

**UNIVERZITA KARLOVA
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
KATEDRA BIOLOGICKÝCH A LÉKAŘSKÝCH VĚD**



DIPLOMOVÁ PRÁCE

HODNOCENÍ ANTIMIKROBNÍ ÚČINNOSTI NOVÝCH LÁTEK TYPU KVARTERNÍCH AMONIOVÝCH SOLÍ

Ondřej Suk

Vedoucí diplomové práce: PharmDr. Miroslav Kovařík, Ph.D.

Konzultant: PharmDr. Jan Marek, Ph.D.

HRADEC KRÁLOVÉ, 2020

Poděkování

Rád bych na tomto místě poděkoval vedoucímu mé práce panu PharmDr. Miroslavu Kovaříkovi, Ph.D. za odborné vedení této diplomové práce. Dále bych chtěl poděkovat konzultantu této práce panu PharmDr. Janu Markovi, Ph.D. za cenné rady, návrhy, připomínky a obsahové vedení této diplomové práce. Také bych chtěl poděkovat Mgr. Michaele Hympánové za pomoc při experimentální části.

„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci jsou řádně citovány. Práce nebyla použita k získání jiného nebo stejného titulu.“

V Hradci Králové

Ondřej Suk

Abstrakt

Autor: Ondřej Suk

Název: Hodnocení antimikrobní účinnosti nových látek typu kvarterních amoniových solí

Diplomová práce

Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Studijní obor: Farmacie

Cíl práce: Cílem této diplomové práce bylo vyhodnotit antimikrobní aktivitu nově navržených a připravených látek typu kvarterních amoniových solí.

Metody: Mikrodiluční bujónovou metodou byla měřena antimikrobní aktivita 8 nových látek rozdělených do třech strukturních skupin na osmi bakteriálních kmenech: *Staphylococcus aureus*, methicilin-rezistentní *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli*, *Yersinia bercovieri*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella pneumoniae* ESBL pozitivní a multirezistentní *Pseudomonas aeruginosa*.

Výsledky: Ze tří strukturních skupin byl největší antimikrobní potenciál nalezen u některých solí methylmorfolinu a substituovaných solí benzylimidazolu. Obecně byly látky dle předpokladu účinnější na Gram pozitivní kmeny bakterií oproti kmenům Gram negativním. Proti multirezistentnímu kmeni *Pseudomonas aeruginosa* nevykazují tyto látky při měřených koncentracích žádný baktericidní účinek.

Závěry: Testované Gram pozitivní kmeny jsou k daným látkám citlivější než Gram negativní kmeny. Při porovnání látek s komerčně zavedenými standardy v podobě benzalkoniových solí nevykazuje žádná testovaná látka vyšší účinnost v celém spektru hodnocených bakterií. Avšak u některých jednotlivých bakteriálních kmenů dosahují některé látky srovnatelné, či dokonce vyšší účinnosti oproti měřeným standardům. Látky by tak v budoucnu mohly přispět k rozšíření portfolia dezinfekčních látek a být tak případnou vhodnou náhradou při vzniku rezistence na látky aktuálně používané.

Klíčová slova: testování antimikrobní účinnosti, mikrodiluční bujónová metoda, minimální inhibiční koncentrace, minimální baktericidní koncentrace, kvarterní amoniové soli

Abstract

Author: Ondřej Suk

Title: Evaluation of antimicrobial effectiveness of new quaternary ammonium salt compounds

Diploma thesis

Charles University in Prague, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Study program: Pharmacy

Background: The aim of the work was to evaluate antimicrobial activity of newly proposed and prepared quaternary ammonium salts.

Methods: Broth microdilution method was used to measure antimicrobial activity of 8 new substances divided into three structure groups on 8 bacteria strains: *Staphylococcus aureus*, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli*, *Yersinia bercovieri*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella pneumoniae* ESBL positive and multiresistant *Pseudomonas aeruginosa*.

Results: Out of the 3 structure groups, the highest antimicrobial potential was found with some methylmorpholine salts and benzylimidazole substituted salts. Generally, the substances were, as supposed, more efficient with the Gram-positive bacteria tribes than with the Gram-negative ones. No bactericidal effect of these substances in the concentration measured was found on the strain of multiresistant *Pseudomonas aeruginosa*.

Conclusions: The Gram-positive strains tested are more sensitive towards the tested substances than the Gram-negative ones. In comparison with some commercially introduced standards of benzalkonium salt types, no substances showed a higher efficacy over the whole range of the evaluated bacteria. However, with some individual bacterial strains, some substances show a comparable or even higher efficacy in comparison with the standards mentioned. Therefore, the substances could extend the disinfectant portfolio and be used as a potential suitable substitute in cases of acquired resistance to currently used substances.

Key words: antimicrobial efficacy testing, microdilution broth method, minimum inhibitory concentration, minimum bactericidal concentration, quaternary ammonium salts

Obsah

1	Úvod	10
1.1	Zadání práce – cíl práce	10
2	Teoretická část	11
2.1	Metody stanovení citlivosti bakterií	11
2.2	Diluční metody	13
2.2.1	Agarová diluční metoda	13
2.2.2	Diluční bujónová metoda	14
2.2.3	Automatizované systémy	14
2.3	Difúzní metody	16
2.3.1	Disková difúzní metoda	16
2.3.2	Gradientová difúzní metoda, Etest	16
2.3.3	Agarová jamková difúzní metoda	17
2.3.4	Agarová metoda antagonismu mikrobiálních populací	18
2.3.5	Agarová metoda křížujících se pruhů	18
2.4	Mikrokalorimetrie	19
2.5	Polymerázová řetězová reakce	19
2.6	Mikrofluidní metody	20
2.6.1	Mikrofluidní agarózové kanálky	21
2.6.2	Mikrofluidní pH senzor	21
2.6.3	Self-loading mikrofluidní přístroj	22
2.6.4	Mikrokapičky	23
2.7	Mechanické metody	24
2.7.1	Vážení mikrobiálních buněk pomocí vibračních mikrokonzolí	24
2.7.2	Rotace magnetických kuliček	24
2.7.3	Senzor povrchových akustických vln	25
2.8	Optické metody	25
2.8.1	MALDI-TOF	26
2.8.2	Optická pinzeta	27
2.8.3	Ramanova spektrometrie	28
2.8.4	Měření optické denzity	28
2.8.5	Biomimetický polymerní senzor	29
2.8.6	Kvantifikace bakteriálního růstu pomocí softwarové obrazové analýzy ..	30
2.8.7	Průtoková cytometrie	31

2.9	Interpretace výsledků stanovení citlivosti	31
2.10	Antimikrobní potenciál kvartérních amoniových solí.....	32
2.11	Mechanismus účinku.....	33
2.12	Rezistence	36
2.12.1	Přímá rezistence	36
2.12.2	Nepřímá rezistence	37
2.12.3	Vnitřní rezistence	37
2.12.4	Získaná rezistence	39
2.13	Struktura	41
3	Experimentální část	44
3.1	Využité vybavení:	44
3.1.1	Pomůcky:	44
3.1.2	Přístroje:.....	44
3.1.3	Chemikálie	45
3.1.4	Zkoušené kmeny bakterií.....	45
3.1.5	Testované látky	45
3.2	Metodika	47
3.2.1	Příprava zásobní suspenze zkoušených kmenů bakterií	47
3.2.2	Příprava roztoků testovaných látek.....	47
3.2.3	Příprava koncentrační řady roztoku testované látky.....	48
3.2.4	Příprava mikrotitrační destičky.....	48
3.2.5	Odečtení MIC	49
3.2.6	Odečtení MBC	50
3.3	Výsledky	51
3.3.1	Výsledné tabulky jednotlivých skupin látek.....	51
3.3.2	Výsledné grafy MBC testovaných látek pro jednotlivé bakterie	59
3.3.3	Shrnující tabulka a grafy.....	66
4	Diskuze	69
4.1	Závislost struktury a účinku u jednotlivých testovaných kmenů	69
4.1.1	Závislost účinnosti a lipofility	70
4.1.2	Účinnost v porovnání s použitými standardy	71
5	Závěr.....	74
6	Použité zkratky	76
7	Seznam použitých grafů, obrázků, tabulek.....	78

7.1	Grafy	78
7.2	Obrázky	78
7.3	Tabulky	78
8	Použitá literatura.....	80

1 Úvod

Bakteriální onemocnění představují velké riziko v dnešním světě. Proto se vynakládá nemalé úsilí na hledání nových potenciálních antimikrobních látek a na vývoj metod stanovování citlivosti mikroorganismů k těmto látkám. V posledních desetiletích narůstá počet metod stanovování citlivosti a zároveň je kladen stále větší důraz na automatizaci jednotlivých metod. Hodnocená skupina látek, kvarterní amoniové soli (QAS), patří mezi dlouhodobě využívané šetrné látky v oblasti dezinfekce a antiseptiky. Nesprávné užívání dezinfekčních látek se také podílí na vzniku bakteriální rezistence a na selekci a šíření odolných kmenů nemocničních nozokomiálních nákaz.

Záměrem této práce bylo zhodnotit antimikrobní účinnost nových potenciálně antimikrobních látek na bázi QAS. K tomuto účelu byla využita mikrodiluční bujónová metoda, kterou byly stanoveny hodnoty minimální inhibiční koncentrace (MIC) a minimální baktericidní koncentrace (MBC) po inkubaci bakterií v jamkách mikrotitrační destičky. Celkem bylo otestováno 8 nových antimikrobních látek spolu se standardy v podobě benzalkoniových solí. Látky byly syntetizovány v Centru biomedicínského výzkumu Fakultní nemocnice v Hradci Králové. Využité bakteriální kmeny patří mezi tzv. nozokomiální kmeny ve zdravotnických zařízeních. Využity byly: *Staphylococcus aureus*, methicilin-rezistentní *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli*, *Yersinia bercovieri*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella pneumoniae* produkující širokospektré β -laktamázy a multirezistentní *Pseudomonas aeruginosa*.

1.1 Zadání práce – cíl práce

- Rešerše odborné literatury
- Práce v mikrobiologické laboratoři
- Praktické měření minimální inhibiční koncentrace a minimální baktericidní koncentrace
- Zhodnocení výsledků a jejich porovnání se standardy
- Diskuze

2 Teoretická část

2.1 Metody stanovení citlivosti bakterií

Mikrobiální citlivost je stanovována obecně pro každý mikroorganismus, který je součástí infekčního procesu, za předpokladu, že jeho citlivost nelze spolehlivě předpovědět ze znalosti jeho druhu. Stanovení citlivosti mikroorganismů je indikováno zejména pro mikroorganismy, u kterých se předpokládá, že náleží do skupiny mikroorganismů, které mohou být rezistentní na standardní antimikrobní látky [1]. Určení rezistence individuálních izolátů je zvláště důležité u těch bakterií, u kterých je velké riziko získané rezistence. Jako je *Streptococcus pneumoniae* a rody *Pseudomonas*, *Staphylococcus*, *Enterococcus*. Mikrobiální citlivost se využívá také ke stanovení citlivosti k empiricky vybrané antimikrobní látce v klinické praxi. Tyto metody jsou využívány jak ve výzkumných laboratořích, tak v každodenní praxi v laboratořích klinické mikrobiologie [2].

Nejstarší metody stanovení citlivosti bakterií *in vitro* se používají již od roku 1929. Tyto metody jsou založeny na přidání antimikrobní látky ke zkoušeným bakteriím s následným vyhodnocením bakteriálního růstu. Ty nejjednodušší metody, které se zaměřují na stanovení MIC a růstových křivek bakterií, byly standardizovány mezi lety 1920 až 1980. Výsledky jsou odečítány často jen pouhým okem s dostatečnou účinností. Výhodou těchto testů je kromě jednoduchosti i jejich standardizace různými organizacemi jako CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute), nebo ISO (International Organization for Standardization). Interpretace výsledků je standardizována normami EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing). Mezi nevýhody patří časová náročnost, množství manuální práce a metody nám nedávají náhled na mechanismus interakce [3].

Většina těchto metod poskytuje během 18 až 24 hodin výsledky, tedy identifikaci a stanovení citlivosti. Jen některé diskové difuzní techniky poskytují výsledky i během 4 až 6 hodin [4]. Toto urychlení je možné buď citlivější detekcí, urychlením růstu, nebo náhradou standardizovaného inokula přímo vzorkem. K tomu času je ale nutné připočítat alespoň 24 hodin nutných k přípravě a růstu bakteriální kolonie. Rutinní metody stanovení citlivosti bakterií tedy potřebují k dosažení výsledků minimálně dva dny. Díky stanovování citlivosti konkrétních bakteriálních izolátů není jedinou variantou empirická antibiotická léčba. Stanovení citlivosti konkrétních izolátů je důležité zejména u kmenů

s rozšířenou získanou rezistencí. Ta vede k širšímu využívání rezervních antimikrobních látek a následně k selekci multirezistentních kmenů [5].

Množství manuální práce se postupně od sedmdesátých let minulého století snižuje, jak se zavádí automatizace metod. Vzhledem k nutnosti izolace bakterií pro toto fenotypické testování bývají výsledky k dispozici až během dvou dnů po začátku léčby [4]. Právě zdržení kvůli pomalejším původním metodám stanovení citlivosti obecně vede k prodloužené hospitalizaci, zvýšené mortalitě pacientů a v neposlední řadě i k růstu nákladů na zdravotní péči [5].

Obecně starší fenotypické metody stanovení citlivosti, které měří bakteriální růst v přítomnosti antimikrobní látky, jsou náročné na čas a manuální práci. Přesto některé z nich zůstávají rutinními a důležitými metodami v mikrobiologických laboratořích i přes nové diagnostické nástroje, jako některé z metod v následujícím výčtu. Výhodou fenotypických metod (například disková difúzní metoda, mikrodiluční bujónová metoda), oproti genotypickým metodám, je možnost předpovědět citlivost stejně jako rezistenci k určité látce. U některých metod je i možnost kvantitativního stanovení citlivosti [5] [6] [7].

Původní metody testování citlivosti byly automatizovány pomocí přístrojů jako MicroScan WalkAway, Vitek2 a další. Byly též výrazně urychleny citlivější detekcí růstu a zkrácením manuální práce a inkubace [3] [5].

Pro urychlení detekce a zároveň pro zlepšení citlivosti detekce se vyvíjí nové techniky. Jsou to například metody mikrofluidní, kalorimetrické a metody založené na konduktivitě. Tyto metody ale umožňují testování jen jednoho vzorku. Další metody jako polymerázová řetězová reakce (PCR), hmotnostní spektrometrie a průtoková cytometrie jsou sice velmi citlivé, ale také velmi drahé a náročné na obsluhující personál [8].

Mezi další metody používané k testování citlivosti mikroorganismů patří mechanické metody, které se objevují zhruba od přelomu století. Mechanické metody zatím nejsou v klinické praxi a jejich využití je pouze ve výzkumu. U nich se magnety, nebo elektrody vkládají do bakteriálních kultur k měření impedance, rotační a rezonanční frekvence pro určení bakteriálního růstu. Mezi mechanické metody patří například metody využívající změnu spinu magnetických kuliček v magnetickém poli v závislosti na množství zachycených bakterií [3].

Další možností jsou optické metody využívané od sedmdesátých let minulého století. Optické metody využívají světelné paprsky k zachycení, detekci a stimulaci bakterií. Těmito metodami můžeme měřit bakteriální hustotu, intenzitu fluorescence,

pohyb nebo vibraci bakteriálních buněk. Patří sem metody jako průtoková cytometrie, biomimetické polymery, spektrofotometrie, obrazová softwarová analýza, Ramanova spektroskopie, hmotnostní spektrometrie s průletovým analyzátozem (MALDI-TOF) a mikrofluidní metody. Různé optické metody poskytují kvalitativní i kvantitativní zhodnocení citlivosti. Obecně se ale jedná o drahé metody závislé na složitých přístrojích, které mají své uplatnění zatím také zejména ve výzkumu [3].

2.2 Diluční metody

Diluční metody jsou referenční metody testování citlivosti mikroorganismů. Metody jsou standardizovány normami CLSI, EUCAST. Metody se využívají pro kvantitativní stanovení antimikrobní aktivity proti kvasinkám, vláknitým houbám a bakteriím. Určují hodnoty MIC, jako nejnižší koncentrace testované látky, která viditelně inhibuje růst mikroorganismů [9].

2.2.1 Agarová diluční metoda

Agarová diluční metoda je jednou z nejstarších metod stanovení citlivosti. Její vývoj započal již v roce 1929 a od čtyřicátých let je metoda využívána. Agarová diluční metoda patří mezi kvantitativní metody stanovení citlivosti, jelikož určuje hodnoty MIC. Standardizované inokulum obsahující definovaný počet bakterií se naočkuje na nutriční agarové médium nasycené antimikrobní látkou na určité koncentrace. Pro většinu rychle rostoucích aerobních a fakultativně anaerobních bakterií se využívá Mueller–Hintonův agar. Po 48 hodinách kultivace se odečítají výsledky jako počty kolonií tvořících jednotek (CFU), přičemž MIC odpovídá ta nejnižší koncentrace antimikrobní látky, kde již nedojde k nárůstu mikroorganismů. Jednotlivé plotny s agarem obsahují koncentrační řadu antimikrobní látky odpovídající dvojkovému ředění. Metoda je výhodná pro možnost kultivace většího množství bakteriálních kmenů ke stanovení citlivosti k jedné antimikrobní látce. Nebo ke kultivaci a stanovení citlivosti u heterogenní kultury bakterií, nebo k určení rezistentních subpopulací. Navíc se jedná o CLSI standardizovanou metodu. Oproti bujónové mikrodiluční metodě je agarová výhodná pokud testujeme více izolátů proti jedné antimikrobní látce, nebo pokud testovaná látka brání svou barvou detekci v kapalném médiu. Nevýhodou je časová náročnost, i když moderní chromogenní agary umožňují barevnou změnou detekci definovaných citlivých kmenů již po 18 až 24 hodinách. Navíc je to metoda velice pracná manuální a časovou náročností při přípravě Petriho misek s agarem s testovanou látkou a při očkování bakterií. Proto se agarová diluční metoda v laboratořích běžně neuznává jako metoda stanovení citlivosti

mikroorganismů. Nicméně nevýhody agarové diluční metody mohou být zmírněny částečnou automatizací této metody využitím replikátorů inokula. Ty hromadně přenášejí 32 až 60 různých bakteriálních inokul na jednu agarovou plotnu [3] [9] [10] [11].

2.2.2 Diluční bujónová metoda

Existují dva typy diluční bujónové metody. Starší makrodiluční metoda je dnes již méně využívána a byla v širším měřítku nahrazena mikrodiluční metodou. Makrodiluční metoda pracuje s většími objemy okolo 1 ml v jednotlivých zkumavkách. U mikrodiluční metody se využívá 96jamková mikrotitrační destička a celkově nižší objemy látek. Mikrodiluční metoda je částečně automatizovaná. Je možnost komerčně dostupných zmrazených a vysušených mikrodilučních testovacích panelů, které ulehčují práci a snižují pravděpodobnost chyb. Mezi komerčně dostupné platformy pro mikrodiluční bujónovou metodu patří například BD Phoenix (Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA, New Jersey) nebo MicroScan WalkAway (Siemens Healthcare Diagnostics, Deerfield, USA, Illinois). Zkumavky u makrodiluční metody nebo mikrotitrační destička obsahují dvojkovou řadu koncentrace testované antimikrobní látky. Každá zkumavka nebo jamka destičky je poté inokulována suspenzí testovaného bakteriálního kmene o denzitě 0,5 stupňů podle MacFarlanda. Výhodou je možnost kvantitativního hodnocení citlivosti pomocí odečtení hodnot MIC po 24hodinové inkubaci, stejně jako hodnot MBC. Odečet může probíhat vizuálně. U mikrodiluční metody se s výhodou používají automatické čtečky mikrodilučních panelů odečtem intenzity fluorescence, nebo turbidimetrickým měřením. Médiem není jako u agarových metod agar, ale s výhodou se využívá kapalné bujónové médium jako Mueller–Hintonův bujón. Mikrodiluční bujónová metoda je standardizována normami CLSI pro aerobní i anaerobní bakterie [2] [3] [9].

2.2.3 Automatizované systémy

Automatizované systémy vycházejí z bujónové mikrodiluční metody. Jejich výhodou by mělo být snížení náročnosti laboratorní práce a preanalytické přípravy mikroorganismů a také rychlejší provedení testu s detekcí pomocí optických metod [7]. Příklady automatizovaných bujónových mikrodilučních metod jsou systémy Vitek, MicroScan a BD Phoenix [10]. Tyto tři systémy urychlí odečtení výsledků na dobu mezi 3,5 až 18 hodinami díky citlivé optické detekci změn bakteriálního růstu [2].

System BD Phoenix se skládá z velkého inkubátoru se čtecím zařízením, který je schopen pojmout až 99 testovacích panelů. Testovací panely jsou 85 a 136jamkové a v řadě jamek je dodržena posloupnost dvojkového ředění testované látky. Inokulace jamek probíhá manuálně. Společnost nabízí i přístroj pro automatickou přípravu inokula. Detekce hodnot MIC trvá 6 až 16 hodin po 20minutových intervalech. Detekce probíhá pomocí oxidačně-redukčních indikátorů a turbidimetrických metod, kde tento systém byl vůbec prvním takovýmto systémem využívajícím k detekci nefelometrii. Systém testuje citlivost většiny klinicky relevantních Gram pozitivních (G+) i Gram negativních (G-) bakterií. Navíc nabízí i možnost speciálních testovacích panelů pro některé markery rezistence, případně panely sloužící pouze k identifikaci mikroorganismů [2] [12].

System MicroScan WalkAway je opět inkubátor se čtecím zařízením, který je schopen najednou testovat 40 až 96 standardně velkých mikrodilučních panelů. Tyto panely se hydratují a inokulují manuálně a při inkubaci se flourometricky a fotometricky testují k identifikaci růstu bakterií. Výsledky stanovení citlivosti jsou odečteny mezi 3,5 až 18 hodinami. Závisí to na použitých panelech a technice detekce. Rychlejší je detekce z panelů pro stanovení citlivosti G- bakterií s flourogenními substráty. Pomalejší je turbidimetrická detekce [2].

System Vitek 2 využívá speciální 64jamkové plastové karty velikosti hracích karet. Systém pojme 60 nebo 120 karet najednou. Využívá karty pro identifikaci a pro stanovení citlivosti bakterií. Systém se využívá k detekci a stanovení citlivosti běžných rychle rostoucích aerobních G+ a G- bakterií včetně *Streptococcus pneumoniae*. Systém je schopen dodat výsledky již za 5 hodin díky opakované turbidimetrické kontrole bakteriálního růstu při inkubaci. Výhodou jsou i malá mikrolitrová množství použitého média a antimikrobních látek [2] [13].

System Sensititre Aris 2X (TREK Diagnostic Systems, Cleveland, USA, Ohio) je příkladem komerčně dostupné manuální bujónové mikrodiluční metody [10]. Sensititre Aris 2X pojme až 64 běžných 96jamkových mikrotitračních destiček v každém ze svých 4 modulů. Detekce probíhá po 18 až 24 hodinách měřením fluorescence hydrolýzou flourogenních substrátů bakteriemi. Opět se tedy jako u ostatních systémů využívá průběžné detekce růstu bakterií v čase inkubace optickými metodami. Kromě toho je možná i manuální vizuální detekce. Inokulace destiček je možná pomocí autoinokulátoru a je možné testovat G+ i G- bakterie [2] [14].

2.3 Difúzní metody

2.3.1 Disková difúzní metoda

Agarová disková difúzní metoda je jednou z nejstarších a nejlevnějších metod stále běžně používanou mikrobiologickými laboratořemi k rutinnímu stanovení citlivosti zejména rychle rostoucích aerobních bakterií. Metoda je standardizována CLSI a je relativně jednoduchou a praktickou. Na povrch Mueller–Hintonova agaru jsou inokulovány testované bakterie, přibližně $1-2 \cdot 10^8$ CFU/ml. Na povrch jsou následně umístěny komerčně dostupné disky z filtračního papíru obsahující testovanou látku v požadované koncentraci. Petriho misky jsou následně inkubovány 16 až 4 hodin při 35° Celsia. Během toho antimikrobní látka difunduje z disků do agaru. S rostoucí vzdáleností logaritmicky klesá koncentrace antimikrobní látky. Vytváří se tak koncentrační gradient látky v agaru. Výsledkem jsou u citlivých bakteriálních kmenů kruhové inhibiční zóny okolo disků, kde koncentrace antimikrobní látky zabránila růstu bakterií. U výsledných inhibičních zón se měří jejich průměr v mm a interpretují se podle daných standardů např. CLSI. Metoda poskytuje kvalitativní hodnocení citlivosti. Některé komerčně dostupné systémy na odečet inhibičních zón jsou pro určité mikroorganismy a určité antimikrobní látky schopny určit přibližnou hodnotu MIC porovnáním se standardy [2] [9] [10].

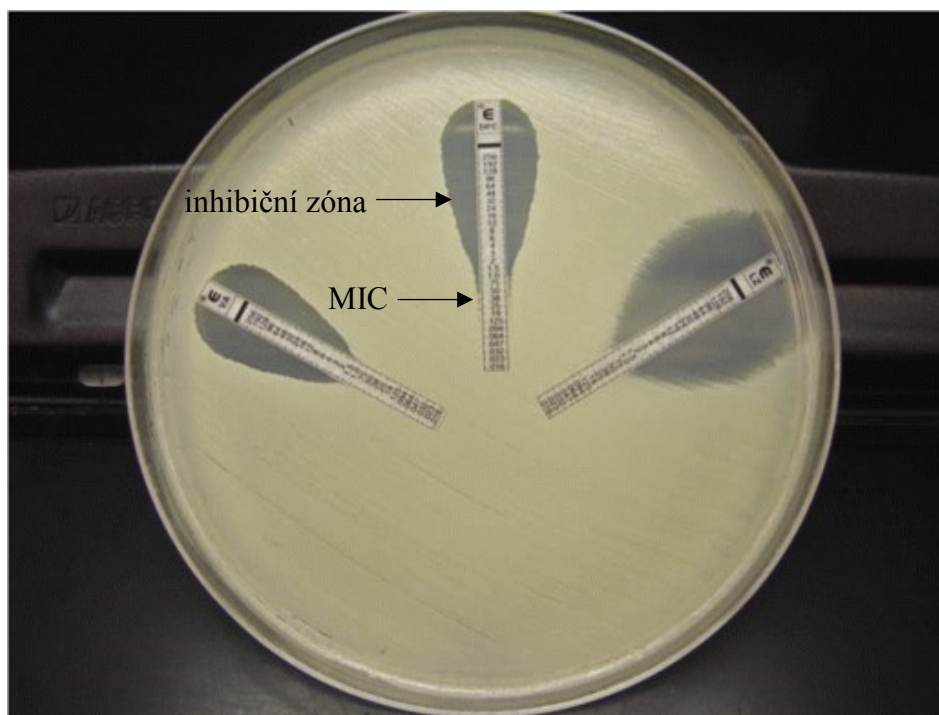
Velké výhody této metody spočívají v její nízké ceně, standardizaci a ve značné flexibilitě, kdy se pouhou výměnou disku docílí změny antimikrobní látky. Mezi nevýhody na druhé straně patří pouze kvalitativní stanovení citlivosti. Metoda není vhodná pro pomalu rostoucí a anaerobní bakterie. Navíc difúzi antimikrobní látky do značné míry ovlivňuje kvalita agarové půdy. Molární hmotnost a hydrofilita pak podmiňují difúzi látky a tvorbu inhibičních zón [3] [10].

2.3.2 Gradientová difúzní metoda, Etest

Gradientová difúzní metoda je vylepšenou modifikací agarové difúzní metody. Byla objevena během osmdesátých let. Postup je podobný, jen místo papírových disků se využívají plastové proužky. Na spodní stranu proužku je naimpregnován koncentrační gradient antimikrobní látky. Na horní straně je vytištěna odpovídající stupnice pro odečtení MIC. Po inkubaci dlouhé 24 hodin se odečte z proužku hodnota MIC. Hodnota MIC se odečte z testovacího proužku v bodě, kde se proužku dotýká eliptická inhibiční zóna. Nevýhodou tohoto testu je vyšší cena, zejména v porovnání s diskovou difúzní

metodou. Výhodou naopak je možnost stanovení citlivosti pro anaerobní bakterie a možnost kvantitativního stanovení citlivosti, kde MIC dobře odpovídá hodnotám získaným bujónovou i agarovou diluční metodou. Navíc díky stabilitě gradientu po dobu okolo 20 hodin je metoda vhodná i pro pomaleji rostoucí bakterie [2] [3] [10].

Mezi komerčně dostupné gradientové difúzní testy patří například M.I.C.Evaluator (Oxoid, Cambridge, Velká Británie) a Etest (bioMérieux, Durham, USA, Severní Karolína) [15]. Provedená metoda Etest se znázorněným odečtem je zobrazena na obrázku č. 1. Podobnou funkci má i metoda spiral gradient endpoint, kde je na jednu agarovou podložku nanesen pomocí nástroje spiral plater gradient antimikrobní látky. Bakterie jsou nanášeny radiálně přes tento gradient. Vzdálenost od centra k místu, kde dojde k ukončení růstu bakterií, umožní určit hodnotu MIC [16].



Obrázek č. 1: Etest

převzato z: [2] a upraveno

2.3.3 Agarová jamková difúzní metoda

Jamková metoda se nejčastěji využívá pro stanovení antimikrobní aktivity rostlinných a mikrobiálních extraktů. Stejně jako u diskové difúzní metody se inokuluje agarová vrstva v Petriho misce danou mikrobiální kulturou. Jako u diskové metody se inokulum rozetře přes celou plochu agaru. Následně se asepticky pomocí sterilního korkovrtu vytvoří jamka o průměru okolo 6 mm. Do jamky se pipetou přenesou 20 až

100 µl testovaného roztoku. Během inkubace dochází k difúzi antimikrobní látky do agaru a měří se opět průměry inhibičních zón tak, jako u diskové difúzní metody [9] [17].

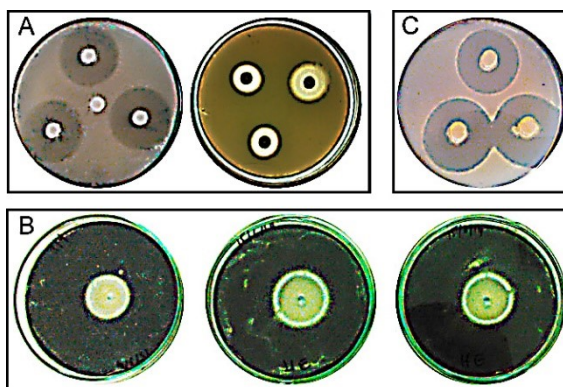
2.3.4 Agarová metoda antagonismu mikrobiálních populací

Tato metoda, v originále „agar plug diffusion method“, v sobě částečně kombinuje jamkovou a diskovou metodu. Ukazuje vzájemný antagonismus mezi dvěma druhy mikroorganismů. V tenkých pruzích se inokuluje agarový plát testovaným mikroorganismem. Během inkubace dochází rostoucími bakteriálními buňkami k produkci látek, které difundují do agaru. Následně jsou do agarové destičky sterilním korkovrtem vytvořeny jamky. Odebraný bloček materiálu se přenesse na druhou agarovou destičku s dalším testovaným mikroorganismem. Mikrobiální sekrety z odebraného vzorku poté difundují do agaru a jejich antimikrobní aktivita se měří znovu za pomoci inhibičních zón [10].

2.3.5 Agarová metoda křížujících se pruhů

U této metody, anglicky „cross streak method“, se také využívá antagonismu mikroorganismů. Kmen, který nás zajímá, se naočkuje v pruhu na agar. Po inkubaci se na živnou půdu nasadí další mikroorganismus v pruhu kolmém k původnímu. Po další, již druhé, inkubaci se analyzuje velikost inhibiční zóny [9]. Výhodou této metody jsou větší inhibiční zóny oproti jamkové metodě. Kvantitativní interpretace bývá ale velmi složitá, protože okraje inhibičních zón bývají často nejasné a rozmazané [18].

Metody křížujících se pruhů, antagonismu mikrobiálních populací a jamková agarová difúzní metoda se neuvádějí běžně v klinické praxi mikrobiologických laboratoří. Výše uvedené metody patří do činnosti výzkumných laboratoří k určení antimikrobní účinnosti testovaných látek a extraktů a ke zjišťování antagonistických vztahů mezi mikroorganismy [9]. Provedení třech z těchto difúzních metod je zobrazeno na následující obrázku č. 2, kde můžeme pozorovat vzniklé inhibiční zóny.



Obrázek č. 2: Agarové difúzní metody

převzato z [9]

Vysvětlivky: Obrázek A znázorňuje diskovou difúzní metodu, kde se z disků uvolňuje antimikrobní látka a měří se inhibiční zóny. Obrázek B ukazuje jamkovou difúzní metodu, kde se kolem jamky po difúzi vyvíjí inhibiční zóna. Na obrázku C je agarová metoda antagonismu mikrobiálních populací, kde se kolem přeneseného bločku inokulovaného agaru tvoří inhibiční zóna.

2.4 Mikrokolorimetrie

Mikrokolorimetrie využívá ke stanovení citlivosti bakterií k antimikrobním látkám měření tepla, které bakterie produkují při svém růstu. Teplo může být měřeno jako průtok v $\mu\text{W}/\text{čas}$, nebo jako naakumulované teplo za jednotku času $\text{J}/\text{čas}$. Průtok tepla je měřen kalorimetrem. Kumulativní produkce tepla koresponduje s růstovými křivkami mikroorganismů. Během exponenciálního růstu bakterií roste exponenciálně i produkce tepla díky zvýšenému buněčnému metabolismu. Výhodou je značná rychlost metody, kdy stanovení citlivosti probíhá relativně rychle i během tří hodin u některých bakterií. Stanovení může probíhat v pevném i kapalném médiu. Nevýhodou je, že metoda není standardizována, takže nám poskytuje pouze informativně údaje o bakteriálním růstu a MIC, přestože se relativně shodují se standardizovanými metodami. Můžeme zde operovat s minimální tepelnou inhibiční koncentrací (MHIC). MHIC značí nejnižší koncentraci antimikrobní látky, která sníží produkci tepla na polovinu. Metoda vznikla v sedmdesátých letech minulého století [7] [9].

2.5 Polymerázová řetězová reakce

Polymerázová řetězová reakce je komerčně dostupnou a automatizovanou metodou, která se v posledních dvou dekadách stává čím dál důležitější v laboratořích

klinické mikrobiologie. Konvenční i real-time PCR se využívají k amplifikaci sekvencí deoxyribonukleové kyseliny (DNA), které jsou specifické pro daný mikroorganismus a jeho citlivost a rezistenci [5].

Velkou výhodou PCR metod je velká rychlost. Metoda může být provedena a vyhodnocena během dvou hodin. Real-time PCR dokáže rychle s krátkou inkubační dobou rozlišit mezi citlivým a rezistentním kmenem. Toho se využívá například u testování methicilin-rezistentních *Staphylococcus aureus* (MRSA) nebo vankomycin-rezistentních *Staphylococcus aureus* [2]. Dále metoda dokáže identifikovat a kvantifikovat jak bakterie, tak viry. Tím pádem odliší virovou infekci a může se zastavit zbytečná antibiotická léčba [5]. PCR také dokáže rozlišit mezi živými a mrtvými bakteriemi využitím fluorescenčních látek jako ethidium bromid. Velkým plusem PCR je, že vzorky nemusí být vždy purifikované. Může se jednat i o nesterilní primární klinické vzorky. Mezi nevýhody patří zejména nemožnost touto metodou porozumět mechanismu rezistence. Dalším velkým problémem je také interpretace výsledků. Respektive můžeme analyzovat expresi určitého genu, ale musíme vědět, jaký efekt na rezistenci mikroorganismu daný gen má. Většinou se u rezistence jedná o složitou komplexní odpověď několika genů [2]. Jednoduchým příkladem může být gen *mecA*. Ten kóduje penicilin-binding protein PBP2a, který má v této modifikaci menší afinitu k β -laktámovým antibiotikům u MRSA. PCR je také relativně drahou metodou [5].

Real-time PCR využívá hydrolyzační sondy, hybridizační sondy a sondy s fluorescenčními barvami vázajícími DNA [19]. Tyto sondy vazbou na DNA kvantifikují množství specifických kopií DNA ve vzorku a tím měří růst bakterií ve vzorku s antimikrobní látkou [2] [6].

2.6 Mikrofluidní metody

Tyto nové metody vznikly v průběhu posledních deseti až patnácti let. Metody se zatím využívají pouze ve výzkumu, ale mají potenciál přejít i do klinické praxe. Umožňují výrazně urychlit stanovení citlivosti využitím malých mikrometrových objemů a prostorů cel a tím dojde k pozorovatelnému brzkému individuálnímu dělení bakterií. Dochází k redukci času ke stanovení citlivosti na několik hodin díky přímému nebo nepřímému monitorování růstu bakterií. Tyto metody vlastně trvají pouze jeden nebo několik málo replikačních cyklů testovaných bakterií. Celý proces probíhá *in vitro* na čipu. Čipy mohou umožnit kombinaci několika dalších funkcí, jako hybridizace a amplifikace nukleových

kyselin nebo buněčná lýza, které se často používají při výzkumu izolovaných buněk. Výrazná možnost dočasné speciální kontroly nad kapalinou a fyzikálními parametry umožňuje spolu s citlivými senzory přímé *in situ* odečítání. Přímé optické zobrazení růstu bakterií je možné i z klinických vzorků a má potenciál zavedení do rutinní laboratorní praxe díky redukci objemů a manuální práce. Dochází zde k přímému pozorování dělení jedné buňky v rámci celé bakteriální populace. Na druhou stranu některé nepřímé metody vyžadují velmi složité přístroje, genetické modifikace a jsou i další překážky pro snadnou detekci. Mezi metody nepřímé detekce patří rotace magnetických kuliček v magnetickém poli nebo pH senzory. Změna rotace magnetických kuliček je nepřímo úměrná navázanému množství bakterií, kdežto změny pH souvisí s akumulací metabolických produktů bakterií. Obecně se nejvíce využívá detekce elektrochemická, optická a mikrokalorimetrická. Překážkou v přímém pozorování jedné bakteriální buňky bývá často jejich neustálý pohyb. K tomu je nutná imobilizace bakteriálních buněk s využitím mikrokapiček, mikrokomůrek, kanálků nebo pastí. Metody jsou relativně rychlé a levné a zároveň velmi automatizované a výkonné díky velkému poměru plocha/objem. Výsledné hodnoty MIC relativně dobře odpovídají standardním hodnotám CLSI. Přesto bývá problém dostat tyto metody do komerční klinické praxe. Některé metody jsou relativně dosti drahé a není jasné, zda mají v klinické praxi zvláštní výhody oproti využívaným metodám vzhledem ke své ceně. Navíc metody nejsou dosud standardizovány [3] [7] [20] [21].

2.6.1 Mikrofluidní agarózové kanálky

V této mikrofluidní metodě jsou bakterie jako *Staphylococcus aureus* (STAU) a *Pseudomonas aeruginosa* imobilizovány v komůrce na agaróze. Dále jsou vystaveny rozdílným antibiotickým podmínkám, což umožňuje analýzu růstu jednotlivých buněk pomocí časosběrných záběrů digitální kamerou s detekcí založenou na interakci dopadajícího fotonu s křemíkovou destičkou polovodiče (CCD). Tyto záběry a proporční tempo růstu spolu s inkubační dobou umožňují zjistit hodnoty MIC. Tento uzavřený, a tudíž bezpečný systém umožňuje interpretaci výsledků během 4 hodin. Nevýhodou je nutnost přípravy vzorku před samotným testováním [3].

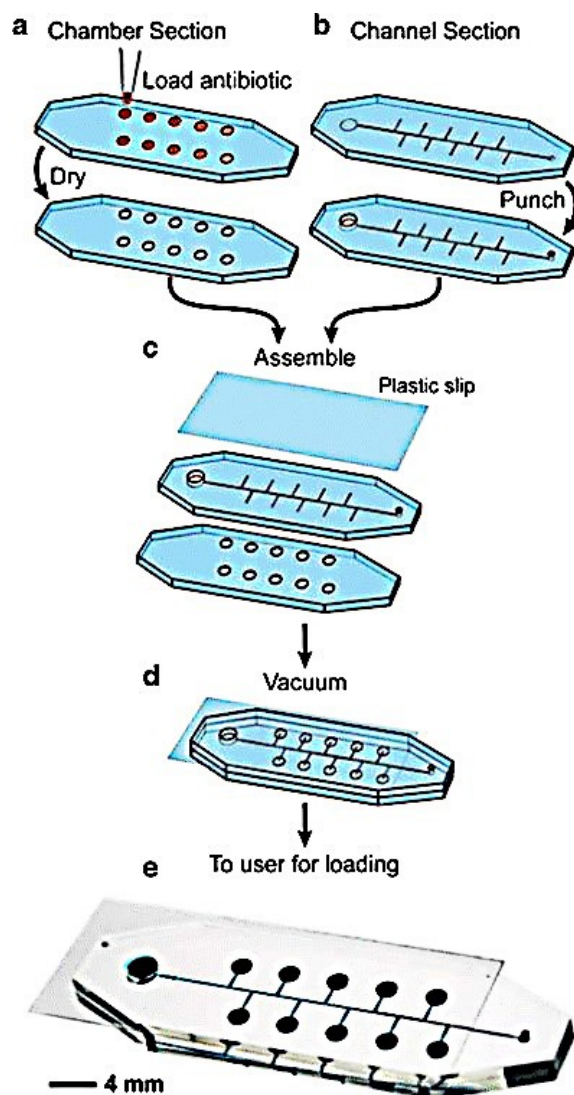
2.6.2 Mikrofluidní pH senzor

U této metody je na mikrofluidní kanálky nanesen chitosanový hydrogel, který reaguje na změny pH smršťováním a rozpínáním. Bakterie při svém růstu metabolizují glukózu a produkují organické kyseliny, které snižují pH, což vede ke změně efektivní

optické tloušťky chitosanu, která je nepřímo úměrná pH. Optickou tloušťku lze odečítat interferometrem pomocí Fourierovy transformace. Čím je vyšší poměr optické tloušťky chitosanu k pH, tím je vyšší bakteriální aktivita. Metoda umožňuje rychlé odečtení MIC a poskytuje růstové křivky mikroorganismů již během dvou hodin [3] [22].

2.6.3 Self-loading mikrofluidní přístroj

V této metodě jsou ve vrstvě polydimethylsiloxanu vytvořeny komůrky naplněné vysušenou antimikrobní látkou. Vrstva je dále spojena s další vrstvou polydimethylsiloxanu s kanálky napojujícími se na komůrky. Sestavené zařízení je evakuováno. Polydimethylsiloxan poté natahuje plyn ze svého okolí, čímž vytváří vakuum v kanálcích. Pomocí tohoto vakuu zde vzniká síla, která vtahuje injektovanou bakteriální suspenzi do komůrek, kde rozpouští antimikrobní látku. Sestavení přístroje viz obrázek č. 3. Tato síla zároveň brání zpětnému toku a kontaminaci. Po 18hodinové inkubaci podle CLSI může být stanovena hodnota MIC jako nejnižší hodnota koncentrace antimikrobní látky, kdy ještě nedojde k barevné změně. Barevná změna je vyvolána přidáním glukózy a fenolové červeně do bakteriální suspenze. Bakterie při růstu spotřebovávají glukózu a produkované organické kyseliny způsobí barevnou změnu indikátoru z červené na žlutou [3] [23].



Obrázek č. 3: Self-loading mikrofluidní přístroj

převzato z: [3]

2.6.4 Mikrokapičky

Mikro a nanokapičky se mohou využít jako malé individuální reakční nádoby, které představují preferované prostředí pro růst bakterií, kde jsou uzavřeny bakterie v emulzi nosné kapaliny. S jednotlivými kapkami může být manipulováno. Když obsahují dostatečný počet bakterií, tak může být monitorována jejich metabolická aktivita. Obě kapaliny jsou vzájemně nemísitelné. Ke stanovení citlivosti byl vytvořen systém obsahující 100nl kapičky vodné emulze obsahující 10^3 bakterií a různou definovanou koncentrací antimikrobní látky. Kapky jsou sledovány v čase flourescenčním detektorem, který umožňuje detekovat růstové křivky při každé koncentraci antimikrobní látky. Nedávno byly vytvořeny i kapky obsahující jednu bakteriální buňku. Doba testování může být velmi krátká, stačí jen několik replikačních

cyklů. Aby se metoda mohla stát rutinním stanovením citlivosti, bude ještě třeba vytvořit referenční databáze MIC [3] [7].

2.7 Mechanické metody

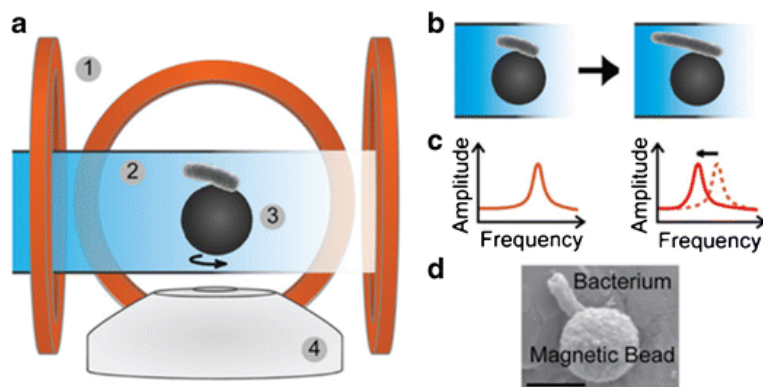
2.7.1 Vážení mikrobiálních buněk pomocí vibračních mikrokonzolí

Tato metoda je perspektivní k využití v blízké budoucnosti. Jedná se o kvantitativní metodu. Zařízení obsahuje vibrující mikrokonzole, které obsahují drobné kanálky umožňující průchod mikroorganismů. Mikroorganismy při průchodu kanálky svou hmotností mění různou měrou rezonanční frekvenci vibrací mikrokonzolí podle své denzity. Pokud jsou mikroorganismy v kontaktu s antimikrobní látkou i jejich denzita se mění, což zaznamená tato metoda. Jeden tento přístroj umožňuje s jednou rostoucí kulturou bakterií při vhodné úpravě testovat i několik druhů antimikrobních látek o různé koncentraci najednou. Výhodou je, že tempo růstu a typ buněk může být rozpoznán z malého výchozího počtu buněk, jelikož i denzita se obvykle liší pro různý typ buněk. Výhodou je také rychlost detekce mezi 20 minutami až 2 hodinami. Metoda se již využívá ve výzkumu stanovování citlivosti k antimikrobním látkám. Nicméně k jejímu zařazení do rutinní praxe stanovování citlivosti je potřeba další výzkum v oblasti spolehlivé detekce různých rezistentních bakteriálních kmenů [3] [7].

2.7.2 Rotace magnetických kuliček

Tato metoda využívá změnu frekvence rotace magnetických částic v magnetickém poli po navázání molekul bakterií nebo virů. Bakteriální suspenze o známé koncentraci se promísí s magnetickými kuličkami s ligandem vázajícím bakteriální buňky. Následuje inkubace a poté promytí suspenze. Po navázání bakterií je v rotačním magnetickém poli následně zaznamenána změna frekvence spinu částic. Jak se bakterie začnou dělit, začne se znovu měnit i frekvence. Pokud je testovaný bakteriální kmen citlivý na danou antimikrobní látku, tak nedojde ke změně frekvence. Takto tedy může být detekována a kvantifikována rezistence k antimikrobní látce. Tato metoda existuje i v uspořádání s jednou magnetickou kuličkou, viz následující obrázek č. 4. Metoda se zatím využívá jen pro *Escherichia coli* (ESCO). Jestli funguje i na jiné kmeny musí být ještě potvrzeno. Metoda je u ESCO relativně rychlá s výsledky během 1,5 hodiny. S navázáním bakterií na částice rotační perioda nejprve klesá, po dosažení určitého čísla bakterie expandují a rotační perioda opět stoupá. Takže roztoky s vyšší koncentrací antimikrobní látky mají nejnižší přírůstek. Rotační periody se měří pomocí

fotodiod. Nicméně složitě nastavení této metody ji činí prozatím velmi komplikovanou k rutinnímu využití v klinické praxi [3] [7].



Obrázek č. 4: Metoda rotace magnetických kuliček

převzato z: [3]

Vysvětlivky: Část A popisuje metodu rotace magnetických kuliček v uspořádání s využitím pouze jedné magnetické kuličky, ke které je navázaná 1 bakterie ESCO a okolo jsou elektromagnetické cívky. V částech B a C pole indukuje rotaci kuličky, jejíž frekvence a amplituda se mění s růstem bakterie. Snímek D pochází z elektronového mikroskopu.

2.7.3 Senzor povrchových akustických vln

Tato metoda využívá detekci změny impedance působením metabolismu bakteriální suspenze. Změna impedance se projevuje změnou frekvence na elektrodách v roztoku, kde se měří čas do změny frekvence. Metoda je relativně rychlá a bezpečná a umožňuje práci i s velmi virulentními mikroorganismy. Bohužel byla metoda využívána zatím jen s ESCO. S ostatními bakteriemi je nutné ještě provést testování a validaci metody. Navíc je metoda poměrně hlučná. Je náchylná na udržení stálého pH, na stálou teplotu a adhezi proteinů na elektrody [3].

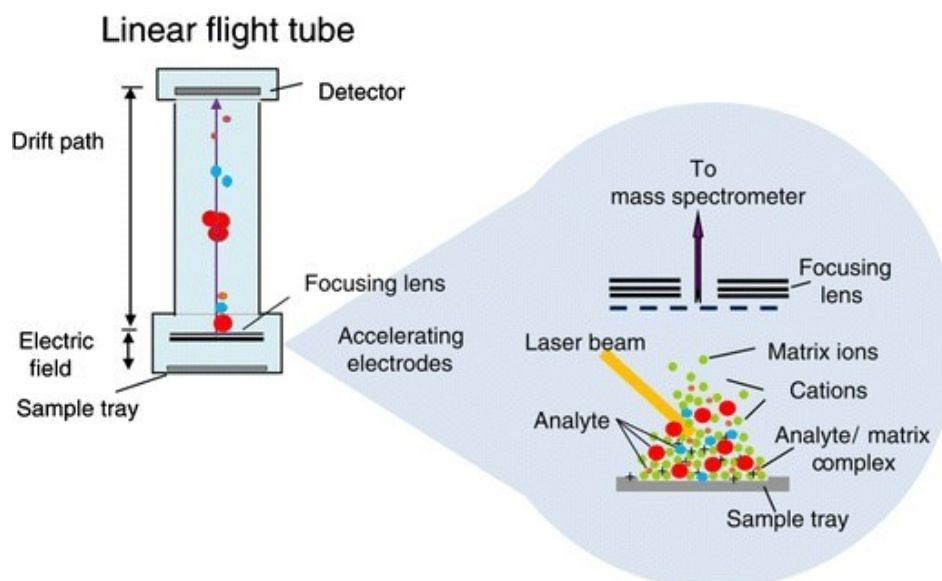
2.8 Optické metody

Optické metody se využívají pro zjišťování citlivosti mikroorganismů k antimikrobním látkám již od sedmdesátých let minulého století. Lehce modernizovaná stanovení citlivosti optickými metodami se stále uplatňují hlavně ve výzkumu. Rozšíření těchto metod do klinické praxe brání zejména drahé a složité odečítání výsledků. Základem těchto metod je využití světelných paprsků k interakci s bakterií. Optické

metody se využívají nejen k identifikaci bakterií, ale umožňují i stanovit i růstové křivky a také hodnoty MIC [3].

2.8.1 MALDI-TOF

Hmotnostní spektrometrie s laserovou desorpcí a ionizací za účasti matrice s průletovým analyzátozem neboli MALDI-TOF je metodou stanovení citlivosti a rychlou metodou identifikace mikroorganismů, která se využívá od počátku nového tisíciletí v laboratorní praxi. Metoda dokáže rozlišit jednotlivé mikrobiální kmeny podle jejich ribozomálních proteinů a určení poměru hmotnosti a náboje. Laserové pulzy ionizují pro analýzu biomolekuly jako ribozomální proteiny. Urychleným iontům je měřen jejich následný čas letu rovnou trubicí k detektoru, přičemž menší letí rychleji. Ten je poté převeden na poměr hmotnosti a náboje, jak je znázorněno na obrázku č. 5. Jednotlivé patogeny jsou následně identifikovány pomocí porovnání s databází specifických spekter produkovaných daným analytem. Lze tedy konstatovat, že rozdílný čas letu k detektoru značí rozdíly v ribozomálních proteinech. Výhodou metody je relativně rychlá identifikace mikroorganismů. Kromě identifikace lze MALDI-TOF využít i jako metodu stanovení citlivosti mikroorganismů. Například lze touto metodou detekovat produkty PCR určující bakteriální rezistenci nebo lze detekovat změny přítomnosti bakteriálních proteinů, které jsou ve vztahu s bakteriální citlivostí v přítomnosti, či nepřítomnosti antimikrobní látky. Dalším přístupem je dokumentace aktivity enzymů rozkládajících antimikrobní látky jako β -laktamázy a tím stanovení rezistence. Příkladem je u G⁻ bakterií aktivita karbapenemázy. Taková možnost identifikace rezistence je ale specificky vázána jen na určité skupiny antimikrobních látek (hydrolýza β -laktámů nebo acetylace fluorochinolonů). MALDI-TOF lze využít pro G⁺ i G⁻ bakterie i kvasinky, jelikož je nezávislý na metabolické aktivitě. Výhodou metody kromě rychlé identifikace je i nízká cena provozování zařízení, přestože pořizovací cena přístroje je naopak velkou nevýhodou této metody. Další nevýhodou je nutnost analyzovat klinické vzorky do 48 hodin, jelikož poté by již spektra byla těžko reprodukovatelná kvůli degradaci ribozomálních proteinů. Zatímco identifikace patogenů je relativně bezproblémová, tak identifikace různých bakteriálních kmenů kvůli rezistenci je obtížnější kvůli malým odlišnostem v ribozomálních proteinech. Využití metody ke stanovení citlivosti také brání nedostatečná standardizace metody, nedostatečné databáze i chybějící softwarové nástroje [3] [5] [7] [24] [25].



Obrázek č. 5: MALDI-TOF mechanismus

převzato z [3]

2.8.2 Optická pinzeta

Metoda optické pinzety se využívá v mnoha odvětvích výzkumu, ať již například při výzkumu pohybu bakterií jako je chemotaxe a rotace bičků, či při zkoumání životaschopnosti buněk. Metoda je kvantitativním stanovením citlivosti bakterií na úrovni jednotlivé buňky a má potenciál pro biomedicínskou aplikaci [26]. Další výhodou je bezpečnost práce, jelikož se tato metoda obejde bez kultivace kolonií patogenů a jedná se o zachycení jednotlivé buňky. Vyhodnocení je navíc v řádu minut podle dané bakterie a antimikrobní látky. Metoda je natolik citlivá, že odliší pohyb bakterie pomocí bičků od Brownova pohybu. Nevýhodou naopak je využitelnost této metody jen pro pohybující se bakterie. Prozatím se antimikrobní aktivita zkoumala jen u ESCO. Proto není metoda standardizována. Vzhledem ke své citlivosti by se mohlo jednat o slibnou metodu po provedení dalšího výzkumu a po následné validaci [3].

Principem metody je uvěznění buňky laserovým paprskem pro vyhodnocení účinku antimikrobní látky. Zředěný vzorek se umístí na piezoelektrický transduktor umožňující kontrolu pozice buňky v řádu nanometrů. Světlo z buňkou rozptýleného laserového paprsku, který se přes první dichroické zrcadlo dostává do optického mikroskopu bočním portem, je dalším dichroickým zrcadlem převedeno na detektor citlivý k určení polohy. Životaschopnost buněk je pak určena statistickou analýzou pozičních signálů v čase [3] [26].

2.8.3 Ramanova spektrometrie

Ramanova spektrometrie je další možností identifikace a stanovení citlivosti bakterií pomocí zjištění metabolických změn v jednotlivé bakteriální buňce za přítomnosti antimikrobní látky. Výhodou je opět kratší čas oproti konvenčním metodám stanovení citlivosti. Metoda by se mohla využívat k identifikaci i ke stanovení citlivosti. Většina studií však pracuje s velmi vysokými koncentracemi antimikrobních látek, které se neblíží klinicky využívaným hodnotám [27].

Principem měření je detekce vibrací chemických vazeb. Získáme Ramanova spektra molekul, která jsou dána posunem vlnové délky záření vyzářeného elektronem při návratu z excitovaného stavu. Výhodou je zrychlení stanovení citlivosti do řádu několika málo hodin. Metoda navíc poskytuje kvantitativní výsledky získáním hodnoty MIC [28]. Ramanovou spektrometrií lze pozorovat celé růstové křivky kolonií. Metoda nám může poskytnout i informace o mechanismu působení látky na buňku [3].

Výhodou je možnost neomezeně analyzovat jakýkoliv typ antimikrobní látky a mikroba po dobu přítomnosti proteinů a nukleových kyselin. Ramanova spektrometrie je navíc velmi citlivá a umožňuje pozorovat mechanismus účinku antimikrobní látky na mikroba podle excitace stavebních bloků proteinů a nukleových kyselin. Nevýhodou je vysoká cena a také fakt, že se metoda dosud klinicky nevyužívá ke stanovení citlivosti [3].

2.8.4 Měření optické denzity

Měření optické denzity pomocí spektrofotometru je metoda zkoumaná již ve druhé polovině minulého století, ale s největším rozkvětem až ve století současném. Měření optické denzity je možné určit růstové křivky bakterií v kapalném médiu v čase [3].

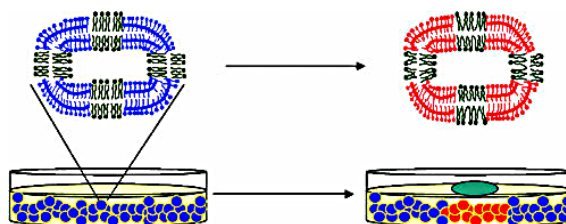
Měření absorbance při 600 nm získáme relativní množství bakterií ve vzorku. Měření absorbance v určitých časových intervalech v přítomnosti antimikrobní látky umožní rozlišit citlivý a rezistentní kmen. Toto měření lze případně spojit s měřením extracelulárního adenosintrifosfátu (ATP) chemiluminiscenční detekcí. Bakterie uvolňují extracelulárně ATP v růstové fázi a také když dochází k buněčné lýze účinnou antimikrobní látkou. Naopak optická denzita během lýze zůstává stejná a roste jen během růstu bakterií. Z toho vyplývá, že po dosažení ustáleného stavu růstu bakterií účinnost antimikrobní látky signalizuje vzestup poměru ATP k optické denzitě [29].

Výhodou této metody je rychlost detekce růstu bakterií během pár hodin. Další výhodou je nižší cena a fakt, že metoda je nedestruktivní. Metoda ale pro malý počet provedených zkoumání není validována pro celé spektrum bakterií. Pokusy byly dělány pro různé kmeny ESCO, STAU a několik dalších. Nejsou tedy ani k dispozici standardizované protokoly měření optické denzity. K dispozici jsou pouze protokoly pro bakteriální suspenze podle CLSI. Nevýhodou je také nutnost kapalného prostředí. Nelze tedy zkoumat buňky, které se dělí jen zachycené na specifickém povrchu. Dalším problémem je interference rozpustného substrátu s měřením. Navíc metodu nelze využít pro nízké koncentrace bakterií. Metoda navíc není plně kvantitativní a neposkytuje hodnoty MIC. Stanovení růstu pouze přibližně odhaduje množství CFU v roztoku [3].

2.8.5 Biomimetický polymerní senzor

Biosenzory jsou jednou z nejrychlejších využitelných metod detekce bakterií jako STAU. Během posledních deseti let se biosenzory staly jednou z velmi diskutovaných metod, které vychází z elektrochemických či optických přenosů signálu [30].

V detekci a stanovení citlivosti bakterií se může využít biomimetický polymerní senzor. Tato metoda využívá membrány, které prodělávají kolorimetrické a fluorescenční změny při interakci se sekrečními látkami bakterií. Principem metody je ukotvení nanočástic v agarovém růstovém médiu. Ukotvené nanočástice se skládají z dvojvrstvy fosfolipidů a dvojvrstvy polydiacetylenů, který je zodpovědný za fluorescenční a kolorimetrické změny při interakci. Během proliferace bakterií dochází k sekreci látek, které difundují agarem k ukotveným nanočásticím, kde dochází k barevné změně vyvolané těmito látkami, jak je zobrazeno na obrázku č. 6 [31].



Obrázek č. 6: Princip biomimetického polymerního senzoru

převzato z: [31]

Vysvětlivky: Proliferací bakterií (zobrazena zeleně) dochází k barevné změně ukotvených nanočástic z modré na červenou.

Agarové médium stíní signály z pozadí nesouvisející s bakteriemi. Navíc také amplifikuje detekované signály tím, že podporuje růst a proliferaci bakterií. Membránu aktivující amfifilní působky bakterií způsobí v nanočásticích a lipozomech barevnou změnu polydiacetylenů z modré na červenou. Navíc dojde i k emisi fluorescenčního záření při 560 a 640 nm. Metoda je využitelná pro detekci G+ i G- bakterií [32].

Zatímco barevný přechod může být odečten pouhým okem i laiky, tak instrumentální detekce fluorescence umožňuje zapojení metody do vysoce citlivých screeningových aplikací a také dovoluje potenciální automatizaci metody. Fluorescence, která ukazuje na barevnou změnu, také urychluje detekci růstu kolonií, jelikož se objeví dříve, než je možno okem pozorovat nárůst bakterií. Nevýhodou této metody je, že není standardizována. Metoda navíc není schopna rozlišit druhy patogenů. Pokud dojde k vložení antimikrobní látky do matrix, tak můžeme simultánně k bakteriálnímu růstu detekovat ještě citlivost k dané antimikrobní látce [31].

2.8.6 Kvantifikace bakteriálního růstu pomocí softwarové obrazové analýzy

Tato metoda studuje růst bakterií obrazovou detekcí růstu v průběhu času. Jednotlivé obrazce jsou pak analyzovány specifickým softwarem. Mezi výhody této metody patří relativně nižší cena a jednoduchá a bezpečná obsluha. Většina softwarů je v open-source režimu. Jedná se navíc o rychlou a citlivou metodu, kde díky časně detekci růstu patogenu můžeme získat velmi rychle hodnoty MIC. Naopak obtížně se získává přesná hodnota MIC. Pro vysokou přesnost je zapotřebí velkého množství snímků v čase, jejichž analýza může snížit rychlost metody. Testovat je také možné jen na pevných agarových substrátech. Mezi komerčně dostupné programy patří CellProlifer, Colony Imager, YeastXtract nebo HT Colony Analyser [3].

CellProlifer je open-source program, který automaticky na základě algoritmů identifikuje daný objekt, který může být dále měřen. Zjišťuje se jeho poloha, rozměry, textura, intenzita barvy, počet sousedů apod. Program může být aplikován na široké spektrum úkolů od klasifikace a počítání kolonií kvasinek až po kvantifikaci nádoru u myši [33].

Podobný systém Colonyzer je software, který automaticky měří velikost, barvu a polohu mikroorganismů na agaru. Software je opět open-source. Colonyzer je velmi citlivý i u nízkých denzit buněk, kde využívá velmi zředěné kapalné inokulum. Systém

automaticky kvantifikuje buněčný růst díky analýze velkého množství snímků pořízených v čase. Oproti CellProlifer je Colonyzer o trochu pomalejší systém, ale na rozdíl od CellProlifer byl navržen právě pro analýzu růstové kinetiky bakterií [34].

2.8.7 Průtoková cytometrie

Průtoková cytometrie je metoda schopná detekovat či separovat i minimální množství mikroorganismů a přesně je po inkubaci bakterií s antimikrobní látkou a fluorescenčním činidlem spočítat [35]. Metoda spočívá v průchodu suspenze testovaného patogenu měřícím zařízením, kde po ozáření vzorku laserovým paprskem dochází k emisi fluorescenčního záření. Bakterie jsou nejprve inkubovány s fluorescenčními činidly tak, aby pouze živé buňky s neporušenou membránou mohly být detekovány emisí fluorescence. Metoda se může využít ke stanovení citlivosti bakterií v případě porovnání různě citlivých bakteriálních kmenů. Například po dvou hodinách inkubace kultur STAU citlivého k methicilinu a MRSA s oxacilinem můžeme pozorovat zvýšení fluorescence u MRSA oproti druhému vzorku. Tím rozeznáme a odlišíme rezistentní a citlivý kmen [36].

Výhodou oproti PCR je možnost dobře rozlišit živé a mrtvé buňky. Mezi nevýhody patří nejednoznačnost v tvrzení, že životaschopnost buněk souvisí s intenzitou fluorescence. Záleží totiž také na použité antimikrobní látce, metabolismu konkrétní bakterie a tvorbě buněčných agregátů. Záleží také na účinku antibiotika. Jestli dochází k lýze buňky, změně permeability, či zda je patogen rezistentní a zůstane intaktní [36].

Metoda má možnost širokého uplatnění ve výzkumu a klinickém screeningu v budoucnosti po přísné validaci metody. Výhodou je rychlost a široký potenciál využití. Průtokovou cytometrií lze zkoumat prokaryotické i eukaryotické buňky [3].

2.9 Interpretace výsledků stanovení citlivosti

In vitro laboratorní testy antimikrobních látek na stanovení citlivosti jsou důležitým nástrojem pro zjištění, zda k léčbě potíží způsobených daným infekčním agens budou určené antimikrobní látky vhodné. Interpretace výsledků je celoevropsky sjednocena normami CLSI a EUCAST. Normy EUCAST byly vytvořeny pro potřeby mikrobiologických laboratoří. Sjednocují interpretace výsledků testů citlivosti napříč Evropou. Normy EUCAST pracují s kvalitativním hodnocením, tedy se třemi druhy výsledku interakce bakterií s antibakteriálně účinnou látkou. Bakteriální kmen pak může být rezistentní a předpokládá se selhání léčby pro slabou účinnost látky. Dále může být

intermediárně rezistentní, kdy je výsledek nejistý. Poslední variantou je citlivý kmen, kdy nám vyšetření citlivosti dává vysokou pravděpodobnost úspěchu léčby danou antibakteriální látkou [37] [38]. Veškeré metody testování citlivosti mikroorganismů k antimikrobním látkám poskytují kvalitativní odpověď, zda je kmen rezistentní, či citlivý [2].

Do těchto tří kategorií EUCAST jsou izolované kmeny bakterií z klinické praxe rozděleny na základě breakpointů neboli hraničních hodnot MIC. Breakpointy jsou stanovovány nejen podle citlivosti bakteriálních kmenů, ale je nutné zároveň zapojit znalosti farmakokinetiky a farmakodynamiky daného léčiva i jeho *in vitro* parametry účinku. Breakpointy v podstatě znamenají hraniční koncentrace v mg/l a µg/l u dilučních metod a v mm průměrů inhibičních zón u diskové difuzní metody [37] [38].

Právě interpretace laboratorního výsledku stanovení citlivosti pomocí MIC využívá breakpointy ať již EUCAST, nebo CLSI. Zapojením znalostí farmakokinetiky, farmakodynamiky, pravděpodobnosti účinku léčiva v eradikaci bakterií v různých částech lidského těla, výsledků klinických zkoušek a mikrobiologických dat získáme správnou interpretaci výsledku tabelovanou oběma orgány [2]. Sjednocené normy breakpointů, ať již EUCAST, nebo CLSI nám umožňují srovnávat antibiotickou rezistenci v celé Evropě. Zároveň mohou být tyto normy využity i k určení *in vitro* aktivity nově připravených potenciálně antimikrobních látek [37] [38].

Některé metody stanovení citlivosti bakteriálních kmenů poskytují i kvantitativní zhodnocení citlivosti. Je to například mikrodiluční bujónová metoda, která pracuje s hodnotou MIC [2].

2.10 Antimikrobní potenciál kvartérních amoniových solí

Látky s biocidním účinkem jsou významným hráčem kontrolujícím rozšiřování patogenů v prostředí jak ve zdravotnictví, tak v domácnostech či potravinářství. Jednou ze skupin antimikrobních látek jsou i kvarterní amoniové soli (QAS). QAS patří mezi povrchově aktivní látky a cílí na cytoplazmatickou membránu bakterií a lipidové obaly virů, ale některé moderní struktury dokážou zasáhnout i neobalené viry. Jejich antimikrobní potenciál je znám více než sto let, ale k výraznějšímu širokému využití došlo až po 2. světové válce. S jejich dlouhodobým a masovým užíváním souvisí i otázka rezistence a zaznamenané zvýšené tolerance mikroorganismů ke QAS zejména díky činnosti efluxních transportérů [39].

Nadřazenou skupinou pro tyto látky jsou obecně povrchově aktivní látky, které mají ve své struktuře hydrofóbní uhlíkový řetězec a polární funkční skupinu. Povrchově aktivní látky lze rozdělit na základní dvě skupiny neionických a ionických tenzidů. Podle náboje polární funkční skupiny můžeme ionické tenzidy dále dělit na anionické, amfifilní a právě kationické surfaktanty, kam jako typický případ patří QAS [40].

Mezi jejich výhody patří obecně nižší toxicita a možnost formulovat je do řady aplikačních forem [39]. Toxicita souvisí s délkou alkylového řetězce. Čím je řetězec delší, tím je cytotoxicita větší. Děje se tak patrně díky větší lipofilitě molekuly a lepšímu průniku membránou do buňky [41].

QAS jsou účinné na G⁺ i G⁻ bakterie, mykobakterie, spory rodu *Bacillus*, enteroviry, noroviry, spory *Trichophyton* a některé další houby i některé prvoky (*Acanthamoeba*) [39]. Většina látek je mnohem více účinná na G⁺ bakterie, jelikož dvojitá membrána G⁻ bakterií představuje pro většinu QAS často nepřekonatelnou překážku. Široce se využívají na čištění a dezinfekci povrchů a rukou ve zdravotnictví, kde slouží i jako prevence šíření nozokomiálních infekcí. Dále se používají v potravinářství, při úpravě vody, proti tvorbě bakteriálních biofilmů, jako součást topických mastí a očních kapek, proti zubnímu kazu [41]. QAS se využívají také jako změkčovadla a antimikrobní látky. U solí *N*-alkylpyridinia se využívá jejich interakce s nikotinovými receptory. Využití najdou i jako pomocná rozpouštědla v analytické chemii. Je známa i jejich vlastnost inhibovat enzym acetylcholinesterázu. Popsána je i možnost, že tyto látky pomáhají zlepšit absorpci oligonukleotidů přes fosfolipidové membrány jako přenašeče [42].

Kationické surfaktanty, mezi které QAS patří, vytváří ve vodném prostředí po překročení kritické micelární koncentrace speciální útvary zvané micely. Tyto látky se mohou využívat i jako tzv. micelární katalyzátory urychlující chemický rozklad vysoce toxických látek při dekontaminaci pro vojenské účely, jako například látek typu organofosfátů (Sarin, Soman, Tabun, VX, pesticidy apod.) [43].

2.11 Mechanismus účinku

Amoniové soli patří mezi biocidní látky, které zasahují mnoho buněčných cílů a vedou k buněčné smrti. Tyto látky patří mezi nejúspěšnější a nejčastěji používané dezinfekční prostředky. QAS působí zejména na cytoplazmatickou membránu a vedou k porušení fosfolipidové dvojvrstvy [40].

Mechanismus účinku QAS lze popsat v několika krocích, ale není ještě zcela objasněn. V základu vychází z povahy QAS jako povrchově aktivních látek. Dochází k interakci kladně nabitě hlavičky surfaktantu se záporně nabitou membránou. Nejprve dochází k adsorpci na buněčnou stěnu a její penetraci. Následuje interakce s cytoplazmatickou membránou a její dezorganizace. Poté dochází k úniku materiálu z vnitrobuněčného prostoru a degradaci proteinů a nukleových kyselin. Nakonec dojde k autolýze buněčné stěny uniklými lytickými enzymy [39].

Jejich selektivní působení na bakteriální cytoplazmatickou membránu lze pozorovat při pokusech na protoplastech (buňkách bez buněčné stěny), které jsou suspendovány v různých rozpouštědlech. Příkladem může být sukrosa. Na rozdíl od jiných látek vedoucích k lýze protoplastů, jako například trichlorsalicylanilid, nepoškozují QAS bakteriální membránu na specifických cílech, nýbrž působí celkově na membránu a vedou k lýze suspendovaných protoplastů v různých rozpouštědlech. Protoplasty jsou nevratně poškozeny působením těchto látek na cytoplazmatickou membránu, po jejíž dezorganizaci dochází k lýze buňky z důvodu osmotického stresu. Samostatné membrány nepodléhají oné disagregaci, jelikož účinek QAS na membránovou dezorganizaci není sám o sobě dostatečně vysoký [40].

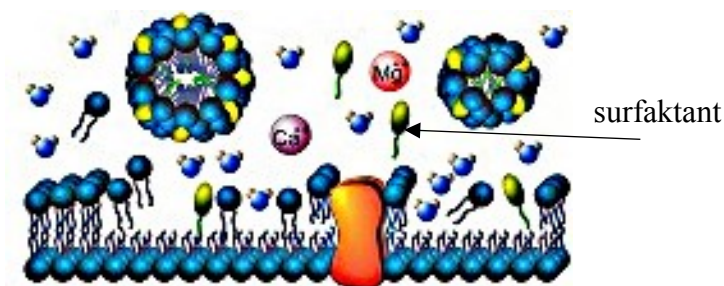
Další antimikrobní potenciál této skupiny látek je tvořen také změnou membránového potenciálu při dezorganizaci cytoplazmatické membrány. Tím dojde k zásahu do transportních systémů, metabolismu a do tvorby ATP. Dále jsou tyto kationické surfaktanty schopné poškozovat i vnější membránu G⁻ bakterií. U cetylpyridium chloridu bylo navíc konkrétně pozorováno, že vede k úbytku K⁺ u kvasinek *Sacharomyces cerevisiae*. Protivirový efekt byl pozorován zejména proti obaleným virům, kde dochází k interakci s lipidovým obalem. U viru lidské hepatitidy typu B tak dochází k morfologickým změnám vedoucím ke ztrátě infekčnosti viru. Cetylpyridium chlorid ve studiích s bakteriofágy vedl k inhibici transdukce. Navíc inaktivoval fágové částice [40].

V nízkých koncentracích (0,5–5 mg/l) působí QAS bakteriostaticky, fungistaticky, sporistaticky. Ve vyšších koncentracích působí mikrobicidně na stejné skupiny mikroorganismů [39]. Jejich sporistatický efekt je vysvětlován tím, že brání vývoji a růstu spor, tedy vývoji vegetativní buňky ze spory. Nebrání ale vlastnímu přechodu spor z aktivního metabolického stavu. Neinhibují tedy vlastní proces

germinace. Účinek QAS na mykobakteria není z hlediska mechanismu účinku příliš objasněn. Víme ale, že na mykobakteria působí tyto látky mykobakteriostaticky, nikoliv cidně [40].

Studie popisují interakci mezi záporně nabitou buněčnou membránou a kladně nabitým dusíkem monomeru účinné látky. Navíc se na efektu může podílet i interakce s intracelulárními proteiny a zvýšená rozpustnost a dostupnost substrátů intracelulárně. Antimikrobní aktivita je zřejmě nejvíce podmíněna délkou alkylového řetězce, rigiditou a prostorovým uspořádáním monomeru při interakci s buněčnou membránou [41].

Všechny kationické surfaktanty interagují svou polární kladně nabitou částí se záporně nabitou buněčnou stěnou nebo membránou. Tyto membrány jsou stabilizovány kationty jako Mg^{2+} a Ca^{2+} . Kationické surfaktanty pak mohou svým kladným nábojem nahradit tyto ionty a vmezeřit nepolární alkylové řetězce do fosfolipidové dvojvrstvy [44]. Toto porušení membrány dále vede k úniku K^+ a dalších cytoplazmatických komponent z vnitřního prostředí ven a následně dojde k buněčné smrti [43]. QAS tím způsobí rozpad membrány a porušení její integrity za tvorby micel. Viz následující obrázek č. 7, který zobrazuje děje na buněčné membráně [44].



Obrázek č. 7: Mechanismus účinku kvarterních amoniových solí

převzato z: [44] a upraveno

Díky tomu je nakonec kladný náboj hlavním nositelem baktericidního efektu kationických surfaktantů. Navíc zbytek struktury těchto látek moduluje dále tento efekt. Předpokládá se, že substituenty vedoucí ke snížené elektronové hustotě na kationtu surfaktantu vyvolají silnější interakci s polarizovatelnými regiony zejména ve fosfolipidových membránách. Tím pádem vedou k silnějšímu baktericidnímu efektu [44]. Substituenty na kvarterním dusíku jsou důležité i z hlediska hydrofilně-lipofilní

rovnováhy, která je důležitou podmínkou antimikrobní aktivity QAS. Prodlužováním alkylového řetězce u pyridiniových solí v rozsahu C₁₂–C₁₆, se zvyšuje hydrofobicita molekuly, která pak může být příliš velká, než aby mohla umožňovat transport přes bakteriální buněčnou membránu [43].

Kationické surfaktanty jako QAS mohou mít vyšší afinitu k prokaryotickým buňkám díky rozdílné stavbě prokaryotických a eukaryotických buněk. Ty se odlišují například přítomností peptidoglykanu a buněčné stěny u prokaryontních a cholesterolu a nerozvětveným fosfolipidům u eukaryotních organismů. Bakteriální cytoplazmatická membrána je také více záporně nabitá. Na rozdíl od savčích buněk je jejich membrána více závislá na elektrostatických a hydrofobních interakcích [41].

2.12 Rezistence

Rezistence mikroorganismů k biocidním látkám je přirozený jev, který nabývá na významu v posledních desetiletích v souvislosti s nadměrným užíváním antimikrobních látek nejen v terapii. Spektrum možných cílů biocidních látek je velmi široké od prionů přes bakterie až po protozoa. Tím pádem mají tyto cíle odlišnou stavbu, metabolismus a fyziologii. Stanovení citlivost k antimikrobním látkám tak musí probíhat zvláště pro jednotlivé skupiny mikroorganismů. S tím souvisí i rozdíl v rezistenci různých skupin patogenů z důvodu výše zmíněných odlišností. Navíc je spektrum antimikrobních látek velmi široké a stejně tak je velké i množství různých cílových struktur patogenu. Obecně nejvyšší rezistence dosahují priony, spory a mykobakterie. Naopak nejmenší tendenci k rezistenci můžeme pozorovat u velkých obalených virů a G⁻ bakterií [40].

Dále se budeme věnovat pro zjednodušení pouze bakteriální rezistenci se zaměřením zejména na skupinu QAS.

2.12.1 Přímá rezistence

Jak již je výše zmíněno, samotná rezistence je jevem přírodně přirozeným, ale nadmírou užívání antimikrobních látek se stala v současnosti velkým problémem. Problémem mohou být i nízké zbytkové koncentrace antimikrobních látek u živočichů a v prostředí, které nevedou k inhibici patogenů, ale mohou se podílet na vzniku rezistence. Principem je nárůst podílu bakteriálních kmenů, které exprimují geny vedoucí k rezistenci na danou antimikrobní látku. Toho dosáhneme vystavením populace patogenu určité antimikrobní látce a působením selekčního tlaku. Tato přímá rezistence se u infekčních agens ke QAS realizuje nejčastěji pomocí efluxních pump [45].

2.12.2 Nepřímá rezistence

Kromě této přímé rezistence existuje ještě možnost selekce rezistentních fenotypů zvaná rezistence nepřímá. Zde jsou geny vedoucí k rezistenci na určitou antimikrobní látku exprimovány současně s jiným spojeným genem. Nemusí to být gen kódující rezistenci, který byl pozitivně selektován jinou látkou. Další možností nepřímé rezistence je zkřížená rezistence. U zkřížené rezistence dochází k tomu, že exprese genu rezistence vyvolaná určitou antimikrobní látkou vede k rezistenci na více chemicky podobných antimikrobních látek. Například exprese genu pro efluxní pumpu u naší skupiny testovaných látek vede k rezistenci na více QAS, nejen na konkrétní použitou látku. Vystavení jedné látky tedy vede k expresi efluxního genu. Podle těchto teorií má v podstatě každá antimikrobní látka potenciál vyvolat rezistenci na jinou antimikrobní látku [45].

2.12.3 Vnitřní rezistence

Rezistence bakterií k antibakteriálním látkám může být i vnitřní a to buď přirozená, nebo získaná pomocí plazmidů, transpozonů či mutací. Vnitřní rezistence na výše zmíněné látky je typická zejména pro spory, G⁻ bakterie a mykobakterie. Vnitřní rezistence je způsobena vnějšími buněčnými obaly, které brání přístupu QAS ke svému místu účinku. Proto mají látky jako benzalkonium chlorid, benzethonium chlorid a cetrimid výrazně vyšší hodnoty MIC u G⁻ bakterií (*Pseudomonas aeruginosa*), než u G⁺ (STAU). Další možností vnitřní rezistence, i když méně častou zejména v souvislosti s QAS, je tvorba bakteriálních enzymů, které rozkládají danou antimikrobní látku. To je typické například pro látky z jiných skupin biocidů jako chlorhexidin [40].

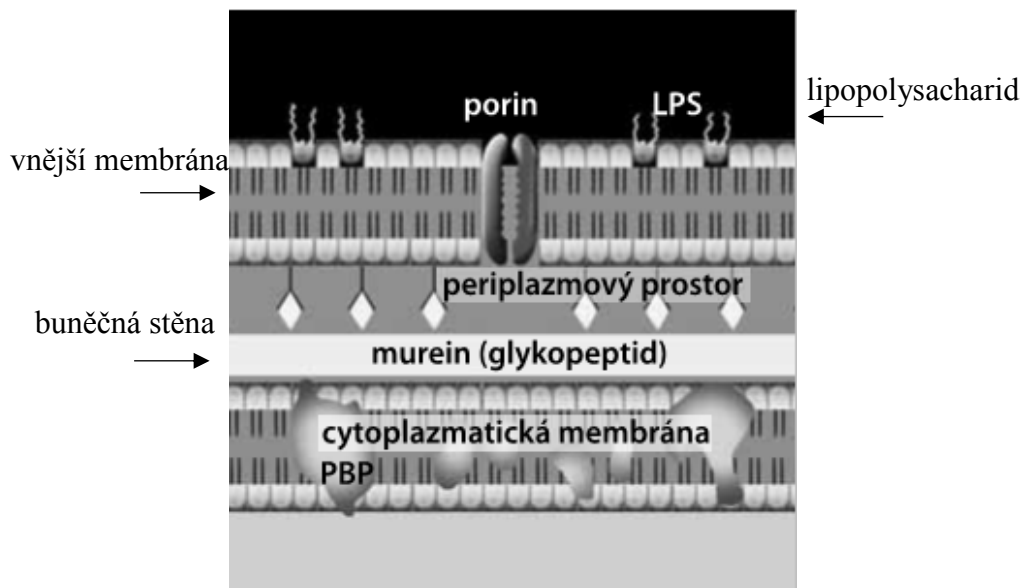
U bakteriálních spor je mechanismem rezistence přítomnost peptidoglykanového kortexu a vnějších obalů spor. Rezistence může být během vývoje spor u určitých látek různá od brzké po pozdní. U QAS přispívá k rezistenci částečně již kortex. Spory samotné představují velmi odolnou formu bakterií. Kmeny, které jsou normálně ke QAS citlivé, vyžadují ve formě spor výrazně vyšší koncentrace antimikrobní látky a velmi často ještě podpořené zvýšenou teplotou [40].

V případě mykobakterií bude hlavním faktorem přirozené rezistence rigidní buněčná stěna z peptidoglykanů kovalentně spojených s arabinogalaktanovým polymerem a dalšími strukturami lipidového a voskovitého charakteru. Proto většina QAS působí i ve vysokých koncentracích na mykobakterie pouze mykobakteriostaticky,

nikoliv mykobaktericidně [40]. Arabinogalaktan by zřejmě mohl být tou složkou buněčné stěny, která brání v penetraci amoniových sloučenin do buněk. Usuzuje se tak na základě faktu, že účinnost QAS je potencována etambutolem, který narušuje syntézu arabinogalaktanu [46].

U G+ bakterií, jako například STAU, MRSA a *Staphylococcus epidermidis* (STEP), využitých v experimentální části není tato rezistence nijak obvyklá. Proto i hodnoty MIC bývají u těchto organismů dosahovány nižší v porovnání se sporami, mykobakteriemi nebo i G- bakteriemi. Přes jejich peptidoglykanovou buněčnou stěnu prostupují QAS poměrně lehce, přestože se mohou objevit rozdíly v citlivosti na antimikrobní látku v závislosti na stádiu růstu a dostatku živin díky určité plasticitě peptidoglykanové buněčné stěny. U STAU se v přírodě vyskytuje zajímavý fenomén, kdy jsou jeho kolonie tvořeny buňkami obalenými slizovým pouzdem. Buňky obalené touto mukózní vrstvou jsou následně zabíjeny mnohem pomaleji některými typy antimikrobních látek, mezi něž patří i amoniové soli jako cetrimid. Mukózní vrstva tedy slouží jako fyzikální bariéra a brání účinku těchto antimikrobních látek [40].

G- bakterie vykazují obecně vyšší rezistenci než G+ bakterie, a tudíž dosahují i vyšších hodnot MIC. Z nich vyazuje obecně nejvyšší hodnoty kmen *Pseudomonas aeruginosa*. Vysoká rezistence je typická i pro rod *Proteus*. Jedná se o nižší citlivost k biocidům obecně. Vyskytuje se kromě QAS i u hexachlorofenu, triclosanu a u výše zmíněných bakterií i k chlorhexidinu. Příčinu můžeme hledat ve vnější membráně G- bakterií, která funguje jako bariéra vstupu biocidních látek včetně QAS. Tím pádem je chráněna vnitřní membrána, která je cílem působení těchto látek [40]. Tato membrána G- bakterií, která představuje účinnou bariéru pro QAS, je schematicky zachycena na obrázku č. 8. QAS a další kladně nabitě desinfekční látky nakonec přechází přes vnější membránu tak, že membránu poškodí a ta se následně pro ně stane průchozí. Díky svému pozitivnímu náboji se tyto látky ochotně vážou na záporně nabitě struktury bakteriálních buněčných stěn a vnějších membrán. Po obsazení svých vazebných míst dochází k poškození těchto buněčných struktur [47].



Obrázek č. 8: Membrány G⁻ bakterie

převzato z: Schindler, J. *Mikrobiologie: pro studenty zdravotnických oborů*. [57]
a upraveno

U výše zmíněných G⁻ bakterií *Pseudomonas aeruginosa* a rodu *Proteus*, které se vyznačují obzvláště zvýšenou rezistencí k antimikrobním látkám, je tato rezistence dána právě jejich buněčnou stěnou a vnější membránou. Tyto organismy mají ve své vnější membráně specifické lipopolysacharidy, pevnější vazby mezi nimi či rozdílnou aciditu. Navíc jsou póry této membrány ztlačně menší. Dalším spíše minoritním původcem vnitřní rezistence G⁻ bakterií k antimikrobním látkám je buněčná stěna. Ta je ale ztlačně slabší než u G⁺ bakterií a zřejmě nepředstavuje tak zásadní bariéru, zejména v porovnání s vnější membránou. Další možností zvýšené bakteriální rezistence je tvorba biofilmů a to jak u G⁺, tak i G⁻ zástupců. V biofilmovém uspořádání se může projevat zvýšená rezistence přítomných mikroorganismů z mnoha důvodů. Jednak může jít o transfer plazmidů, dále o sníženou možnost kontaktu vnitřních buněk s antimikrobní látkou, rozdílnou produkci degradačních enzymů apod. Také rozdílný obsah nutrientů v okolí, rozdílné buněčné prostředí a jiný vývoj růstu bakterií v biofilmu hraje v pozmeněné rezistenci svou roli [40].

2.12.4 Získaná rezistence

Získaná bakteriální rezistence může být zprostředkována různými mechanismy. Může se jednat o transport genetické informace s pomocí plazmidů a transpozónů. Další možností je získání rezistence formou mutace [40].

Riziko selekce rezistentních bakteriálních kmenů v současnosti stoupá se zvýšeným užíváním antimikrobních látek obecně a zejména antibiotik v humánní i veterinární medicíně a v potravinářství. Biocidní látky dokáží zabít mikroorganismy jen v dostatečných koncentracích. Nicméně v kontaktu s bakteriemi bývají často pouze subletální dávky biocidních látek z mnoha různých důvodů. V takovémto případě ale dochází k adaptaci původně citlivých bakterií na antimikrobní látku. Při opakovaném vystavení populace antimikrobní látce v nižší než letální koncentraci může dojít ke snížení citlivosti a k rezistenci těchto bakterií. Bakterie se brání typickými možnostmi jako sníženou permeabilitou, zvýšeným efluxním transportem, zvýšenou aktivitou rozkladných enzymů anebo výše zmíněnými metodami získané rezistence [48].

Právě při opakovaném vystavování nižším koncentracím biocidních látek na bázi QAS může postupem času docházet ke chromozomovým mutacím a následně k adaptaci k růstu v médiu obsahujícím mnohonásobně vyšší koncentrace antimikrobních látek. Dojde k drobným změnám ve vnějších strukturách bakteriálních buněk. Pokud budou ale buňky růst v médiu, které nebude obsahovat subletální koncentrace QAS, tak dojde opět ke ztrátě této rezistence. Na příkladu *Staphylococcus marcescens* se citlivé a rezistentní buňky v tomto médiu vzájemně odlišují povrchovými charakteristikami a elektroforetickou pohyblivostí [40]. Adaptací na QAS je znám opět rod *Pseudomonas*. Mechanismus jeho rezistence je nespecifický i na jiné amfoterní surfaktanty, ale nevyskytuje se zkřížená rezistence na chlorhexidin. Dochází ke změnám ve složení mastných kyselin a zejména proteinů vnější membrány. Díky těmto změnám ve vnějším obalu G⁻ bakterií dochází k celkově sníženému prostupu QAS do buněk. U rodu *Pseudomonas* je známo, že rezistenci k těmto látkám sníží přítomnost EDTA, která zejména u těchto G⁻ bakterií výrazně mění strukturu a prostupnost vnější membrány [40].

Stále je ale složité interpretovat tyto teoretické poznatky do klinické praxe. Ještě stále není jasné, zda tento efekt rezistence po vystavení populace subletálními koncentracím antimikrobní látky je signifikantní i v klinické praxi. Některé studie ukazují, že například kmeny rezistentní na antibiotika nemusí být zároveň rezistentnější na biocidní dezinfekční látky než kmeny na antibiotika citlivé [40].

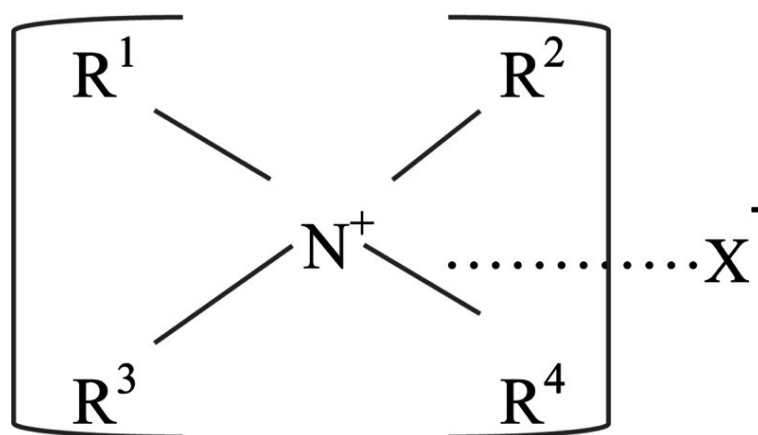
Druhou možností je získání rezistence pomocí plazmidů. Geny pro rezistenci k antimikrobním látkám se nachází na plazmidech, tedy na malých cirkulárních strukturách DNA schopných samostatně se replikovat a přenášet mezi bakteriemi.

Plazmidy kódují skupiny genů s různou funkcí jako konjugace a transmise, systém toxin-antitoxin a právě mobilní geny antimikrobiální rezistence. Tyto geny bývají hrozbou zejména u G⁻ bakterií, kde často vedou k produkci karbapenemáz, β-laktamáz nebo také k produkci plazmidy řízených efluxních pump [49].

Plazmidy zprostředkovaná rezistence na QAS je nejčastější pomocí efluxních transportérů a tím sníženého vstupu látek do buněk. Přesto bývá u G⁻ bakterií potíží dokázat, zda daná zvýšená rezistence s jistotou souvisí s plazmidy. Naopak u G⁺, zejména u rodu *Staphylococcus*, je prokázána možnost plazmidového přenosu rezistence na mnoho biocidů včetně QAS. Rezistence je pak zprostředkována zejména efluxními transportéry. Dosud ale není důkladně s jistotou popsána plazmidy řízená rezistence u jiných G⁺ bakterií než u rodu *Staphylococcus* [40].

2.13 Struktura

Efekty nových struktur látek na bázi QAS se většinou hodnotí v porovnání se solemi benzalkonia a pyridinia, které se běžně používají jako dezinfekční látky [50]. Obecný vzorec QAS s antimikrobní aktivitou je N⁺R¹R²R³R⁴X⁻ a je graficky znázorněn na obrázku č. 9. X⁻ je anion nejčastěji Cl⁻ a Br⁻. R¹⁻⁴ mohou být libovolné skupiny atomů, ale alespoň jeden musí být alkylový řetězec o délce většinou mezi 8–18 uhlíky. Antimikrobní efekt totiž nemají látky s řetězcem kratším než 4 a delším než 18 uhlíků s maximem efektu mezi 12 až 16 uhlíky. Mezi nejčastěji používané struktury patří například soli cetylpyridinia, benzalkonia, carbethopendecinia a cetrimonia [41].

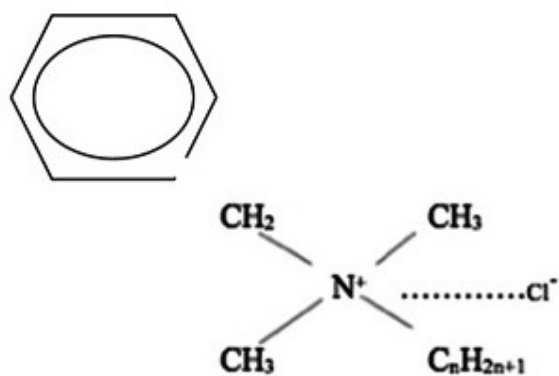


Obrázek č. 9: Kvarterní amoniové soli

převzato z: [39]

Jejich vlastnosti vyplývají ze struktury, kde je onou nezbytnou součástí kladně nabitý kvarterní atom dusíku. Ten je zodpovědný za rozpustnost ve vodě. Lipofilní alkylové řetězce různé délky pak ovlivňují interakci těchto látek s biologickými strukturami, jako jsou receptory nebo membrány. Kvarterní dusík může být podle výše zmíněného obecného vzorce součástí necyklických systémů jako u cetrimonia a benzalkonia. Další možností je zapojení atomu dusíku do heterocyklu, jako mohou být pyridin, imidazol, chinolin nebo isochinolin. Komerčně se nejčastěji využívají směsi obsahující soli benzalkonia a *N*-alkylpyridinia [50]. Mezi přípravky obsahující QAS náleží například Ajatin (směs benzalkonium chloridů C_8 – C_{18} používaných jako dezinfekční roztok). Mezi další dezinfekční roztoky obsahující benzalkonium chlorid patří Dettol. Sanytol je další dezinfekční roztok, který obsahuje tentokrát didecylmethylamonium chlorid. Octenisept je také dezinfekční roztok pro kožní použití obsahující oktenidin dihydrochlorid. Carbethopendecinium bromid je například účinnou složkou kožní dezinfekce Septonex, očních kapek Ophthamo-Septonex. QAS se dále využívají jako dezinfekce ústní dutiny například Orofar (benzoxonium), Septolete (benzalkonium chlorid), Neoseptolete (cetylpyridinium). Dalším komerčním užitím solí benzalkonium chloridu jsou také spermicidní krémy jako Pharmtex.

Soli benzalkonia se využívají jako konzervační látky u očních, nosních i parenterálních přípravků, jako antiseptika pro topické užití a pro dezinfekci nástrojů. Antimikrobní účinek závisí na délce alkylového řetězce na dusíku. Největšího antimikrobního efektu dosahují homology s délkou řetězce 12 až 16 uhlíkových atomů. C_{12} vykazuje nejvyšší aktivitu proti kvasinkám a houbám. C_{14} je nejúčinnější proti G^+ bakteriím a C_{16} homolog proti G^- bakteriím, přičemž komerčně se využívají většinou směsi dvou až tří homologů [51]. Obrázek č. 10 znázorňuje strukturu právě těchto komerčně využívaných benzalkoniových solí. QAS vzhledem ke své nízké toxicitě patří mezi často používané antimikrobní látky v různých formách. Kromě solí benzalkonia a *N*-alkylpyridinia mají významný antimikrobní efekt i některé deriváty chinolinu [42]. Obecně panuje názor, že největší antimikrobní aktivitu mají QAS nesoucí na kvarterním dusíku jako substituent dlouhý alkylový řetězec. Optimum pro G^+ bakterie se předpokládá se substituentem v alkylovém řetězci C_{12} – C_{14} a u G^- bakterií s látkami C_{14} až C_{16} [44].



Benzalkonium chloride

Obrázek č. 10: Benzalkonium chlorid

převzato z [39] a upraveno

3 Experimentální část

V experimentální části práce byla aplikována zavedená mikrodiluční bujónová metoda, kterou se stanovuje citlivost testovaných bakteriálních kmenů k nově syntetizovaným látkám na bázi QAS s dezinfekčním potenciálem. Přes dílčí odečtení bakteriostatické koncentrace popsané hodnotou MIC byly dále odečteny i hodnoty MBC pro testované látky. Každá z látek byla měřena třikrát. Z osmi testovaných bakteriálních kmenů patří 3 mezi G⁺ (STAU, MRSA, STEP). Dalších 5 patří mezi G⁻ bakterie: ESCO, *Yersinia bercovieri* (YER), *Klebsiella pneumoniae* neprodukující širokospektré β -laktamázy (KLPN ES⁻), *Klebsiella pneumoniae* produkující širokospektré β -laktamázy (KLPN ES⁺) a multirezistentní *Pseudomonas aeruginosa* (PSAE MR). Pro porovnání antibakteriální aktivity byly jako standardy vybrány soli benzalkonium bromidu o délce alkylového řetězce, 12, 14 a 16 uhlíků. Práce byla vykonána na pracovišti Katedry epidemiologie, Fakulty vojenského zdravotnictví v Hradci Králové, Univerzity Obrany v Brně.

3.1 Využité vybavení:

3.1.1 Pomůcky:

Všechny pomůcky v níže uvedeném seznamu byly zakoupeny od firmy VWR (Stříbrná Skalice, Česká republika).

1. 12jamkové rezervoáry
2. jednorázové očkovací kličky
3. mikropipety
4. Petriho misky
5. sterilní mikrotitrační destičky
6. sterilní špičky
7. sterilní zkumavky
8. stojánky na zkumavky

3.1.2 Přístroje:

1. Denzitometr Den-1B (Biosan ltd, Riga, Lotyšsko)
2. laminární box Heal force (Shanghai Lisben scientific equipment, Šanghaj, Čína)
3. Inkubátor CelSafe (ESCO, Singapur)
4. Vortex mixer Stuart (Bibby-scientific/Cole-Parmer, Staffordshire, UK)

3.1.3 Chemikálie

1. DMSO pro molekulární biologii $\geq 99,9\%$ (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA)
2. Mueller–Hintonův bujón, kultivační médium (HiMedia, Bombaj, Indie)
3. Mueller–Hintonův agar, kultivační půda (HiMedia, Bombaj, Indie)
4. voda pro injekce (Braun, Malsungen, Německo)

3.1.4 Zkoušené kmeny bakterií

Gram pozitivní bakterie (G+)

1. *Staphylococcus aureus*, C1947, (zkratka STAU)
2. methicilin-rezistentní *Staphylococcus aureus*, C1923, (zkratka MRSA)
3. *Staphylococcus epidermidis*, C1936, (zkratka STEP)

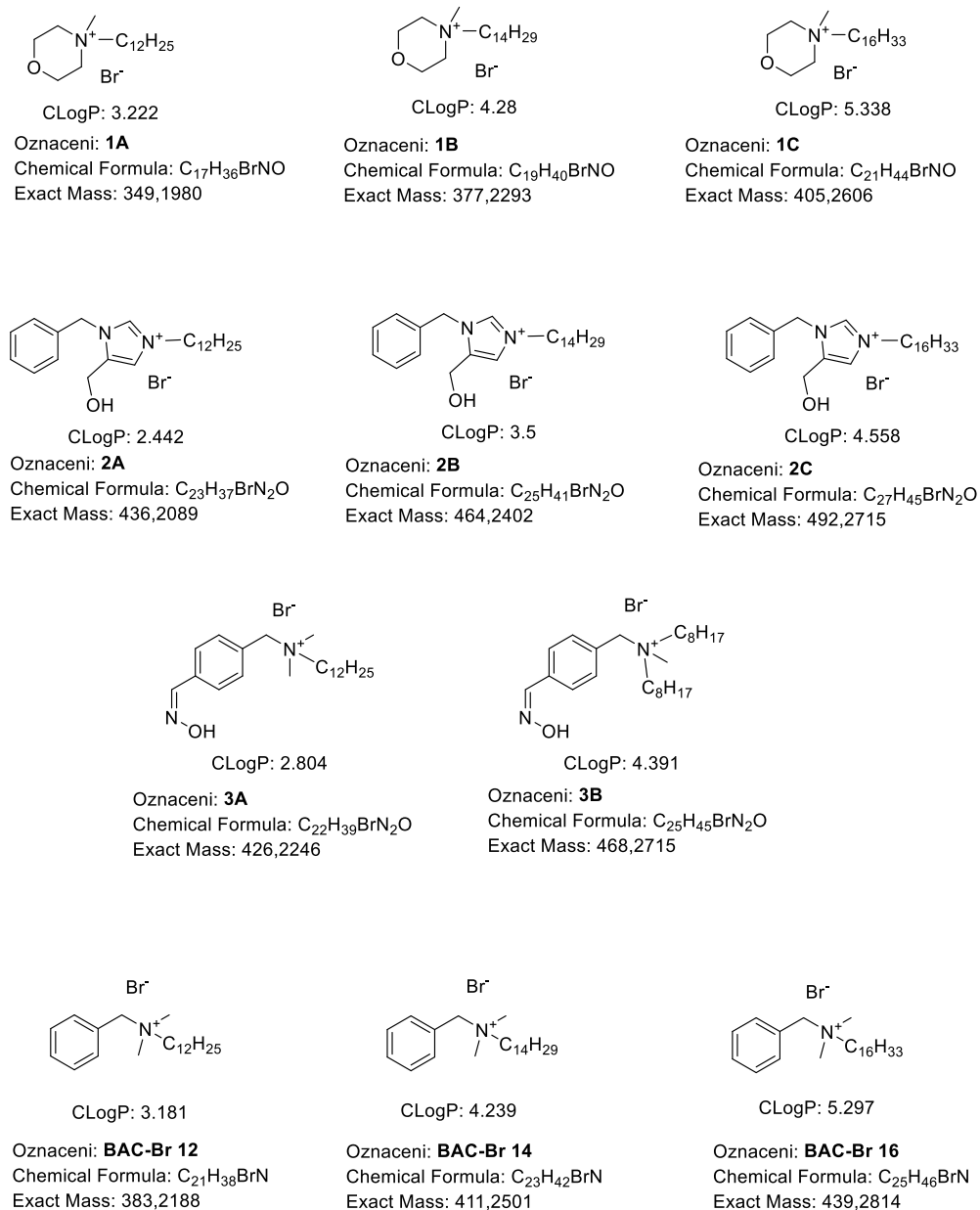
Gram negativní bakterie (G-)

1. *Escherichia coli*, A1235, (zkratka ESCO)
2. *Yersinia bercovieri*, CNCTC 6230, (zkratka YER)
3. *Klebsiella pneumoniae*, C1950, (zkratka KLPN ES-)
4. *Klebsiella pneumoniae* produkující širokospektré β -laktamázy, C1934, (zkratka KLPN ES+)
5. multirezistentní *Pseudomonas aeruginosa*, A1245, (zkratka PSAE MR)

3.1.5 Testované látky

Testováno bylo celkem 11 látek typu QAS. Látky byly syntetizovány v Centru biomedicínského výzkumu Fakultní nemocnice v Hradci Králové. Byly potvrzeny jejich struktury, molekulové hmotnosti a vypočítány hodnoty logaritmu rozdělovacího koeficientu (CLogP). S takto dodanými látkami proběhlo stanovování citlivosti mikrodiluční bujónovou metodou. Jednalo se o 3 soli benzalkonium bromidu s alkylovým řetězem o délce 12, 14 a 16 uhlíkových atomů, které sloužily pro porovnání. Z nových látek bylo testováno 8 zástupců rozdělených do třech skupin podle struktury. Látky 1A, 1B a 1C jsou soli *N*-alkyl-*N*-methylmorfolinium bromidu. Látky 2A, 2B a 2C jsou soli 1-alkyl-3-benzyl-4-(2-hydroxyethyl)imidazolium bromidu. Zástupci těchto dvou skupin se liší jen délkou alkylového řetězce. Látky 3A a 3B jsou soli odvozené od 4-hydroxyiminomethylbenzylaminu s kombinací jednoho nebo dvou dlouhých

alkylových řetězců. Struktury látek včetně jejich vypočítaných CLogP jsou na obrázku č. 11.



Obrázek č. 11: Testované látky

Obrázek byl vytvořen v programu ChemDraw professional (PerkinElmer Informatics, Waltham, Massachusetts, USA) verze 17.0.0206 (121)

Vysvětlivky: Na obrázku jsou testované struktury a jejich vypočtené hodnoty logP vyjadřující jejich lipofilitu. Dále jsou zde uvedeny další charakteristiky látek jako sumární chemický vzorec (chemical formula) a molekulová hmotnost (exact mass).

3.2 Metodika

3.2.1 Příprava zásobní suspenze zkoušených kmenů bakterií

Do laminárního boxu bylo připraveno 8 sterilních zkumavek popsaných zkratkami jednotlivých kmenů testovaných bakterií, tedy STAU, MRSA, STEP, ESCO, YER, KLPN ES-, KLPN ES+, PSAE MR. Očkovací kličkou bylo z jednotlivých bakteriálních kultur odebráno malé, ale dostatečné množství kolonie. Ve sterilní zkumavce bylo suspendováno v objemu přibližně 3 ml, ale maximálně okolo 5 ml vody pro injekce tak, aby optická denzita po promíchání na vortexu dosahovala hodnoty 0,5 stupňů podle MacFarlanda. Při nižší hodnotě by se doplnilo množství odebrané kolonie, při vyšší hodnotě by se přidalo více vody pro injekce tak, aby nebylo překročeno celkové množství 5 ml suspenze. Takto připravená zásobní bakteriální suspenze by se mohla při teplotě 4 °C v lednici uchovávat po dobu 14 dnů.

3.2.2 Příprava roztoků testovaných látek

Připravená látka dodaná z Centra biomedicínského výzkumu Fakultní nemocnice v Hradci Králové se rozpustila v dimethylsulfoxidu (DMSO) a byla promíchána na vortexu do úplného rozpuštění. Koncentrace zásobního roztoku byla 0,05 mol/l a byla volena tak, aby první testovaná koncentrace látky po naředění médiem byla 500 µmol/l a zároveň byl obsah DMSO v testované koncentrační škále maximálně 1%. Koncentrační řada byla připravena naředěním médiem s 1% DMSO. Objem DMSO v základním roztoku byl vypočítán podle rovnice:

$$V_{DMSO} = \frac{m}{M \times c \times 100} = x \text{ l DMSO}$$

m.....navážka v gramech

c.....500 µmol/l = 0,0005 mol/l (koncentrace v první zkumavce koncentrační řady)

M.....molární hmotnost

Pokud by se látka nerozpustila v daném objemu DMSO, tak by se následně přidala další ekvivalentní dávka DMSO do úplného rozpuštění. Zároveň by se tím posunula koncentrační řada přidáním jednoho ekvivalentního množství DMSO z 500 µmol/l na 250 µmol/l atd. Látky byly dodány v konkrétních navážkách. Krom míchání probíhala veškerá práce za aseptických podmínek.

3.2.3 Příprava koncentrační řady roztoku testované látky

Do laminárního boxu bylo připraveno 11 sterilních zkumavek a očíslováno. Do první zkumavky bylo pipetou přeneseno 20 μ l zásobního roztoku testované látky a 1,98 ml růstového média. Promíchalo se na vortexu do úplného rozpuštění. V případě, že by nedošlo k rozpuštění, přidala by se další ekvivalentní dávka růstového média. Poměr 20 μ l ku 1,98 ml média byl nutný, neboť v mikrotitrační destičce mohl být roztok o maximální koncentraci DMSO 1 %. Toto naředění umožnilo 100x koncentrovanější roztok přenést do objemu média za požadované koncentrace. Do zbylých 10 zkumavek bylo napipetováno 0,5 ml DMSO. Do druhé zkumavky bylo napipetováno 0,5 ml základního roztoku. Obsah zkumavky byl promíchán a 0,5 ml bylo pipetou přeneseno do zkumavky číslo 3. Takto se postupovalo až do jedenácté zkumavky, čímž bylo provedeno dvojkové ředění koncentrační řady v rozsahu 500 μ l až 0,49 μ l.

Do připraveného 12jamkového rezervoáru bylo napipetováno do jamek 2–11 1,98 ml růstového média. Do jamky číslo 1 byl převeden obsah zkumavky číslo 1. Do jamek 2–11 bylo přidáno pipetou vždy 20 μ l naředěné testované látky ze zkumavky s příslušným číslem. Do jamky číslo 12 bylo přidáno k růstovému médiu 20 μ l DMSO.

3.2.4 Příprava mikrotitrační destičky

Do každého z osmi řádků mikrotitrační destičky označených zkratkami testovaných bakteriálních kmenů (STAU, MRSA, STEP, ESCO, YER, KLPN ES-, KLPN ES+, PSAE MR) byla přenesena koncentrační řada testované látky v růstovém médiu z 12jamkového rezervoáru pomocí 12kanálové pipety. Do každé jamky bylo tedy v laminárním boxu přeneseno 200 μ l roztoku testované látky o koncentraci 500 až 0,49 μ l v sestupné koncentraci od jamek ve sloupci 1 po sloupec 11. Poslední jamka číslo 12, obsahující pouze DMSO, byla využita jako kontrola. Poté bylo do každé jamky pipetou přidáno 10 μ l připravené bakteriální suspenze z označených sterilních zkumavek. Každý řádek mikrotitrační destičky byl pro jeden kmen. Přikrytá mikrotitrační destička se pak nechala kultivovat 24 h v termostatu při teplotě 35 °C. Pro lepší představu je schéma mikrotitrační destičky s koncentracemi antimikrobní látky v jednotlivých jamkách zobrazeno v tabulce č. 1.

Tabulka č. 1: Ukázka mikrotitrační destičky

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
STAU	500	250	125	62,5	31,25	15,63	7,81	3,91	1,95	0,98	0,49	K
MRSA	500	250	125	62,5	31,25	15,63	7,81	3,91	1,95	0,98	0,49	K
STEP	500	250	125	62,5	31,25	15,63	7,81	3,91	1,95	0,98	0,49	K
ESCO	500	250	125	62,5	31,25	15,63	7,81	3,91	1,95	0,98	0,49	K
YER	500	250	125	62,5	31,25	15,63	7,81	3,91	1,95	0,98	0,49	K
KLPN ES-	500	250	125	62,5	31,25	15,63	7,81	3,91	1,95	0,98	0,49	K
KLPN ES+	500	250	125	62,5	31,25	15,63	7,81	3,91	1,95	0,98	0,49	K
PSAE MR	500	250	125	62,5	31,25	15,63	7,81	3,91	1,95	0,98	0,49	K

Vysvětlivky: Číselné hodnoty vyjadřují koncentraci antimikrobní látky v $\mu\text{mol/l}$ v jamce mikrotitrační destičky. Jamky označené písmenem K (dvanáctý sloupec) označují kontrolní jamky obsahující kultivační médium s obsahem 1% dimethylsulfoxidu (DMSO). V každém řádku mikrotitrační destičky je testován jeden z následujících bakteriálních kmenů: *Staphylococcus aureus* (STAU), methicilin-rezistentní *Staphylococcus aureus* (MRSA), *Staphylococcus epidermidis* (STEP), *Escherichia coli* (ESCO), *Yersinia bercovieri* (YER), *Klebsiella pneumoniae* neprodukující širokospektré β -laktamázy (KLPN ES-), *Klebsiella pneumoniae* produkující širokospektré β -laktamázy (KLPN ES+) a multirezistentní *Pseudomonas aeruginosa* (PSAE MR).

3.2.5 Odečtení MIC

Hodnota MIC byla odečtena po 24 a 48 hodinách inkubace v termostatu. MIC byla odečtena jako hodnota v jamce s nejnižší koncentrací látky, ve které již nedošlo k viditelnému růstu bakterií. Růst bakterií by se projevil zákalem či usazeninou v jamce. Odečet probíhal vizuálně. První čirá jamka, která nebyla zakalena, byla považována za hodnotu MIC. V tomto stanovení MIC, vzhledem k nedokonalosti lidského zraku v odlišení čirosti a zákalu, bylo ale operováno s hodnotou inhibiční koncentrace růstu 95 % bakterií (IC_{95}). Ve výsledku bylo pak IC_{95} bráno jako vizuálně odečtená MIC.

3.2.6 Odečtení MBC

Hodnota MBC byla odečtena z nové destičky. Po 24hodinové inkubaci původní destičky bylo do nové destičky napipetováno do každé jamky 200 μ l média a do každé jamky nové destičky bylo přeneseno 10 μ l obsahu z příslušné jamky původní destičky pro odečtení MIC. Destička byla poté inkubována 24 hodin za stejných podmínek jako pro stanovení MIC. Po inkubaci následoval odečet. První jamka bez nárůstu bakterií znamenala hodnotu MBC.

Pro kontrolu byl navíc inokulován na agar obsah té jamky, která by měla značit hodnotu MBC dle předchozího odečtu, a následující jamky obsahující dvojnásobnou koncentraci testované látky. Agar byl dalších 24 hodin inkubován v termostatu. První koncentrace bez nárůstu bakteriální kolonie odpovídala MBC, která byla touto kontrolou po 24 hodinách potvrzena.

3.3 Výsledky

Celkem bylo testováno 11 látek pomocí mikrodiluční bujónové metody pro stanovení hodnot MBC. Z těchto 11 látek byly testovány 3 standardní benzalkoniové dezinfekční látky pro porovnání účinnosti. Ostatní látky byly syntetizovány v Centru biomedicínského výzkumu Fakultní nemocnice v Hradci Králové v laboratoři Dr. Marka.

3.3.1 Výsledné tabulky jednotlivých skupin látek

U látek byly odečítány hodnoty MIC po 24 a 48 hodinách inkubace a byla odečtena hodnota MBC. Hodnoty MIC a MBC byly určovány u každé látky pro inhibici různých bakteriálních kmenů. U následujících skupin látek byly zjištěny tyto hodnoty zaokrouhlené na dvě desetinná místa:

QAS odvozené od methylmorfolinu (**1A–C**)

Testované soli *N*-alkyl-*N*-methylmorfolinium bromidu pod označením 1A až 1C mají v tabulce č. 2 uvedeny své vybrané charakteristiky pro identifikaci a hledání vztahů mezi strukturou a účinkem. V tabulce č. 3 jsou zaznamenány vlastní naměřené hodnoty MIC a MBC testovaných látek.

Tabulka č. 2: Charakterizace látek **1A–C**

Kód	Sumární vzorec	<i>N</i> -alkyl	Molární hmotnost g/mol	CLogP
1A	C ₁₇ H ₃₆ BrNO	dodecyl	349,20	3,22
1B	C ₁₉ H ₄₀ BrNO	tetradecyl	377,23	4,28
1C	C ₂₁ H ₄₄ BrNO	hexadecyl	405,26	5,34

Vysvětlivky: CLogP označuje vypočtenou hodnotu logaritmu rozdělovacího koeficientu dané látky.

Tabulka č. 3: Hodnoty MIC a MBC pro testované látky **1A**, **1B**, **1C** u jednotlivých bakteriálních kmenů

Kmen	Kód	MIC (IC ₉₅ μmol*l ⁻¹)		MBC (μmol*l ⁻¹)
		24h	48h	
<i>Staphylococcus aureus</i>	1A	3,91	3,91	15,63
	1B	1,95	1,95	3,91
	1C	0,98	0,98	1,95
methicilin-rezistentní <i>Staphylococcus aureus</i>	1A	15,63	15,63	62,5
	1B	3,91	3,91	15,63
	1C	3,91	3,91	7,81
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	1A	31,25	62,5	500
	1B	1,95	3,91	31,25
	1C	0,98	0,98	3,91
<i>Escherichia coli</i>	1A	1,95	1,95	1,95
	1B	1,95	1,95	1,95
	1C	15,63	15,63	31,25
<i>Yersinia bercovieri</i>	1A	1,95	31,25	62,5
	1B	15,63	31,25	31,25
	1C	3,91	3,91	3,91
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ESBL negativní	1A	>500	>500	>500
	1B	125	125	125
	1C	31,25	31,25	125
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ESBL pozitivní	1A	250	250	250
	1B	15,63	15,63	15,63
	1C	31,25	125	125
multirezistentní <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1A	>500	>500	>500
	1B	>500	>500	>500
	1C	>500	>500	>500

Vysvětlivky: Tabulka uvádí vizuálně odečtené hodnoty minimální inhibiční koncentrace MIC vyjádřené hodnotou inhibice růstu 95% bakterií IC₉₅ a minimální baktericidní koncentrace MBC v μmol/l u využitých laboratorních kmenů. Znaménko > značí, že v daném rozsahu koncentrací nemá látka na bakterie inhibiční účinek. *Klebsiella pneumoniae* produkující širokospektré β-laktamázy (ESBL pozitivní), *Klebsiella pneumoniae* neprodukující širokospektré β-laktamázy (ESBL negativní).

QAS odvozené od substituovaného benzylimidazolu (**2A–C**)

Testované soli 1-alkyl-3-benzyl-4-(2-hydroxyethyl)imidazolium bromidu pod označením 2A až 2C mají v tabulce č. 4 uvedeny své vybrané charakteristiky pro identifikaci a hledání vztahů mezi strukturou a účinkem. V tabulce č. 5 jsou zaznamenány vlastní naměřené hodnoty MIC a MBC testovaných látek.

Tabulka č. 4: Charakterizace látek **2A–C**

Kód	Sumární vzorec	<i>N</i> -alkyl	Molární hmotnost g/mol	CLogP
2A	C ₂₃ H ₃₇ BrN ₂ O	dodecyl	436,21	2,44
2B	C ₂₅ H ₄₁ BrN ₂ O	tetradecyl	464,24	3,50
2C	C ₂₇ H ₄₅ BrN ₂ O	hexadecyl	492,27	4,56

Vysvětlivky: CLogP označuje vypočtenou hodnotu logaritmu rozdělovacího koeficientu dané látky.

Tabulka č. 5: Hodnoty MIC a MBC pro testované látky **2A**, **2B**, **2C** u jednotlivých bakteriálních kmenů

Kmen	Kód	MIC (IC ₉₅ μmol*l ⁻¹)		MBC (μmol*l ⁻¹)
		24h	48h	
<i>Staphylococcus aureus</i>	2A	3,91	3,91	15,63
	2B	7,81	7,81	31,25
	2C	3,91	3,91	3,91
methicilin-rezistentní <i>Staphylococcus aureus</i>	2A	7,81	7,81	7,81
	2B	7,81	7,81	62,5
	2C	3,91	3,91	3,91
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	2A	3,91	7,81	15,63
	2B	1,95	7,81	7,81
	2C	0,98	3,91	3,91
<i>Escherichia coli</i>	2A	31,25	31,25	31,25
	2B	125	125	125
	2C	125	125	125
<i>Yersinia bercovieri</i>	2A	31,25	31,25	31,25
	2B	31,25	31,25	31,25
	2C	1,95	7,81	15,63
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ESBL negativní	2A	62,5	125	125
	2B	125	125	125
	2C	>500	>500	>500
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ESBL pozitivní	2A	125	500	500
	2B	250	250	250
	2C	125	125	125
multirezistentní <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2A	>500	>500	>500
	2B	>500	>500	>500
	2C	>500	>500	>500

Vysvětlivky: Tabulka uvádí vizuálně odečtené hodnoty minimální inhibiční koncentrace MIC vyjádřené hodnotou inhibice růstu 95% bakterií IC₉₅ a minimální baktericidní koncentrace MBC v μmol/l u využitých laboratorních kmenů. Znaménko > značí, že v daném rozsahu koncentrací nemá látka na bakterie inhibiční účinek. *Klebsiella pneumoniae* produkující širokospektré β-laktamázy (ESBL pozitivní), *Klebsiella pneumoniae* neprodukující širokospektré β-laktamázy (ESBL negativní).

QAS odvozené od 4-hydroxyiminomethylbenzylaminu (**3A–B**)

Testované soli 4-hydroxyiminomethylbenzylaminu pod označením 3A a 3B mají v tabulce č. 6 uvedeny své vybrané charakteristiky pro identifikaci a hledání vztahů mezi strukturou a účinkem. V tabulce č. 7 jsou zaznamenány vlastní naměřené hodnoty MIC a MBC testovaných látek.

Tabulka č. 6: Charakterizace látek **3A–B**

Kód	Sumární vzorec	<i>N</i> -alkyl	Molární hmotnost g/mol	CLogP
3A	C ₂₂ H ₃₉ BrN ₂ O	2x methyl, 1x dodecyl	426,26	2,80
3B	C ₂₅ H ₄₅ BrN ₂ O	1x methyl, 2x octyl	468,27	4,39

Vysvětlivky: CLogP označuje vypočtenou hodnotu logaritmu rozdělovacího koeficientu dané látky.

Tabulka č. 7: Hodnoty MIC a MBC pro testované látky **3A**, **3B** u jednotlivých bakteriálních kmenů

Kmen	Kód	MIC (IC ₉₅ μmol*I ⁻¹)		MBC (μmol*I ⁻¹)
		24h	48h	
<i>Staphylococcus aureus</i>	3A	3,91	3,91	3,91
	3B	1,95	1,95	1,95
methicilin-rezistentní	3A	7,81	15,63	15,63
<i>Staphylococcus aureus</i>	3B	7,81	15,63	15,63
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	3A	15,63	15,63	31,25
	3B	3,91	7,81	7,81
<i>Escherichia coli</i>	3A	62,5	62,5	62,5
	3B	62,5	62,5	62,5
<i>Yersinia bercovieri</i>	3A	31,25	62,5	62,5
	3B	15,63	31,25	62,5
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	3A	62,5	62,5	125
ESBL negativní	3B	62,5	62,5	62,5
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	3A	125	125	250
ESBL pozitivní	3B	125	125	250
multirezistentní	3A	500	500	500
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	3B	500	500	500

Vysvětlivky: Tabulka uvádí vizuálně odečtené hodnoty minimální inhibiční koncentrace MIC vyjádřené hodnotou inhibice růstu 95% bakterií IC₉₅ a minimální baktericidní koncentrace MBC v μmol/l u využitých laboratorních kmenů. *Klebsiella pneumoniae* produkující širokospektré β-laktamázy (ESBL pozitivní), *Klebsiella pneumoniae* neprodukující širokospektré β-laktamázy (ESBL negativní).

Referenční QAS – Benzalkonium bromidy (**BAC-Br 12–16**)

Referenční látky benzalkonium bromidy pod označením BAC-Br 12–16 mají v tabulce č. 8 uvedeny své vybrané charakteristiky pro identifikaci a hledání vztahů mezi strukturou a účinkem. V tabulce č. 9 jsou zaznamenány vlastní naměřené hodnoty MIC a MBC testovaných referenčních látek.

Tabulka č. 8: Charakterizace látek **BAC-Br 12–16**

Kód	Sumární vzorec	<i>N</i> -alkyl	molární hmotnost g/mol	CLogP
BAC-Br 12	C ₂₁ H ₃₈ BrN	dodecyl	383,22	3,18
BAC-Br 14	C ₂₃ H ₄₂ BrN	tetradecyl	411,25	4,24
BAC-Br 16	C ₂₅ H ₄₆ BrN	hexadecyl	439,28	5,30

Vysvětlivky: CLogP označuje vypočtenou hodnotu logaritmu rozdělovacího koeficientu dané látky.

Tabulka č. 9: Hodnoty MIC a MBC pro testované látky **BAC-Br 12, 14, 16** u jednotlivých bakteriálních kmenů

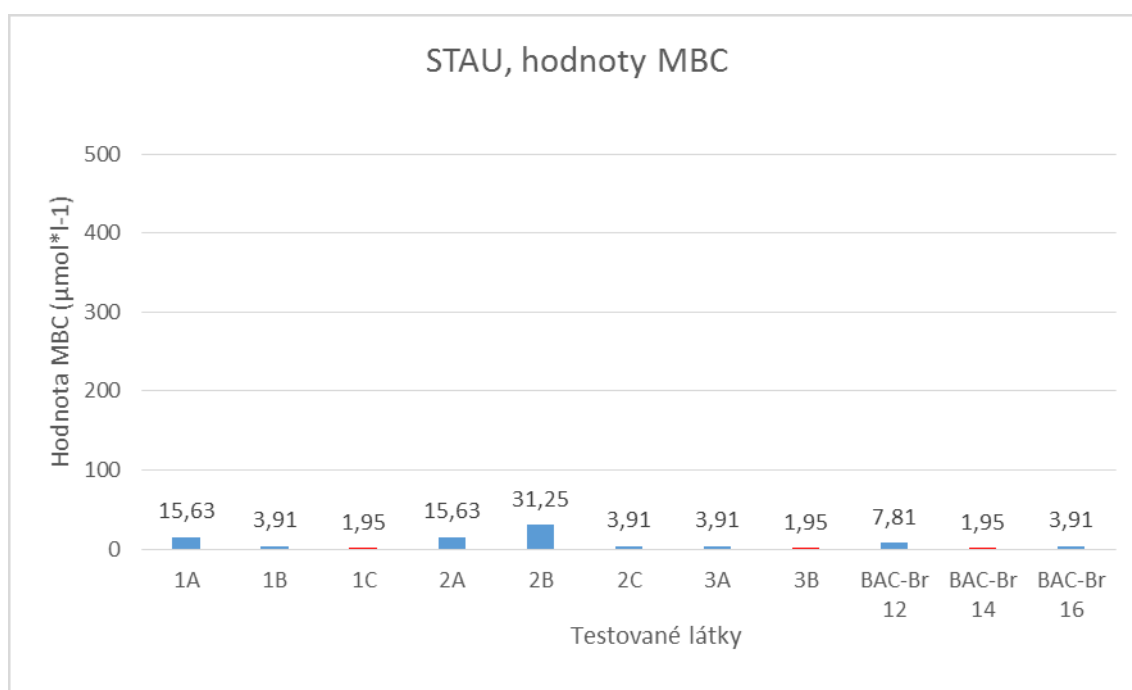
Kmen	Kód	MIC (IC ₉₅ μmol*l ⁻¹)		MBC (μmol*l ⁻¹)
		24h	48h	
<i>Staphylococcus aureus</i>	BAC-Br 12	1,95	1,95	7,81
	BAC-Br 14	0,98	0,98	1,95
	BAC-Br 16	0,49	0,49	3,91
methicilin-rezistentní <i>Staphylococcus aureus</i>	BAC-Br 12	15,63	15,63	31,25
	BAC-Br 14	3,91	3,91	3,91
	BAC-Br 16	3,91	7,81	15,63
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	BAC-Br 12	15,63	15,63	31,25
	BAC-Br 14	0,98	1,95	3,91
	BAC-Br 16	1,95	1,95	3,91
<i>Escherichia coli</i>	BAC-Br 12	15,63	15,63	15,63
	BAC-Br 14	15,63	15,63	15,63
	BAC-Br 16	62,5	62,5	62,5
<i>Yersinia bercovieri</i>	BAC-Br 12	7,81	15,63	15,63
	BAC-Br 14	7,81	7,81	31,25
	BAC-Br 16	15,63	15,63	31,25
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ESBL negativní	BAC-Br 12	7,81	7,81	7,81
	BAC-Br 14	15,63	15,63	15,63
	BAC-Br 16	62,5	62,5	62,5
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ESBL pozitivní	BAC-Br 12	15,63	15,63	15,63
	BAC-Br 14	15,63	15,63	15,63
	BAC-Br 16	62,5	62,5	62,5
multirezistentní <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	BAC-Br 12	31,25	500	500
	BAC-Br 14	125	125	250
	BAC-Br 16	125	125	125

Vysvětlivky: Tabulka uvádí vizuálně odečtené hodnoty minimální inhibiční koncentrace MIC vyjádřené hodnotou inhibice růstu 95% bakterií IC₉₅ a minimální baktericidní koncentrace MBC v μmol/l u využitých laboratorních kmenů. *Klebsiella pneumoniae* produkující širokospektré β-laktamázy (ESBL pozitivní), *Klebsiella pneumoniae* neprodukující širokospektré β-laktamázy (ESBL negativní).

3.3.2 Výsledné grafy MBC testovaných látek pro jednotlivé bakterie

V následujících grafech číslo 1–8 můžeme názorně porovnat, které látky jsou potenciálně nejúčinnější na daný testovaný patogen. Zároveň tím zjistíme, které patogeny jsou rezistentní na dané spektrum testovaných antimikrobních látek. Také zde můžeme pozorovat vztahy mezi strukturou antimikrobních látek a jejich baktericidním účinkem. Sloupce, které označují dále v textu diskutované hodnoty, jsou označeny červeně.

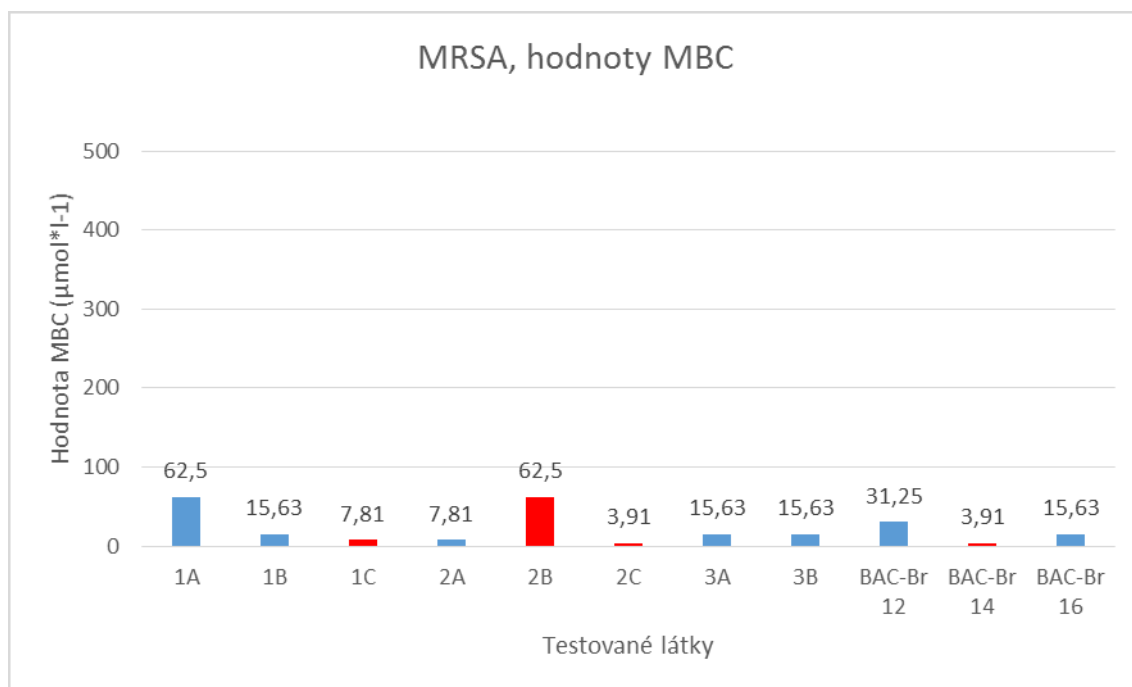
Graf č. 1 STAU, hodnoty MBC



Vysvětlivky: Graf uvádí vizuálně odečtené hodnoty minimální baktericidní koncentrace MBC v $\mu\text{mol/l}$ u testovaného kmene *Staphylococcus aureus* (STAU). Červeně vyznačené hodnoty dokládají vztah mezi strukturou a účinkem a zároveň se jedná o nejúčinnější látky na daný kmen.

Látky skupiny 2 mají slabší účinek, látky skupin 1 a 3 jsou na úrovni standardů benzalkonií. Účinnost stoupá od C₁₂–C₁₆ a také se záměnou jednoho dlouhého alkyly za dva kratší řetězce u **3B**. U standardů benzalkonia je optimum délky alkylového řetězce C₁₄.

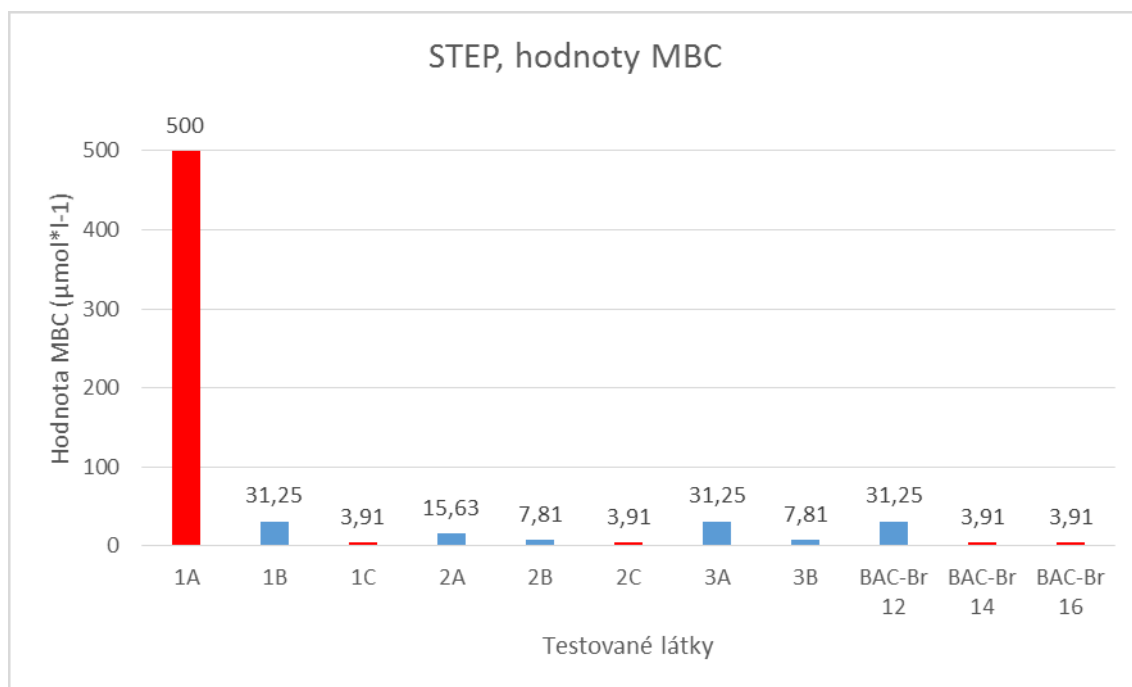
Graf č. 2: MRSA, hodnoty MBC



Vysvětlivky: Graf uvádí vizuálně odečtené hodnoty minimální baktericidní koncentrace MBC v µmol/l u testovaného kmene methicilin-rezistentní *Staphylococcus aureus* (MRSA). Červeně vyznačené hodnoty dokládají vztah mezi strukturou a účinkem a zároveň ukazují látky s nejvyšší účinností. Případně ukazují látky, které se vymykají svým účinkem.

U látek skupin 1 a 2 se zdá, že účinnost stoupá v řadě C₁₂–C₁₆ alkyly, přičemž skupina 2 je účinnější, s výjimkou **2B** se substituentem C₁₄. U látek **3A** a **3B** se zdá, že jeden dlouhý nebo dva kratší alkylové řetězce nehrají roli. Tyto látky jsou srovnatelné či slabě účinnější než benzalkoniové soli s ekvivalentním počtem uhlíků v alkylových řetězcích. U standardu benzalkoniových solí se zdá nejvýhodnější substituent C₁₄ srovnatelný s látkou **2C** se substituentem C₁₆.

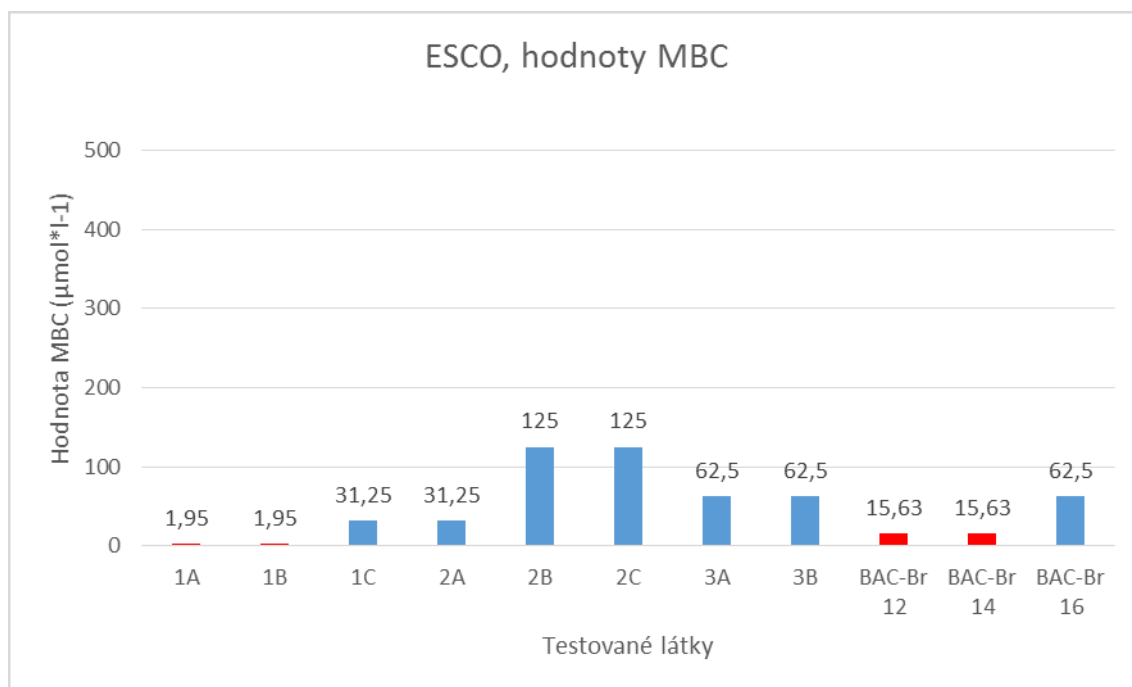
Graf č. 3: STEP, hodnoty MBC



Vysvětlivky: Graf uvádí vizuálně odečtené hodnoty minimální baktericidní koncentrace MBC v $\mu\text{mol/l}$ u testovaného kmene *Staphylococcus epidermidis* (STEP). Červeně vyznačené hodnoty dokládají vztah mezi strukturou a účinkem a zároveň ukazují látky s největší účinností. Případně tyto hodnoty ukazují na látky, které se svou účinností vymykají.

Vztah struktura a účinek zde jasně ukazuje na souvislost s délkou alkylového řetězce na kvarterním dusíku. Účinnost stoupá v řadě C_{12} – C_{16} . Látky s C_{16} alkylem jsou u všech testovaných strukturních základů srovnatelné se standardy benzalkonia. Také 2 kratší alkylové substituenty místo jednoho dlouhého u skupiny 3 zvyšují účinnost. Zajímavá je C_{12} substituovaná **1A**, jejíž účinnost je velmi nízká, oproti všem látkám testovaným na G+ bakterie. Její účinek bude spíše bakteriostatický než baktericidní.

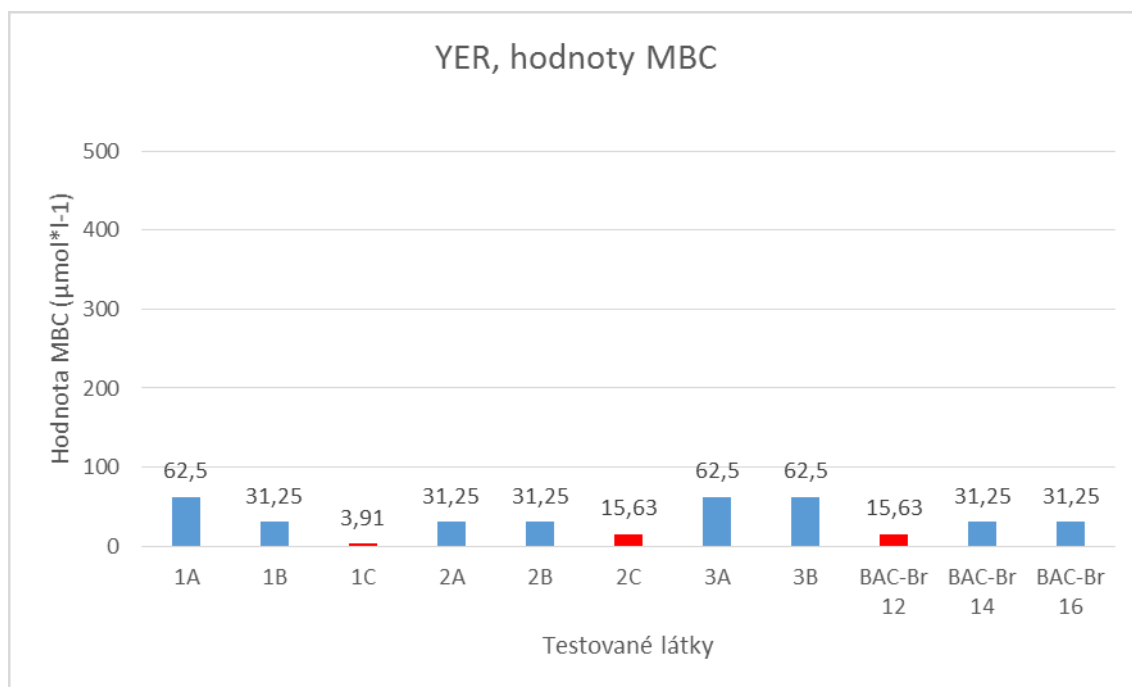
Graf č. 4: ESCO, hodnoty MBC



Vysvětlivky: Graf uvádí vizuálně odečtené hodnoty minimální baktericidní koncentrace MBC v $\mu\text{mol/l}$ u testovaného kmene *Escherichia coli* (ESCO). Červeně vyznačené hodnoty dokládají vztah mezi strukturou a účinkem a zároveň ukazují látky s nejvyšší účinností.

Zde je vztah délky alkylového řetězce k účinnosti vyjádřen tak, že účinnost roste se zkracujícím se alkylovým řetězcem. Účinnosti C_{12} a C_{14} homologů jsou stejné s výjimkou skupiny 2, kde je C_{14} na úrovni C_{16} homologu. Oproti benzalkoniovým standardům se jeví skupina 1 jako účinnější, naopak skupina 3 se ukazuje jako méně účinná.

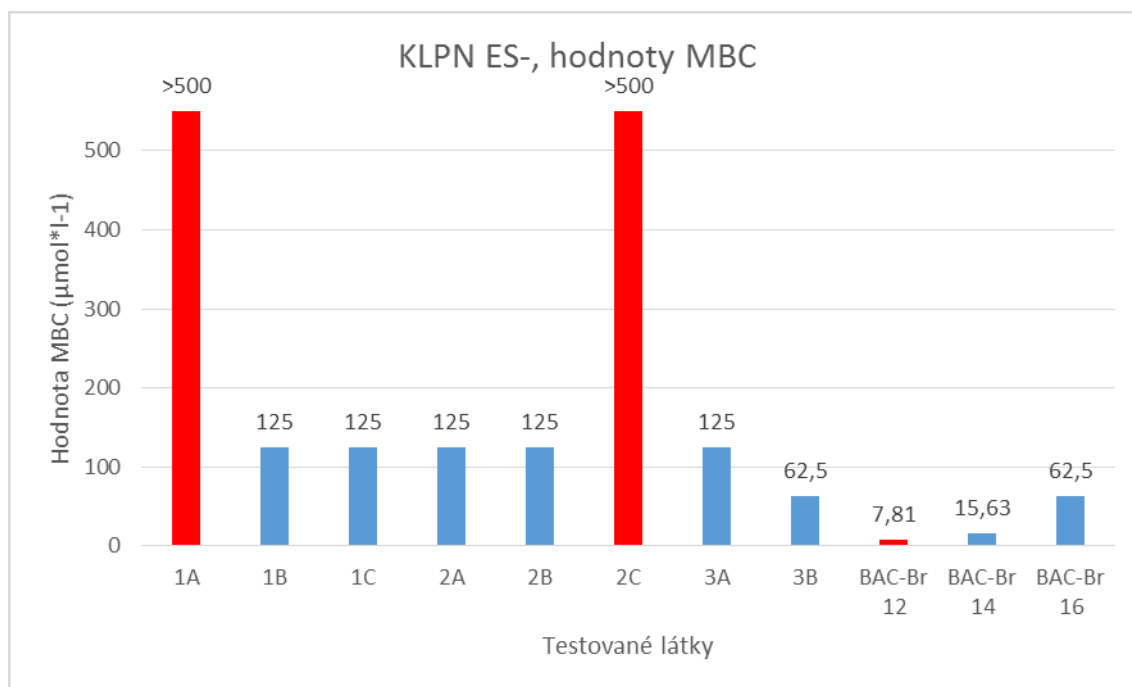
Graf č. 5: YER, hodnoty MBC



Vysvětlivky: Graf uvádí vizuálně odečtené hodnoty minimální baktericidní koncentrace MBC v $\mu\text{mol/l}$ u testovaného kmene *Yersinia bercovieri* (YER). Červeně vyznačené hodnoty dokládají vztah mezi strukturou a účinkem a zároveň ukazují látky s nejvyšší účinností na tento kmen.

Zde platí, že účinek stoupá s růstem délky alkyly u skupin 1 a 2, které vykazují obdobnou účinnost jako benzalkoniové soli. Naopak struktura skupiny 3 se ukazuje jako méně účinná. Látka **1C** se takto ukazuje jako výrazně nejúčinnější i ve srovnání s benzalkoniovými solemi. Zajímavostí je fakt, že u benzalkonií naopak účinnost s prodloužením řetězce klesá.

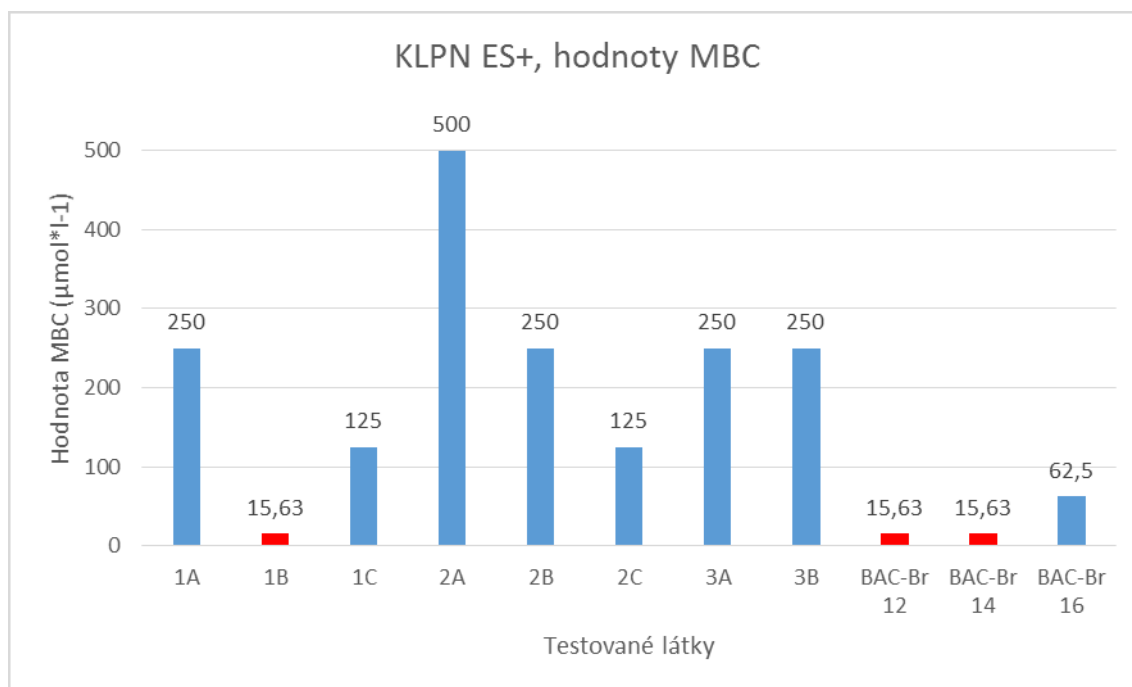
Graf č. 6: KLPN ES⁻, hodnoty MBC



Vysvětlivky: Graf uvádí vizuálně odečtené hodnoty minimální baktericidní koncentrace MBC v $\mu\text{mol/l}$ u testovaného kmene *Klebsiella pneumoniae* neprodukující širokospektré β -laktamázy (KLPN ES⁻). Znaménko > značí, že v daném rozsahu koncentrací nemá látka na patogen baktericidní účinek. Červeně vyznačené hodnoty ukazují na látky, které se svou účinností vymykají ostatním, případně ukazují nejúčinnější látku na daný kmen.

U tohoto kmene platí opět klesající účinnost benzalkoniových solí s rostoucí délkou řetězce. Benzalkoniové soli jsou také výrazně nejúčinnější. Ostatní látky vykazují obdobnou účinnost bez zjevné závislosti na substituci. Látky **1A** a **2C** nevykazují v daném spektru koncentrací baktericidní účinnost.

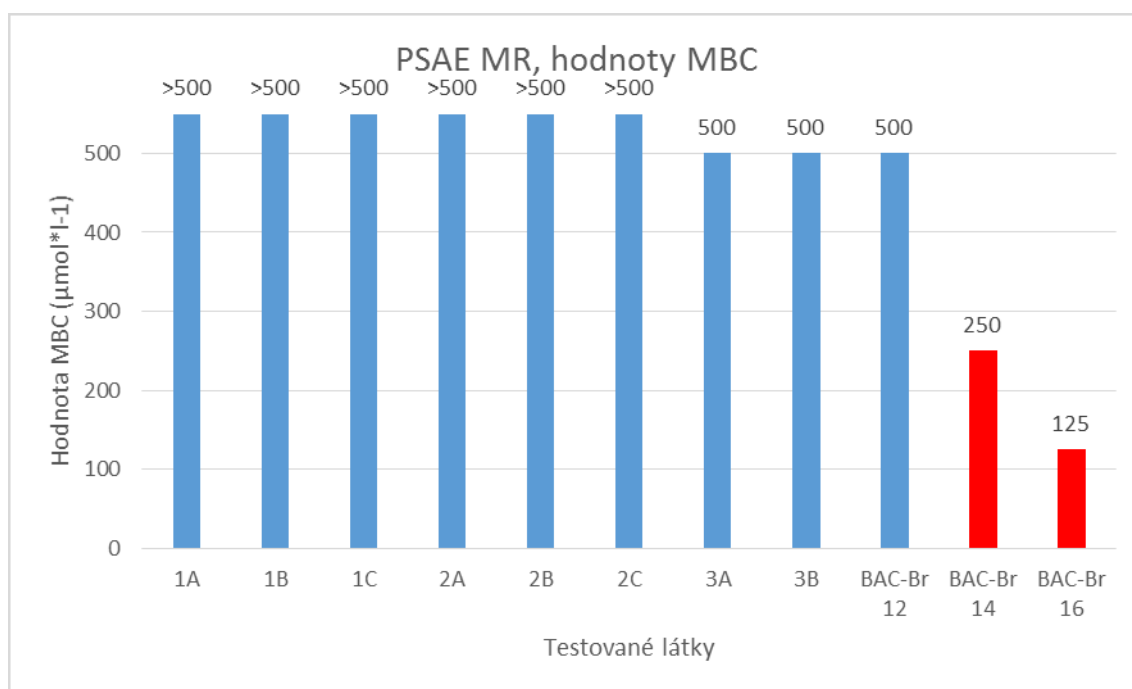
Graf č. 7: KLPN ES+, hodnoty MBC



Vysvětlivky: Graf uvádí vizuálně odečtené hodnoty minimální baktericidní koncentrace MBC v $\mu\text{mol/l}$ u testovaného kmene *Klebsiella pneumoniae* produkující širokospektré β -laktamázy (KLPN ES+). Červeně vyznačené hodnoty ukazují na neúčinnější látky na daný kmen.

Proti tomuto kmenu se jeví jako neúčinnější soli benzalkonia s kratším alkylovým řetězcem. Látky skupiny 2 sice vykazují tendenci růstu účinku opačně, tedy s prodlužováním řetězce, jejich účinnost je ale mnohem nižší, stejně jako u skupiny 3. Látky skupiny 1 vykazují také malou účinnost (kromě C₁₄ homologu), který je na úrovni **BAC-Br 12, BAC-Br 14**.

Graf č. 8: PSAE MR, hodnoty MBC



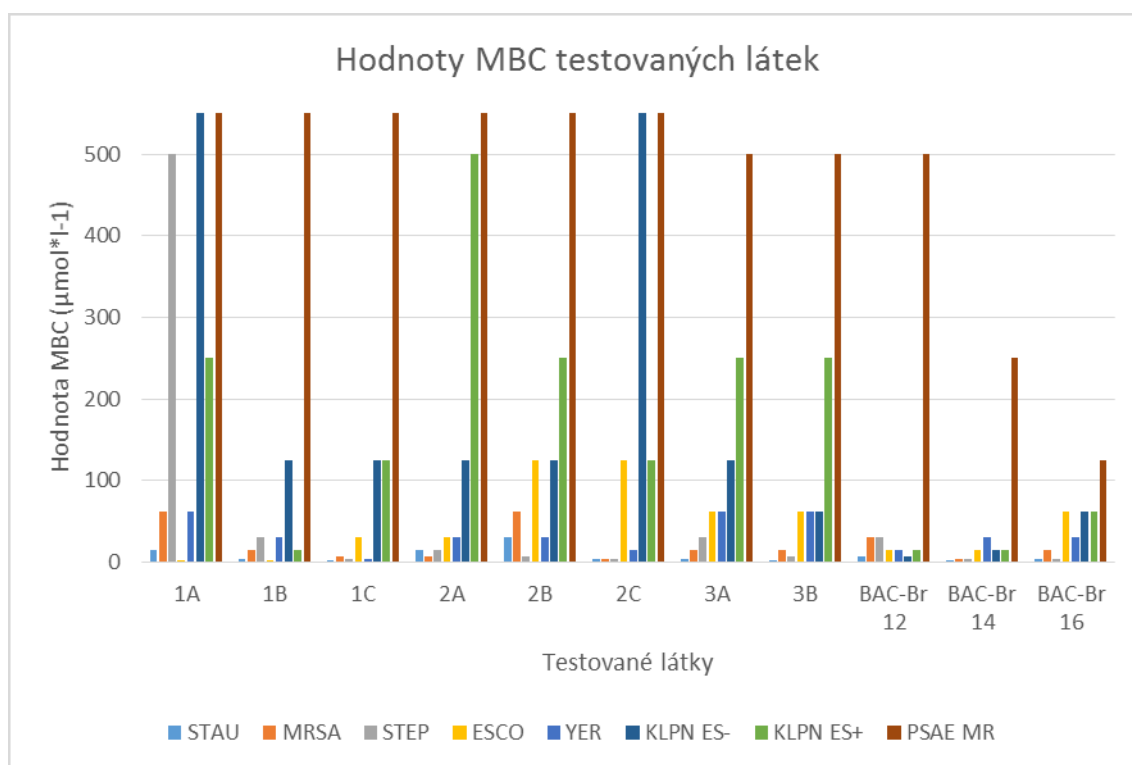
Vysvětlivky: Graf uvádí vizuálně odečtené hodnoty minimální baktericidní koncentrace MBC v $\mu\text{mol/l}$ u testovaného kmene multirezistentní *Pseudomonas aeruginosa* (PSAE MR). Znaménko > značí, že v daném rozsahu koncentrací nemá látka na patogen baktericidní účinek. Červeně vyznačené hodnoty ukazují látky s nejvyšší účinností na daný kmen a dokládají vztah mezi strukturou a účinkem.

Na tento kmen mají látky skupin 1 a 2 v daném rozsahu koncentrací pouze bakteriostatický účinek. Kratší alkyl u benzalkoniových solí a struktura skupiny 3 vedou také ke slabšímu spíše statickému účinku. U benzalkoniových solí lze pozorovat růst účinku s růstem *N*-alkylového řetězce.

3.3.3 Shrnující tabulka a grafy

V následujícím grafu č. 9 můžeme porovnat rozdíly v účinnosti jednotlivých testovaných látek proti všem využitým bakteriálním kmenům. Je zde zobrazena tedy účinnost na celé spektrum testovaných mikroorganismů u všech látek. Následující tabulka č. 10 slouží jako legenda grafu č. 9. Červeně označené hodnoty budou dále v práci diskutovány. V grafu č. 10 vidíme graficky znázorněnou závislost dosažených hodnot MBC testovaných látek o různém CLogP pro každý bakteriální kmen zvlášť. Tato závislost bude dále diskutována jako jeden z faktorů, který může být spolu se strukturou zodpovědný za dosažený účinek testovaných látek.

Graf č. 9: Hodnoty MBC testovaných látek

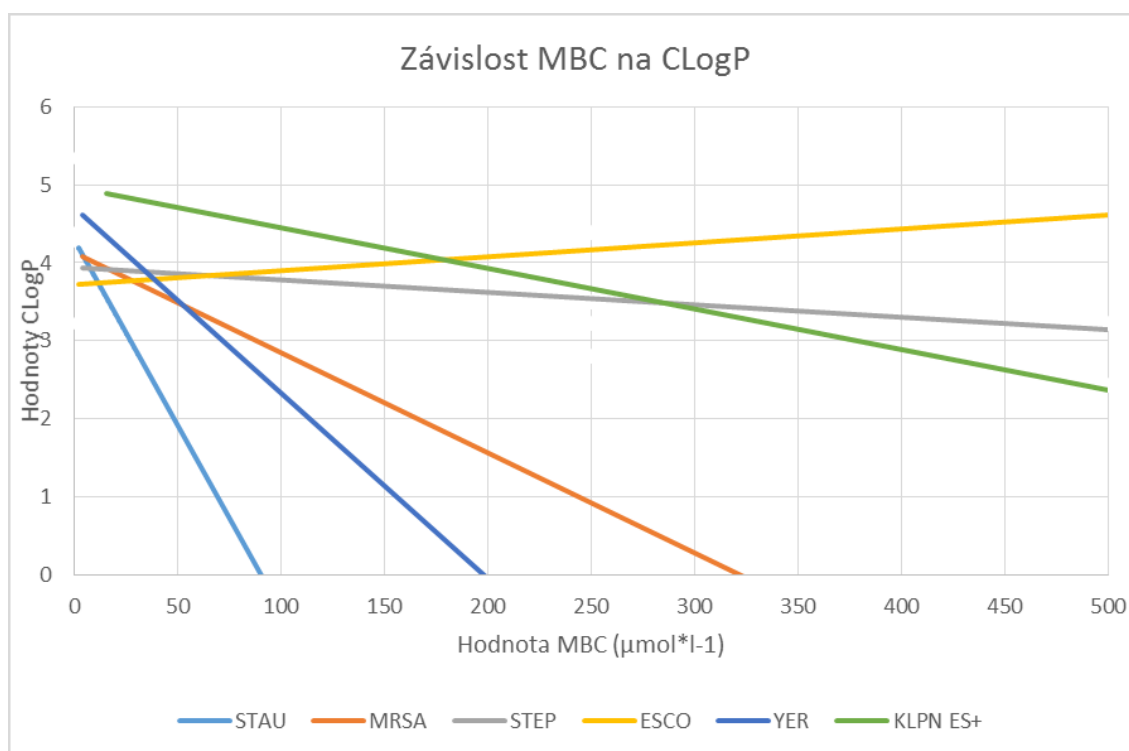


Tabulka č. 10: Hodnoty MBC všech testovaných látek

	STAU	MRSA	STEP	ESCO	YER	KLPN ES-	KLPN ES+	PSAE MR
1A	15,63	62,5	500	1,95	62,5	>500	250	>500
1B	3,91	15,63	31,25	1,95	31,25	125	15,63	>500
1C	1,95	7,81	3,91	31,25	3,91	125	125	>500
2A	15,63	7,81	15,63	31,25	31,25	125	500	>500
2B	31,25	62,5	7,81	125	31,25	125	250	>500
2C	3,91	3,91	3,91	125	15,63	>500	125	>500
3A	3,91	15,63	31,25	62,5	62,5	125	250	500
3B	1,95	15,63	7,81	62,5	62,5	62,5	250	500
BAC-Br 12	7,81	31,25	31,25	15,63	15,63	7,81	15,63	500
BAC-Br 14	1,95	3,91	3,91	15,63	31,25	15,63	15,63	250
BAC-Br 16	3,91	15,63	3,91	62,5	31,25	62,5	62,5	125

Vysvětlivky: Tabulka uvádí vizuálně odečtené hodnoty minimální baktericidní koncentrace MBC v µmol/l u všech testovaných látek 1A až BAC-Br 16 u laboratorních kmenů: *Staphylococcus aureus* (STAU), methicilin-rezistentní *Staphylococcus aureus* (MRSA), *Staphylococcus epidermidis* (STEP), *Escherichia coli* (ESCO), *Yersinia bercovieri* (YER), *Klebsiella pneumoniae* neprodukující širokospektré β-laktamázy (KLPN ES-), *Klebsiella pneumoniae* produkující širokospektré β-laktamázy (KLPN ES+) a multirezistentní *Pseudomonas aeruginosa* (PSAE MR). Znaménko > značí, že v daném rozsahu koncentrací nemá látka na bakterie inhibiční účinek. Červeně vyznačené hodnoty představují významné hodnoty komentované již výše a také následně v diskuzi.

Graf č. 10: Závislost MBC na CLogP



Vysvětlivky: Graf znázorňuje přímky proložené body, které znamenají dosažené hodnoty minimální baktericidní koncentrace (MBC) jednotlivých látek o dané vypočítané hodnotě logaritmu rozdělovacího koeficientu (CLogP), pro každý bakteriální kmen zvlášť. Jsou to: *Staphylococcus aureus* (STAU), methicilin-rezistentní *Staphylococcus aureus* (MRSA), *Staphylococcus epidermidis* (STEP), *Escherichia coli* (ESCO), *Yersinia bercovieri* (YER), *Klebsiella pneumoniae* produkující širokospektré β -laktamázy (KLPN ES+).

V grafu nejsou znázorněny kmeny KLPN ES⁻ a PSAE MR, u kterých z našich hodnot MBC (graf č. 6 a graf č. 8) nevyplývá žádná závislost mezi lipofilitou a MBC. V grafu také nejsou zahrnuty standardy **BAC-Br 12, 14, 16**. V grafu můžeme pozorovat růst MBC s klesající lipofilitou u většiny testovaných kmenů (kromě KLPN ES⁻, PSAE MR a ESCO). Přímka pro STEP může být zkreslena hodnotou MBC látky 1A, která se svou hodnotou zcela vymyká dosaženým hodnotám MBC u G⁺ bakterií, viz tabulka č. 10.

4 Diskuze

Má diplomová práce si klade za cíl otestovat nové potenciální antimikrobní látky na bázi QAS. Pomocí bujónové mikrodiluční metody byly stanoveny hodnoty MIC a MBC ke zhodnocení citlivosti vybraných kmenů nozokomiálních rezistentních bakterií k testovaným látkám. Tato jednoduchá a časově nenáročná metoda se díky tomu využívá jako primární hodnocení potenciálních účinných antimikrobních látek a jako základní screeningová metoda. Pro toto screeningové zhodnocení dostačuje vizuální odečet výsledných hodnot inhibice růstu bakteriálních kultur v jamkách mikrotitrační destičky vyjádřených hodnotami MIC a MBC potvrzených nárůstem na agar. Přesnější výsledné hodnoty koncentrací by poskytlo spektrofotometrické stanovení, které by ale metodu učinilo dražší a zdouhavější a zbavilo by ji to další výhody v podobě absence náročného přístrojového vybavení. Další výhodou této metody je možnost otestovat citlivost více bakteriálních kmenů najednou (v tomto případě osmi) k jedné testované látce v širším rozsahu koncentrací. Podle toho, jak na dané bakteriální kmeny účinkovaly jednotlivé látky, můžeme kmeny vyhodnotit jako citlivé k antimikrobní látce, nebo při její neúčinnosti jako rezistentní. Metoda má sice nevýhodu, že neposkytuje vysvětlení mechanismu působení antimikrobních látek. To ale v tomto screeningovém testování nevádí. Celkem bylo testováno 8 nových antimikrobních látek na bázi QAS rozdělených do tří strukturních skupin. Zároveň byly testovány i standardy v podobě benzalkoniových solí.

Ve výsledcích v hodnotách MIC 24 a MIC 48 si lze všimnout, že některé bakteriální kmeny, zejména STEP a YER, vykazují pozvolný nárůst v médiu a tím rozdílné hodnoty MIC po 24 a 48 hodinách. Na rozdíl od ostatních kmenů, které rostou rychleji jejich a hodnoty MIC po 24 a 48 hodinách se téměř neliší.

4.1 Závislost struktury a účinku u jednotlivých testovaných kmenů

Při stanovování účinnosti jednotlivých látek k jednotlivým testovaným bakteriálním kmenům docházíme k závěrům, že na G⁺ bakterie působí testované látky obecně lépe než na G⁻ bakterie. To se na základě literatury dopředu předpokládalo, viz [40] [52] [53]. U benzalkoniových solí, standardů našeho měření, by měl být ve vztahu struktury a účinku nejučinnější C₁₄ homolog u G⁺ a C₁₆ u G⁻ kmenů bakterií [51]. Tento předpoklad se potvrzuje u G⁺ bakterií s výjimkou STEP, kde má i C₁₆ homolog stejnou

účinnost. U G- bakterií nicméně předpoklad platí pouze pro PSAE MR. Ostatní G- bakterie vykazují vyšší citlivost ke kratším homologům zejména k **BAC-Br 12**.

Vztah struktury a účinku u jednotlivých bakteriálních kmenů pro testované látky byl blíže komentován pod jednotlivými grafy č. 1–9. Z těchto grafů vyplývá, že u G+ stoupá účinnost s rostoucí délkou alkylového řetězce či s jeho rozvětvením (**3B**) u STAU a MRSA. U STAU jsou látky skupiny 2 relativně méně účinné. Látky **1C** a **3B** jsou u STAU neúčinnější. Dosahují hodnot MBC jako standardy, stejně jako látka **2C** u MRSA a **1C** a **2C** u STEP. Svým slabším účinkem se pak vymykají látky **2B** u MRSA a **1A** u STEP, která jako jediná působí na G+ bakterie spíše bakteriostaticky než cidně.

Pro látky skupin 1–3 z grafů č. 1–9 vyplývá, že dosahují nižší účinnosti u G- než u G+ bakterií. U ESCO klesá účinnost těchto látek s délkou alkylového řetězce. U YER je tomu u zmiňovaných látek naopak. U KLPN ES- a PSAE MR účinek neovlivňuje ani délka alkylového řetězce, ani strukturní základ. Látky **1A** a **2C** nejsou účinné u KLPN ES- stejně jako všechny látky skupin 1–3 u PSAE MR. U KLPN ES+ účinek látek skupiny 2 stoupá s delším alkylem, ale i tak nedosahuje účinnosti standardů. Látky skupiny 3 jsou u G- bakterií obecně málo účinné. Pouze látka **1B** u KLPN ES+ je výrazně účinnější než ostatní. U YER se podobně vymyká látka **1C**. Látky skupiny 1 dosahují u ESCO výrazně vyšší účinnosti než skupiny 2 a 3.

4.1.1 Závislost účinnosti a lipofility

Z výsledků vyplývá, že lipofilnější látky s vyšší hodnotou CLogP vykazují vyšší účinnost než látky relativně hydrofilnější. Látky skupiny 1 jsou relativně lipofilnější než ostatní testované látky, které mají stejný počet uhlíků v *N*-substituovaném dlouhém alkylovém řetězci. Nicméně účinek testovaných skupin látek často souvisí spíše s délkou dlouhého alkylového řetězce na kvarterním dusíku než se strukturním základem. Nejvyšší účinnost by měly vykazovat struktury se substituenty C₁₄ a C₁₆ [51], které jsou samozřejmě lipofilnější než homology s kratším alkylem. Ukazuje se, že skupina 1 s alkyly C₁₄ a C₁₆ vykazuje vyšší účinnost než látky skupiny 2 s obdobnými alkyly C₁₄ a C₁₆. Nicméně to neznamená, že by látky skupiny 1 s kratším řetězcem byly výrazně účinnější než látky skupiny 2 s delším řetězcem. Nejvíce hydrofilní látky **2A** a **3B** sice nepatří mezi neúčinnější látky, ale ani nedosahují nejnižších hodnot účinnosti na jediný testovaný bakteriální kmen. Z výsledků dále vyplývá, že u PSAE MR ani KLPN ES- není žádná souvislost mezi lipofilitou a antimikrobním účinkem. U PSAE MR působí všechny

testované látky vyjma standardů pouze bakteriostaticky. U KLPN ES⁻ se hodnoty MBC testovaných látek liší maximálně o jedno ředění s výjimkou dvou látek. Lipofilita těchto dvou látek si ale není v kontextu ostatních látek ani blízka, ani nepatří mezi extrémní hodnoty lipofility zkoumaných látek.

Z grafu č. 10 vyplývá, že u všech testovaných kmenů (vyjma ESCO) s klesající lipofilitou klesá účinnost (stoupá MBC). Toto zjištění je v souladu s tím, že lipofilnější homology testovaných látek se 14 a 16 uhlíky v alkylovém substituentu jsou u většiny testovaných látek výhodnější, neboť dosahují nižších hodnot MBC. U G⁺ bakterií (STAU, MRSA) se tato závislost jeví jako silnější, což odpovídá literatuře, viz [54]. U STEP se tato závislost jeví jako velmi nízká, nicméně graf může být zkrácen hodnotou MBC látky **1A** (500 μmol/l), která nekoresponduje s hodnotami, kterých dosáhly ostatní látky u G⁺ bakterií.

Zatímco u KLPN ES⁻ z našich výsledků nevyplývá závislost antimikrobního účinku na lipofilitě, tak KLPN ES⁺ vykazuje trend mírného snížení účinnosti s poklesem lipofility. Tato zjištění jsou v souladu s odbornou literaturou, viz [54] a [55], že u různých QAS roste jejich antimikrobní účinnost s jejich lipofilitou. Tento růst účinku s lipofilitou má ale své meze, jelikož příliš lipofilní látky by již nedokázaly interagovat s amfifilní biologickou membránou. Proto se maximum předpokládá mezi C₁₂–C₁₆ alkylem, kdy mají látky nejvýhodnější i další vlastnosti jako adsorbci nebo kritickou micelární koncentraci [44].

4.1.2 Účinnost v porovnání s použitými standardy

U G⁺ bakterií je u benzalkonium bromidů, využitých jako standardy, optimální délka alkylového substituentu na kvarterním dusíku 14 atomů uhlíku pro nejvyšší účinek. To souhlasí s literaturou [51]. Žádná z testovaných látek nedosahuje lepších hodnot než tento standard **BAC-Br 14**. Nicméně látky **1C** a **2C** dosahují jinak nejlepších hodnot a zároveň srovnatelných výsledků mezi sebou. V porovnání se standardem mají tyto látky hodnoty MBC buď stejné, nebo o jedno až dvě ředění vyšší. Jedná se o látky obsahující jako základ struktury alkylmorfolinium (**1C**) a benzylimidazolium (**2C**). Obě látky se ale shodují v délce alkylového řetězce 16 uhlíků. Z toho vyplývá i největší lipofilita z testovaných látek. Zároveň má látka **1C** z testovaných látek i nejpodobnější molekulovou hmotnost s optimem **BAC-Br 14**.

Zároveň lze konstatovat, že určujícím faktorem pro lepší efekt látek je spíše alkylový substituent než strukturní základ molekuly nesoucí kvarterní aminoskupinu. U látek **3A** a **3B** se také potvrzuje, že bohatší alkylová substituce je účinnější než kratší, méně objemný alkyl. V tomto případě se jedná o dva octylové řetězce na kvarterním dusíku. Látky **3A** a **3B** nedosahují lepších výsledků než srovnávané standardy. Nicméně i zde platí, že molekula **3B** s větším počtem uhlíků, objemnější substitucí na kvarterním dusíku a vyšší lipofilitou dosahuje lepších výsledků. U kmene STAU dosahuje **3B** dokonce stejných výsledků jako standard **BAC-Br 14**.

U G⁻ bakterií je optimem u standardů C₁₂ alkylový řetězec s výjimkou PSAE MR, kde účinnost roste s délkou alkylového řetězce k C₁₆ substituentu a homolog C₁₂ je neúčinný. Homolog C₁₆ by měl být optimem pro G⁻ bakterie. Zde úspěšný homolog C₁₂ by měl vykazovat největší účinnosti proti houbovým organismům podle literatury [56]. Alespoň u PSAE MR se tento předpoklad růstu účinnosti od C₁₂ k C₁₆ potvrzuje. Navíc lze z této práce zobecnit, že G⁻ bakterie jsou méně citlivé k benzalkoniovým solím než G⁺ bakterie, což potvrzuje literatura, viz [56]. Důvod lze hledat ve vnější membráně G⁻ bakterií, která brání účinku QAS na cytoplazmatickou membránu těchto bakterií [41]. U G⁻ bakterií je na tenčí peptidoglykanové buněčné stěně ještě vnější membrána obsahující biologicky aktivní lipopolysacharid, která chrání buněčnou stěnu. Tato vnější membrána je hlavní permeabilní bariérou G⁻ bakterií. Mezi ní a buněčnou stěnou je periplazmový prostor obsahující mimo jiné různé degradační enzymy jako β-laktamázy [57].

Z grafů č. 1–9 vyplývá, že strukturní základ molekuly u zkoumaných látek ovlivňuje účinek méně než délka alkylového substituentu. Pouze u KLPN ES⁺ lze pozorovat, že methylmorfoliniové soli (**1A–C**) jsou výrazně účinnější než strukturní základ skupiny 2. Zároveň zde lze pozorovat růst účinku s délkou alkylového substituentu s optimem C₁₄ (skupina 1) a C₁₆ (skupina 2). Stejný růst antimikrobního účinku s maximem v C₁₆ lze u obou skupin látek pozorovat i u YER. Zejména látka **1C** vykazuje selektivně u YER výrazně vyšší antimikrobní účinnost než běžně užívané benzalkoniové soli. U KLPN ES⁻ lze pouze pozorovat neúčinnost některých látek vedoucí k závěru, že skupina 1 bude mít optimum spíše u vyšších a skupina 2 u nižších alkylů. U ESCO panuje soulad u všech skupin látek, že kratší substituent vede k vyššímu účinku. U všech G⁻ bakterií mají látky skupiny 3 nižší účinek než standardy se srovnatelným počtem uhlíků.

Obecně lze konstatovat, že u PSAE MR dosahují všechny testované látky vyjma standardů spíše bakteriostatického účinku. Zároveň lze tvrdit, že strukturní základ skupiny 3 vede ke slabšímu účinku než u benzalkoniových solí (vyjma STAU). U G- bakterií pouze látky **1B** u KLPN ES+ a **2C** u YER dosahují stejných hodnot účinnosti jako standardy. Látky **1A**, **1B** u ESCO a látka **1C** u YER pak dosahují výrazně lepších hodnot účinnosti než využití standardy. Je tedy možné tvrdit, že ve spektru G- bakterií by látky skupiny 1 s delším alkylovým substituentem (**1B**, **1C**) mohly být v účinnosti srovnatelné se standardy a u některých kmenů by mohly být i výhodnější. Zároveň patří i k těm neúčinnějším látkám proti G+ bakterií. Zejména látka **1C** u některých G+ kmenů dosahovala shodné účinnosti se standardy a u dalších se lišila v malém rozsahu ředění. Nicméně všechny látky postrádají účinek proti PSAE MR.

5 Závěr

- Pomocí mikrodiluční bujónové metody byla změřena antimikrobní aktivita nových látek a používaných standardů. Celkem bylo otestováno 8 nových antimikrobních látek. Látky byly rozděleny do třech strukturních skupin, jejichž antimikrobní aktivita byla porovnávána s testovanou účinností 3 standardů v podobě benzalkoniových solí.
- Hodnocené QAS vykázaly obecně vyšší antimikrobní aktivitu proti G+ bakteriím, ale žádná testovaná látka nedosahovala lepších hodnot MBC než strukturně odpovídající standardy. Nicméně látky **1C** a **2C** dosahovaly u všech G+ bakterií hodnot stejných nebo o jedno ředění horších.
- Jako neúčinnější látky se u testovaných strukturních skupin jeví lipofilnější deriváty s delším uhlíkovým řetězcem o délce 14 a 16 uhlíkových atomů (kromě *Escherichia coli*), kde byly naopak účinnější látky s 12uhlíkovým řetězcem. Látky **1A** a **1B** zde vykazovaly výrazně lepší výsledky než standardy benzalkonií.
- Látka **1C** měla výrazně vyšší antimikrobní aktivitu proti kmenu *Yersinia bercovieri* oproti měřeným standardům.
- Žádná z testovaných látek (kromě standardů) nevykazovala významnou baktericidní aktivitu proti multirezistentnímu kmeni *Pseudomonas aeruginosa* a u zbylých G- bakterií nedosahovala žádná testovaná látka lepších hodnot MBC než standardy.
- Látka **1C** se tedy jeví jako nejnadějnější testovaná látka s vysokou účinností proti G+ bakteriím a *Yersinia bercovieri*, na kterou má selektivně nejvyšší účinnost.
- V této práci byla hodnocena antimikrobní účinnost pomocí stanovení hodnot MIC a MBC. Nicméně v praxi se velmi často používají daleko vyšší koncentrace, než jsou stanovené MIC a MBC (v našem případě nejvyšší koncentrace 500 μmol/l). Ale na druhou stranu čas působení je nutné vzhledem k praktické použitelnosti výrazně zkrátit (například Ajatin, což je roztok benzalkonium bromidů, se používá 0,1% nebo i 1%, což odpovídá koncentraci přibližně 2,4 mM, respektive 24 mM). Vyššími koncentracemi používaných roztoků se výrobci často jistí nebo rozšiřují spektrum účinnosti (např. o viry, spory apod.). Při vysokých koncentracích ale velmi často narážíme na problém, kdy se již pohybujeme na hranici cytotoxicity nebo rozpustnosti použitých látek. Je třeba proto výše zmíněné testování brát jako

základní screeningovou metodu, na kterou je při zamýšlené aplikaci (zavádění do praxe) třeba navázat dalšími testy (např. expozičními testy dle státních norem).

6 Použité zkratky

ATP	adenosintrifosfát
BAC-Br	benzalkonium bromid
CCD	zařízení s vázanými náboji
CFU	kolonii tvořící jednotka
CLogP	vypočítaná hodnota logaritmu rozdělovacího koeficientu
CLSI	Institut pro klinické a laboratorní standardy
ESCO	Escherichia coli
EDTA	ethylendiamintetraoctová kyselina
ESBL	produkující širokospektré β -laktamázy (Klebsiella pneumoniae)
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DMSO	dimethylsulfoxid
EUCAST	Evropská komise pro testování antimikrobiální citlivosti
G+	Gram pozitivní
G-	Gram negativní
IC ₉₅	inhibiční koncentrace, kdy dojde k inhibici růstu 95 % bakterií
ISO	Mezinárodní organizace pro normalizaci
KLPN ES-	Klebsiella pneumoniae ESBL negativní
KLPN ES+	Klebsiella pneumoniae ESBL pozitivní
MALDI-TOF	hmotnostní spektrometrie s laserovou desorpčí a ionizací za účasti matrice s průletovým analyzátozem
MBC	minimální baktericidní koncentrace
MHIC	minimální tepelná inhibiční koncentrace
MIC	minimální inhibiční koncentrace

MRSA	methicilin-rezistentní <i>Staphylococcus aureus</i>
QAS	kvarterní amoniové soli
PCR	polymerázová řetězová reakce
PSAE MR	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
STAU	<i>Staphylococcus aureus</i>
STEP	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
YER	<i>Yersinia bercovieri</i>

7 Seznam použitých grafů, obrázků, tabulek

7.1 Grafy

Graf č. 1 STAU, hodnoty MBC	59
Graf č. 2: MRSA, hodnoty MBC	60
Graf č. 3: STEP, hodnoty MBC	61
Graf č. 4: ESCO, hodnoty MBC	62
Graf č. 5: YER, hodnoty MBC	63
Graf č. 6: KLPN ES–, hodnoty MBC	64
Graf č. 7: KLPN ES+, hodnoty MBC	65
Graf č. 8: PSAE MR, hodnoty MBC	66
Graf č. 9: Hodnoty MBC testovaných látek	67
Graf č. 10: Závislost MBC na CLogP	68

7.2 Obrázky

Obrázek č. 1: Etest	17
Obrázek č. 2: Agarové difúzní metody	19
Obrázek č. 3: Self-loading mikrofluidní přístroj	23
Obrázek č. 4: Metoda rotace magnetických kuliček	25
Obrázek č. 5: MALDI-TOF mechanismus	27
Obrázek č. 6: Princip biomimetického polymerního senzoru	29
Obrázek č. 7: Mechanismus účinku kvarterních amoniových solí	35
Obrázek č. 8: Membrány G– bakterie	39
Obrázek č. 9: Kvarterní amoniové soli	41
Obrázek č. 10: Benzalkonium chlorid	43
Obrázek č. 11: Testované látky	46

7.3 Tabulky

Tabulka č. 1: Ukázka mikrotitrační destičky	49
Tabulka č. 2: Charakterizace látek 1A–C	51
Tabulka č. 3: Hodnoty MIC a MBC pro testované látky 1A, 1B, 1C u jednotlivých bakteriálních kmenů	52
Tabulka č. 4: Charakterizace látek 2A–C	53
Tabulka č. 5: Hodnoty MIC a MBC pro testované látky 2A, 2B, 2C u jednotlivých bakteriálních kmenů	54
Tabulka č. 6: Charakterizace látek 3A–B	55

Tabulka č. 7: Hodnoty MIC a MBC pro testované látky 3A, 3B u jednotlivých bakteriálních kmenů.....	56
Tabulka č. 8: Charakterizace látek BAC-Br 12–16	57
Tabulka č. 9: Hodnoty MIC a MBC pro testované látky BAC-Br 12, 14, 16 u jednotlivých bakteriálních kmenů.....	58
Tabulka č. 10: Hodnoty MBC všech testovaných látek.....	67

8 Použitá literatura

1. CLSI [Clinical and Laboratory Standards Institute]. *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard – Tenth Edition*. CLSI document M07-A10. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2015. Volume 35, Number 2 ©2015. ISBN 1-56238-988-2.
2. Jorgensen, J. H., Ferraro M. J., Weinstein, M., Reller, L. B. Antimicrobial Susceptibility Testing: A Review of General Principles and Contemporary Practices. *Clinical Infectious Diseases*. 2009, **49**(11), 1749–1755. ISSN 1058-4838.
3. Schumacher A., Vranken T., Malhotra A., Arts J. J. C., Habibovic P. In vitro antimicrobial susceptibility testing methods: agar dilution to 3D tissue-engineered models. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*. 2018, **37**(2), 187–208. ISSN 0934-9723.
4. Wheat, P. F. History and development of antimicrobial susceptibility testing methodology. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2001, **48**(Supplement_1), 1–4. ISSN 1460-2091
5. Maurer, F. P., Christner, M., Hentschke, M., Rohde, H. Advances in rapid identification and susceptibility testing of bacteria in the clinical microbiology laboratory: implications for patient care and antimicrobial stewardship programs. *Infectious Disease Reports*. 2017, **9**(1). ISSN 2036-7449.
6. Pulido, M. R., Garcia-Quintanilla, M., Martin-Pena, R., Cisneros, J. M., McConnell, M. J. Progress on the development of rapid methods for antimicrobial susceptibility testing. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2013, **68**(12), 2710–2717. ISSN 0305-7453.
7. van Belkum, A., Dunne, W. M. Next-Generation Antimicrobial Susceptibility Testing. *Journal of Clinical Microbiology*. 2013, **51**(7), 2018–2024. ISSN 0095-1137.
8. Fredborg, M., Andersen, K. R., Jorgensen, E., Droce, A., Olesen, T., Jensen, B. B., Rosenvinge, F. S., Sondergaard, T. E. Real-Time Optical Antimicrobial Susceptibility Testing. *Journal of Clinical Microbiology*. 2013, **51**(7), 2047–2053. ISSN 0095-1137

9. Balouiri, M., Sadiki, M., Ibsouda, S. K. Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *Journal of Pharmaceutical Analysis*. 2016, **6**(2), 71–79. ISSN 20951779.
10. Jenkins, S. G., Schuetz, A. N. Current Concepts in Laboratory Testing to Guide Antimicrobial Therapy. *Mayo Clinic Proceedings*. 2012, **87**(3), 290–308. ISSN 00256196.
11. OIE [World Organisation for Animal Health]. Laboratory methodologies for bacterial antimicrobial susceptibility testing. *In Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals (mammals, birds and bees)*. Paris: 2012. Seventh Edition, Volume 2, Chapter 3.1., s. 1311–1321 ©2012. ISBN 978-92-9044-880-8.
12. Becton, Dickinson and Company. *BD Phoenix™ automated identification and susceptibility testing system*. [online]. 2019 [cit. 2019-09-17]. Dostupné z: <https://www.bd.com/en-us/offerings/capabilities/microbiology-solutions/identification-and-susceptibility-testing/bd-phoenix-automated-identification-and-susceptibility-testing-system>
13. bioMérieux SA. *VITEK® 2*. [online]. 2019 [cit. 2019-09-17]. Dostupné z: <https://www.biomerieux-diagnostics.com/vitekr-2-0>
14. ThermoFischer scientific. *Sensititre Antimicrobial Susceptibility Testing System*. [online]. [cit. 2019-09-17]. Dostupné z: <https://www.thermofisher.com/cz/en/home/clinical/clinical-microbiology/antimicrobial-susceptibility-testing/sensititre-antimicrobial-susceptibility-testing-system.html>
15. Khan, Z. A., Siddiqui, M. F., Park, S. Current and Emerging Methods of Antibiotic Susceptibility Testing. *Diagnostics*. 2019, **9**(2). ISSN 2075-4418.
16. Hill, G. B., Schalkowsky, S. Development and Evaluation of the Spiral Gradient Endpoint Method for Susceptibility Testing of Anaerobic Gram-Negative Bacilli. *Clinical Infectious Diseases*. 1990, **12**(Supplement_2), 200–209. ISSN 1537-6591.
17. Purkayastha, S., Dahiya, P. Phytochemical screening and antimicrobial activity of some medicinal plants against multi-drug resistant bacteria from clinical isolates. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2012, **74**(5), 443–450. ISSN 0250-474X.

18. Velho-Pereira, S., Kamat, N. M. Antimicrobial Screening of Actinobacteria using a Modified Cross-Streak Method. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2011; **73**(2), 223–228. ISSN 0250-474X.
19. Matsuda, K. *PCR-Based Detection Methods for Single-Nucleotide Polymorphism or Mutation*. Advances in Clinical Chemistry. 2017, **80**, 45–72. ISBN 9780128120750.
20. Dai, J., Hamon, M., Jambovane, S. Microfluidics for Antibiotic Susceptibility and Toxicity Testing. *Bioengineering*. 2016, **3**(4). ISSN 2306-5354.
21. Chen, C. H., Lu, Y., Sin, M. L. Y., Mach, K. E., Zhang, D. D., Gau, V., Lia, J. C., Wong, P. K. Antimicrobial Susceptibility Testing Using High Surface-to-Volume Ratio Microchannels. *Analytical Chemistry*. 2010, **82**(3), 1012–1019. ISSN 0003-2700.
22. Tang, Y., Zhen, L., Liu, J., Wu, J. Rapid Antibiotic Susceptibility Testing in a Microfluidic pH Sensor. *Analytical Chemistry*. 2013, **85**(5), 2787–2794. ISSN 0003-2700.
23. Cira, N. J., Ho, J. Y., Dueck, M. E., Weibel, D. B. A self-loading microfluidic device for determining the minimum inhibitory concentration of antibiotics. *Lab Chip*. 2012, **12**(6), 1052–1059. ISSN 1473-0197.
24. Maxson, T., Taylor-Howell, C. L., Minogue, T. D., Becker, K. Semi-quantitative MALDI-TOF for antimicrobial susceptibility testing in *Staphylococcus aureus*. *PLOS ONE*. 2017, **12**(8). ISSN 1932-6203.
25. Lasserre, C., De Saint Martin, L., Cuzon, G., *et al.* Efficient Detection of Carbapenemase Activity in Enterobacteriaceae by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry in Less Than 30 Minutes. *Journal of Clinical Microbiology*. 2015, **53**(7), 2163–2171. ISSN 0095-1137.
26. Samadi, A., Zhang, C., Chen, J., Reihani, S. N. S., Chen, Z. Evaluating the toxic effect of an antimicrobial agent on single bacterial cells with optical tweezers. *Biomedical Optics Express*. 2015, **6**(1), 112–117. ISSN 2156-7085.
27. Novelli-Rousseau, A., Espagnon, I., Filiputti, D., Gal, O., Douet, A., Mallard, F., Josso, Q. Culture-free Antibiotic-susceptibility Determination From Single-bacterium Raman Spectra. *Scientific Reports*. 2018, **8**(1). ISSN 2045-2322
28. Pilát, Z., Bernatová, S., Ježek, J., Kirchhoff, J., Tannert, A., Neugebauer, U., Samek, O., Zemánek, P. Microfluidic Cultivation and Laser Tweezers Raman

- Spectroscopy of *E. coli* under Antibiotic Stress. *Sensors*. 2018, **18**(5).
ISSN 1424-8220.
29. Heller, A. A., Spence, D. M., Almeida, A. A rapid method for post-antibiotic bacterial susceptibility testing. *PLOS ONE*. 2019, **14**(1). ISSN 1932-6203.
 30. Rubab, M., Shahbaz, H. M., Olaimat, A. N., Oh, D. H. Biosensors for rapid and sensitive detection of *Staphylococcus aureus* in food. *Biosensors and Bioelectronics*. 2018, **105**, 49–57. ISSN 09565663.
 31. Silbert, L., Ben Shlush, I., Israel, E., Porgador, A., Kolusheva, S., Jelinek, R. Rapid Chromatic Detection of Bacteria by Use of a New Biomimetic Polymer Sensor. *Applied and Environmental Microbiology*. 2006, **72**(11), 7339–7344. ISSN 0099-2240.
 32. Meir, D., Silbert, L., Volinsky, R., Kolusheva, S., Weiser, I., Jelinek, R. Colorimetric / fluorescent bacterial sensing by agarose-embedded lipid / polydiacetylene films. *Journal of Applied Microbiology*. 2008, **104**(3), 787–795. ISSN 1364-5072.
 33. Lamprecht, M. R., Sabatini, D. M., Carpenter, A. E. CellProfiler™: free, versatile software for automated biological image analysis. *BioTechniques*. 2007, **42**(1), 71–75. ISSN 0736-6205.
 34. Lawless, C., Wilkinson, D. J., Young, A., Addinall, S. G., a Lydall, D. A. Colonyzer: automated quantification of micro-organism growth characteristics on solid agar. *BMC Bioinformatics*. 2010, **11**(1). ISSN 1471-2105.
 35. Shrestha, N. K., Scalera, N. M., Wilson, D. A., Procop, G. W. Rapid Differentiation of Methicillin-Resistant and Methicillin-Susceptible *Staphylococcus aureus* by Flow Cytometry after Brief Antibiotic Exposure. *Journal of Clinical Microbiology*. 2011, **49**(6), 2116–2120. ISSN 0095-1137.
 36. Roth, B. L., Poot, M., Yue, S. T., Millard, P. L. Bacterial Viability and Antibiotic Susceptibility Testing with SYTOX Green Nucleic Acid Stain. *Applied and environmental microbiology*. 1997, **63**(6), 2421–2431. ISSN 0099-2240.
 37. Leclercq, R., Cantón, R., Brown, D. F. J., *et al.* EUCAST expert rules in antimicrobial susceptibility testing. *Clinical Microbiology and Infection*. 2013, **19**(2), 141–160. ISSN 1198743X.

38. Urbášková, P., Žemličková, H., Hrabák, J. Jaké breakpointy používat pro interpretaci výsledků vyšetření citlivosti bakterií k antibiotikům?. *Zprávy epidemiologie a mikrobiologie*. 2010, **19**(9), 266–267. ISSN 1803-6422.
39. Gerba, C. P., Müller, V. Quaternary Ammonium Biocides: Efficacy in Application. *Applied and Environmental Microbiology*. 2015, **81**(2), 464–469. ISSN 0099-2240.
40. McDonnell, G., Russell, A. D. Antiseptics and disinfectants: activity, action, and resistance. [published correction appears in Clin Microbiol Rev 2001 Jan;14(1):227]. *Clinical Microbiology Reviews*. 1999; **12**(1), 147–179. ISSN 0893-8512.
41. Marek, J., Malinák, D., Doležal, R., Soukup, O., Benkova, M., Nachtigal, P., Vavra, P., Kuca, K. Novel Series of Quaternary Ammonium Surfactants Based on 2,3-Dihydro- [1,4]dioxino[2,3-b]pyridin-7-ol Ring: Synthesis, Analysis and Antimicrobial Evaluation. *Letters in Organic Chemistry*. 2017, **15**(1). ISSN 15701786.
42. Malinák, D., Doležal, R., Marek, J., *et al.* 6-Hydroxyquinolinium salts differing in the length of alkyl side-chain: Synthesis and antimicrobial activity. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 2014, **24**(22), 5238–5241. ISSN 0960894X.
43. Marek, J., Malinák, D., Doležal, R., Soukup, O., Pasdiorova, M., Doležal, M., Kuca, K. Synthesis and Disinfection Effect of the Pyridine-4-aldoxime Based Salts. *Molecules*. 2015, **20**(3), 3681-3696. ISSN 1420-3049.
44. Doležal, R., Soukup, O., Malinák, D., *et al.* Towards understanding the mechanism of action of antibacterial N-alkyl-3-hydroxypyridinium salts: Biological activities, molecular modeling and QSAR studies. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2016, **121**, 699–711. ISSN 02235234.
45. Murray, A. K., Zhang, L., Snape, J., a Gaze, W. H. Comparing the selective and co-selective effects of different antimicrobials in bacterial communities. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 2019, **53**(6), 767–773. ISSN 09248579.
46. Broadley, S. J., Jenkins, P. A., Furr, J. R., Russel, A. D. Potentiation of the effects of chlorhexidine diacetate and cetylpyridinium chloride on mycobacteria by ethambutol. *Journal of Medical Microbiology*. 1995, **43**(6), 458–460. ISSN 0022-2615.

47. Grare, M., Dibama, M. H., Lafosse, S, Ribon, A., Mourer, M., Regnouf-de-Vains, J. B., Finance, C., Duval, R. E. Cationic compounds with activity against multidrug-resistant bacteria: interest of a new compound compared with two older antiseptics, hexamidine and chlorhexidine. *Clinical Microbiology and Infection*. 2010, **16**(5), 432–438. ISSN 1198743X.
48. Soumet, C., Méheust, D., Pissavin, C., *et al.* Reduced susceptibilities to biocides and resistance to antibiotics in food-associated bacteria following exposure to quaternary ammonium compounds. *Journal of Applied Microbiology*. 2016, **121**(5), 1275–1281. ISSN 13645072.
49. Buckner, M. M C, Ciusa, M. L., Piddock, L. J. V. Strategies to combat antimicrobial resistance: anti-plasmid and plasmid curing. *FEMS Microbiology Reviews*. 2018, **42**(6), 781–804. ISSN 1574-6976.
50. Marek, J., Joskova, V., Dolezal, R., Soukup, O., Benkova, M., Fucikova, A., Malinak, D., Bostikova, V., Kuca, K. Synthesis, Antimicrobial Effect and Surface Properties of Hydroxymethylsubstituted Pyridinium Salts. *Letters in Drug Design & Discovery*. 2018, **15**(8), 828–842. ISSN 15701808.
51. Kuca, K., Marek, J., Stodulka, P., Musilek, K., Hanusova, P., Hrabanova, M., Jun, D. Preparation of Benzalkonium Salts Differing in the Length of a Side Alkyl Chain. *Molecules*. 2007, **12**(10), 2341–2347. ISSN 1420-3049.
52. Wales, A., Davies, R. Co-Selection of Resistance to Antibiotics, Biocides and Heavy Metals, and Its Relevance to Foodborne Pathogens. *Antibiotics*. 2015, **4**(4), 567-604. ISSN 2079-6382.
53. Tumah, H. N. Bacterial Biocide Resistance. *Journal of Chemotherapy*. 2018, **21**(1), 5-15. ISSN 1120-009X.
54. Siatra-Papastaikoudi, T., Papadaki-Valiraki, A., Tsantili-Kakoulidou, A., Tzouvelekis, L., Mentis, A. Synthesis, Lipophilicity Studies and Antibacterial Properties of Some Novel Quaternary Ammonium Salts. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*. 1994, **42**(2), 392-394. ISSN 0009-2363.
55. Shtyrlin, N., Sapozhnikov, S., Koshkin, S., *et al.* Synthesis and Antibacterial Activity of Novel Quaternary Ammonium Pyridoxine Derivatives. *Medicinal Chemistry*. 2015, **11**(7), 656-665. ISSN 1573-4064.
56. Daoud N. N., Dickinson N. A., Gilbert P. Determination of benzalkonium chloride by chemical ionization mass spectroscopy. *Microbios*. 1983;**37**, 73–85. ISSN 0026-2633.

57. Schindler, J. *Mikrobiologie: pro studenty zdravotnických oborů*. Praha: Grada, 2010, s. 22. ISBN 978-80-247-3170-4.