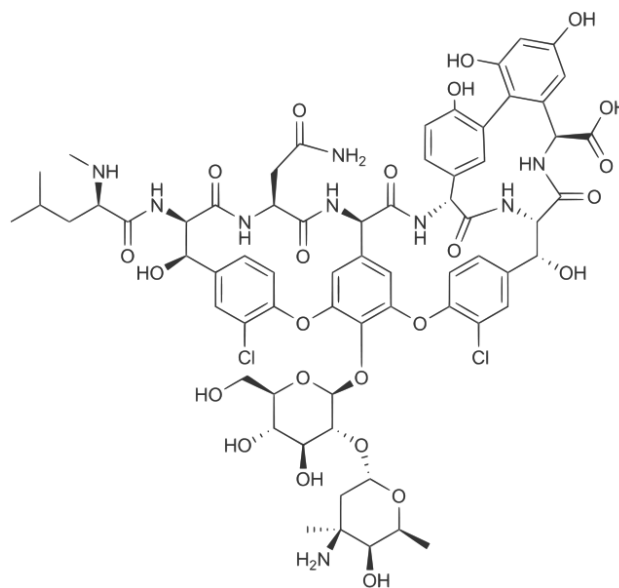


Obrázek . 1: Použití vankomycinu souhrnně v USA, Francii, Itálii, Německu, Velké Británii a Nizozemí [25].

V roce 1989 společnost US Food and Drug Administration schválila orální podávání vankomycinu k léčbě pseudomembranózních kolitid způsobených *Clostridium difficile*. V roce 2004 pak společnost Eli Lilly poskytla licenci na vankomycin několika farmaceutickým firmám v USA, Velké Británii a Austrálii [32].

### 1.1.2 Obecná charakteristika

Vankomycin je tricyklické glykoproteinové antibiotikum určené k léčbě těžkých bakteriálních infekcí. Je poměrně stabilní a dobře rozpustný ve vodě. Jeho molekulární hmotnost je 1450 Da, jeho sumárním vzorcem je:  $C_{66}H_{75}Cl_2N_9O_{24}$  [3, 6, 8, 9, 11].



Obrázek 2: Struktura vankomycinu [13].

### 1.1.2.1 Klinické využití

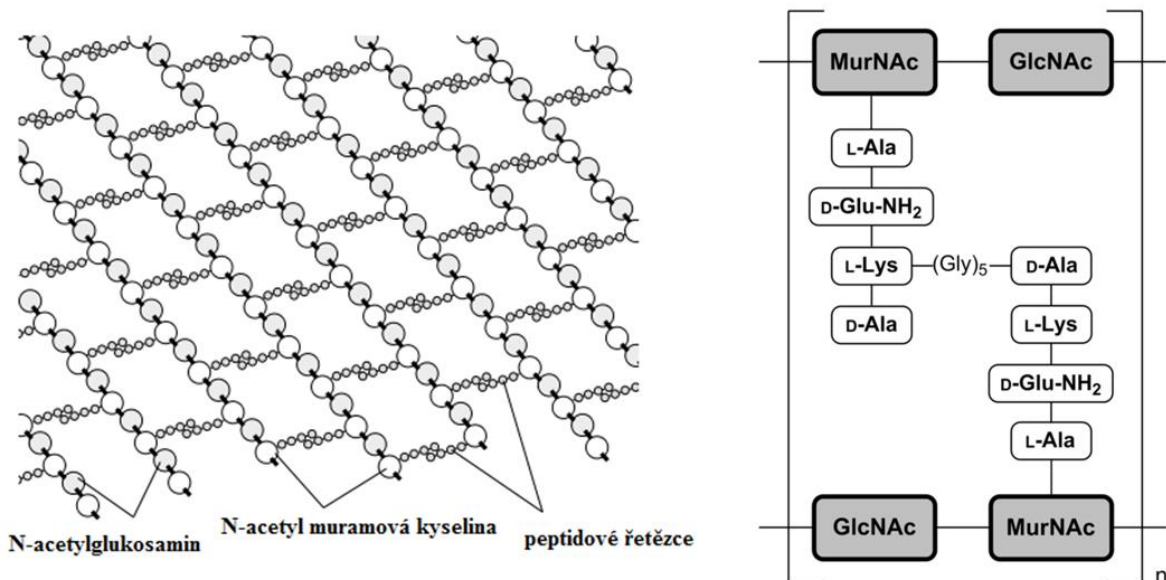
Vankomycin se využívá k léčbě těžkých bakteriálních infekcí způsobených MRSA a ostatními gram-pozitivními bakteriemi. Používá se u pacientů s alergií nebo rozvinutou rezistencí k ostatním antibiotikům a v případech, kdy veškerá předchozí léčba selhala. Nejčastěji k léčbě endokarditid, infekcí kostí, dolních cest dýchacích a hnisavých kožních infekcí. Podává se také jako prevence při velkých chirurgických operacích, například v ortopedii při výměně kostních implantátů. Perorální cestou se může podávat k léčbě pseudomembránových kolitid způsobených *Clostridium difficile*. Lze ho použít i v kombinaci s ostatními léky, v kombinaci s cefalosporiny 3. generace se vankomycin používá při léčbě hnisavých meningitid a v kombinaci s aminoglykosidy při léčbě endokarditid způsobených *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus viridans* a *Streptococcus bovis* [3, 6, 7, 8, 9, 11, 14, 17, 22, 23, 25].

### 1.1.2.2 Mechanismus účinku

Mechanismem účinku vankomycinu je inhibice syntézy buněčné stěny gram-pozitivních bakterií, které mají buněčnou stěnu tvořenou silnou vrstvou zesíleného peptidoglykanu (mureinu). Není účinný na gram-negativní bakterie, mykobakterie ani houby [3, 9, 22, 26, 33, 39].

Vankomycin působí na buněnou stěnu ve fázi její syntézy, kdy je jednotlivé peptidoglykanové vrstvy nevytvorily pevná spojení pomocí pentaglycinových vazeb. Vankomycin rozeznává vazbu C-terminálního D-alanyl-D-alaninu a naváže se na něj pevnou nekovalentní vazbou. Zabrání tak tomu, aby se na tuto strukturu navázal enzym podmiňující spojení jednotlivých vrstev. Tím zabrání vytvoření pevného spojení peptidoglykanových vrstev a buněná stěna se rozpadne [22, 33, 39], viz obrázek 6. Vankomycin mimo jiné také má nízkou permeabilitu buněné stěny a ovlivňuje syntézu RNA [22, 26].

Buněná stěna bakterií je tvořena silnou vrstvou peptidoglykanu, skládající se ze dvou střídajících se aminosacharidů N-acetylglukosaminu (NAG) a N-acetylmuramové kyseliny (NAM), ze které vybíhají četné peptidy [39].

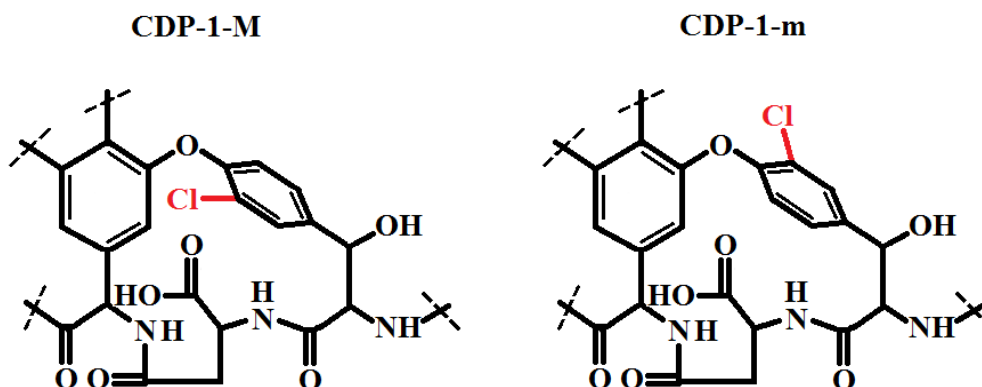


Obrázek 3: Struktura peptidoglykanu *Staphylococcus aureus* [12].

### 1.1.2.3 Termodegradací produkty

Již při teplotě lidského těla dochází k tepelné degradaci vankomycinu na krystalizační produkt CDP-1 (crystalline degradation product), který se skládá ze dvou konformačních izomerů - majoritního CDP-M a minoritního CDP-m. Tyto produkty vznikají hydrolytickým odštěpením amoniaku, jsou si strukturně podobné vankomycinu, jenže postrádají antibiotickou účinnost. Důvodem je se tomu tak hlavně při kumulaci vankomycinu v těle, kde emulze dochází hlavně u pacientů s renální insuficiencí. Tyto degradační produkty se pak mohou v těle hromadit a

přispívá k selhání léčby a k rozvoji rezistence. U většiny imunochemických stanovení navíc nejsou tyto produkty odlišitelné od vankomycinu a tudíž má stanovení falešně zvýšené výsledky [11, 27, 29, 35].



Obrázek 4: Termodegradací produkty vankomycinu.

#### 1.1.2.4 Dávkování

Vankomycin se podává intravenózně, výjimečně se může podávat perorálně k léčbě systémových infekcí vyvolaných *Clostridium difficile*. Intramuskulární podávání se nedoporučuje vzhledem k možné nekróze svalové tkáně [8].

Obecné terapeutické rozmezí vankomycinu je 15 - 20 mg/l s dolní hranicí 5 - 10 mg/l a horní hranicí 30 - 40 mg/l [8, 11, 42]. Jinak se dávka vypočítává z tělesné hmotnosti a upravuje se dle následných sérových koncentrací [41]. Doporučené dávkování u dospělých pacientů je podávání 1 g každých 12 hodin nebo 500 mg každých 6 hodin. Podání 1 g vankomycinu vyžaduje minimálně 1 hodinu dlouhou infuzi, s podáváním vyšších koncentrací než 1 g je nutné prodloužit infuze [4, 8, 25, 40, 41, 42]. Dávkování by nikdy nemělo být rychlejší než 10 mg za minutu [11]. Sérové koncentrace by se dlouhodobě neměly pohybovat pod 10 mg/l nebo kolem hodnot blízkých minimální inhibiční koncentraci (MIC), to by mělo za následek rozvoj rezistence [8, 41].

Pro léčbu hnisavé meningitidy se doporučuje dávkování 0,1 - 8,5 mg/kg/den a pro léčbu enterokolitidy se doporučuje dávka 125 - 500 mg každých 6 hodin [3]. U dialyzovaných pacientů stačí podávat 1 g/týden, protože schopnost eliminace je značně omezena a vankomycin v těle zůstává mnohem déle [4].

Dávkování u dětí a novorozenců je problematické. Je třeba nebyly stanoveny optimální hodnoty ani způsob dávkování. Bylo zjištěno, že u dětí mladších 12 let se nedosáhne takových terapeutických hladin, jako při podání stejného množství dříve starších 12 let, proto je nutné těmto mladším dětem podávat o něco vyšší dávky k dosažení optimálních terapeutických hladin [42]. Na druhou stranu ledviny novorozenců nejsou ještě zcela zralé, proto musí být dávkování omezené [11]. Jedna studie zabývající se optimálním dávkováním doporučuje podávat takové množství, aby se docílilo spodní terapeutické hladiny 15 mg/l, tj. podávat 15 mg/kg každých 6 nebo 8 hodin. Druhé doporučení uvádí dávkování 70 mg/kg/den k dosažení spodní terapeutické hladiny 10 mg/l a 85 mg/kg/den k dosažení spodní terapeutické hladiny 15 mg/l [42].

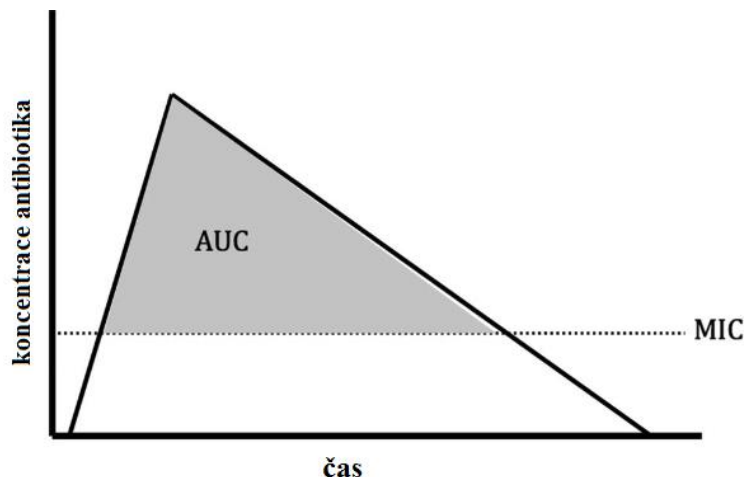
Velkým problémem je fakt, že u novorozenců trpících touto bakteriální infekcí se v tětinou nezjistí hodnoty MIC bakterií a pro léčbu se předpokládá MIC o hodnotu 1 mg/l, jenže ve skutečnosti může být novorozenec napaden kmenem s hodnotou MIC 2 mg/l a vyšší (jak je tomu u většiny ostatních koaguláza-negativních Stafylokoků a i u menší části kmenů MRSA), léčba je pak podhodnocená a tudíž neúčinná [42].

### 1.1.3 Farmakokinetika

Perorální cestou se vankomycin z více než 90 % vyloučí v nezměněné formě, proto se doporučuje pouze intravenózní podání, po kterém se vankomycin distribuuje do mnoha tkání celého těla. Jeho distribuční objem je přibližně 0,4 až 1 l/kg [3, 4, 7, 8]. Délka jeho distribuční fáze neboli eliminace je 30 až 60 minut. V této době dosáhne vankomycin maximální koncentrace v tkáních. Eliminace (vyloučení) pak trvá 6 až 12 hodin a je závislá na renální funkci, u pacientů s renální insuficiencí se poločas eliminace zpravidla prodlužuje až na 6 až 10 dní [3, 8, 11].

Nejlepším farmakodynamickým parametrem hodnotícím účinnost léčby vankomycinem je poměr AUC (plochy pod křivkou) a MIC, pomocí mnoha *in vitro* pokusů, pokusů na zvířatech a výsledků získaných z mnoha studií dávkování u lidí, byla stanovena optimální hodnota poměru  $\frac{AUC}{MIC} \times 400$ , aby měla léčba dostatečnou

klinickou účinností, nižší hodnoty než 400 jsou spojovány s malou účinností léku a vyšší mortalitou [7, 8, 40, 41, 42].



Obrázek 5: Graf vzestupu sérové koncentrace vankomycinu za čas a zastoupení ploch AUC a MIC [42].

Účinek vankomycinu není závislý na koncentraci, jakmile je sérová koncentrace v terapeutickém rozmezí, tak uhlí zvýšení dávky nezpůsobí vzrůst účinnosti. Prodlouží se pouze doba účinku [8, 40, 42]. Ustálení stavu nastane zpravidla po 4. dávce, v této době je vhodné začít terapeutické monitorování [7, 40, 41].

Celková aktivita vankomycinu v tkáních závisí na tkáňové distribuci, vazbě na proteiny, stupni zánětu a na množství cílových patogenů [8]. Vazba vankomycinu na proteiny je různá, obvykle 30 až 55 % a závisí na koncentraci albuminu v krvi [7, 8, 40]. Byla provedena studie penetrace vankomycinu do cerebrospinální tekutiny, porovnávaly se dvě skupiny pacientů. Jedna skupina byla tvořena zdravými pacienty a ta druhá pacienty s hnisavou meningitidou. U pacientů s meningitidou byly naměřeny mnohem vyšší koncentrace než u zdravých pacientů. Tento výsledek ukázal, že vankomycin lépe proniká tkáněmi postihnutými zánětem [8, 40]. Testovala se také distribuce vankomycinu u pacientů s diabetem. Porovnávala se skupina –estí diabetiků a –estí pacientů bez diabetu po operaci srdce. Byl jim intravenózně podáván vankomycin v dávkách 80 až 120 mg/den, po osmi dnech byla u obou skupin měřena koncentrace vankomycinu v různých tkáních. Pacienti s diabetem dosáhli mnohem nižších koncentrací, než pacienti bez diabetu. Závěrem tedy bylo, že



pacienti s diabetem mají výraznou porušenou penetraci vankomycinu do mnoha tkání, což by mohlo mít negativní dopad na léčbu a současně podmiňovat vznik rezistence [7]. Penetrace vankomycinu do plic je značně variabilní, snižuje ji vazba vankomycinu na proteiny a samotný fakt, že vankomycin je poměrně velká molekula a prostup do plicní tkáně je pro ni tudíž obtížnější [8].

Při studích distribuce vankomycinu v tkáních se provádí biopsie mnoha tkání a následně se v nich měří hodnoty koncentrace vankomycinu. Problémem je ale skutečnost, že se často nerozlišuje koncentrace vankomycinu od jeho neaktivních termodegradací produktů [7].

Vankomycin je eliminován glomerulární filtrací a následně vyloučen do moči. Hodnota jeho clearance je 60 ml/hod/kg a je závislá na renální funkci [3, 4, 7]. Eliminaci vankomycinu u hemodialyzovaných pacientů lze hrubě předpokládat pouze z typu dialyzační membrány. Nízkoprotokovou hemodialyzační membránou je vankomycin odstraňován slabě, kdežto vysokoprotokovou membránou je vankomycin odstraňován výrazně. Proto by se mělo zvolit adekvátní dávkování vankomycinu, zpravidla po proběhnutí hemodialýzy.

Vankomycin lépe interferuje s gentamicinem, amfotericinem B, streptomycinem, neomycinem, tobramycinem, polymyxinem B, kanamycinem, amikacinem, bacitracinem, kolistinem, viomycinem a cisplatinou. S většinou aminoglykosidů působí synergicky a to i ve smyslu zvýšené ototoxicity a nefrotoxicity. Dále může v tkáních reagovat s anestetiky a svalovými relaxanciemi [3, 23, 26].

Pokud pacient současně užívá pryskyřice vázající fluórové kyseliny ke snížení VLD cholesterolu, je nutné vankomycin podávat alespoň hodinu před podáním pryskyřic, jinak by mohlo dojít ke zhoršení vstřebávání vankomycinu [3]. Kontraindikací k podání vankomycinu je alergie, nedoslýchavost, akutní renální selhání a těhotenství a kojení, protože vankomycin se vylučuje i do mateřského mléka [9, 11].

#### 1.1.4 Nežádoucí účinky

Vankomycin je ve většině případů dobře snášen. Nejvíce nežádoucích účinků bylo spojeno s užíváním prvních forem vankomycinu tzv. šMississippiským bahněm, po jeho následné purifikaci ale v tělna nežádoucích účinků ustoupila.

Nejastějšími komplikacemi jsou alergické reakce, horečka, zimnice, flebitida povrchové žíly, do které je zavedena infuze, dočasné neutropenie a trombocytopenie. Při intramuskulárním podání hrozí nekróza svalové tkáně v místě vpichu. Při perorálním podávání vankomycinu k léčbě systémových infekcí se mohou objevit problémy. Objevuje se komplikace spojená s rychlou infuzí tzv. šSyndrom rudého mufla, který je charakteristický svdáním, zrudnutím kůže, vazodilací a následným poklesem krevního tlaku s možností vyvinutí šoku a srdeční zástavy, proto je nutné podávat infuzi minimálně po dobu jedné hodiny [3, 4, 9, 23, 25, 26].

Vankomycin bývá také spojován s ototoxicitou a nefrotoxicitou.

Ototoxicita a nefrotoxicita vznikají při monoterapii vankomycinem velmi vzácně, prevalence je menší než 5 %, ale riziko vzniku ototoxicity a nefrotoxicity roste v případě kombinace s dalšími potenciálně nefrotoxickými a ototoxickými léky.

Riziko ototoxicity stoupá v kombinaci s aminoglykosidy, diuretiky, cyklosporinem, cisplatinou, aspirinem, polymyxinem B, erytromycinem a u pacientů s dalšími poruchami sluchu. Riziko může také stoupat s podáváním vysokých dávek a u pacientů s renální insuficiencí, protože vlivem snížené glomerulární filtrace dochází k hromadění vankomycinu v organismu. Riziko bohužel většinou nekoreluje se sérovými hladinami vankomycinu. Prvními příznaky ototoxicity je tinitus a závrať, dále hrozí postupná ztráta schopnosti slyšet vysokofrekvenční tóny a hluchota. Proto se okamžitě při těchto příznacích musí léčba přerušit. Preventivně se proto provádí audiometrické testy sluchu před, během a po terapii potenciálně ototoxickými léky [3, 4, 7, 9, 11, 23, 25, 26, 27, 31, 40, 41].

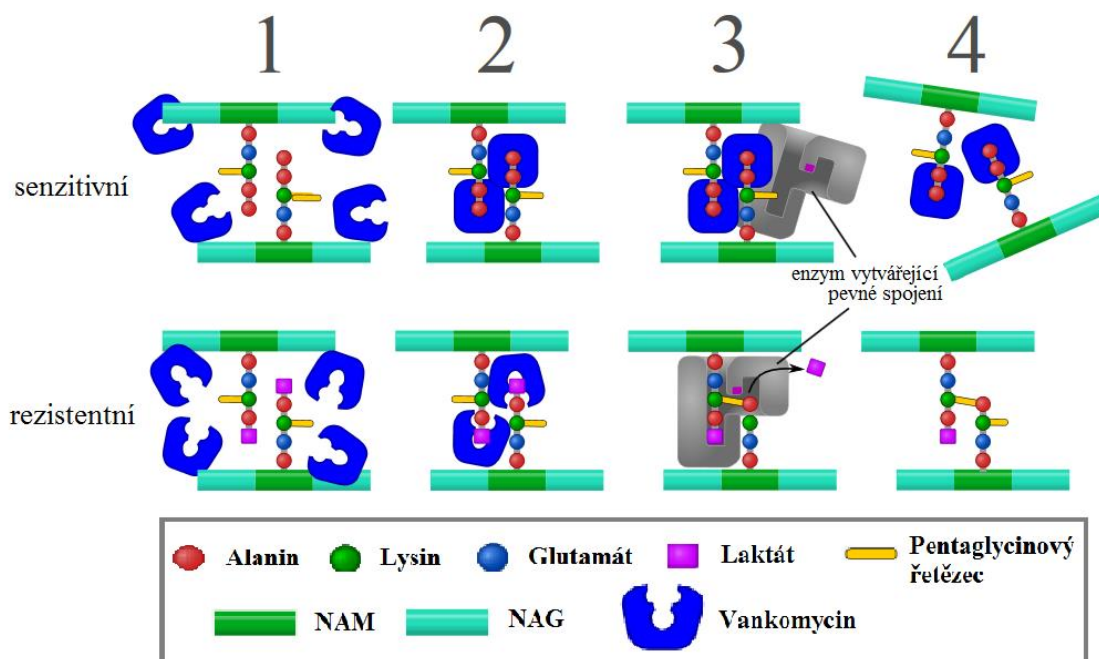
Nefrotoxicita způsobená vankomycinem je vzácná, v případě velmi mírná a reverzibilní. Její závažnost stoupá s užíváním aminoglykosidů, amfotericinu B a diuretik, s podáváním vysokých dávek, při krátkodobé léčbě, u pacientů vyžadujících

v ku a u pacientů s renální insuficiencí. Přesná korelace nefrotoxicity s vysokými koncentracemi vankomycinu nebo s délkou terapie však není zcela prozkoumána. Vankomycin působí na epitel renálního proximálního tubulu, kde aktivuje oxidativní fosforylaci, při které se rozvine oxidativní stress, což může vést k nekróze a následné destrukci glomerulu. Doposud však nebyla řádněmu pacientovi s monoterapií vankomycinem indikována dialýza a v této pacient se velmi brzy po skonění léčby vrátila hodnota glomerulární filtrace a clearance kreatininu do normálních hodnot. Přesto je před každou indikací léčby nefrotoxickými léky nutné znát každý stupeň renální insuficience pacienta [3, 7, 8, 9, 11, 23, 25, 40, 42].

### 1.1.5 Vznik rezistence

Od 40. let 20. století se pro léčbu bakteriálních infekcí hojně používal penicilin. Zcela se však rychle vytvářela i rezistence vůči penicilinu, kterou dnes nalzáme u 70 - 80 % izolovaných kmenů *Staphylococcus aureus*. [34, 39]. Na methicilin a ostatní semisyntetické peniciliny se rozvinula rezistence již v 60. letech a kmen MRSA stále přibývalo. Tudíž se do popředí dostalo používání vankomycinu. Z toho důvodu netrvalo dlouho ani vznik rezistence k vankomycinu. Uprostřed 80. let se rezistence objevila u rodu *Enterococcus*. První kmeny s rezistencí byly izolovány v letech 1987 v USA a 1986 v Evropě [24, 25, 27, 28, 34, 39].

U bakterií bylo objeveno specifické genové podmiňující vznik rezistence k vankomycinu, byly označeny: VanA, VanB, VanC, VanD, VanE a VanG. Tyto geny způsobují přeměnu aminokyselinového zbytku D-alanyl-D-alaninu na terminálním konci peptidoglykanového řetězce bakteriální buněčné stěny. Geny VanA, VanB a VanD podmiňují přeměnu primárního D-alanyl-D-alaninu za D-alanyl-D-laktát, který po vazbě s vankomycinem postrádá jednu z primárních vodíkových vazeb, což má za následek až tisícinásobný pokles afinity k vankomycinu. Bakterie s těmito geny jsou vysoce rezistentní k vankomycinu s hodnotami MIC nad 32 mg/l. Přítomnost genů VanC, VanE a VanG způsobuje přeměnu D-alanyl-D-alaninu za D-alanyl-D-serin, který má jinou konformační strukturu, což způsobuje stonásobný pokles afinity k vankomycinu. Bakterie nesoucí tyto geny mají obvykle nízkou rezistenci k vankomycinu s hodnotami MIC okolo 16 mg/l [24, 25, 33, 37].



Obrázek . 6: Mechanismus působení vankomycinu na vankomycin-senzitivní a vankomycin-rezistentní bakterie na úrovni peptidoglykanové vrstvy buněčné stěny [13].

Objev tohoto genu vzbudil obavy z toho, že by se rezistence mohla přenést na ostatní patogenní organismy, zejména na bakteriální kmeny MRSA [24, 25, 27, 36, 39].

Provedly se dva *in vitro* pokusy přenosu genu. Prvním byla demonstrace přenosu genu VanB mezi dvěma Enterokoky. Donorem genu VanB byl *Enterococcus faecium* s prokázanou rezistencí k vankomycinu a příjemcem se stal druhý, fluorescenčně značený, *Enterococcus faecium* citlivý na vankomycin. Tyto dva kmeny se společně kultivovaly v poměru 1:1 na Petriho miskách. Přenos genu VanB byl prokázán metodou PCR s následnou elektroforézou značených fragmentů DNA a vzniklá rezistence se potvrdila diskovou difuzí metodou na flukním médiu s přidáním vankomycinem [38].

Druhým pokusem se v roce 1992 potvrdila možnost *in vitro* přenosu genu VanA z rodu *Enterococcus* na bakterie *Staphylococcus aureus*. Zůstávalo otázkou, zda se tento transfer uskuteční i v přirozeném prostředí bakterií.

To potvrdily následné zprávy v roce 1997 z Japonska a USA, kde byl objeven *Staphylococcus aureus* rezistentní k nízkým hodnotám vankomycinu [25,39]. První zcela rezistentní kmen *Staphylococcus aureus* s hodnotami MIC nad 32 mg/l byl

objeven v roce 2002 v Michiganu u pacienta, u kterého byl souasně prokázán i vankomycin-rezistentní *Enterococcus* (VRE), který byl pravděpodobně donorem genu Van A [24, 25, 36, 39]. Druhý izolát VRSA byl vzápětí objeven v Pensylvánii a tento VRSA s hodnotami MIC nad 64 mg/l byl izolován v roce 2004 v New Yorku [25].

Později bylo vytvořeno rozdělení vankomycin-rezistentních kmenů *Staphylococcus aureus* dle hodnot MIC: VISA (vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus*) s hodnotami MIC od 4 do 8 mg/l, hVISA (heterogeneous vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus*) s hodnotami MIC nad 4 mg/l a VRSA (vancomycin-rezistance *Staphylococcus aureus*) s hodnotami MIC nad 16 mg/l [7, 27, 28, 39].

Dnes se uvažuje o různých variantách toho, jak by se rezistence k vankomycinu dala zvrátit. Jednou možností by bylo vyvinout modifikaci původního vankomycinu, který by si nejen zachoval afinitu k D-alanyl-D-alaninu, ale který by se dokázal pevně navázat na strukturu D-alanyl-D-laktátu nebo D-alanyl-D-serinu [33]. Druhou možností, jak potlačit rezistenci u bakterií, by mohlo být potlačení genu vyvolávající rezistenci. Do bakteriální buňky by se vpravil komplementární antisens gen, který by produkoval RNA, která by se navázala na matrici, podle níž bakterie syntetizuje proteiny způsobující rezistenci. Zatím není vyřešeno, jak by se tento gen dostal do všech bakteriálních buněk v těle. Mohlo by se využít bakteriofág, avšak to by mohlo u pacienta vyvolat neřádnou imunologickou reakci [36].

### 1.1.6 Stanovení

Koncentraci vankomycinu v krvi je nutné monitorovat kvůli jeho úzkému terapeutickému rozmezí. Je nezbytné vědět, jestli pacient eliminuje vankomycin rychleji nebo pomaleji než je obvyklé a popřípadě mu adekvátně upravit dávkování. Stanovení také slouží k odhadnutí potenciálního rizika toxicity a to hlavně u pacientů s indikovanou agresivní léčbou, s renální insuficiencí, s dlouhodobou léčbou a souasně užívaných dalších potenciálně nefrotoxicá nebo ototoxická léčiva [25, 40, 41]. Odběr se provádí dvě hodiny po dávce, kdy by koncentrace vankomycinu měla dosáhnout maxima, avšak výrazně nepřesahovat horní mez terapeutického rozmezí, a pak před další aplikací léku, kdy by koncentrace neměla klesnout pod dolní terapeutickou mez. Stanovení se může být prováděno v séru a v

plazma odebrané do zkumavek s ethylendiamintetraoctovou kyselinou (EDTA), heparinem nebo citrátem. Stabilita vzorku je pak dána poloasem rozpadu, takže by se vzorek měl zpracovat maximálně do 4 hodin od odběru. Je možné také vzorek zamrazit, při méně než  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  zůstane stabilní až 10 týdnů. Je důležité znát i významné interference při stanovení. Pokud je ve vzorku vysoká koncentrace bilirubinu nebo hemolýza, může dojít při imunochemickém stanovení k analytickému falešnému snížení hodnot vankomycinu. Naopak pokud je vzorek lipemický, může dojít k jeho analytickému falešnému zvýšení [16].

### 1.1.6.1 Imunochemické metody

- Fluorescenční polarizační imunoanalýza (FPIA)

Jedná se o homogenní kompetitivní metodu, která vyvolává ke značení fluorescein. Principem metody je měření emitované fluorescence v rovině polarizovaného světla pomocí fluorimetru. Vankomycin ze vzorku soutěží se značeným vankomycinem o omezený počet vazebných míst IgG zvlášť protilátky proti vankomycinu. Pokud se značený vankomycin naváže na protilátku a vytvoří imunokomplex, způsobí to nárůst polarizační fluorescence. Toto zvýšení je pak nepřímo úměrné koncentraci vankomycinu ve vzorku. Vyvolává se toho, že volná molekula vankomycinu značená fluoresceinem rotuje velmi rychle a emitované světlo je depolarizované. Avšak po navázání na vlastní molekulu protilátky a vytvoření imunokomplexu se její rotace zpomalí a detektor tak zaznamenává nárůst fluorescence v rovině polarizovaného světla [10, 14, 15, 16, 17, 22]. FPIA je nejčastěji používaná metoda v rutinní praxi, je rychlá, levná, přesná, nenárovná na množství materiálu, má dobrou linearitu a při stanovení nevádí bilirubin, hemolýza, lipémie ani různé koncentrace sérových proteinů. Je plně automatizována a je k dispozici široké spektrum kitů od různých výrobců. Avšak na rozdíl od HPLC nedokáže rozeznat termodegradací produkty vankomycinu, které nacházíme hlavně u pacientů s renální insuficiencí a u pacientů podstupujících peritoneální dialýzu. U těchto pacientů se vankomycin nedoporučuje stanovovat metodou FPIA, protože by se stanovila hodnota, která by zahrnovala i koncentraci neaktivních degradací produktů a skutečná koncentrace aktivního vankomycinu by byla ve skutečnosti nižší [18, 22].

Firma Roche Diagnostic vyvinula FPIA metodu stanovení vankomycinu na analyzátoru Cobas INTEGRA. Bohužel ani tato metoda neumí rozpoznat termodegradací produkty od aktivního vankomycinu [15].

#### ▪ Radioimunoanalýza (RIA)

Je jednou z nejstarších imunochemických metod, kterými se vankomycin stanovoval. Jedná se o heterogenní kompetitivní imunoanalýzu využívající značení radioaktivním jodem  $^{125}\text{I}$  s poloasem rozpadu 60 dní, který vyzařuje  $\gamma$  záření. Princip RIA spoívá v kompetici radioaktivního značeného vankomycinu s vankomycinem ze vzorku o omezený počet vazebných míst protilátky, která je zakotvena na pevné fázi, většinou na stěně zkumavky.

Do zkumavky s IgG protilátkou proti vankomycinu se přidá vzorek séra nebo plazmy a stejné množství roztoku se značeným vankomycinem. Směs se nechá několik minut inkubovat, poté se provede separace vzniklých imunokomplexů a změří se radioaktivita jako po  $\gamma$  impulzu za minutu. Koncentrace vankomycinu ve vzorku je pak nepřímo úměrná naměřené hodnotě radioaktivity [10, 16].

Například Pfaller a Krogstad (1984) stanovovali vankomycin RIA metodou takto: K 100  $\mu\text{l}$  IgG králíčí protilátky proti vankomycinu přidali 100  $\mu\text{l}$  séra nebo kontroly a 100  $\mu\text{l}$  roztoku značeného vankomycinu a nechali směs inkubovat 10 minut. K separaci imunokomplexů použili ovčí IgG protilátku proti králíčí protilátce, která zbylé králíčí protilátky vyvázala. Následovala inkubace 20 minut, poté se směs 10 minut centrifugovala a odsál se horní supernatant, kde zůstaly pouze imunokomplexy králíčích protilátek s vankomycinem (značeným i neznačeným). Pomocí detektoru  $\gamma$  záření se pak stanovila radioaktivita a vypočetla koncentrace stanovovaného vankomycinu [17].

Ackerman, Berg, et al. (1983) porovnávali stanovení vankomycinu metodami FPIA a RIA. Porovnali výsledky obou analýz, korelace byla vysoká, avšak RIA metoda měla v 63 % analýz tendenci nadhodnocovat výsledek, a to nejen u stanovení vankomycinu, ale u všech antibiotik. Dohlédk závěru, že vhodnější metodou pro stanovení vankomycinu je FPIA, protože je rychlejší, levnější a méně náročná na bezpečnost než RIA [20].

- Chemiluminiscenční imunoanalýza (CLIA)

Společnost SIEMENS vyvinula v roce 2006 metodu pro stanovení vankomycinu na analyzátoru IMMULITE 2500. Jde o kompetitivní chemiluminiscenční imunoanalýzu na pevné fázi zesílenou enzymem. Pevná fáze (kulička) je potažena značeným vankomycinem, který soupeří s vankomycinem ze vzorku o omezený počet vazebných míst myší monoclonální protilátky proti vankomycinu, která je konjugovaná s alkalickou fosfatázou (ALP). Směs se inkubuje 30 minut. Poté se provede centrifugace, odebere se horní supernatant a přidá se k němu substrát, který se naváže na pevnou fázi. Naměřený signál chemiluminiscence je pak nepřímo úměrný koncentraci vankomycinu ve vzorku [11].

- Luminiscenční imunoanalýza (LIA)

Vankomycin lze stanovit luminiscenční imunoanalýzou s esterem akridinu. Jde o kompetitivní heterogenní analýzu, kdy vankomycin ze vzorku soupeří s vankomycinem označeným esterem akridinu o omezený počet vazebných míst myší monoclonální protilátky proti vankomycinu. Myší monoclonální protilátka je navázána na kozí protilátku, která je ukotvena na paramagnetických částicích. Tyto částice jsou pak po inkubaci odděleny pomocí magnetického pole. Následným promytím je oddělena suspenze imunokomplexu myší protilátky a vankomycinu. V této suspenzi se po nástupu hydroxidu sodného spustí oxidace akridinu a dojde k emisi luminiscenčního záření, jehož intenzita je nepřímo úměrná koncentraci vankomycinu ve vzorku. Variační koeficient stanovení je 1,6 až 3,0 % [16].

- Fluorescenční imunoanalýza (FIA)

Je metoda využívající schopnost některých látek po osázení určitou vlnovou délkou emitovat fluorescenční světlo. Takové látky jsou nazývány flourochromy (fluorescein-isothiokyanát (FITC), umbeliferon atd.). Fluorescence je pak detekována fluorimetrem pod úhlem 90° a je nepřímo úměrná koncentraci stanovované látky ve vzorku. Je však velmi citlivá k interferencím, pH a teplotě. Ve vzorku by neměly být žádné molekuly pohlcující světlo, například kyselina, která způsobí pokles výsledné fluorescence. Velmi důležitá je i čistota laboratorního skla, protože zbytky mycích prostředků mají silný fluorescenční potenciál. Nejvíce



nevýhodou metody je rychlá klesající intenzita fluorescence [17, 19]. Ke stanovení vankomycinu se využívá heterogenní kompetitivní FIA, kdy vankomycin ze vzorku soupeří s fluorochromem značeným vankomycinem o omezený počet vazebných míst protilátky. Nebo se místo vankomycinu označí fluorochromem daná protilátka.

Pfaller a Krogstad mezi sebou porovnávali metody stanovení vankomycinu. Z tohoto pokusu vyšla FIA s nejhodnějšími výsledky, hodnota variačního koeficientu dosahovala 12,2 až 16,2 %. Provedli manuální přípravu vzorku pro stanovení vankomycinu. Do zkumavky s IgG králičí protilátkou proti vankomycinu přidali 100  $\mu$ l vzorku a 100  $\mu$ l roztoku vankomycinu značeného fluorochromem. Jako diluční roztok byl použit fosfátový pufr o hodnotě pH 7,5. Směs se 30 minut inkubovala při pokojové teplotě, během této doby došlo k vytvoření imunokomplexu. Volné protilátky se vyloučily přidáním IgG ovčích anti-králičích protilátek. Poté se směs 10 minut centrifugovala při 1500 g. Odebral se horní supernatant s imunokomplexy a vložil se do fluorimetru Amerifluor od společnosti American Diagnostic. Vzorek byl osvětlen světlem o vlnové délce 490 nm a detektor zaznamenal emitované fluorescenční záření o vlnové délce  $\times$  520 nm. Chyby měření byly nejspíše důsledkem nepřesného pipetování nebo částečným rozpadem fluorochromu [17].

#### ▪ Turbidimetrie

Vankomycin je možné stanovit také metodou kompetitivní inhibiční turbidimetrie s využitím homogenních částic. Tato metoda využívá kompetice vankomycinu ze vzorku s konjugátem vankomycinu o vazebná místa myších monoklonálních protilátek. Touto kompeticí se snižuje rychlost agregace, která se měří turbidimetricky při 340 nm. Rychlost agregace je pak nepřímo úměrná koncentraci vankomycinu ve vzorku. Tato metoda není vhodná pro rutinní stanovení vankomycinu, není tak přesná jako ostatní imunochemické metody a má malý rozsah, pouze do 34,5  $\mu$ mol/l [16].

#### ▪ Enzymová imunoanalýza (EIA)

Jedná se o homogenní kompetitivní enzymovou imunoanalýzu. Ke vzorku s neznámou koncentrací vankomycinu je přidán vankomycin značený enzymem

glukóza-6-fosfátdehydrogenázou (G6P-DH), má monoklonální protilátka proti vankomycinu, glukóza-6-fosfát a  $\text{NAD}^+$ . Pokud vznikne vankomycin s G6P-DH vytvoří imunokomplex, klesá aktivita enzymu. G6P-DH konvertuje  $\text{NAD}^+$  na NADH, což způsobí nárůst absorbance, tento nárůst je pak fotometricky detekován při 340 nm a je nepřímo úměrný koncentraci vankomycinu ve vzorku. Další možností je měřit přímo aktivitu G6P-DH, která by byla přímo úměrná koncentraci vankomycinu ve vzorku. Přítomnost endogenní G6P-DH ve vzorku nevádí, do reakce vstupuje pouze komerčně vyráběný bakteriální konjugát G6P-DH. Tato metoda tedy není vhodná pro rutinní stanovení vankomycinu, její rozsah je pouze 3,35 až 33,5  $\mu\text{mol/l}$ , vyšší koncentrace by bylo nutné před analýzou naedit. Hodnota variačního koeficientu je 2 až 6 % [16].

### 1.1.6.2 HPLC

Vysokou tlakovou kapalinovou chromatografií (HPLC) je jedinou metodou, která dokáže rozlišit vankomycin od jeho neaktivních termodegradací produktů. Pracuje na principu dělení látek mezi mobilní a stacionární fázi na základě rozdílné afinity látek k těmto fázím. Celá separace se odehrává v úzkých ocelových kolonách, ve kterých jsou malé nosné částice se stacionární fází. Mobilní fáze a vzorek jsou pak do kolony vstříkávány pod vysokým tlakem o hodnotě několika desítek MPa. Na konci kolony je připojen detektor s výstupem do počítače, který provede kalkulaci výsledků.

HPLC je hojně používanou metodou pro stanovení vankomycinu, existuje mnoho modifikací lišících se postupem přípravy vzorku, použitými reagensy, mobilní fází nebo rozdílným přístrojovým vybavením.

Před analýzou je nutné ze vzorku odstranit veškeré sérové proteiny, protože interferují při stanovení. Nejčastěji se k tomu používá extrakce na pevné fázi, ionexová chromatografie nebo extrakce kapalina-kapalina. Jako precipitancia se hojně používají acetonitril, ledová kyselina trichloroctová, EDTA nebo směs izopropanol-acetonitril. Jako vnitřní standardy se používají cefazolin, vitamin B12, trimethoprim nebo 3,4,5-trimethoxy-phenyl-acetonitril. Nejčastěji používanými kolonami na běžné i reverzní fázi jsou: Microbondapak  $\text{C}_{18}$ , Aminopropylshimpak CLC  $\text{NH}_2$ , ODS, Supelco  $\text{LC}_{18}$  a Nucleosid  $\text{C}_{18}$  [22].

Phaller et al. například použili pro přípravu vzorku separaci pomocí ionexové gelové chromatografie s elucí pomocí borátu sodného. Smíchali 500  $\mu$ l vzorku s 500  $\mu$ l vnitřního standardu, který obsahoval 16  $\mu$ g ristocetinsulfátu, 0,02 M kyselinu octovou a 0,16 M síran sodný. Připravenou směs aplikovali do polypropylenové kolonky obsahující 0,8 ml CarboxymethylethylóSephadex. Kolonka se před použitím připravila tak, že byla naplněna 0,2 M roztokem síranu sodného a ponechala se přes noc, aby nabobtnala. Poté byla před aplikací vzorku dvakrát promyta 1 ml 0,2 M roztokem síranu sodného a pak 0,5 ml 0,5 M roztokem borátu sodného, poté byl do kolonky aplikován vzorek. Eluce probíhala přidáním 0,5 ml borátového pufru. Do eluátu pak bylo ještě před nástupem do přístroje přidáno 40  $\mu$ l 8,5% kyseliny fosforečné. K analýze byl nastaven nástup 50  $\mu$ l, průtok 1,5 ml/min a vlnová délka detekce 210 nm. Jako mobilní fáze byla použita směs 0,01 M roztoku fosfátového pufru o pH 3,8 - 4 a acetonitrilu v poměru 9:1. Celková hodnota variačního koeficientu byla 2,4 až 5,2 % [17].

Podobný postup použili Filburn, Shull et al. Smíchali stejné množství vzorku a vnitřního standardu, který obsahoval 0,075 mg/ml ristocetinu. Vzorek extrahovali přes ionexovou kolonku CarboxymethylóSephadex a eluce probíhala po přidání 800  $\mu$ l borátového pufru. Prvních 300  $\mu$ l eluátu se nepoufílilo a ze zbytku se provedl nástup, detekce probíhala při 210 nm [14].

Feferbaum et al. pracovali s UV detektorem při vlnové délce 230 nm, použili kolonu CLC-ODS 150 x 6 mm s průtokem 0,8 ml/min. Mobilní fáze obsahovala 0,05 M fosfátový pufr o pH 4,6, metanol a acetonitril v poměru 80:15:5 [18].

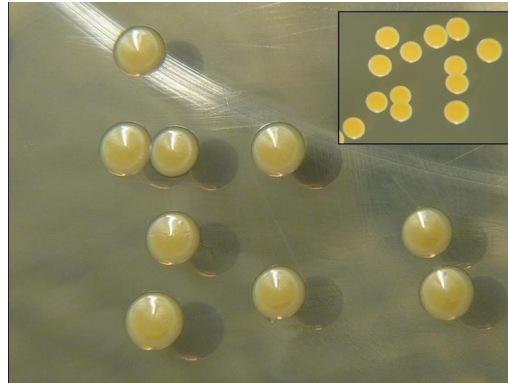
Jehl, Gallion et al. stanovovali vankomycin následujícím způsobem: 500  $\mu$ l vzorku smíchali s 500  $\mu$ l směsí izopropanol-acetonitril (1:1), protřepali a nechali 10 minut centrifugovat. Odsáli horní supernatant do nové zkumavky a smíchali ho s 3,5 ml methylchloridu. Směs se 20 minut centrifugovala a pak se odebralo 20  $\mu$ l horního supernatantu, který se vpravil do přístroje. Mobilní fáze obsahovala směs acetonitrilu, 0,2 M octanu amonového a destilované vody v poměru 9:10:81. Průtok byl 1 ml/min a detektor pak měl signál při 214 nm [21].

## 1.2 Methicilin-rezistentní *Staphylococcus aureus* (MSRA)

### 1.2.1 *Staphylococcus aureus*

#### 1.2.1.1 Obecné vlastnosti a záření

*Staphylococcus aureus* je nesporulující, fakultativní anaerobní, gram-pozitivní, kataláza-pozitivní a koaguláza-pozitivní nepohyblivý kok rostoucí v nepravidelných shlucích, tzv. hroznech. Jeho název žlutý Stafylokok se odvíjí od zbarvení, které může být od zlatofluté, oranžové, hnědé až po bílou, záleží na obsahu karotenových pigmentů [5, 44].



Obrázek 7: *Staphylococcus aureus* [43]

SA patří k velmi odolným bakteriím v životním prostředí. Je známa odolností k vyschnutí, vysoké teplotě a desinfekcím prostředkům. Přežívá na povrchách s obsahem až 15 % NaCl. Zahubí ho vystavení teplotě 70 °C po dobu nejméně jedné hodiny nebo expozice 5% fenolu po dobu 30 minut [44, 45].

Přirozeně se vyskytuje na kůži a sliznicích dýchacích cest lidí a zvířat. Jeho nosičství je velmi časté, 10 až 40 % dospělé populace tvoří trvalé nosiče a až 50 % populace jsou nosiči přechodní. Nosiči jsou potenciálním zdrojem infekce pro ostatní, ale nosičství samo o sobě nebezpečné není, naopak způsobí imunizaci organismu a odolnost nositele. Případný vznik infekce u nosiče je spojován se sníženou obranyschopností, velkou dávkou virulentního kmene SA a s porušenou integritou kůže nebo sliznic [1, 6, 44].

### 1.2.1.2 Onemocnění vyvolaná SA

SA je původce pyogenních hnisavých infekcí lidí a zvířat. Vznik infekce je často spojený s traumaty, chirurgickými výkony, popáleninami, imunodeficiencí a s přítomností cizího tělesa v těle, jako jsou katetry, endoprotézy, umělé srdeční chlopně nebo stehy, kterýmto povrchům SA lehce adhezuje, vytváří biofilm a rychle se množí [1, 6, 44]. SA překoná ochranné bariéry a pronikne do těla hostitele. Pomocí mnoha enzymů a toxinů se dokáže dostat hluboko do tkání, kde způsobí zánět. Z těchto zánětlivých lézí může SA proniknout až do krve a rozšířit se po celém organismu, kde následně vznikají metastatická zánětlivá ložiska. SA způsobuje hnisavé kožní infekce, jako je furunkl, pyodermie, impetigo, karbunkl, paraničias a folikulitidy, infekce otevřených ran, orgánové infekce - mastitidy, osteomyelitidy, artritidy, pyelonefritidy, infekce močových cest, bronchopneumonie, enterokolitidy, meningitidy, endokarditidy, orgánové abscesy a sepse. SA je původcem syndromu toxického šoku (TSS), který je spojován především s používáním menstruačních tamponů, je charakteristický horečkou, zrudnutím kůže, šokem, nauzeou, zvracením, trombocytopenií, sníženým tlakem, poruchami v domě a poruchami funkce ledvin a jater s jejich následným selháváním. Po dvou týdnech od začátku TSS se objevuje odlupování kůže z chodidel a dlaní, lámání nehtů a vypadávání vlasů. Jeho typickým průběhem může být i smrt. SA je také častým původcem alimentárních infekcí, které vznikají po požití potravin s bakteriemi produkujícími enterotoxiny, jsou charakteristické náhlým typickým průběhem, nauzeou, zvracením, průjmy, bolestmi hlavy, křečemi, tachykardií a kolapsem. I bez léčby pak zpravidla následuje rychlé zlepšení stavu a uzdravení [1, 5, 6, 44, 45].

### 1.2.1.3 Faktory patogenity a virulence

Patogenita je soubor faktorů podmiňujících vznik infekce, tedy schopnost určitého mikroorganismu vyvolávat onemocnění. Virulence je pak infekční potenciál určitého bakteriálního kmene, je podmíněna produkcí toxinů a enzymů, schopností rezistence a přítomností specifických antigenních struktur, které napomáhají vstupu do organismu hostitele. SA patří mezi vysoce patogenní a virulentní druhy mikroorganismů, proto produkuje celou řadu různých enzymů, toxinů,

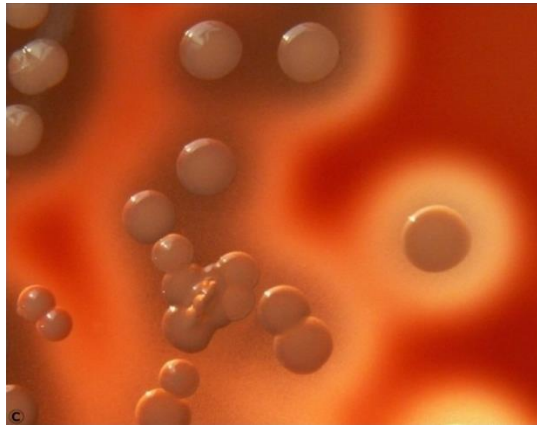
extracelulárních proteinů a antigenních struktur buněčné stěny, které jsou významné pro vznik infekce [1, 5, 44, 45]:

- pouzdro chrání bakterii před fágy, komplementem a protilátkami;
- peptidoglykan – základní složka buněčné stěny, má pyogenní charakter, aktivuje B-lymfocyty, komplement a makrofágy, čímž stimuluje produkci cytokinů;
- protein A – specifický povrchový antigen a součást peptidoglykanu buněčné stěny, zčásti je uvolněn do okolí, kde je schopen vázat i IgG, čímž brzdí jejich opsonizační schopnost, zneškodňuje navázání komplementu a znesnadňuje fagocytózu;
- kyselina teichoová – specifický antigen na buněčné stěně, který tvoří fágové receptory a napomáhá adhezi;
- adheziny – bílkoviny umožňující adhezi ke krevním buňkám a bílkovinám mezibuněčné hmoty;
- hemolysiny:
  - -lyzín (-toxin) – hlavní toxin produkovaný lidskými stafylokoky, porušuje integritu buněčných membrán, lyzuje králičí a beraní erythrocyty, ale nelyzuje lidské. Při kultivaci vzniká za vyčerpání CO<sub>2</sub>. Na krevním agaru tvoří ostře ohraničenou hemolýzu a je antagonistou -lyzínu;
  - -lyzín (sfingomyelináza C) – je charakteristický pro zvířecí kmeny SA. Lyzuje beraní a hovří erythrocyty, ale nelyzuje lidské ani králičí, na krevním agaru tvoří ostře ohraničenou dvojčecí hemolýzu. -lyzín potencuje účinek -lyzínu a je antagonistou -lyzínu;
  - -lyzín – lyzuje králičí erythrocyty a má imunogenní charakter;
  - -lyzín – má charakter povrchové aktivní látky, lyzuje králičí, beraní i lidské erythrocyty, na krevním agaru je hemolýza ostře ohraničená;
- plazmakoaguláza – protein s enzymatickou aktivitou, který konvertuje fibrinogen na fibrin a vytváří tak kolem stafylokoků ochranný fibrinový obal, který ho chrání před fagocytózou a antibiotiky, přispívá k opouštění zaniklých lézí;
- fibrinolysin (stafylokináza) – enzym rozpouštějící fibrin, fungující jako invazivní faktor umožňující proniknutí infekce do okolních tkání;
- hyaluronidáza – enzym, který rozpouští kyselinu hyaluronovou, která je součástí mezibuněčné hmoty tkání, tím usnadňuje šíření stafylokokové infekce;

- TSST-2 superantigen, který se váže přímo na makrofágy a lymfocyty a stimuluje tak produkci cytokinů způsobující TSS, je to pyrogenní toxin, který inhibuje syntézu makromolekul v endotelu a to hlavně v ledvinách a játrech;
- termostabilní nukleáza-3 protein, který odolává teplotě až 100 °C po dobu minimálně 15 minut, působí na DNA i RNA jako fosfodiesteráza;
- P-V leukocidin-3 toxický enzym, který porušuje integritu buněčných membrán leukocytů;
- exfoliantiny-3 proteiny vznikající během aktivního růstu bakterií v místě infekce, které se pak krevní cestou dostávají do kůže, kde vyvolávají těžké poškození (toxickou epidermální nekrózu) následované olupováním vnějších vrstev kůže;
- enterotoxiny-3 toxiny rezistentní k vysoké teplotě a proteolytickým enzymům trávicího traktu, způsobující enterotoxikózy, které vznikají po požití infikovaných potravin, hlavně mléčných a vaječných výrobků, na kterých se enterotoxiny za normální teploty mohou udržet několik desítek minut a nezní ani expozice 100 °C po dobu 30 minut.

#### 1.2.1.4 Laboratorní příkaz

Laboratorní diagnostika se provádí na základě specifických morfologických a metabolických znaků. Příkaz je možné dostat z výtvaru, exsudátu, sputa, krve, moči, likvoru i stolice. První diagnostika se provádí mikroskopicky. SA roste na kultivačních podmínkách a vytváří 1 až 3 mm široké, hladké, lesklé a ostře ohraničené kolonie. Dle Gramova barvení se zbarví do modra díky silné vrstvě peptidoglykanu ve své buněčné stěně. K růstu potřebuje SA kyselinu nikotinovou, thiamin a aminokyseliny jako zdroj dusíku. Charakteristická je pro ni tvorba plazmakoagulázy, která se na krevním agaru projevuje jako viditelný dvorec hemolýzy [1, 44, 45].



Obrázek . 8: *Staphylococcus aureus* na krevním agaru [43].

Jako další se může provést fagotypizace nebo prokaz TSST a enterotoxin pomocí metody ELISA. Dále může provádět prokaz hemolysin, termostabilní nukleázy a katalázy, ale tato vyšetření u laboratorní praxe nejsou tak častá a využívají se modernější metody diagnostiky, založené na prokazu bakteriální DNA [1].

### 1.2.2 Vznik MRSA a mechanismus rezistence

Po objevení a používání penicilinu se brzy začaly objevovat bakteriální kmeny produkující penicilinázu, což způsobilo jejich rezistenci, která se v současnosti vyskytuje u 80 % všech kmenů SA. Záhy byly proto nasazeny nové stabilnější peniciliny (methicilin a oxacilin), které byly rezistentní k penicilináze. První kmeny MRSA byly však objeveny v roce 1961, postupně šířily a na začátku 80. let 20. století byl zaznamenán jejich výskyt v nemocničním prostředí. Tyto kmeny jsou rezistentní jak k penicilinům, tak k methicilinu, oxacilinu a  $\beta$ -laktamovým antibiotikům včetně cyklosporinů a karbapenemů. Někdy mohou nést i rezistenci k dalším antibiotikům, jako je tetracyklin nebo erytromycin. Rezistence je určena přítomností genu *mecA*, který podmiňuje syntézu aberrantního proteinu váščího penicilinu PBP2a, která má oproti normálnímu PBP2 asi 1000 x nižší afinitu k penicilinu. V populaci se vyskytují dva kmeny MRSA, nemocniční a komunitní. Komunitní se od nemocničního liší hlavně jinou lokalizací genu *mecA* a nižší rezistencí k antibiotikům, způsobuje hlavně sepse a nekrotizující fascitidy a často napadá malé děti [1, 5, 6].



### 1.2.3 Nozokomiální infekce a jejich prevence

Nozokomiální infekce jsou vždy spojeny s pobytem v nemocničním prostředí. Jejich vznik je podmíněn setkáním rezistentního kmene bakterie s oslabeným pacientem. Infekce má v těle delší inkubační dobu a onemocnění se projeví nejčastěji 48 hodin po nákaze, někdy až 14 dní po odchodu pacienta do domácího prostředí. Zdrojem infekcí jsou mikroorganismy s vysokou rezistencí k antibiotikům a desinfekčním prostředkům. Vyskytují se často v méně přístupných místech, jako jsou ventilační sítě a klimatizace, jejich přenos zprostředkovává v těle nemocniční personál. Výskyt nozokomiálních infekcí je hlavním kritériem v posuzování kvality nemocniční péče, napadení pacienta nozokomiální infekcí prodlužuje dobu hospitalizace a zvyšuje morbiditu a mortalitu.

Mezi nejčastějšími typy nozokomiálních infekcí patří MRSA. Vysoké riziko vzniku nozokomiální infekce vzniká ve spojitosti s dlouhodobou hospitalizací, otevřenou ranou, kožními ulceracemi, popáleninami, chirurgickým výkonem, přítomností cizího tělesa v těle zavedenou kanylou, katetrem či cévkou, umělou plicní ventilací, nebo připojením na přístroj na mimotělní oběh či dialýzu. Ohroženi jsou i pacienti s imunodeficiencí a pacienti, kterým jsou podávány kortikoidy, cytostatika, imunosupresiva a antibiotika. Velkou rizikovou skupinu tvoří pacienti na JIP, u kterých nalézáme katabolismus, hypoxii, stres, jsou jim podávány kortikosteroidy a navíc mají mnoho otevřených vstupů se zavedenými kanylami [6, 46].

V prevenci nozokomiálních nákaz je nutné dodržovat hygienu, správně a často mytí a desinfikovat ruce, zabránit kontaminaci vnitřního prostředí nemocnice, přístrojů a lůžek, je nutné provádět slednou dekontaminaci, střídat desinfekční prostředky, provádět sterilizaci málo přístupných míst a využívat ochranné bariéry mezi pacienty a mezi pacienty a ošetřujícím personálem. Důležitá je přecházení nálezů rizikových pacientů a to hlavně jejich oxygenací, zabezpečením dostatečného prokrvení i periferních částí těla, přecházení tvorby proleženin, zajištěním správného metabolismu pacienta, zajištěním správné funkce ledvin a stejně, imunomodulací a monitorováním hladin antibiotik. Důležitá je též výživový stav pacienta, je prokázáno, že podvýživou zvyšuje riziko nákazy nozokomiálními infekcemi až 2,5 krát. Přitom lze stav výživy pacienta lehce monitorovat například měřením hodnot albuminu (popř. prealbuminu), transferinu nebo kožníasy.

Preventivně by se měl provádět screening přítomnosti MRSA u pacientů přijímaných na JIP, pacientů přeložených z jiných zdravotnických zařízení a oddělení, u pacientů s předchozí infekcí MRSA nebo u pacientů, u kterých bylo v minulosti zjištěno nosičství. Ideální by byla možnost rozlišit trvalé nosiče a vyloučit je z práce ve zdravotnickém zařízení a z procesu výroby nebo přípravy potravin pro hospitalizované [6, 44, 46]. Pacienti pozitivní na přítomnost MRSA musejí být izolováni od ostatních pacientů, jejich transport po nemocničním prostředí se omezí na minimum a pokud to jejich zdravotní stav dovolí, jsou co nejdříve propuštěni do domácího léčení. V opačném případě jsou uzavřeni na izolační pokoje se samostatným sociálním zařízením. Jsou oblečeni tak, aby se minimalizovala kontaminace okolního prostředí, výtahy k nim mají tedy zakrytou. Pro návštěvy i ošetřující personál pak platí přísná hygienická pravidla zahrnující používání ochranných pomůcek a desinfekci rukou po každém kontaktu s pacientem. Po propuštění takového pacienta se provede desinfekce celého pokoje a jeho příslušenství a až po negativních výsledcích kultivace se do takového pokoje může umístit další pacient. Každý záznam o pozitivitě pacienta na přítomnost MRSA se musí zaznamenat do jeho zdravotní karty [6].

### 1.3 APLIKACE VANKOMYCINU V LOKÁLNÍCH NOSIČÍCH UŽÍVANÝCH V ORTOPEDII

Infekce postihující pohybový aparát, zejména kosti, představují vážné komplikace v ortopedii a traumatologii. S rostoucím rozvojem bakteriální rezistence k antibiotikům se tento problém stává čím dál tím závažnějším. Vysoce patogenní kmeny *Staphylococcus aureus* mají velmi rozvinutou rezistenci k různým typům antibiotik avšak ke glykoproteinovým antibiotikům (vankomycinu a teicoplaninu) si stále zachovávají citlivost. Úplná rezistence je zatím jen ojedinělou záležitostí. V minulosti bylo nalezeno jen několik případů výskytu VISA a VRSA s MIC > 16 mg/l. Infekce jsou charakteristické výskytem hlubokých zánetlivých ložisek a vyžadují dlouhodobou léčbu. Způsobují je bakterie schopné vytvářet biofilm a odolávat tak nízkým koncentracím antibiotik. Tyto nízké koncentrace jsou v těle spojeny s užíváním systémových antibiotik. Úplná eradikace infekce je tak úspěšná díky lokální aplikaci antibiotik, která zajistí vysoké koncentrace, které mnohonásobně převyšují hodnoty MIC a které jsou schopny odstranit bakteriemi vytvořený biofilm a zároveň vytvářet dlouhodobou preventivní ochranu před kolonizací endoprotéz [2, 28, 49].

#### 1.3.1 Kostní cement

Kostní cement je často používaným lokálním nosičem vankomycinu a jiných antibiotik. V těle se používají polymethylmetakrylátové (PMMA) cementy (Copal nebo Palacos), které nepodléhají biodegradaci a slouží tak k trvalé stabilizaci kostních endoprotéz i kostních defektů. Vankomycin se z kostního cementu kontinuálně uvolňuje do okolí a prochází i mrtvou, devaskularizovanou tkání kosti, která se vyskytuje typicky například u pacientů s osteomyelitidou, čímž je zajištěna účinná prevence vzniku bakteriálních infekcí díky vysoké lokální koncentraci antibiotika, která převyšuje hodnotu MIC patogenních bakterií a kmenů VRSA a která zároveň není spojována s rizikem systémové toxicity. Rychlost uvolňování vankomycinu pak závisí na povrchu, tvrdosti a porézních vlastnostech konkrétního cementu. Vysoce porézní cementy mají lepší uvolňovací schopnosti než méně porézní [2, 27]. Polymethylmetakrylátové cementy po styku s vodnými roztoky ztrácejí

pofladované fyzikální a mechanické vlastnosti, proto je doporučováno do cementu přidávat antibiotika nikoliv v roztocích, ale v práškové formě [27, 47, 48].

S aplikací kostních cementů jsou spojeny i některé lokální nežádoucí účinky. Kostní cement může nepříznivě ovlivňovat proliferaci osteoklastů a osteoblastů. Způsobuje tepelnou nekrózu okolní tkáně díky jeho zahříváním při procesu tvrdnutí, kdy teplota dosahuje až 80 °C. *In vitro* byl prokázán dokonce negativní účinek na makrofágy, konkrétně na jejich schopnost fagocytózy a chemotaxe [2, 27]. Po implantaci endoprotézy s cementem se výjimečně může objevovat pokles krevního tlaku, alergická reakce, tromboflebitida, krvácení, srdeční arytmie nebo infarkt myokardu [47, 48].

### 1.3.1.1 Copal a Palacos

Copal a Palacos od firmy Heraeus jsou rychle tvrdnoucí cementové pryskyřice z polymethylmetakrylátu. Jako rentgenové kontrastní činidlo obsahují oxid zirkoniitový. Pro dobrou rozlišitelnost od kosti a okolní tkáně jsou obarveny chlorofylem. Oba mají vysokou pórovitost, takže se z nich antibiotika uvolní rychle a rychle. Kostní cementy Copal a Palacos jsou určeny k vyplnění kostních dutin a následnému upevnění kostních endoprotéz, stabilizaci kloubních náhrad, k vyplnění nebo krytí kostních defektů. Kostní dutina se před aplikací cementu musí chirurgicky vyčistit. Cement se připraví dle návodu, vznikne tak měkká, tvarovatelná hmota, která se aplikuje do určeného místa, přizpůsobí se tvaru a upevní se do něj endoprotéza, poté zůstane hmota tvrdnout a chladnout. Tyto cementy se aplikují hlavně při revizních operacích a reimplantacích kloubních endoprotéz, u pacientů s vysokým rizikem vzniku infekce nebo po předchozím výskytu infekce způsobené MRSA. Nepoužívají se při aplikaci primárních protéz, protože by to mohlo za následek zvýšení rizika vzniku rezistence k vankomycinu. Neaplikují se u těhotných a kojících žen a lidem s alergií na některé z použitých antibiotik nebo na komponenty cementu [2, 27, 47, 48].

### 1.3.2 Kostní štěpy

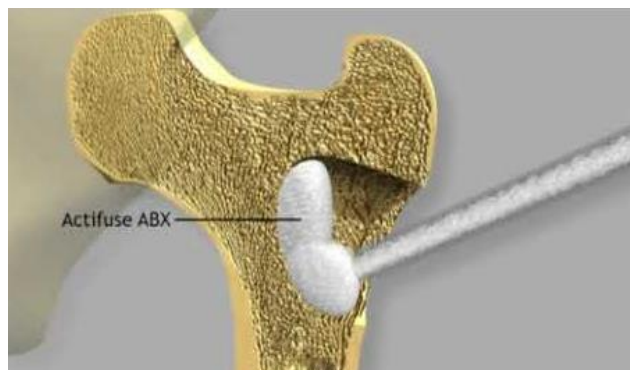
Kostní štěpy jsou určené hlavně k plošné rekonstrukci poškozené kostní tkáně. Mají jako nosiče vankomycinu tu výhodu, že jsou tělu vlastní a jsou snadno přijaty organismem pacienta. Jsou schopny reagovat na aktuální potřeby těla pacienta, podléhají osteoindukci, osteointegraci a remodelaci.

Připravená kost se nejprve zbaví všech chrupavčitých a fibrózních tkání, ponechá se jen kolagen a osteoinduktivní proteiny a poté se kost namele a sterilizuje gama zářením. Takto upravená kost je připravena na absorpci antibiotik, mohou se přidávat jak ve formě roztoku, tak v podobě prášku. Následně se tato kostní hmota aplikuje na určené místo. Některé kostní cementy už antibiotika obsahují, do kostních štěpů se ale antibiotika musejí přidávat i jejich přípravě, je doporučeno přidávat je 1 až 1,5 g vankomycinu na jednu femorální hlavici [2, 27]. Uvolnění antibiotika je pak závislé na jeho koncentraci, velikosti namletých částic kosti a na pH [27].

### 1.3.3 Actifuse

Actifuse je silikátová, osteostimulační, biokompatibilní náhrada kostního štěpu, která obsahuje, podobně jako kost, 0,8 % křemíku. Skládá se z biodegradabilního materiálu, takže může být postupně nahrazována nově vytvořenou kostní hmotou. *In vitro* bylo dokázáno, že urychluje metabolickou aktivitu a proliferaci kostní tkáně. Má rozporodou pórovitost, která umožní rychlé pronikání tkání a cévami. Actifuse je určen pro výplň mezer a otvorů v kostech, které vznikly při chirurgickém výkonu nebo při traumatu, kdy je běžný hojivý proces nahrazen nově vytvořenou kostní tkání. Neměly by se používat k výplni kostních mezer kostí, které se přímo podílejí na podpoře skeletu, neměly by se aplikovat pacientům s vážným onemocněním cév, s nekompenzovaným diabetem, osteomyelitidou, abnormálním metabolismem vápníku, pacientům s maligním nádorovým onemocněním nebo s touto renální insuficiencí. Jen výjimečně se mohou objevit nežádoucí účinky spojené s aplikací štěpu - hematoma, edém, zlomenina v místě umístění štěpu, špatné zahojení defektu v kosti. Příprava syntetického kostního štěpu Actifuse je snadná, po rozbalení se

přípravek pouze smíchá s příslušnými roztoky, kostní dřeň nebo krev pacienta a antibiotikem, naplní se pistole a aspiruje se dle potřeby do kostního otvoru [50, 51].



Obrázek . 9: Aspirace přípravku do otvoru v kosti [51].

## 1.4 CHIRURGICKÉ VÝKONY V ORTOPEDII VYUŽÍVAJÍCÍ LOKÁLNÍ APLIKACI VANKOMYCINU

### 1.4.1 Reimplantace endoprotézy ky elního kloubu

Jak ufl bylo zmín no d íve, implantace kostního cementu i kostních t p s obsahem antibiotik se provádí p edev ím p i revizních operacích i reimplantací endoprotéz. Mezi nej ast j í d vody reimplantace ky elní endoprotézy pat í luxace i uvoln ní n které ásti endoprotézy, infekce, zlomeniny femuru v oblasti cementového l flka i zlomeniny samotných ástí endoprotézy. Existuje n kolik mofností jak postupovat. Pokud jde o infek ní p í inu reimplantace, provádí se aplikace nové endoprotézy s novým cementovým l flkem s obsahem antibiotik. Tato metoda je velmi náro ná a vyžaduje extrakci cementového l flka a úplné manuální odstran ní zán tlivé tkán kole endoprotézy. Je náro ná na dobu chirurgického výkonu, dochází p i ní k výrazn j ím ztrátám krve a nese sebou rizika jako je tuková embolie i zlomeniny femuru. N kdy se m fle p istoupit k bezpe n j í dvoubodové reimplantaci, kdy je v prvním kroku odstran na endoprotéza, cementové l flko i zán tlivá tká a na místo endoprotézy se do kostní dutiny aplikuje pouze cementová vloflka s obsahem antibiotik. Po 6 ó 12 týdnech, kdy se infekce zhojí a ustoupí v echny známky zán tu, se pak do cementového l flka upevní endoprotéza.

Pokud ale nejde o infek ní komplikace, je zde mnoho variant, jak postupovat, záleflí na d vodou reimplantace, zda selhalo cementové l flko, jamka, zda do-lo k uvoln ní i fraktu e endoprotézy. Je mofné také aplikovat novou endoprotézu do p vodního cementového l flka, nový cement s antibiotiky je pak aplikován na povrch starého cementového l flka p ed fixací nové endoprotézy. Tato metoda ponechání p vodního cementového l flka je indikována hlavn v p ípadech, kdy je nutné vym nit pouze um lou kloubní jamku, a kdy jsou ostatní komponenty zachovány neporu-eny a mají stále pofladovanou pevnost a stabilitu sty ných ploch [52, 53].

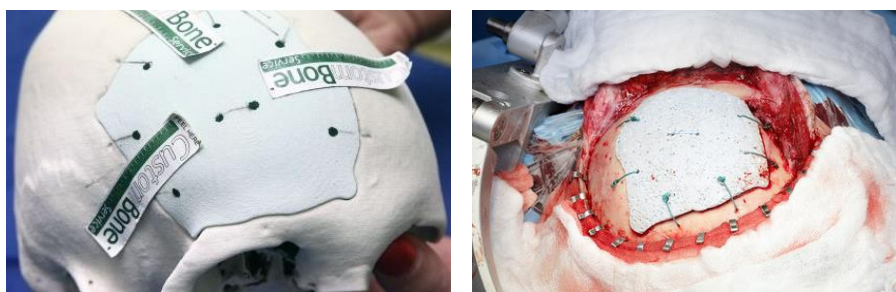
### 1.4.2 Reimplantace endoprotézy kolenního kloubu

Endoprotéza kolenního kloubu je velmi astý a úsp -ný ortopedický výkon, k selhání endoprotézy dochází pouze ve 3 ó 8 % v 10 - 15 letech po implantaci. K nej ast j ím p í inám selhání endoprotézy pat í uvoln ní n kterých z komponent,

infekce, nestabilita, fraktury kolem endoprotézy nebo otř polyethylenu. Opotřebenění povrchu endoprotézy způsobí resorpci kosti pod cementovou vrstvou se vznikem dutinek a malých defektů, což způsobuje pacientovi bolest. Reimplantace kolenní endoprotézy je zaměřena hlavně na obnovení přirozené osy kolene, obnovení stability a náhradu kostních defektů i defektů endoprotézy. Jako v předchozím případě reimplantace kyčelní endoprotézy, i při reimplantaci kolenní endoprotézy je ve většině případů nutné chirurgicky odstranit implantát s cementem a vytvořit nekrotickou a zánětlivou tkáň. Proveďte se vytvoření dutiny kostí, nejprve tibie, poté femuru a aplikuje se do nich nová endoprotéza s cementem. Následně je seřízena osa kloubu, poloha pately a výška endoprotézy vzhledem ke stavu vaz [54].

### 1.4.3 Zakrývání defektů na kosti lebeční

Pomocí kostního cementu lze spravovat tělší defekty v kosti lebeční. Cement se připraví dle návodu do tvarovatelné hmoty. Defekt v lebeční kosti se vyčistí, dura mater se zakryje buničinou a hliníkovou fólií, na kterou se aplikuje cement. Vytvaruje se do potřebného tvaru a tloušťky 4 až 5 mm. Teplota uvolňované polymerací se musí regulovat, proto se cement v průběhu tvarování skrývá fyziologickým roztokem. Jakmile začne cement tuhnout, upraví se jeho okraje a provrtají se do něj na několika místech otvory, kterými bude moci odtékat epidurální tekutina a kterými bude moci později prorostat pojivová tkáň. Z dura mater se odstraní hliníková folie a buničina a přiloží se hotový cement, který se následně zafixuje na několika místech nevstřebatelným materiálem [48].



Obrázek 10 a 11: Hydroxyapatit jako krycí materiál otvoru v kosti lebeční [55, 56].



## 2 CÍLE

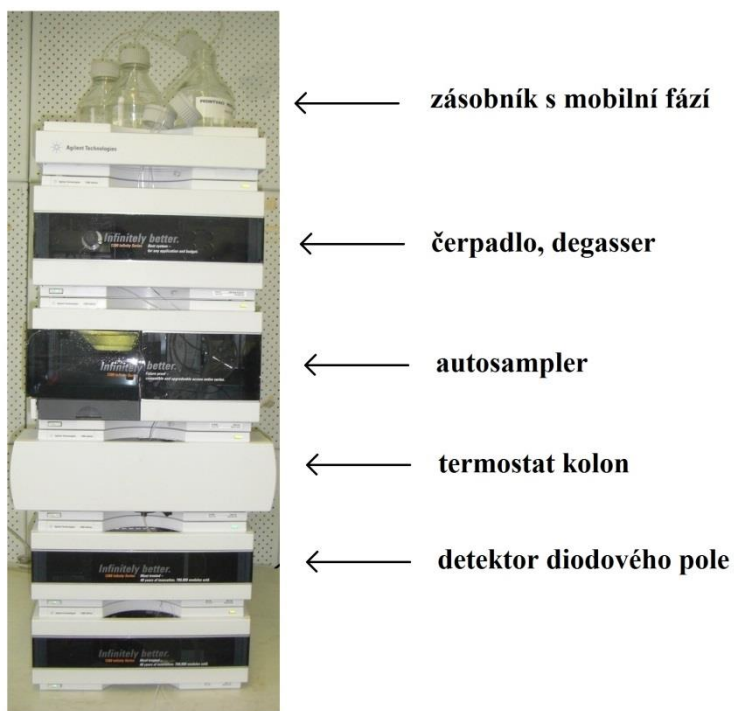
1. Zavedení a validace metody pro stanovení vankomycinu a jeho termodegradací produktů.
2. Monitoring koncentračního profilu uvolnění vankomycinu a jeho termodegradací produktů z různých typů nosičů vankomycinu vyufflívaných při ortopedických operacích.

### 3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

#### 3.1 Přístroje, chemikálie a pomůcky

##### 3.1.1 Přístroje

- HPLC sestava Agilent 1260 s DAD detektorem (Agilent Technologies)



Obrázek . 12: HPLC sestava Agilent 1260.

- Vortex (Velp-Scientifica)
- Kolona ZorbaxSb-Aq 4,6 x 250 mm, 5  $\mu$ m
- Evaporátor (ECOM)
- analytické váhy (Mettler-Toledo)
- PC s vyhodnocovacím programem Open Lab
- vakuová vývaha (Merck)



Obrázek . 13: Vortex.

### 3.1.2 Pomůcky a materiál

- Lidské spongiózní kostní štěpky (kostní banka, 1. ortopedická klinika 1. LF UK)
- Kostní cement Palacos (Heraeus)
- Kostní cement Copal (Heraeus)
- Syntetický kostní štěpek Actifuse (Apatech LTD)
- SPE kolonky Sep-Pak Vac (Waters)
- automatická pipeta (Biohit)
- štěpky
- eppendorfký
- kádinky
- odměrné válce
- skleněné zkumavky (10 ml)
- plastové kyvety (50 ml)
- váleček
- stůlka s destilovanou vodou
- vialky s uzávěry (Agilent Technologies)
- skleněná láhev (1 l)

### 3.1.3 Chemikálie

- dihydrogenfosforenan draselný  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (Penta)
- hydrogenfosforenan didraselný  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  (Penta)
- monohydrát dyhydrogenfosforenanu sodného  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  (Penta)
- heptahydrát hydrogenfosforenanu disodného  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$  (Penta)
- vancomycin (Sigma-Aldrich, PharmaSwiss 1000 mg)
- cefazolin (Sigma-Aldrich)
- degradační produkty vankomycinu (Ratiochem, s.r.o.)
- destilovaná voda (Biotech)

- metanol (Merck)
- acetonitril (Sigma-Aldrich)

### 3.1.4 Příprava reagensů a vzorků

#### ▪ Příprava promývacího roztoku

Promývací roztok do HPLC sestavy jsme připravili smícháním metanolu a destilované vody v poměru 1:1.

#### ▪ Příprava mobilní fáze A a B

Pro analýzu jsme vyuffívali gradientovou eluci dvou mobilních fází A a B. Pro jejich přípravu jsme si připravili zásobní pufr, na analytických vahách jsme navážili 2,14 g  $K_2HPO_4$  a 11,94 g  $KH_2PO_4$  a rozpustili ve 2 l destilované vody. Mobilní fáze A obsahovala 910 ml pufru, 50 ml acetonitrilu a 40 ml metanolu. Mobilní fáze B obsahovala 840 ml pufru, 80 ml acetonitrilu a 80 ml metanolu.

#### ▪ Příprava elučných roztoků pro SPE

První elučný roztok jsme připravili smícháním výše zmíněného pufru a acetonitrilu v poměru 3:7. Druhý elučný roztok jsme připravili smícháním vody a acetonitrilu v poměru 1:1.

#### ▪ Příprava vnitřního standardu (IS)

Jako vnitřní standard pro stanovení vankomycinu byl zvolen cefazolin. Na přípravu zásobního roztoku jsme navážili 0,01 g práškového cefazolinu a rozpustili v 10 ml destilované vody. Tento roztok jsme ještě zředili v poměru 1:9 destilovanou vodou, aby bylo dosaženo požadované koncentrace 100 mg/l.

#### ▪ Příprava kontrol

Kontroly pro analýzu jsme připravovali v nízkých i vysokých koncentracích pro vankomycin i pro termodegradací produkty vankomycinu. Ve směném standardu termodegradací produktů vankomycinu se nachází 23,1 % CDP-m a 76,9 % CDP-M. Nejprve jsme navážili 0,01 g práškového vankomycinu a 0,01 g termodegradací produktů a rozpustili jsme každý v 10 ml destilované vody, získali jsme tak zásobní roztoky o koncentraci 1 mg/l vankomycinu, 0,231 mg/l CDP-m a 0,769 mg/l CDP-M. Poté jsme si do skleněných zkumavek připravili zásobní roztoky kontrol dle následujících tabulek:

Vankomycin			
	zás. roztok ( l)	voda ( l)	koncentrace (mg/l)
kontrola 1	135	8865	15
kontrola 2	900	8100	100

Tabulka 1: Příprava kontrol vankomycinu.

Termodegradací produkty				
	zás. roztok ( l)	voda ( l)	CDP6M (mg/l)	CDP6m (mg/l)
kontrola 1	585	8415	50	15
kontrola 2	1170	7830	100	30

Tabulka 1 a 2: Příprava kontrol termodegradací produktů.

Následně jsme z každého takto připraveného zásobního roztoku odebrali 200 l do eppendorfek, označili a skladovali při -20 °C.

#### ▪ Příprava kalibračních roztoků

Pro vankomycin a pro termodegradací produkty vankomycinu byly připraveny osmibodové lineární kalibrace. Kalibrační roztoky byly připraveny dle následujících tabulek:

Vankomycin			
	zás. roztok ( l)	voda ( l)	koncentrace (mg/l)
1	5 (10x zedno)	495	1
2	50 (10x zedno)	450	10
3	15	485	30
4	30	470	60
5	50	450	100
6	100	400	200
7	200	300	400
8	300	200	600

Tabulka 3: Příprava kalibračních roztoků pro vankomycin.

Termodegradací produkty				
	zás. roztok ( l)	voda ( l)	CDP 6 M (mg/l)	CDP 6 m (mg/l)
1	7 (10x zedno)	493	1,08	0,3
2	7	493	10,8	3,2
3	21	479	32,3	9,7
4	42	458	64,6	19,4
5	65	435	100	30,0
6	130	370	200	60,0
7	260	240	400	120,1
8	500	-	769	231,0

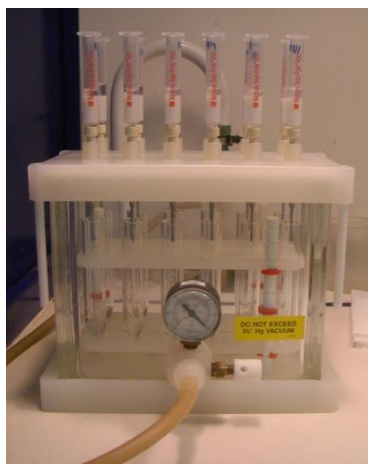
Tabulka 4: Příprava kalibračních roztoků termodegradací produkty vankomycinu.

#### ▪ Příprava fosfátového pufru

Fosfátový pufr byl připraven pro pokusy s lokálními nosiči vankomycinu. Na jeden litr pufru bylo smícháno 95 ml 0,2 M roztoku monohydrátu dyhydrogenfosforenanu sodného  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , 405 ml 0,2 M roztoku heptahydrátu hydrogenfosforenanu disodného  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$  a 500 ml destilované vody. Následně byl takto připravený fosfátový pufr uzavřen a uzavřen do sterilní láhve.

#### ▪ Příprava vzorků

Ke 200 l vzorku, kontroly i kalibrátoru v eppendorfkách jsme přidali 200 l vnitřního standardu (cefazolinu), 200 l destilované vody a směs jsme krátce promíchali na vortexu. Pro vyšetření čistoty směsi jsme je také provedli separací na pevné fázi (SPE) pomocí extrakčních kolonek. Připravili jsme si skleněné zkumavky a umístili jsme je do vakuové vývěvy. SPE kolonky jsme nejprve aktivovali napipetováním 1,6 ml metanolu a následně 0,8 ml vody. Poté jsme na takto aktivované kolonky nanесли vzorky, pak jsme na kolonky ještě napipetovali 1,6 ml vody. Po vsáknutí jsme kolonky uzavřeli a vymyli jsme skleněné zkumavky za účelem, abychom mohli jít eluovat vzorku. Na kolonky jsme postupně nanесли dvě eluční inidla, nejprve 0,8 ml směsi pufru a acetonitrilu v poměru 3:7 a poté 0,8 ml směsi vody a acetonitrilu v poměru 1:1.



Obrázek . 14: Vakuová vývaha s kolonkami pro SPE.

Zkumavky s eluátem jsme vložili do evaporátoru a sušili jsme vzorky vzduchem po dobu 10 minut, aby se nám zredukoval objem na cca 1 ml. Takto připravené vzorky jsme pipetovali do skleněných vialek, které jsme uzavřeli víčkem a vložili do pístroje.



Obrázek . 15: Evaporátor.

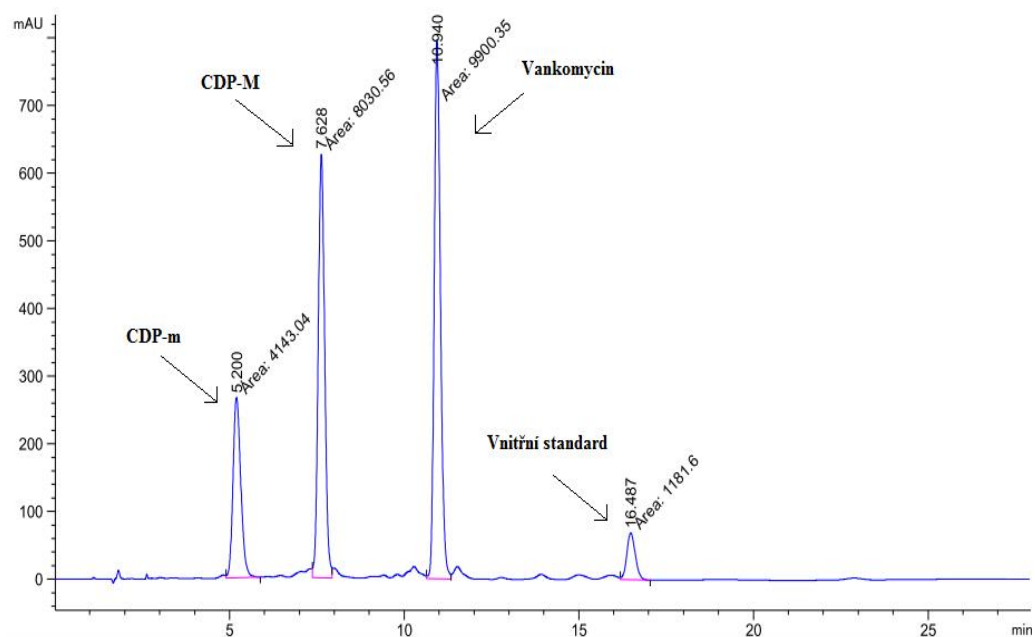
### 3.1.5 HPLC analýza

Vycházeli jsme z metody popsané v práci Bakes D. W. et al., kterou jsme následně optimalizovali. Chromatografická analýza probíhala za průtoku 1,5 ml/min gradientovou elucí dvou mobilních fází A a B dle následující tabulky.

minuty	MF A	MF B
0 - 2	100 %	-
2 - 9	-	100 %
9 - 21	-	100 %
21 - 24	100 %	-
24 - 28	100 %	-

Tabulka 5: Gradient mobilních fází.

Celková doba analýzy byla nastavena na 28 minut při tlaku cca 230 bar. Kolona byla temperována na teplotu 22 °C. Nástik na kolonu byl nastaven na 50  $\mu$ l a detekce probíhala pomocí detektoru diodového pole při 210 nm. Vankomycin byl eluován při 11. minutě analýzy, majoritní degradační produkt byl eluován při 7. minutě, minoritní degradační produkt byl eluován při 5. minutě a vnitřní standard při 17. minutě analýzy.



Obrázek 16: Průběh HPLC analýzy.

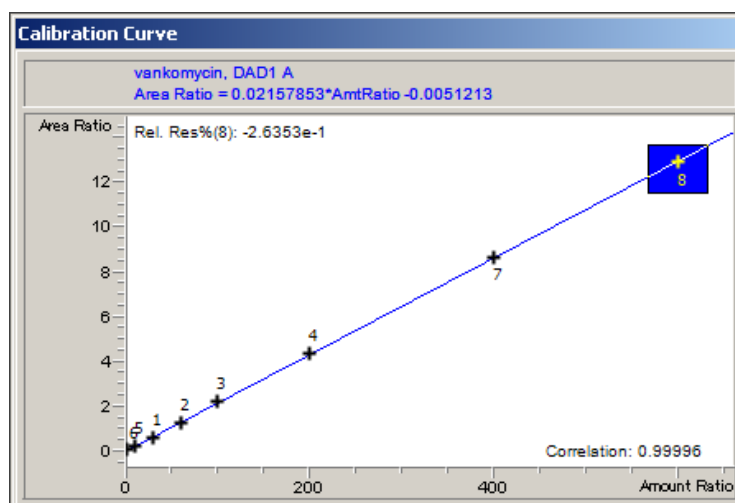


## 4 VÝSLEDKY A DISKUSE

### 4.1 VALIDACE METODY

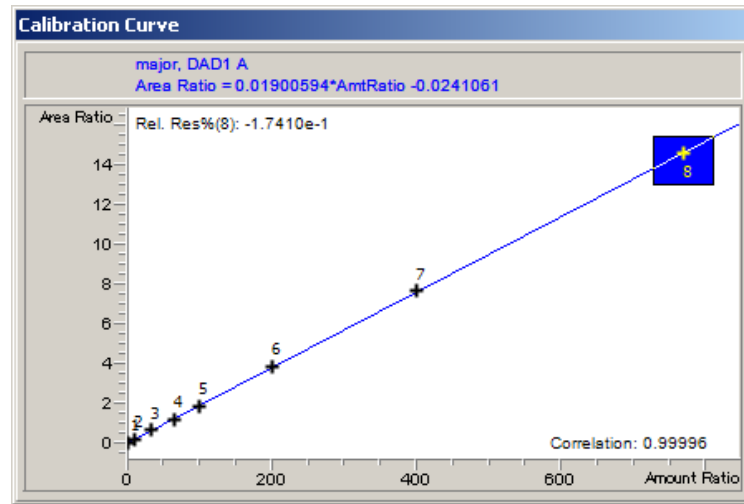
#### 4.1.1 Kalibrace

Pro stanovení vankomycinu byla sestavena osmi bodová lineární kalibrace, každý kalibrátor byl připraven v dubletu. Koncentrace jednotlivých kalibrátorů byly 1, 10, 30, 60, 100, 200, 400 a 600 mg/l. Pro výpočet koncentrace vankomycinu byla použita rovnice regrese  $y = 0,02177908 \cdot x + 0,0168092$ , kde  $y$  je poměr ploch pík vankomycinu a IS a  $x$  je koncentrace vankomycinu. Hodnota regresního koeficientu pro vankomycin je 0,99995, ta nám udává míru rozptylu bodů od regresní křivky. Kalibrační křivka byla v celém rozsahu testovaných koncentrací lineární.



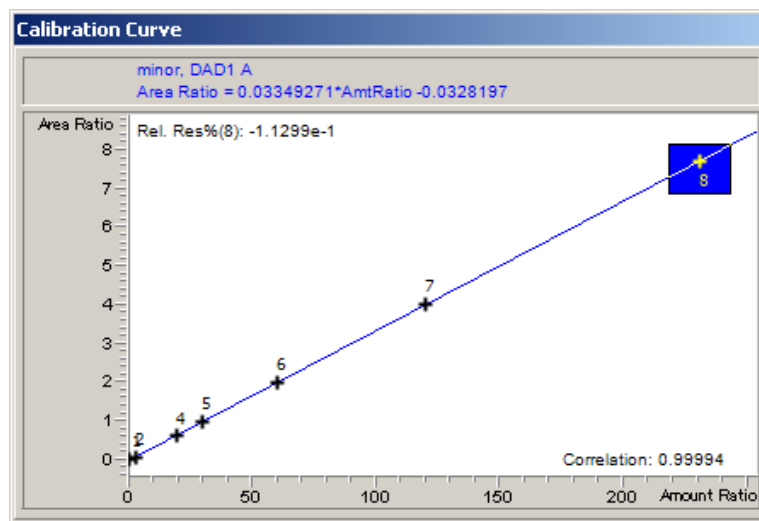
Obrázek 17: Kalibrační křivka vankomycinu.

Pro kalibraci termodegradací produktů vankomycinu byly připraveny dvě samostatné kalibrace. Pro majoritní termodegradací produkt vankomycinu byla vytvořena osmi bodová lineární kalibrace o koncentracích kalibračních roztoků 1,08, 10,8, 32,3, 64,4, 100, 200, 400 a 769 mg/l. Pro výpočet koncentrace CDP-M byla použita rovnice regrese  $y = 0,01900594 \cdot x + 0,0241061$ , hodnota regresního koeficientu pro CDP-M je 0,99995. Kalibrační křivka byla v celém rozsahu testovaných koncentrací lineární.



Obrázek . 18: Kalibra ní k ivka pro CDP-M.

Pro minoritní termodegradacího produkt byla sestavena také osmi bodová lineární kalibrace, jeden bod byl vypuštěn, tudíž byla kalibra ní k ivka sestavena z kalibrátor o koncentracích 0,32, 3,2, 19,4, 30,0, 60,1, 120,1 a 230,0. Pro výpočet CDP-m byla použita rovnice regrese  $y = 0,0334927.x \pm 0,0328197$ , hodnota regresního koeficientu je 0,99994. Kalibra ní k ivka byla v celém rozsahu testovaných koncentrací lineární.



Obrázek . 19: Kalibra ní k ivka pro CDP-m.

#### 4.1.2 Opakovatelnost

Opakovatelnost neboli přesnost je definována, jako přesnost shody naměřených hodnot za podmínek opakovatelnosti měření. Vzorby by měly být připraveny téžle osobou, stejným analytickým postupem, na téžle místě a měly by být měřeny na stejném analyzátoru v krátkém časovém období [57]. V této práci byla opakovatelnost zjištěna pomocí měření série dvaceti kontrol od nízké i vysoké hladiny koncentrace vankomycinu a termodegradací produktů vankomycinu. Z naměřených výsledků byl pak vypočítán průměr, směrodatná odchylka výbořová (SD), variační koeficient (CV) a bias neboli správnost. Směrodatná odchylka nám udává míru rozptylu hodnot od střední hodnoty, tedy čím nižší je její hodnota, tím je metoda přesnější. Variační koeficient neboli nepřesnost, je vyjádřen jako podíl směrodatné odchylky a průměrné hodnoty měření a neměl by přesáhnout hodnotu 10 %. V našem případě hodnota CV pro nízkou hladinu kontroly vankomycinu dosahuje 5,53 %, pro vysokou hladinu 2,50 %. Hodnota CV kontrol pro termodegradací produkty vankomycinu dosahuje v nízkých hladinách hodnoty 5,11 % pro CDP-m a 2,89 % pro CDP-M, ve vysokých hladinách kontrola pak 2,49 % pro CDP-m a 1,82 % pro CDP-M. Všechny tyto naměřené hodnoty variačního koeficientu splňují podmínky úspěšné validace metody.

<b>Vankomycin</b>		
	<b>Ko 1 (15 mg/l)</b>	<b>Ko 2 (100 mg/l)</b>
1	14,27	99,03
2	15,44	98,48
3	15,43	99,07
4	15,32	104,76
5	14,73	101,05
6	13,17	100,93
7	16,06	101,16
8	15,82	106,35
9	15,19	102,30
10	16,08	99,86
11	14,36	104,81
12	16,02	103,82
13	15,89	105,31
14	14,94	101,73
15	13,49	103,68
16	14,87	105,02
17	14,12	104,22
18	14,97	102,60
19	14,78	98,43
20	15,57	99,10
<b>průměr</b>	15,03	102,09
<b>SD</b>	0,83	2,56
<b>CV (%)</b>	5,53	2,50
<b>Bias (%)</b>	0,17	2,09

Tabulka 6: Opakovatelnost vankomycinu.

<b>Termodegradací produkty vankomycinu</b>				
	<b>Ko 1</b>		<b>Ko 2</b>	
	<b>CDP-m (15 mg/l)</b>	<b>CDP-M (50 mg/l)</b>	<b>CDP-m (30 mg/l)</b>	<b>CDP-M (100 mg/l)</b>
1	16,35	52,76	30,23	104,85
2	15,85	50,06	30,01	103,47
3	14,70	50,45	29,51	105,08
4	16,49	50,47	29,93	103,56
5	14,52	51,86	32,00	103,33
6	16,59	51,51	29,02	102,15
7	15,62	51,35	29,56	102,42
8	16,09	50,19	30,07	103,46
9	15,27	53,26	29,32	97,99
10	14,55	52,62	29,12	100,26
11	14,66	52,68	30,56	101,94
12	14,91	53,29	31,47	98,27
13	14,22	52,94	30,69	104,20
14	14,68	53,03	30,64	102,36
15	14,04	51,70	30,55	102,80
16	15,33	52,00	30,66	102,18
17	15,01	49,95	30,64	101,31
18	14,73	49,43	30,73	101,44
19	14,55	48,48	29,84	103,21
20	15,79	49,25	30,54	101,30
<b>průměr</b>	15,20	51,36	30,25	102,28
<b>SD</b>	0,78	1,48	0,75	1,87
<b>CV (%)</b>	5,11	2,89	2,49	1,82
<b>Bias (%)</b>	1,32	2,73	0,85	2,28

Tabulka 7: Opakovatelnost termodegradací produktů vankomycinu.

### 4.1.3 Reprodukovatelnost

Reprodukovatelnost je definována jako t snost shody nam ěných hodnot za podmínek reprodukovatelnosti m ění. Kdy je jedna z podmínek opakovatelnosti poru-ena [57]. V na-í práci jsme poru-ili podmínku m ění kontrol v úzkém časovém období. M ěli jsme dvacet kontrol pro nízkou i vysokou hladinu vankomycinu a termodegradací produktů vankomycinu vřdy v jiný den. Ostatní podmínky opakovatelnosti byly zachovány. Z výsledk ů jsme op t vypo ítali pr m r, sm rodatnou odchylku výb rovou, varia ní koeficient a bias. V-echny na-e hodnoty CV pro vankomycin a pro termodegradací produkty vankomycinu spl ují podmínky úsp -né validace metody. Hodnoty CV pro nízkou hladinu kontrol vankomycinu dosáhly 5,80 %, pro vysokou 2,91 %, pro nízkou hladinu kontrol termodegradací produktů 6,65 % pro CDP-m a 3,76 % pro CDP-M, ve vysokých hladinách kontrol zase 6,44 % pro CDP-m a 3,37 % pro CDP-M.

<b>Vankomycin</b>		
	<b>Ko 1 (15 mg/l)</b>	<b>Ko 2 (100 mg/l)</b>
1	14,06	104,89
2	15,48	106,83
3	15,81	102,96
4	15,94	99,98
5	15,59	100,29
6	15,44	98,97
7	13,55	106,86
8	15,58	103,09
9	13,28	100,32
10	15,47	103,15
11	15,33	103,27
12	14,95	100,68
13	15,78	98,83
14	15,40	98,58
15	16,01	109,74
16	16,49	102,15
17	16,75	101,36
18	15,79	102,68
19	15,61	101,80
20	16,45	99,56
<b>průměr</b>	15,44	102,30
<b>SD</b>	0,90	2,97
<b>CV (%)</b>	5,80	2,91
<b>Bias (%)</b>	2,92	2,30

Tabulka 8: Reprodukovatelnost vankomycinu.

Termodegradací produkty vankomycinu				
	Ko 1		Ko 2	
	CDP-m (15 mg/l)	CDP-M (50 mg/l)	CDP-m (30 mg/l)	CDP-M (100 mg/l)
1	15,52	54,34	28,40	102,33
2	16,58	55,58	26,51	105,64
3	14,93	54,85	28,77	99,89
4	15,34	53,52	31,25	109,70
5	14,72	51,66	25,10	108,68
6	15,37	54,22	27,76	102,45
7	15,48	48,73	29,32	102,43
8	15,41	53,09	26,06	109,43
9	14,52	51,38	30,01	109,76
10	15,46	53,8	29,45	103,53
11	14,46	50,46	26,57	102,62
12	14,04	52,25	28,44	102,23
13	13,10	49,50	30,27	101,48
14	14,82	54,52	29,99	98,54
15	16,78	52,02	27,92	106,02
16	13,89	51,53	25,33	102,55
17	14,36	53,73	31,04	104,15
18	15,66	50,13	30,44	101,06
19	17,03	49,99	29,53	100,35
20	16,42	51,17	28,65	99,45
<b>průměr</b>	15,19	52,32	28,54	103,61
<b>SD</b>	1,01	1,97	1,84	3,49
<b>CV (%)</b>	6,65	3,76	6,44	3,37
<b>Bias (%)</b>	1,30	4,65	-4,87	3,61

Tabulka 9: Reprodukovatelnost termodegradací produktů vankomycinu.



#### 4.1.4 Správnost (bias)

Správnost neboli také pravdivost je definována jako rozdíl mezi střední hodnotou výsledků zkoušky a přijatou referenční hodnotou. Udává nám hodnotu odhadu systematické chyby měření, která by neměla přesáhnout hodnotu 10 % [57]. Z naměřených hodnot opakovatelnosti a reprodukovatelnosti jsme vypočetili hodnoty bias. Vypočítané hodnoty jsou zaznamenány v tabulkách 6, 9 a 10 a žádná z naměřených hodnot nepřekrojuje hodnotu 5 %.

#### 4.1.5 Mez detekce

Mez detekce je nejmenší množství analytu ve vzorku, které může být detekováno a analytický signál je statisticky významně odlišný od šumu [57]. V našem případě byla mez detekce zjištěna změřením tří slepých vzorků (blank), u kterých byla zaznamenána výška píků. Z těchto hodnot se vypočetl průměr a vynásobil se třemi. Pro výpočet meze detekce pak byla využita rovnice:

$$X_d = \text{mez detekce} \quad Y_d = \frac{Y_d}{b_1}$$

$$Y_d = 3 \cdot h_{\max}$$

$b_1$  = směrnice kalibrační křivky, zjištěná ze závislosti  $y = b_1 \cdot x$ , kde  $y$  je výška píku

Výška píků nulových vzorků			
	vankomycin	CDP-m	CDP-M
1	0,05	0,10	0,06
2	0,45	0,09	0,05
3	0,12	0,01	0,01
<b>Průměr</b>	0,21	0,07	0,04
<b>Y<sub>d</sub></b>	<b>0,63</b>	<b>0,21</b>	<b>0,12</b>

Tabulka 10: Hodnoty výšek píků naměřených blanků.

Směrnice kalibrační křivky pro vankomycin je 1,6087. Mez detekce pro stanovení vankomycinu je tedy 0,39 mg/l. Směrnice kalibrační křivky pro CDP-m je 1,8344. Mez detekce pro stanovení minoritního termodegradacího produktu vankomycinu je 0,11 mg/l. Směrnice kalibrační křivky pro CDP-M má hodnotu

1,2519. Mez detekce pro stanovení majoritního termodegradního produktu vankomycinu je 0,10 mg/l.

#### 4.1.6 Výtřinnost

Výtřinnost metody nám udává poměr množství analytu získaného danou analytickou metodou k přijaté referenční hodnotě [57]. Námí získané hodnoty výtřinnosti pro vankomycin jsou 100,20 a 102,09 %. Hodnoty výtřinnosti metody pro stanovení termodegradních produktů vankomycinu jsou pak pro CDP-m 100,83 a 101,33 % a pro CDP-M 102,28 a 102,72 %. Výtřinnost by se měla pohybovat v rozmezí 90 a 110 %, tudíž námí naměřené hodnoty výtřinnosti splují podmínky úspěšné validace.

#### 4.1.7 Robustnost

Robustnost je schopnost metody poskytovat přijatelné výsledky měření i v případě, že dojde k malým odchylkám od měřicího postupu i k malé změně složení vzorku. Udává nám spolehlivost metody při jejím běžném používání v praxi [57]. V našem případě stanovení vankomycinu jsme se rozhodli porovnávat vliv skladování vzorků při různých teplotách. Připravili jsme si zásobní roztoky kontrol vankomycinu dle tabulky 11. Na celkový objem 20 ml byla připravena kontrola 1 o koncentraci 60 mg/l a kontrola 2 o koncentraci 120 mg/l.

	koncentrace (mg/l)	zás. roztok (ml)	voda (ml)
<b>Ko1</b>	60	1,2	18,8
<b>Ko2</b>	120	2,4	17,6

Tabulka 11: Příprava kontrolních roztoků pro měření robustnosti.

Zásobní roztoky kontrol jsme po 200 l rozpíjeli do eppendorfek. Provedli jsme měření první série erstv připravených vzorků a zbytek kontrol jsme umístili do lednice (cca 4 °C), mrazáku (cca -20 °C) a do místnosti o průměrné teplotě cca 25 °C. Vzorky skladované v lednici a při pokojové teplotě byly pak měřeny po 12, 24, 48 a 120 hodinách. A vzorky v mrazáku po 1, 2 a 3 měsících od zhotovení. Bylo provedeno vždy měření 10 vzorků kontroly 1 a 10 vzorků kontroly 2. Ze

stanovených hodnot koncentrací vankomycinu byl pak vypočítán průměr a zaznamenán do následujících tabulek:

Početní koncentrace připravených kontrol	
Ko 1 (60 mg/l)	Ko 2 (120 mg/l)
58,28	118,89

Tabulka . 12: Naměřené koncentrace jednotlivých kontrol bezprostředně po zhotovení.

Vzorky skladované při cca 25 °C		
čas (hodiny)	Ko 1 (mg/l)	Ko 2 (mg/l)
12	58,54	119,79
24	57,82	120,27
48	59,62	118,68

Tabulka . 13: Naměřené hodnoty kontrol po skladování při laboratorní teplotě.

Vzorky skladované při cca 4 °C		
čas (hodiny)	Ko 1 (mg/l)	Ko 2 (mg/l)
12	59,94	120,11
24	59,44	121,87
48	57,51	121,31
120	58,64	120,98

Tabulka . 14: Naměřené hodnoty kontrol skladovaných v lednici.

Vzorky skladované při cca -20 °C		
čas (minuty)	Ko 1 (mg/l)	Ko 2 (mg/l)
1	59,38	118,96
2	57,64	121,36
3	58,45	119,41

Tabulka . 15: Naměřené hodnoty kontrol vzorků skladovaných v mrazáku.

Naměřené hodnoty rozkladu skladovaných vzorků se od původní koncentrace lišily v maximálním rozsahu 2,77 %. Z naměřených hodnot lze tedy usoudit, že krátkodobé skladování vzorků vankomycinu při různých teplotách nemá výrazný vliv na změnu koncentrace. Vzhledem k tomu, že se vankomycin vlivem vyšších teplot rozpadá na termodegradací produkty, mohl by se krátkodobě skladovat v lednicích při cca 4 °C, ale při dlouhodobějším skladování by bylo vhodné zvolit skladování v mrazáku při cca -20 °C a méně.

#### 4.2 Testování uvolňování vankomycinu a jeho termodegradací produktů z různých typů nosičů vankomycinu

Bylo provedeno pilotní pokus s různými typy lokálních nosičů vankomycinu. Na 100 g každého materiálu bylo přidáno určité množství vankomycinu, materiál byl následně odvážen a rozdělen na 10 vzorků o stejné hmotnosti 1 g. Z materiálu byla vytvářena kulička, která se umístila do plastových kyvet, do kterých se následně přidalo 20 ml fosfátového pufru.



Obrázek 20, 21 a 22: Příprava kostního cementu.



Obrázek 23 a 24: Jednotlivé vzorky kostního cementu v kyvetách.

Kyvety byly popsány, uzavřeny a umístěny do termostatu nastaveného na 37 °C. Po určitých časových intervalech v časovém rozmezí 2 až 3 týdnů se pak z každého vzorku, po promíchání jeho obsahu, odebíralo 200 µl fosfátového pufru, ve kterém jsme detekovali koncentraci uvolněného vankomycinu a termodegradací produktů. Abychom zachovali konstantní objem, ve kterém se vankomycin z materiálu lokálních nosičů uvolňoval, vždy jsme do kyvet napipetovali opět 200 µl stejného fosfátového pufru. Z naměřených koncentrací jsme pak sestrojili koncentrační profil uvolňování vankomycinu a jeho termodegradací produktů z různých typů materiálů, které jsme tímto mohli porovnat.

Přehled testovaných lokálních nosičů vankomycinu		
pokus	typ materiálu	množství vankomycinu na 100 g materiálu (g)
1	Kostní štěrpek	2,50
2	Palacos	2,50
3	Copal	3,17
4	Actifuse	2,50
5	Kostní štěrpek	2,50

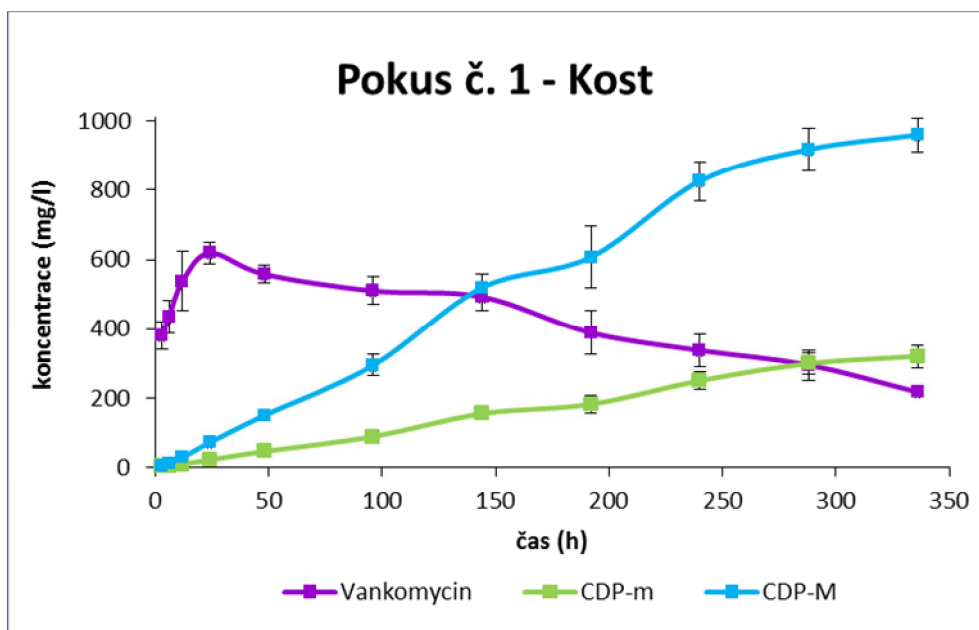
Tabulka 16: Použití materiálů lokálních nosičů vankomycinu.

#### 4.2.1 Pokus 1.0 Kost

Na první pokus se spongiózními kostními štěrpkami bylo naváženo 100 g kostních štěrpků o velikosti 4 až 5 mm, do kterých bylo následně promícháno 2,5 g práškového vankomycinu. Tato směs se důkladně promíchala a po 1 g se rozdělila a zavázala do malých kuliček pomocí gázy. Takto vytvořené kuličky byly umístěny do kyvet a zality 20 ml fosfátového pufru. Následně jsme odebírali vzorky v intervalech 3, 6, 12, 24, 48, 96, 144, 192, 240, 288 a 336 hodin. Naměřené koncentrace jsou zaznamenány do následujícího grafu:



Obrázek . 25, 26, 27 a 28: Příprava namleté lidské spongiózní kosti.



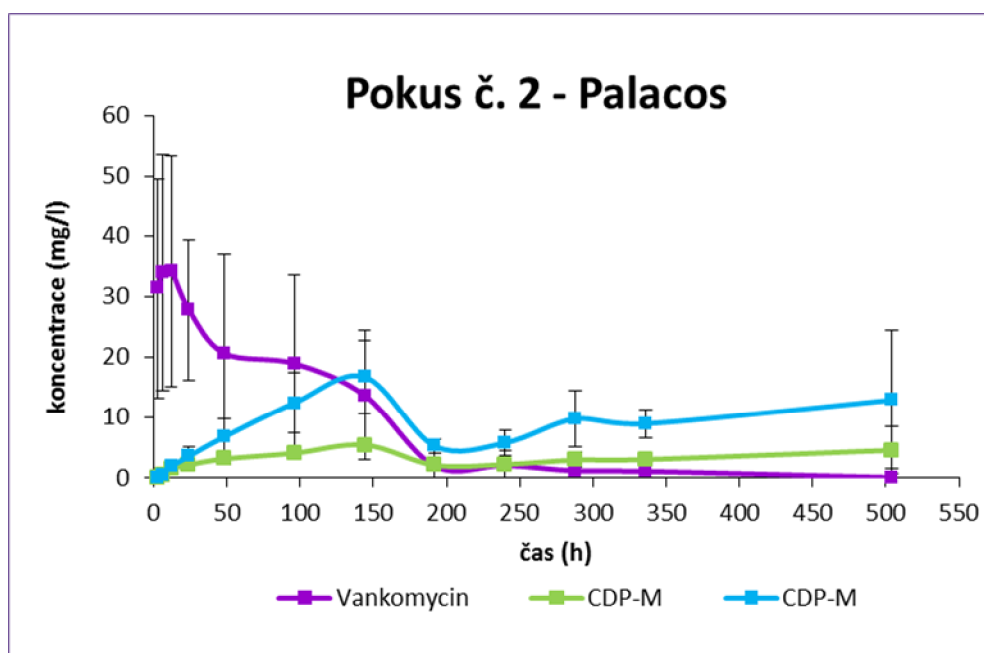
Graf . 1: Příprava uvolnění vankomycinu z kostních  $\mu$ p.

Maximální hodnoty naměřené koncentrace uvolněného vankomycinu bylo dosaženo po 24 hodinách od začátku pokusu a to 618,9 mg/l, poté docházelo k pozvolnému poklesu koncentrace až na hodnotu 217,5 mg/l, což je stále

n kolikanásobně vyšší koncentrace než je hodnota MIC pro VRSA. Koncentrace uvolněných termodegradací produktů téměř lineárně stoupala až k dosažení hodnoty 959,8 mg/l pro CDP-M a 320,9 pro CDP-m. Buttaro et al. ve svých pracích popisují, že prováděli *in vitro* a *in vivo* pokusy se spongiózními kostními těly, aby zjistili jejich kapacitu jako lokálních nosičů vankomycinu. Impregnovali 6,5 g vankomycinu na jednu lidskou femorální hlavici a pozorovali množství uvolněného vankomycinu. Ukázalo se, že naměřené hodnoty jsou až 220 krát vyšší než je potřebná MIC hlavních patogenních bakterií včetně MRSA a VRSA. Takové hodnoty lokální koncentrace vankomycinu mohou mít však negativní vliv na aktivitu osteoblastů a mohou vést až k lokální nekróze [59, 61]. Námi naměřené koncentrace jsou jen cca 38 krát vyšší než je potřebná MIC. Autoři navíc ve své publikaci neuvádějí, jakou hmotnost měla použítá femorální hlavice. V další jejich studii je uvedeno, že zkoumali *in vivo* uvolňování vankomycinu ze spongiózních kostních těl, užitých u 10 pacientů, kteří podstoupili reimplantaci kyčelní endoprotézy. Impregnovali 1 g vankomycinu na jednu femorální hlavici. Maximální naměřené koncentrace metodou FPIA dosahovaly hodnot kolem 1400 mg/l, což n kolikanásobně převyšuje hodnotu MIC, avšak tato metoda neumí rozlišit vankomycin od jeho termodegradací produktů a jelikož dochází ke zkráceným reakcím termodegradací produktů s vankomycinem, je tato hodnota pravděpodobně jejich sumou [59, 60].

#### 4.2.2 Pokus 2.0 Palacos

Palacos je syntetický polymerový kostní cement bez přidání antibiotika. Připravili jsme ho následujícím způsobem: Na analytických vahách jsme odváhili 100 g cementu, do kterého jsme přidali 2,5 g práškového vankomycinu a promíchali. Ke směsi byl přidán celý obsah ampulky s tekutým monomerem a vše bylo důkladně promícháno do vzniku elastické homogenní směsi. Tuto směs jsme rozdělili na deset 1 g kuliček, které jsme pak umístili do fosfátového pufru a do termostatu. Cement po zhotovení rychle tuhne za zvýšené teploty, která dosahuje hodnot až 80 °C, proto jsme museli pracovat velmi rychle, dokud bylo možné připravenou hmotu tvarovat. Vzorky jsme pak odebírali v intervalech 3, 6, 12, 24, 48, 96, 144, 192, 240, 288, 336 a 504 hodin. Naměřené koncentrace vankomycinu a jeho termodegradací produktů jsou znázorněny v následujícím grafu.



Graf . 2: Průběh uvolňování vankomycinu z kostního cementu Palacos.

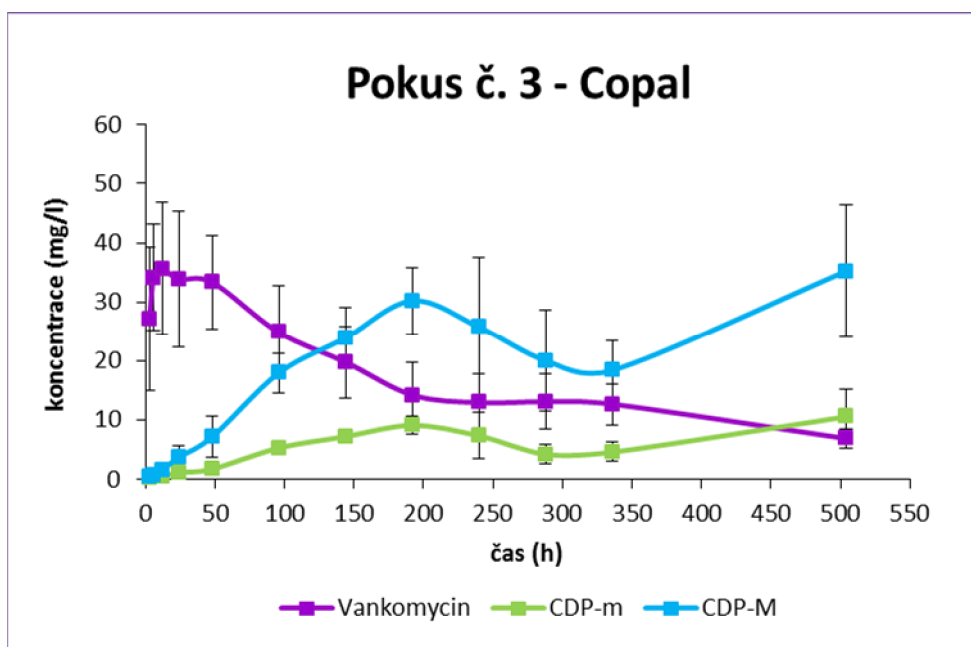
Maximální koncentrace uvolněného množství vankomycinu bylo dosaženo po 12 hodinách a to hodnoty 34,2 mg/l, poté docházelo k poklesu. 7. den klesla koncentrace uvolněného vankomycinu na hodnotu přibližně 13,9 mg/l, což už je menší hodnota než MIC pro VRSA. V tento ten bylo také dosaženo maximálních koncentrací termodegradací produktů, 16,7 mg/l pro CDP-M a 5,4 mg/l pro CDP-m. Od té doby se uvolňování vankomycinu i jeho termodegradací produktů z kostního cementu Palacos zejména zastavilo a hodnoty koncentrace vankomycinu se pohybovaly okolo 1 mg/l. To mohlo být způsobeno tím, že kostní cement během polymerace zcela zatvrdne a to znemožní uvolňování antibiotika z celého objemu materiálu. V prvních 7 dnech se tedy pravděpodobně uvolnilo pouze to množství vankomycinu, které bylo ukotveno na povrchu vytvořených kuliček. Buttaro et al. v jedné ze svých prací uvádí, že prováděli porovnání uvolňování antibiotik u 10 pacientů s implantovanými kostními štěpy a 10 pacientů s implantovaným PMMA cementem, kteří podstoupili totální endoprotézu kyčelního kloubu. Zaznamenali, že koncentrace uvolněné z PMMA cementu jsou až 35 krát nižší, než koncentrace uvolněné z kostních štěpů [60]. Velké výkyvy v naměřených koncentracích vankomycinu mohou být způsobeny nerovnoměrným zastoupením vankomycinu v jednotlivých vzorcích kostního cementu, ke kterému pravděpodobně došlo při



promíchávání kostního cementu s právkovým vankomycinem. Další příčinou nerovnoměrného uvolnění může být i nejednotná velikost cementových kuliček, protože v nich v kterých případech při jejich zhotovení nebyla správně odhadnuta velikost a po přešetření se musel jít kousek materiálu přidat, tudíž plocha, ze které se mohl uvolnit vankomycin byla větší.

#### 4.2.3 Pokus č. 3 - Copal

Copal je syntetický polymerový kostní cement, který uhlí ve svém složení obsahuje 3,17 g vankomycinu na 100 g materiálu, tudíž je zde o 26,8 % větší množství vankomycinu, než bylo použito v ostatních pokusech. Cement jsme připravili následujícím způsobem: Obsah ampulky s práškovou kapalinou jsme nalili do sterilní keramické nádoby a důkladně jsme v ní rozmíchali 100 g cementu obsahující vankomycin. Poté jsme opatrně z hmoty, dříve než začala tvrdnout a zahřívát se, vytvořili kuličky o hmotnosti 1 g a umístili jsme je do 20 ml fosfátového pufru. Vzorke jsme odebírali v intervalech 3, 6, 12, 24, 48, 96, 144, 192, 240, 288, 336 a 504 hodin.



Graf č. 3: Průběh uvolnění vankomycinu z kostního cementu Copal.

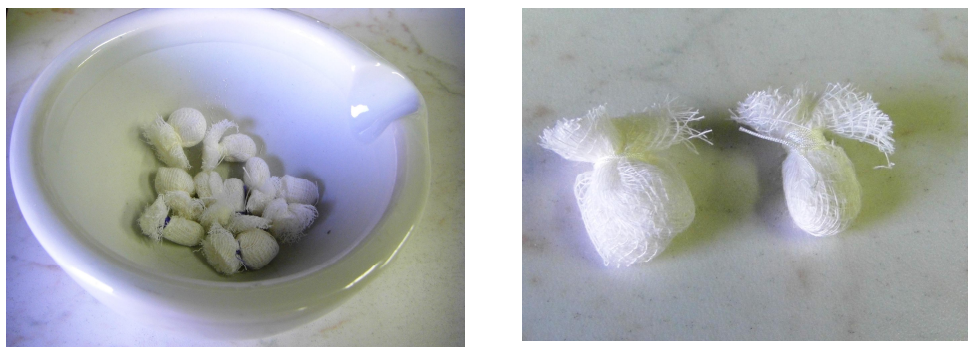
Maximální uvolněné koncentrace vankomycinu (35,7 mg/l) bylo dosaženo během 12. hodiny od začátku pokusu. 9. den pokusu klesla koncentrace pod hodnotu MIC pro VRSA na 14,2 mg/l. Poté se koncentrace vankomycinu udržovaly přibližně kolem hodnoty 10 mg/l a velmi pozvolna klesaly. Poslední (22.) den poklesla koncentrace na 6,9 mg/l. Koncentrace CDP-M během prvních 9 dní prudce vzrostla na hodnotu 30,2 mg/l, pak došlo k jejímu poklesu na hodnotu 18,4 mg/l a během posledního týdne pokusu došlo k jejímu opětovnému nárůstu až na hodnotu 35,2 mg/l. Účinným byl tento nástup zejména souběžně s nedokážděným vysvětlením, protože k řádnému rozpadu a zbroucení kuliček cementu, při kterém by mohlo dojít k dalšímu uvolnění, nedošlo.

Klekamp et al. ve své práci uvádí, že kombinace cementu s antibiotiky má mnohé nevýhody. K potencionálnímu promíchání antibiotika s cementem je třeba použít automatickou vakuovou míchačku, která zajistí rovnoměrné zastoupení vankomycinu v cementu a také redukuje velikost vzniklých vzduchových bublin. Pozitivní mechanické vlastnosti cementu zase přebíjí fakt, že z takto tvrdého materiálu se uvolní méně než 50 % z celkově přidávaného vankomycinu. Některí autoři uvádí, že se z kostních cementů uvolní pouze 5 % antibiotika. Další nevýhodnou vlastností PMMA cementu je to, že po přidání vankomycinu často ztrácejí potencionálně mechanické vlastnosti jako je pevnost, odolnost vůči tlaku a celkově se dochází k jejich časové a mechanické únavě materiálu [62].

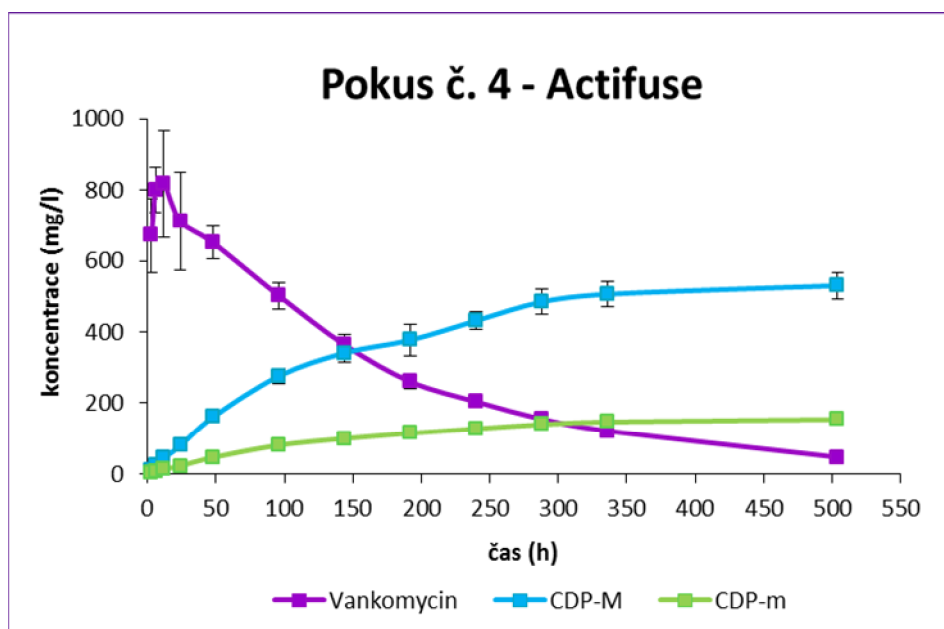
Buttaro et al. v diskuzi jedné ze svých prací uvádí, že cement s impregnovaným množstvím 1, 2 až 3 g na 100 g materiálu byl neúčinný v 90, 70 a 50 % případů v tomto poadí [61].

#### 4.2.4 Pokus 4.6 Actifuse

Actifuse byl připraven smícháním 100 g materiálu s 2,5 g vankomycinu a s daným množstvím kyseliny hyaluronové, která byla součástí balení Sm s byla dále kladně promíchána a opět rozdělena na 10 částí o hmotnosti 1 g, které byly svázány pomocí gázy do kuliček. Vzorke pufru byly odebírány v intervalech 3, 6, 12, 24, 48, 96, 144, 192, 240, 288, 336 a 504 hodin, jejich koncentrace jsou zaznamenány v následujícím grafu.



Obrázek . 29 a 30: Actifuse zavázaný do kuliček pomocí gázy.



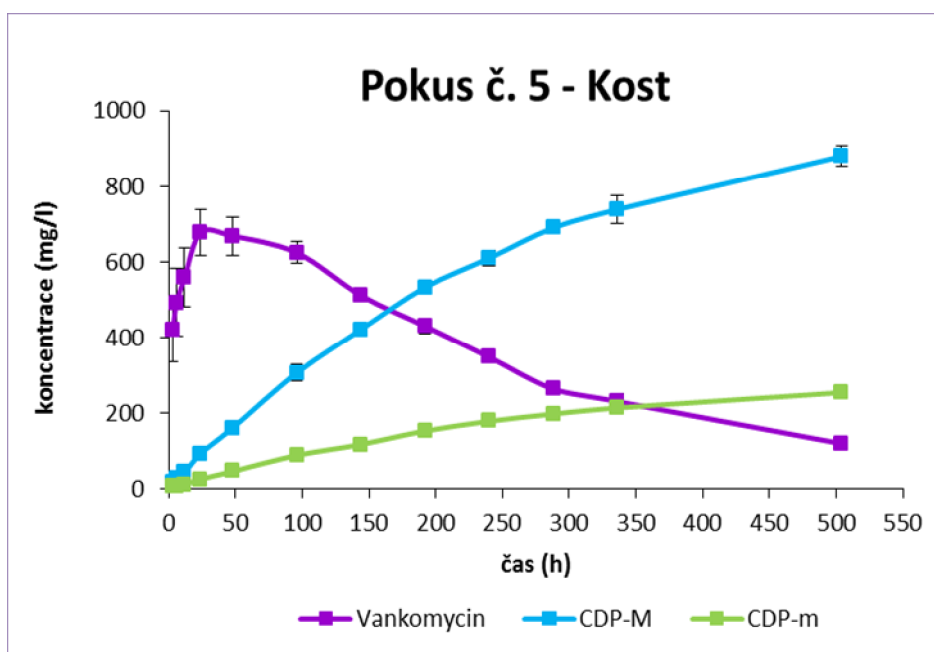
Graf . 4: Průběh uvolňování vankomycinu ze syntetických kostních čepů Actifuse.

Nejvyšší množství vankomycinu bylo uvolněno během prvních 12 hodin, kdy byla naměřena koncentrace 816,7 mg/l, poté postupně klesala až na konečnou hodnotu 47,3 mg/l, která stále převyšuje hodnotu MIC a tím splňuje podmínky pro úspěšnou eradikaci VRSA. Koncentrace termodegradací produktů do závěru pokusu postupně stouply až na hodnoty 530,2 mg/l pro CDP-M a 154,2 mg/l pro CDP-m. Variabilita naměřených koncentrací na závěru byla pravděpodobně způsobena nerovnoměrným rozmícháním vankomycinu v materiálu, nebyla totiž vytvořena homogenní směs a hmota nedrželá pohromadě. Syntetický kostní čep Actifuse se jeví jako vhodný lokální nosič vankomycinu, který je schopen

absorbovat velké množství vankomycinu a díky své vysoké pórovitosti zajistit jeho pozvolné uvolňování.

#### 4.2.5 Pokus 5 - Kost

Druhý pokus se spongiózními kostními těpy se od prvního pokusu lišil tím, že jsme kostní hmotu smíchanou s vankomycinem po zhotovení ještě na dobu 5 minut zahřáli na 80 °C a nechali postupně chladnout, aby byly vytvořeny stejné podmínky uvolňování jako u pokusu se syntetickými kostními cementy. Vzorky jsme odebírali v časových intervalech 3, 6, 12, 24, 48, 96, 144, 192, 240, 288, 336 a 504 hodin. Naměřené hodnoty jsou zaznamenány v následujícím grafu.



Graf 5: Průběh uvolňování vankomycinu z kostních těp zahřátých na 80 °C.

Z grafu je patrné, že maximální koncentrace vankomycinu byla zaznamenána po 48 hodinách a to 668,6 mg/l, poté došlo k jejímu téměř lineárnímu poklesu. 22. den poklesla koncentrace na hodnotu 119,0 mg/l, což je kolikrát násobně pod hodnotu MIC pro VRSA. Koncentrace uvolněného CDP-M výrazně rostly a 22. den dosahovaly hodnot 880,2 mg/l. Koncentrace CDP-m velmi pozvolna rostla afl na konečnou hodnotu 254,0 mg/l. Winkler et al. ve své práci porovnávali uvolňování vankomycinu z několika druhů kostních těp. Testovali lidské spongiózní a kortikální kostní těpy o velikosti 1 - 5 mm namletých částic, bovinní spongiózní

kostní štěpy o velikosti 3,5 mm a je účelem uvolnění vankomycinu z 5 mm<sup>3</sup> krychlí lidské spongiózní kosti a bovinní spongiózní kosti. Všechny kostní štěpy byly impregnované roztokem vankomycinu (1 g/ 10 ml) po dobu 24 hodin a poté byly 2 krát opláchnuty ve fyziologickém roztoku. Kostní štěpy prošly procesem lyofilizace a poté byly rozdeleny po 1 g do zkumavek, kam byly následně přidány 3 ml 5% roztoku lidského albuminu, pak byly zkumavky se vzorky umístěny do termostatu nastaveného na 37 °C. Roztok albuminu byl kompletně vyměňován každých 24 hodin po dobu prvních 10 dní a pak 13., 15., 20., 22. a 28. den. Koncentrace vankomycinu v roztoku lidského albuminu byla měřena pomocí HPLC. Ve vzorcích lidské spongiózní kosti byla naměřená poááte ní koncentrace kolem 20 900 ± 1 800 mg/l, která během jedenácti výměn roztoku albuminu klesla na hodnotu 4,43 ± 0,95 mg/l. Poááte ní koncentrace lidské kortikální kosti byly dle očekávání nižší než v případě kosti spongiózní a to 5 752 ± 2 167 mg/l. Následné snižování koncentrací mělo pomalejší průběh než u spongiózních kostních štěpů. Koncentrace vankomycinu ve 13. dni pokusu se však od hodnot naměřených ve spongiózní kosti příliš nelišila (5,15 ± 1,61 mg/l). Bovinní spongiózní kostní štěpy uvolnily ze začátku pokusu větší množství vankomycinu. Po 13. dni byla koncentrace dokonce 2 krát vyšší, než u lidské spongiózní kosti. Celkový rozdíl koncentrací byl však statisticky nevýznamný. Statisticky nevýznamné byly i rozdíly mezi uvolněným množstvím vankomycinu z 5 mm<sup>3</sup> krychlí lidských a bovinních spongiózních kostních štěpů [58].

Když bychom porovnali eluční vlastnosti obou kostních štěrpků, moc by se nelišily. V obou případech bylo dosaženo maximální uvolněné koncentrace vankomycinu okolo 650 mg/l, která posledního dne pokusu klesla až na hodnotu přibližně 200 mg/l a obě koncentrace uvolněného CDP-M se dostaly až na hodnotu kolem 1000 mg/l. A koliv byla kost z pokusu 5 krátkodobě zahřata až na 80 °C, zejména to na její eluční schopnosti nemělo vliv. Také množství uvolněného CDP-M nebylo výrazně ovlivněno u kostního štěrku z pokusu 1. To naznačuje tomu, že krátkodobé zahřátí pravděpodobně nemá vliv na uvolnění termodegradací produktů.

Syntetický kostní štěrpk Actifuse dosáhl v prvních dnech oproti lidským kostním štěrpkům vyšší eluční koncentrace vankomycinu (cca 818 mg/l) a téměř polovinu nižší konečné koncentrace CDP-M. To by mohlo být způsobeno tím, že oba kostní štěrpkové materiály mají poměrně mastný povrch, tudíž se díky tomu mohlo uvolnění vankomycinu zpomalit.

Eluční vlastnosti obou cementů se také příliš nelišily. U obou cementů bylo nejvyšší množství vankomycinu uvolněno po 12 hodinách a to podobné hodnoty koncentrace kolem 35 mg/l. Účinná koncentrace vankomycinu v cementu Palacos byla ztracena 7. den, kdy se koncentrace snížila pod hodnotu MIC na cca 14 mg/l. Díky tomu, že v cementu Copal bylo přibližně 27 % více vankomycinu, než v ostatních materiálech, klesla koncentrace pod hodnotu MIC až 9. den, kdy také klesla na přibližně 14 mg/l.

## ZÁVĚR

Byla zavedena a validována metoda pro stanovení vankomycinu a jeho termodegradací produktů pomocí HPLC s detekcí diodového pole. Metoda byla testována z hlediska opakovatelnosti a reprodukovatelnosti. Hodnoty variačních koeficientů nepřekročily hranici 7 % a hodnoty směrodatné odchylky se pohybovaly pod 5 %. Bylo provedeno také testování robustnosti metody z hlediska skladování vzorků při různých teplotách. Hodnoty koncentrací vzorků skladovaných krátkodobě při pokojové teplotě, po dobu 5 dnů při teplotě cca 4°C a po dobu 3 měsíců při cca -20 °C se nelišily více než o 5 %.

Uvedená metoda je poměrně časově náročná na přípravu vzorků, ale je robustní a vhodná pro zavedení do klinické praxe a to hlavně pro určitou rizikovou skupinu pacientů (s renální insuficiencí, dialyzovaní, diabetici, novorozenci), u kterých dochází ke kumulaci termodegradací produktů vankomycinu v těle.

Dále bylo provedeno testování elučných vlastností na kterých lokálních nosičích vankomycinu využívaných při složitých ortopedických operacích. Testované kostní štěpy vykazovaly výborné elučné vlastnosti, kdy se i po 3 týdnech koncentrace uvolněného vankomycinu držela několikrát nad hranicí MIC pro VRSA. Dobré elučné vlastnosti vykazoval i syntetický kostní štěp Actifuse, zatímco se vankomycin uvolňoval sice rychleji, než z lidských kostních štěpů, ale také u něj došlo k rychlému poklesu koncentrací vankomycinu. I přes to bylo po 3 týdnech dosaženo koncentrací, které převyšují hodnotu MIC pro VRSA. Nejhorší elučné vlastnosti z testovaných nosičů vankomycinu měly oba testované PMMA cementy Palacos a Copal. Vankomycin se během prvních 12 hodin pravděpodobně uvolnil pouze z povrchu vytvořených tvrdých kuliček a pak se eluce zastavila. Tyto výsledky naznačují tomu, že množství antibiotika předaného k použitým cementům je nedostatečné, což již bylo popsáno v odborné literatuře.

Tato práce byla podpořena projektem NT/14218.

## Referenční seznam

1. BEDNÁŘ, M., FRAJKOVÁ, V. et al. *Lékařská mikrobiologie*. První vydání. Praha: Marvil, 1996. ISBN 978-80-7473-048-1.
2. JAHODA, D., SOSNA, A. et al. *Infekční komplikace kloubních náhrad*. První vydání. Praha: Triton, 2008. ISBN 978-80-7387-158-1.
3. KATZUNG, B. G. *Základní a klinická farmakologie*. 1. vydání. Nakladatelství a vydavatelství H&H, 1994. p. 1072. ISBN 80-85787-30-0.
4. LÜLLMANN, H., MOHR, K. et al. *Farmakologie a toxikologie*. Příklad 15., zcela přepracované vydání. Grada Publishing, a.s., 2004. p. 728. ISBN 80-247-0836-1.
5. SHINDLER, J. *Mikrobiologie pro studenty zdravotnických oborů*. 1. Vydání. Praha: GradaPublishing, a.s., 2010. ISBN 978-80-247-3170-4.
6. MAJÁR, R., PODSTATOVÁ, R. et al. *Prevence nozokomiálních nákaz v klinické praxi*. 1. vydání, Praha: Grada Publishing, a.s., 2006. p. 184. ISBN 80-247-1673-9.
7. ESTES, K. S., DERENDORF, H. *Comparison of the pharmacokinetic properties of vancomycin, linezolid, tigecyclin, and daptomycin*. European Journal of Medical Research, 2010. p. 533-543. Dostupné z: <http://www.eurjmedres.com/content/15/12/533>
8. RYBAK, M. J. *The pharmacokinetic and pharmacodynamic properties of vancomycin*. Oxford Journals. Clinical Infectious Diseases, 2006, p. 35 - 39. Dostupné z: [http://cid.oxfordjournals.org/content/42/Supplement\\_1/S35.full](http://cid.oxfordjournals.org/content/42/Supplement_1/S35.full)
9. SCHEITTLER, G., USADEL, K. H. et al. *Repetitorium praktického lékaře*. 11. přepracované vydání. Galen, 1995. ISBN 80-85824-18-3.
10. MATERN, P. a kol. *Obecná a klinická biochemie*. 2. upravené vydání. Praha: Nakladatelství Karolinum, 2011. ISBN 978-80-246-1979-8.
11. Siemens Medical Solutions Diagnostics. *Immulin 2500 Vancomycin*. 29.3.2006 [7. 10. 2013].
12. <http://de.wikipedia.org/wiki/Peptidoglycane>
13. <http://en.wikipedia.org/wiki/Vancomycin>



14. FILBURN, B. H., SHULL, V. H. et al. *Evaluation of an automated fluorescence polarization immunoassay for vancomycin*. Department of Laboratory Medicine (Pathology), The Johns Hopkins Medical Institutions, Baltimore: American Society and Chemotherapy, 1983. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC185140/pdf/aac00197-0084.pdf>
15. Roche Diagnostics. *Vankomycin. Cobas INTERGA 400/800*. [online]. Terapeutické monitorování léků. [14.12.2014]. březen 2011. Dostupné z: <http://www.roche-diagnostics.cz/objednavky/info/20737941pi.pdf>
16. FONS - PÍRU KA LABORATORNÍCH VÝVĚTĚNÍ. *Vankomycin* [online]. 3.9.2013. Stapro s.r.o. a česká společnost klinické biochemie. [30.9.2013]. ISSN 1211-7137. Dostupné z: <http://www.katalogfons.cz/Produkty/6CACDC9A-B525-4E34-A0AA-7EE57295A141>
17. PFALLER, M. A., KROGSTAD, D. J. et al. *Laboratory evaluation of five assay methods for vancomycin: bioassay, high-pressure liquid chromatography, fluorescence polarization immunoassay, radioimmunoassay, and fluorescence immunoassay*. Journal of Clinical Microbiology, American Society for Microbiology, 1984. p. 311-316. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC271319/>
18. FEFERBAUM, R. et al. *Vancomycin monitoring in term newborns: Comparison of peaks and trough serum concentrations determined by high-performance liquid chromatography and fluorescence polarization immunoassay*. Revista do Hospital das Clinicas. Sao Paulo: 2001. ISSN 0041-8781. Dostupné z: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0041-87812001000500004](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0041-87812001000500004)
19. LAŤOVIČKA, J., *Imunoreakce se značenými protilátkami*. [online]. Ústav imunologie 2. LF UK a FN Motol. [13. 12. 2013] Dostupné z: [http://imunologie.lf2.cuni.cz/soubory\\_vyuka/imunoreakce.pdf](http://imunologie.lf2.cuni.cz/soubory_vyuka/imunoreakce.pdf)
20. ACKERMAN, N. B. H., BERG. H. G. et al. *Comparison of radioimmunoassay and fluorescent polarization immunoassay for quantitative determination of vancomycin concentrations in serum*. Journal of Clinical Microbiology. Minnesota, 1983. p. 994-995. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC270950/pdf/jcm00135-0272.pdf>
21. JEHL, F., GALLION, C., et al. *Determination of vancomycin in human serum by high-pressure liquid chromatography*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. France, 1985. p. 503-507. Dostupné z: <http://aac.asm.org/content/27/4/503.full.pdf>

22. SATTUR, A. P., LEE, J. et al. *Analytical techniques for vancomycin: A review*. Biotechnology and Bioprocess Engineering, 2010. p. 153-158. Dostupné z: [http://www.bbe.or.kr/storage/journal/BBE/5\\_3/6849/articlefile/article.pdf](http://www.bbe.or.kr/storage/journal/BBE/5_3/6849/articlefile/article.pdf)
23. Příbalová informace VANCOMYCIN PHARMASWISS 500 mg, 2010 [29. 10. 2013]. Dostupné z: <http://farmaceutika.info/docs/6e17cec5aa044444c72de28e8c1c24c2.pdf>
24. MOELLERING, R. C. Jr. *Vancomycin: a 50-year reassessment*. Department of Medicine, Beth Israel Deaconess Medical Center, Boston, Massachusetts. Clinical Infectious Diseases by the Infectious Diseases Society of America. Boston USA: 2006. Dostupné z: [http://cid.oxfordjournals.org/content/42/Supplement\\_1/S3.full.pdf](http://cid.oxfordjournals.org/content/42/Supplement_1/S3.full.pdf)
25. LEVINE, D. P., *Vancomycin: A history*. Clinical Infectious Diseases. Department of Medicine, Wayne State University. Detroit Michigan: 2006. p. 5-12. Dostupné z: [http://cid.oxfordjournals.org/content/42/Supplement\\_1/S5.full](http://cid.oxfordjournals.org/content/42/Supplement_1/S5.full)
26. VANCOMYCIN HYDROCHLORIDE - vancomycin hydrochloride injection, Barter Healthcare Corporation, 2009 [29. 10. 2013]. Dostupné z: [http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda\\_docs/label/2009/050671s014lbl.pdf](http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2009/050671s014lbl.pdf)
27. MELICHER, P., *Využití lokálních nosičů antibiotik při léčbě infekcí pohybového aparátu*. Praha, 2011. Diplomová práce. Univerzita Karlova v Praze, 1. Lékařská fakulta, I. ortopedická klinika 1. LF UK a FN Motol.
28. MELICHER, P., JAHODA, D. et al. *Monitoring vankomycinu uvolňovaného z kostních štěrů v pokusech in vitro*. ACTA Chirurgiae orthopaedicae et traumatologiae slovacica. Praha: 2010.
29. GHASSEMPOUR, A., ABDOLLAHPOUR, A. et al. *Crystalline degradation products of vancomycin as a new clinical stationary phase for liquid Chromatography*. Chromatographia. Tehran, 2005. p. 151-155.
30. GRIFFITH, R. S. *Introduction to vancomycin*. Reviews of infectious diseases. November-December 1981 [2013\_09\_24]. Dostupné z: <http://www.jstor.org/discover/10.2307/4452677?uid=2129&uid=2&uid=70&uid=4&sid=21102658484041>
31. BRUMMETT, R.E., FOX, K. E. *Vancomycin and erythromycin induced hearing loss in humans*. Minireviews. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. American Society for Microbiology, June 1989 [25. 9. 2013]. p. 791 - 796. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC284231/pdf/aac00377-0007.pdf>

32. Orange Book. *Approved drug products with their therapeutic equivalence evaluations*. US Department of Health and Human Services. 33<sup>th</sup> Edition, 2013. p. 1346. Dostupné z: <http://www.fda.gov/ucm/groups/fdagov-public/@fdagov-drugs-gen/documents/document/ucm071436.pdf>
33. XIE, J., PEIRCE J. G. et al. *A redesigned vancomycin engineered for dual D-ala-D-ala and D-ala-D-lac binding exhibits potent antimicrobial activity against vancomycin-resistant bacteria*. Journal of the American Chemical Society. California: NIH Public Access, 2011. p. 133-135. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3164945/#!po=27.7778>
34. SMITH, T. S., PEARSON, M. L. et al. *Emergence of vancomycin resistance in Staphylococcus aureus*. The New England Journal of Medicine. Massachusetts Medical Society, 1999. p. 493-501. Dostupné z: <http://www.nejm.org/doi/pdf/10.1056/NEJM199902183400701>
35. BACKES D. W., ABOLENEEN H. I. et al. *Quantitation of vancomycin and its crystalline degradation products (CDP-1) in human serum by high performance liquid chromatography*. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. 1998.
36. PAZDERA, J. *Bakterie zdolala vankomycin*. 1.8.2002 [9.10.2013]. Dostupné z: <http://www.osel.cz/index.php?clanek=62>
37. COURVALIN, P. *Antimicrobial drug resistance: "prediction is very difficult, especially about the future"*. Emerging Infectious Diseases. Paris: Institut Pasteur, 2005. p. 1503-1506. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3366764/>
38. HAYDEN, M. K., PICKEN, R. N. et al. *Heterogeneous expression of glycopeptide resistance in Enterococci associated with transfer of VanB*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. American Society for Microbiology, 1997. p. 872-874. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC163816/pdf/410872.pdf>
39. HOWDEN, B. P., DAVIES, J. K. et al. *Reduced vancomycin susceptibility in Staphylococcus aureus, including vancomycin-intermediate and heterogeneous vancomycin-intermediate strains: Resistance mechanisms, laboratory detection, and Clinical Implications*. Clinical Microbiology Reviews. American Society for Microbiology. 2010. p. 99-139. Dostupné z: <http://cmr.asm.org/content/23/1/99.full>

40. RYBAK, M., LOMAESTRO, B. et al. *Therapeutic monitoring of vancomycin in adult patients: A consensus review of the American Society of Health-System Pharmacists, the Infectious Diseases Society of America, and the Society of Infectious Diseases Pharmacists*. *American Journal of Health-System Pharmacy*. 2009. Dostupné z: <http://www.ajhp.org/content/66/1/82.full>
41. RYBAK, M., LOMAESTRO, B. et al. *Vancomycin therapeutic guidelines: A summary of consensus recommendations from the Infectious Diseases Society of America, the American Society of Health-System Pharmacists, and the Society of Infectious Diseases Pharmacists*. Infectious Diseases Society of America, 2009. p. 325-327. Dostupné z: <http://cid.oxfordjournals.org/content/49/3/325.long>
42. COLE, T. S., RIORDAN, A. et al. *Vancomycin dosing in children: What is the question?* Arch Dis Child Published, 2013. Dostupné z: <http://adc.bmj.com/content/early/2013/08/16/archdischild-2013-304169.full>
43. <http://www.bacteriainphotos.com/bacteria%20photo%20gallery.html>
44. BEDNÁŘ, M., SOUŠEK, A. et al. *Lékařská speciální mikrobiologie a parazitologie*. První vydání. Praha: Triton, 1994. ISBN 80-901521-4-7.
45. ZHRADNICKÝ, J. et al. *Mikrobiologie a epidemiologie*. První vydání. Praha: Avicenum, zdravotnické nakladatelství, 1987. Ed: 879528, 08-008-87.
46. Rozhovor s Vladimírem POLANECKÝM, editorem Hygienické stanice hl. m. Prahy na téma Nozokomiální nákazy. Praha 9.1.2014.
47. Heraeus Medical. *Copal G + V*. Návod na použití [online]. červenec 2012. [1.3.2014]. Dostupné z: [http://heraeus-medical.com/media/webmedia\\_local/dc/instructions/ifu\\_Copal\\_GC.pdf](http://heraeus-medical.com/media/webmedia_local/dc/instructions/ifu_Copal_GC.pdf)
48. Heraeus Medical. *Palacos R*. Návod na použití [online]. Prosinec 2008. [1.3.2014]. Dostupné z: [http://heraeus-medical.com/media/webmedia\\_local/dc/instructions/ifu\\_Palacos\\_R\\_INT.pdf](http://heraeus-medical.com/media/webmedia_local/dc/instructions/ifu_Palacos_R_INT.pdf)
49. MELICHER, P., JAHODA, D. et al. *Bone grafts as vancomycin carriers in local therapy of resistant infections*. *Folia Microbiologica*. 2012. p. 459-462.
50. APATECH LTD. *Actifuse Granules*. Návod na použití [online]. 2009. [22.3.2014] Dostupné z: [http://www.baxterbiosurgery.com/us/resources/pdfs/actifuse/Actifuse\\_Granules\\_I\\_FU.pdf](http://www.baxterbiosurgery.com/us/resources/pdfs/actifuse/Actifuse_Granules_I_FU.pdf)
51. APATECH. *Actifuse ABX MIS gun medberg solutions* [online video]. 5.11.2009. [23.3.2014]. Dostupné z: <http://www.youtube.com/watch?v=ppqOySAGlpo>

52. DříUPA, V., TRNKA, T. *Revizní endoprotetika kyčelního kloubu* [online]. Lékařské listy 15/2008 [24.3.2014]. Dostupné z: <http://zdravi.e15.cz/clanek/priloha-lekarske-listy/revizni-endoprotetika-kycelniho-kloubu-381728>
53. JUDL, T., JAHODA, D. et al. *Reimplantace náhrady kyčelního kloubu metodou docementování díku do povodního cementového lůžka*. Praha: Acta chirurgie orthopaedicae et traumatologiae echoslovaca, 2011. p. 416–422. Dostupné z: <http://www.achot.cz/detail.php?stat=491>
54. THEILEMANN, F. W. *Efektivita navigace v případě reimplantace kolenního kloubu* [online]. 2009 [24.3.2014]. Dostupné z: <http://braunoviny.bbraun.cz/clanky/efektivita-navigace-na-priklade-reimplantace-kolenniho-kloubu/>
55. [http://www.tyden.cz/rubriky/zdravi/cesti-lekari-pouzili-poprve-v-cesku-unikatni-nahrada-lebecni-kosti\\_193319.html#.Uy3my1elvl8](http://www.tyden.cz/rubriky/zdravi/cesti-lekari-pouzili-poprve-v-cesku-unikatni-nahrada-lebecni-kosti_193319.html#.Uy3my1elvl8)
56. <http://www.ordinace.cz/clanek/poprve-v-cr-unikatni-nahrada-casti-lebecni-kosti/>
57. SEKK. *Metrologická terminologie v klinické a analytické laboratoři*. 2. vydání. 2009 [5.4.2014] Dostupné z: <http://www.sekk.cz/terminologie/Text/Terminologie.htm#Robustnost>
58. WINKLER, H., JANATA, O. et al. *In vitro release of vancomycin and tobramycin from impregnated human and bovine bone grafts*. Vienna: Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2000. p. 423–428.
59. BUTTARO, M., COMBA, F. et al. *Vancomycin-supplemented cancellous bone allografts in hip revision surgery*. Clinical Orthopedics and Related Research, 2007. p. 74–80. Number 461.
60. BUTTARO, M., GIMENEZ, M. et al. *High active local levels of vancomycin without nephrotoxicity released from impacted bone allografts in 20 revision hip arthroplasties*. Acta Orthopædica, 2005.
61. BUTTARO, M., PUSSO, R. et al. *Vancomycin-supplemented impacted bone allografts in infected hip arthroplasty*. The Journal of Bone and Joint Surgery, 2005. p. 314–319.
62. KLEKAMP, J., DAWSON, J. et al. *The use of vancomycin and tobramycin in acrylic bone cement: biomechanical effect and elution kinetics for use in joint arthroplasty*. The Journal of Arthroplasty, 1999. p. 339–346.

## SEZNAM ZKRATEK

ALP	alkalická fosfatáza
AUC	plocha pod křivkou
CLIA	chemiluminiscenční imunoanalýza
DAD	detektor diodového pole
DNA	deoxyribonukleová kyselina
EDTA	ethylendiamintetraoctová kyselina
EIA	enzymová imunoanalýza
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
FIA	fluorescenční imunoanalýza
FPIA	fluorescenční polarizační imunoanalýza
G6P-DH	glukóza-6-fosfátdehydrogenáza
hVISA	heterogenous vancomycin-intermediate <i>Staphylococcus aureus</i>
IS	vnitřní standard
JIP	jednotka intenzivní péče
MIC	minimální inhibiční koncentrace
NAD	nikotinamidadenindinukleotid
NADH	dihydroderivát nikotinamidadenindinukleotidu
NAG	N-acetylglukosamin
NAM	N-acetylmuramová kyselina
PBP	penicilin-váflící protein
PCR	polymerázová řetězová reakce
PMMA	polymethylmetakrylát
RIA	radioimunoanalýza
RNA	ribonukleová kyselina

SA	<i>Staphylococcus aureus</i>
SPE	separace na pevné fázi
TSS	syndrom toxického šoku
TSST	toxin syndromu toxického šoku
VISA	vancomycin-intermediate <i>Staphylococcus aureus</i>
VRE	vankomycin-rezistentní <i>Enterococcus</i>
VRSA	vankomycin-rezistentní <i>Staphylococcus aureus</i>