

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



DIPLOMOVÁ PRÁCE

***In vitro* screening potenciálních
antimykobakteriálně účinných sloučenin na
rychle rostoucích kmenech rodu *Mycobacterium***

Autor práce: Bc. Lenka Lyčková

Vedoucí diplomové práce: PharmDr. Ondřej Jand'ourek, Ph.D.

Poděkování

V první řadě chci poděkovat panu PharmDr. Ondřeji Jand'ourkovi, Ph.D. za odborné vedení práce, konzultace, rychlé rady a pomoc při jejím zpracování. Dále bych chtěla poděkovat panu PharmDr. Janu Zitkovi, Ph.D. a paní Ing. Janě Vackové za pomoc a pracovníkům katedry Farmaceutické chemie a farmaceutické analýzy za poskytnutí látek. Díky patří i mé rodině a přátelům.

PROHLÁŠENÍ

„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 14. 5. 2019

.....

OBSAH

1. POUŽITÉ ZKRATKY.....	6
2. ABSTRAKT.....	8
3. ABSTRACT.....	9
4. ÚVOD.....	10
5. CÍL PRÁCE.....	11
6. TEORETICKÁ ČÁST.....	12
6.1 EPIDEMIOLOGICKÁ SITUACE TUBERKULÓZY.....	12
6.1.1 Situace ve světě.....	13
6.1.2 Situace v České republice.....	14
6.2 MYKOBAKTERIE.....	17
6.2.1 <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	18
6.3 TUBERKULÓZA.....	20
6.3.1 Historie.....	21
6.3.2 Patogeneze a patologie.....	22
6.3.3 Rezistentní formy.....	23
6.3.4 Prevence – protiepidemická opatření.....	23
6.3.5 Diagnostika a léčba.....	24
6.4 ANTITUBERKULOTIKA.....	28
6.4.1 Léková citlivost a rezistence.....	28
6.4.2 Dělení podle linií.....	29
6.4.3 Nová léčiva.....	32
6.4.4 Látky ve vývoji.....	34
6.5 METODY PRŮKAZU MYKOBAKTERIÍ.....	38
7. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	40

7.1	METODY TESTOVÁNÍ.....	40
7.1.1	Kvalitativní – difúzní metoda.....	40
7.1.2	Kvantitativní – diluční metoda.....	41
7.2	TESTOVANÉ KMENY.....	42
7.2.1	<i>Mycobacterium aurum</i>	42
7.2.2	<i>Mycobacterium smegmatis</i>	43
7.3	TESTOVANÉ LÁTKY.....	44
7.3.1	Sloučeniny dodané.....	44
7.3.2	Standardy antituberkulotik.....	54
7.4	LABORATORNÍ VYBAVENÍ.....	55
7.5	POSTUP TESTOVÁNÍ.....	56
7.6	HODNOCENÍ.....	58
8.	VÝSLEDKY.....	61
9.	DISKUSE.....	64
10.	ZÁVĚR.....	67
11.	SEZNAM TABULEK.....	68
12.	SEZNAM OBRÁZKŮ.....	69
13.	POUŽITÁ LITERATURA.....	70

1. POUŽITÉ ZKRATKY

AIDS	Acquired Immune Deficiency Syndrome – Syndrom získaného selhání imunity
ATB	antibiotika/um
BCG	vakcína proti tuberkulóze Bacille Calmette-Guérin z <i>M. bovis</i>
BSL2	BioSafety Level 2 – Úroveň biologické bezpečnosti 2
CNS	centrální nervový systém
CPX	ciprofloxacin
CLSI	The Clinical & Laboratory Standards Institute – Institut klinických a laboratorních norem
DMSO	dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonukleová kyselina
EUCAST	European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing – Evropský výbor pro testování antimikrobiální citlivosti
HGT	Horizontal gene transfer – Horizontální přenos genů
HIV	Human Immunodeficiency Virus – Virus lidské imunitní nedostatečnosti
ISBT	Informační systém bakteriální tuberkulózy
INH	isoniazid
mc 2155	transformovaný kmen <i>Mycobacterium smegmatis</i> o daném morfortypu
MDR-TB	Multidrug-resistant tuberculosis – Multirezistentní tuberkulóza
MIC	minimální inhibiční koncentrace
MBC	minimální baktericidní koncentrace
PAS	paraaminosalicylová kyselina
PCR	Polymerase Chain Reaction – Polymerázová řetězová reakce

RFM	rifampicin
RNA	ribonukleová kyselina
RTG	rentgen
SAR	Structure-Activity relationships – Vztahy mezi strukturou a účinností
SDGs	Sustainable Development Goals – Cíle udržitelného rozvoje
TBC	tuberkulóza
ÚZIS	Ústav zdravotnických informací a statistiky ČR
WHO	Světová zdravotnická organizace
XDR-TB	Extensively drug-resistant tuberculosis - Extenzivně rezistentní tuberkulóza

2. ABSTRAKT

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra biologických a lékařských věd

Studijní obor: Odborný pracovník v laboratorních metodách

Kandidát: Bc. Lenka Lyčková

Školitel: PharmDr. Ondřej Jand'ourek, Ph.D.

Název diplomové práce: *In vitro* screening potenciálních antimykobakteriálně účinných sloučenin na rychle rostoucích kmenech rodu *Mycobacterium*

Cílem této práce je zjištění účinnosti nových sloučenin pro možnou budoucí léčbu onemocnění tuberkulózou. Pro zjištění minimální inhibiční koncentrace sloučenin byla použita mikrodiluční bujónová metoda s již ověřeným postupem na kmenech *Mycobacterium aurum* a *Mycobacterium smegmatis*.

V teoretické části je shrnutá epidemiologická situace posledních let s globálními trendy incidence a mortality TBC ve světě i ČR, včetně výhledových plánů na nápravu ve stanoveném časovém horizontu. Dále jsou v této práci popsány mykobakterie v hlavním zastoupení s *M. tuberculosis*. Onemocnění tuberkulóza – její historie, formy, diagnostika a léčba antituberkulotiky, které jsou rozděleny podle linií použití a látky nové, či ve vývoji.

Experimentální část obsahuje kvalitativní i kvantitativní metody testování mykobakterií a detailněji zachycuje mikrodiluční bujónovou metodu, použitou v tomto měření. Součástí jsou testované kmeny mykobakterií a jejich základní vlastnosti. V neposlední řadě tato část obsahuje informace o testovaných sloučeninách a standardech antituberkulotik. V závěru experimentální části je shrnuto vybavení a postup testování mykobakterií. Všechny získané informace měření jsou v diplomové práci zpracovány a vyhodnoceny.

Klíčová slova: Mykobakterie, Tuberkulóza, Antituberkulotika, Mikrodiluční bujónová metoda, Minimální inhibiční koncentrace

3. ABSTRACT

Charles University

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Biological and Medical Sciences

Study program: Specialist in Laboratory Methods

Candidate: Bc. Lenka Lyčková

Supervisor: PharmDr. Ondřej Jand'ourek, Ph.D.

Title of diploma thesis: *In vitro* screening of potential antimycobacterial compounds against fast growing strains of *Mycobacterium* genus

The aim of this work is to determine the efficacy of new compounds for possible treatment of tuberculosis in the future. A microdilution broth method with already proven procedure on *Mycobacterium aurum* and *Mycobacterium smegmatis* strains was used to determine the minimum inhibitory concentration of compounds.

The theoretical part summarizes the epidemiological situation of recent years with global trends in the incidence and mortality of tuberculosis in the world and in the Czech Republic, including prospective plans for remediation in the time horizon. Mycobacteria are described in the main representation with *M. tuberculosis*. Tuberculosis disease - its history, forms, diagnosis and treatment with antitubercotics, which are divided according to the use lines, new drugs and drugs in development.

The experimental part contains qualitative and quantitative methods of testing mycobacteria and captures the microdilution broth method used in this measurement in detail. It includes tested strains of bacteria and their basic properties. Last but not least, this section contains information on tested compounds and antitubercotic standards. At the end of the experimental part is the equipment and procedure of testing mycobacteria summarized. All obtained measurements are processed and evaluated in the thesis.

Key words: Mycobacteria, Tuberculosis, Antitubercotics, Microdilution broth method, Minimum inhibition concentration

4. ÚVOD

Tuberkulóza (TBC) – pojem, který zná snad každý člověk ať už ze školy, z očkování proti TBC nebo z lidového přirovnání „kašleš jako tuberák“. Jenže tím povědomí lidí o této velice vážné nemoci často končí, což vzhledem k pomalu narůstajícímu počtu nemocných není vůbec dobré.

V roce 1882 významný mikrobiolog Robert Koch oznámil objev tuberkulózní bakterie a tento den – 24. března, se zapsal jako den boje proti TBC. Objev tuberkulózních mykobakterií byl velkým průlomem, který otevřel cestu diagnostice a léčbě této nemoci. (1)

O 137 let později jsme v situaci, kdy v některých případech nezabírají ani ty nejsilnější léky, které byly doposud vyrobeny. Příčin této situace je mnoho, od nesprávného užívání léků až po genetické mutace mykobakterií, a výsledkem je vždy rezistence na léčbu. Mechanismy vzniku rezistence jsou různé a zahrnují především získání schopnosti odstranit léčivo z buňky nebo ho účinně metabolizovat. Poznání těchto mechanismů je nezbytným předpokladem k vývoji nových účinnějších léčiv a režimů, které by zamezovaly vzniku rezistence.

K zabránění vzniku rezistence slouží mimo jiné testování bakteriální citlivosti. Tato dnes již rutinní metoda odhalí vůči kterým lékům je daný kmen citlivý nebo rezistentní. Díky tomu se aplikují léky s jistým účinkem a neztrácí se čas neúčinnou léčbou, během kterého by si mohly mykobakterie vytvořit rezistenci. K léčbě TBC se využívají léky zvané antituberkulotika, jejichž počet v posledních letech začal přibývat a mnoho nových je v procesu testování.

5. CÍL PRÁCE

Cílem této diplomové práce je *in vitro* testování aktivity nových, potenciálně antimykobakteriálně účinných sloučenin. Nedílnou součástí je stanovené minimální inhibiční koncentrace (MIC) těchto potenciálních antituberkulotik za použití bujónové diluční metody na rychle rostoucích kmenech rodu *Mycobacterium* – *M. aurum* a *M. smegmatis*, z důvodu rychlého růstu a nízké patogenity.

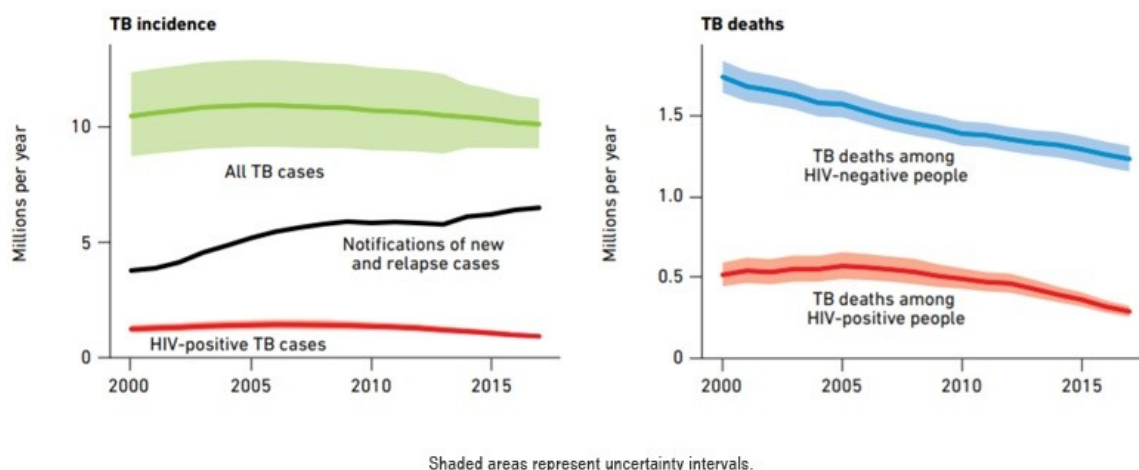
V případě účinnosti látek by tato skutečnost mohla pomoci s vývojem nových účinnějších léčiv nebo nových postupů k zamezení šíření TBC.

6. TEORETICKÁ ČÁST

6.1 EPIDEMIOLOGICKÁ SITUACE TUBERKULÓZY

Zdrojem TBC je nemocný člověk, k jejímu přenosu dochází pomocí kapének a nejčastější výskyt této nemoci je v zemích třetího světa. Největším rizikem pro vznik nemoci je infekce HIV. Onemocnět TBC může téměř kdokoli, avšak nejčastěji se vyskytuje mezi lidmi žijícími ve špatných sociálních a hygienických podmínkách, u lidí na okraji společnosti a dalšími skupinami obyvatel jako jsou migranti, uprchlíci, etnické menšiny, uživatelé drog aplikovaných nitrožilně, pracovníci v riziku, starší osoby, imunokompromitovaní pacienti. ^{1,2,3}

Obecnými rizikovými faktory vzniku onemocnění jsou podvýživa, nízká životní úroveň a kvalita hygieny, kouření, závislost na alkoholu, diabetes mellitus a snížená imunita. Tyto faktory mají významný vliv a individualizují přístup k léčbě. Avšak tento přístup často navíc zhoršují i vysoké náklady spojené s léčbou, vyhledáváním nemocných a jejich zdravotní péčí. ¹



Obrázek 1 - Globální trendy v odhadovaném počtu incidence a úmrtnosti na TBC ⁴

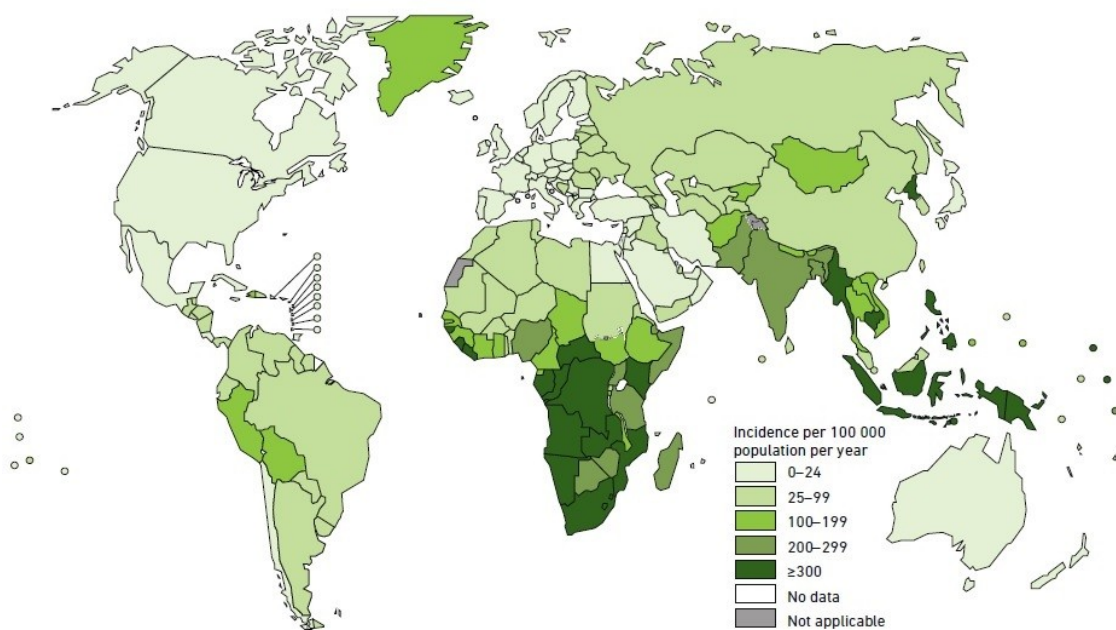
TBC bývá stále vnímána jako nemoc, která není aktuálním rizikem, ale opak je pravdou. Jak je možno vidět na obr. 1, v posledních letech dochází ke snižování počtu úmrtí, ale počet nových případů a případů relapsu opět stoupá. Jedná se především o rozšíření kmenů rezistentních k základním lékům. I přesto, že se na poli výzkumu již pár let daří, je TBC stále příčinou obrovského množství úmrtí a drží se na třetím místě nejrozšířenějších infekčních onemocnění za malárií a AIDS. Hrozbou pro celosvětovou

populaci jsou v současnosti zejména případy rezistentních a multirezistentních forem TBC, které mají stoupající charakter, a již na ně nejsou účinná léčiva první volby. ^{1,4,5,6}

6.1.1 Situace ve světě

V roce 2016, podle reportu Světové zdravotnické organizace (WHO), došlo k úmrtí 1,8 miliónů lidí zdravotně ovlivněných TBC z celkového počtu nemocných, což činilo 10,4 miliónů. ¹

WHO potvrdila, že v roce 2017 byl odhad incidence po celém světě 10 miliónů případů, ale oficiálně hlášený počet byl 6,4 miliónů – jejich rozmístění ve světě je patrné z obr. 2. Z celkového počtu hlášených nemocných bylo 1,3 miliónů úmrtí u HIV negativních osob a v průměru 0,3 milionů HIV pozitivních osob. Tento rok bylo jen v Africe zaléčeno 22 100 nových pacientů a z toho bylo 3 600 s multirezistentní formou TBC. Celosvětově denně zemře v souvislosti s TBC více než 4500 pacientů. V tabulce č. 1 je pro přehled několik států světa s vysokým výskytem TBC rozdělených podle kontinentů. ^{1,5,7}



Obrázek 2 - Odhadovaná incidence výskytu TBC v roce 2017 ⁴

Tabulka 1 - Několik států světa s vysokým výskytem TBC k lednu 2019 dle WHO ⁸

Evropa	Asie	Afrika	Amerika	Austrálie a oceánie
Litva	Mongolsko	Etiopie	Bolívie	Fidži
Moldávie	Irák	Súdán	Brazílie	Kiribati
Rumunsko	Kazachstán	Kenya	Dominikánská rep.	Marshallovy ostrovy
Rusko	Čína	Angola	Ekvádor	Papua-Nová Guinea
Ukrajina	Jemen	Namibie	Guyana	Šalamounovy ostrovy
	Pákistán	Botswana	Haiti	Mikronésie
	Thajsko	Tanzánie	Nikaragua	Nauru

6.1.2 Situace v České republice

ČR patří již dlouhou dobu mezi země s nízkým výskytem TBC a to z důvodu dobré kvality systému prevence, aktivního vyhledávání nemocných a potenciálně nemocných osob, diagnostiky a léčby. Incidence onemocnění má dlouhodobě klesající charakter, včetně onemocnění vyvolaných multirezistentními kmeny. ^{1,9}

V roce 2016 bylo v ČR do registru nahlášeno 517 nových onemocnění TBC, asi 30 % z nich byly osoby pocházející z Ukrajiny, Slovenska, Vietnamu a Rumunska. Onemocnění bylo prokázáno častěji u mužů, a nejčastější výskyt byl mezi lety 40-59. Nejvyšší počet nemocných byl zaznamenán u osob s trvalým bydlištěm v Praze. Z celkového počtu nemocných byla multirezistentní forma zjištěna u 6 osob. ¹

Pro rok 2017 bylo registrováno celkem 505 onemocnění TBC bez rozdílu typu a lokalizace, což představuje 4,8 případů na 100 000 obyvatel. Ve srovnání s předchozím rokem se počet registrovaných případů snížil o 12. Z celkového počtu nemocných bylo 33 osob, které již prodělaly léčbu TBC, dále se ve 372 případech (73,7 %) potvrdila definitivní TBC. Z údajů bylo zřejmé, že 439 případů (86,9 %) TBC souviselo s onemocněním plic. ¹⁰

TBC se opět mnohem častěji objevovala u mužů, a to dokonce ve více než 70 % případů. Dle registru jsou mnohem četnější osoby ve věku 40–59 let, a osoby starší 80-ti let. Pacientů mladšího věku ubylo, ale již po několikáté byl evidován nejvyšší počet pacientů s bydlištěm v Praze, a to 95. ¹⁰

Za rok 2017 přibylo v českém registru TBC 159 nakažených cizinců, což činilo více než 31,5 %. Nejvyšší počet nemocných cizinců přišlo z Ukrajiny dále ze Slovenska, Vietnamu, Mongolska či Rumunska. ¹⁰

350 nemocných z Registru bylo testováno na citlivost k antituberkulotikům, z nichž ve 4,6 % byl kmen rezistentní k isoniazidu (INH), ve 4,3 % byla zaznamenána rezistence vůči streptomycinu, ve 4,0 % byla zaznamenána rezistence na pyrazinamid, ve 2,3 % případů byla evidována rezistence k rifampicinu (RFM) a ve 2,0 % byl kmen rezistentní vůči etambutolu. Co se týče multirezistentní formy, tady byla rezistence detekována v 2,3 %. ¹⁰

Za rok 2017 došlo podle záznamů k 25 úmrtí ve spojitosti s TBC a nejčastěji k němu docházelo v Praze – 8 osob. Registr kromě TBC zaznamenává i vzniklé nemoci zapříčiněné jinými mykobakteriemi a v daném roce takových případů bylo 89, z nichž 71 případů zasáhlo plíce a 18 jinou lokalizaci. Nejčastějšími původci mykobakterií byli původci *Mycobacterium avium* a *M. kansasii*. ¹⁰

Povinné hlášení TBC

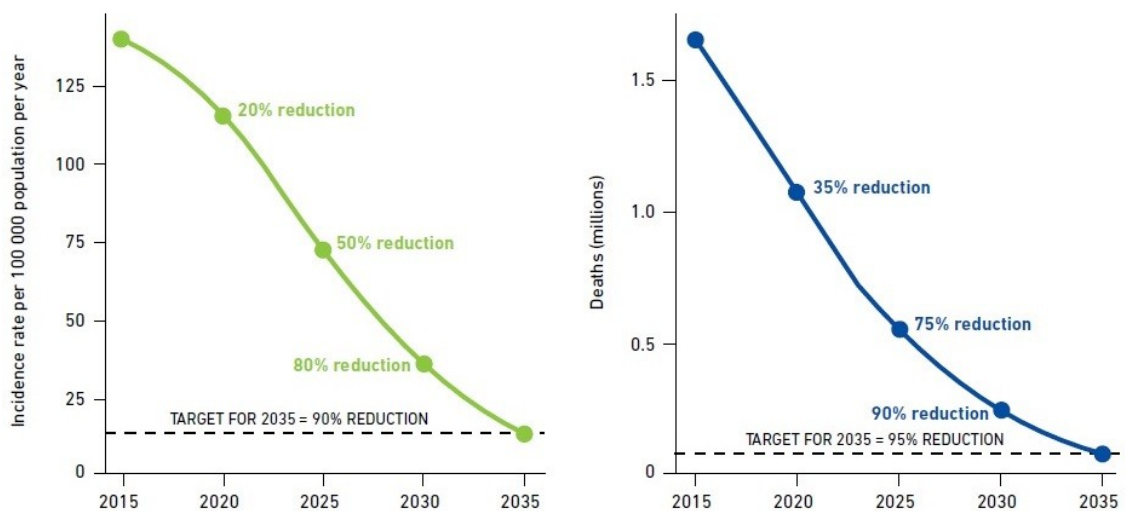
V ČR je povinné hlásit každý nově zjištěný případ onemocnění TBC nebo jiné mykobakteriální onemocnění, jejich recidivu, jimi zapříčiněné úmrtí a úmrtí z jiných příčin v souvislosti s TBC nebo mykobakteriózou. Hlásí se i podezření na ně a jejich nejčastější hlášení jsou z oddělení pneumologie a ftizeologie. Hlášení se podává na Krajskou hygienickou stanici a dále do Registru TBC Informačního systému bakteriální TBC (ISBT). Údaje se následně předávají do Ústav zdravotnických informací a statistiky ČR (ÚZIS) pro celostátní zpracování. Z těchto údajů poté Ministerstvo zdravotnictví vyvozuje závěry a navrhuje případná opatření. ^{6,9}

Výhled

Sdružení Cíle udržitelného rozvoje (SDGs) navrhlo v roce 2015 více než 50 zdravotních cílů, kterých má být dosaženo v průběhu 15 let. Jedním z těchto cílů je program „End TB“, jehož výsledky mají být patrné do roku 2030. Tyto cíle jsou navrženy tak, aby mohly být realizovány ve všech zemích světa bez ohledu na jejich úroveň, a aby ve všech mohl být průběžně sledován pokrok. V případě TBC to znamená konkrétně snížení úmrtnosti o 90 % a o 80 % snížení výskytu TBC oproti hodnotám z roku 2015. Dalším datem má být rok 2035, kdy by měly být hodnoty oproti roku 2015

sníženy ještě více, a to v úmrtnosti o 95 % a ve výskytu o 90 %. Obrázek 3 znázorňuje vytyčené cíle poklesu incidence a mortality. ^{4, 11}

Dosažení takovýchto cílů bude velmi náročné a nákladné a bude potřeba v nejbližších šesti letech technologický průlom. To by znamenalo významný pokles výskytu TBC, průměrně okolo 17 % ročně. Z toho důvodu je priorita výzkumu postavena na vývoji nového léku, či alespoň vakcíny ke snížení rizika infekce. ^{4, 11}



Obrázek 3 - Předpokládaná křivka incidence a mortality, které jsou nezbytné pro dosažení "End TB" v průběhu let 2015-2035 ⁴

6.2 MYKOBAKTERIE

Nadříše: *Prokaryotae*

Říše: *Bacteria*

Kmen: *Actinobacteria*

Třída: *Actinobacteria*

Podtřída: *Actinobacteridae*

Řád: *Actinomycetales*

Podřád: *Corynebacterineae*

Čeleď: *Mycobacteriaceae*

Rod: *Mycobacterium*

Druh: *Mycobacterium tuberculosis*, *M. smegmatis*, *M. aurum* ¹²



Obrázek 4 - Grampozitivní mykobakteriální tyčinky ¹³

Mykobakterie nazývané taky houbové bakterie, dostaly svůj název podle povlaku podobnému plísním, který tvoří při růstu na tekutých půdách. Povlak je tvořený větvenými nebo tečkovanými vlákny. Celkově je asi 50 druhů mykobakterií, které se dělí na 2 hlavní skupiny, a to na pomalu a rychle rostoucí aeroby nebo fakultativní aeroby. Mykobakterie bývají považovány za grampozitivní tyčinky, ale vzhledem k tomu, že se Gramovým barvením nebarví nebo jen velmi málo, jsou označovány jako acidorezistentní. Jejich buněčná stěna je složena z peptidoglykanu mureinu a z větší části z komplexních voskových lipidů, což zapříčiňuje hydrofobicitu a acidorezistenci buňky, která způsobuje rezistenci vůči odbarvení ředěnou anorganickou kyselinou po obarvení karbolfuchsinem. Lipidová frakce buněčné stěny mykobakterií je složena majoritně z mykolových kyselin, které ovlivňují vlastnosti mikroorganismu, jeho

povrchovou propustnost, jsou hlavním determinantem virulence bakterií a mezi prokaryotami jsou jedinečné.^{3, 10, 14, 15}

Vysoká koncentrace lipidů v buněčné stěně zejména *Mycobacterium tuberculosis* zapříčiňuje nepropustnost pro barviva, odolnost vůči mnoha antibiotikům (ATB), odolnost vůči zabíjení kyselými a alkalickými sloučeninami, rezistence vůči osmotické lýze prostřednictvím depozice komplementu, odolnost vůči letálním oxidacím a přežití uvnitř makrofágů.³

Mykobakterie vyvolávají celou řadu vážných infekčních nemocí – septicémií, např. plicní i mimoplicní TBC a lepru.

Obligátně patogenní druhy:

TBC je onemocnění vyvolané *Mycobacterium tuberculosis*, které se stalo nejčastější příčinou úmrtí bakteriálního infekčního onemocnění na světě. Onemocněním je postižena jedna třetina světové populace. Dalším původcem, který taktéž dokáže zapříčinit toto onemocnění i u zvířat, je *Mycobacterium bovis*, které je z 90 % DNA homologní k *M. tuberculosis*. *Mycobacterium leprae* vyvolává onemocnění zvané lepra (malomocenství), což je nepřilíš nakažlivé onemocnění napadající kůži, sliznice a periferní nervy a znetvořuje tělo.¹⁶

Podmíněně patogenní druhy:

Mycobacterium avium – intracellulare je komplex dvou druhů mykobakterií, které si jsou geneticky velmi podobné a není jednoduché je odlišit. Jsou to původci TBC drůbeže, u člověka se objevuje v případech snížené imunity zapříčiněné infekcí HIV. **Mykobakteriíózy** = netuberkulózní mykobakteriální infekce nejsou příliš časté, většinou doprovázejí jiná onemocnění nebo způsobují infekce ran. Oproti TBC se v jejich léčbě využívají více ATB než antituberkulotika, přestože klinicky a na RTG si jsou podobné.

¹⁷

6.2.1 *Mycobacterium tuberculosis*

Mycobacterium tuberculosis je bakterie vyvolávající granulomatózní onemocnění – TBC. Tuberkulózní mykobakterie jsou nepohyblivé tyčinky, nevytvářející spóry a bez pouzdra. Tyto štíhlé acidorezistentní tyčky jsou rovné nebo

mírně zahnuté o velikosti cca 1,5-5 μm a s optimální teplotou růstu při 37-38 °C. V biologických vzorcích se nacházejí jako izolované buňky nebo v drobných shlucích, v tekutých půdách rostou v provazcovitých koloniích. Na Löwenstein-Jensenově půdě bývají kolonie viditelné už po 2 týdnech kultivace, ale v případě pomalejšího růstu až po 8 týdnech (obr. 5). *M. tuberculosis* se od ostatních mykobakterií odlišuje biochemickými vlastnostmi např. tvorbou niacinu či redukcí nitrátů. Při běžných podmínkách prostředí jsou mykobakterie schopny přežít po dobu 1-2 hodin, v biologickém materiálu jsou schopny dlouho přežít intracelulárně jako perzistoři a v kaseózním materiálu i extracelulárně. Jako patogenní bakterie jsou v organismu fagocytovány, ale některé z těchto mikroorganismů odolávají usmrcovacím mechanismům fagocytů a mohou se v buňce dále množit. Nejvýhodnější strategie přežití *M. tuberculosis* v makrofázích je zabraňování splnutí fagozomu s lysozomy a jejich granuly, aby nedocházelo k likvidaci patogenu. Pro tyto mykobakterie je fatální sluneční svit, teploty nad 60 °C a v laboratoři využívaná sterilizace v autoklávu.^{6, 15, 18, 19}



Obrázek 5 - Mykobakterie na Löwenstein-Jensenově půdě³

Mycobacterium tuberculosis je přirozený mutant s inaktivovaným oxidačním stresovým regulačním genem oxyR. Tato charakteristika je spojena s vynikající citlivostí *M. tuberculosis* na INH problém nastává v případě, že je tato oblast transformována.²⁰

Chemická skladba

Mycobacterium tuberculosis jsou z většiny složeny z vody (60 %), anorganických látek a organických lipidů, proteinů, polysacharidů. Polysacharidy jsou rozděleny na 2 třídy, přičemž do 1. třídy spadá arabinóza, galaktóza a manóza a do 2. třídy patří glukán. Organickou skupinu lipidů zastupují mykolová kyselina, fosfolipidy, vosk D a glykolipidy v zastoupení kord faktoru a sulfolipidů. Úkolem lipidů je zajistit toxicitu pro hostitele a snižování mykobaktericidní aktivity alveolárních makrofágů. Proteinové složky jsou chemickou frakcionací rozděleny na skupiny A, B, C a D a slouží k navozování tkáňové i buněčné imunity. ⁶

Virulence

Tuberkulózní mykobakterie mohou růst intracelulárně, což je účinný způsob, jak se vyhnout imunitnímu systému, protože protilátky a komplement je nejsou schopné v buňce zlikvidovat. Jakmile je mykobakterie fagocytována, může inhibovat fagozom-lysozomovou fúzi sekrecí proteinu, který modifikuje fagozomovou membránu. Následně ve fagozomu buď zůstává nebo z něj unikne, ale v obou případech si najde chráněné prostředí pro růst v makrofágu. ³

Z přibližně 4000 genů genomu *Mycobacterium tuberculosis* je 525 genů součástí buněčných stěn a buněčných procesů, 188 genů kóduje regulační proteiny a 91 genů se podílí na virulenci, detoxikaci a adaptaci. Více než 200 genů je identifikováno jako kódující enzymy pro metabolismus mastných kyselin. Takto velký počet enzymů *M. tuberculosis* může být spojen se schopností patogenu růst ve tkáních infikovaného hostitele, kde mohou být jeho hlavním zdrojem uhlíku mastné kyseliny. ³

6.3 TUBERKULÓZA

TBC může být smrtelné onemocnění zapříčiněné bakterií *Mycobacterium tuberculosis*. Je rozšířené po celém světě, postihuje všechny věkové kategorie a zasahuje všechny orgány, nejvíce však plíce. ²

Mezi hlavní příznaky nemoci patří dlouhotrvající kašel, horečka, úbytek na váze, chrčení krve, bolest na hrudi, dušnost a následné komplikace vedoucí až k úmrtí pacienta. Zpravidla chronický ráz onemocnění bývá jen u mladých dospělých, ale může probíhat i akutně s nepříznivou prognózou. ^{2,5}

Postup onemocnění a jeho závažnost závisí na kmenu *M. tuberculosis*, předchozí expozici, očkování, infekční dávce a imunitním stavu hostitele. ³

6.3.1 Historie

Onemocnění TBC provází lidstvo od nepaměti a její epidemie se v historii mnohokrát opakovaly. Již z mladší doby kamenné a na egyptských mumiích byly nalezeny znaky kostní formy TBC. ⁶

Dříve bylo toto onemocnění označováno řeckým slovem fthisa = souchotiny a jeho vědní obor fthisologie. Slovo fthisis označuje neprospívající stav lidského organismu, jež se projevuje úbytkem tělesné hmoty, chátráním, sesycháním a chřadnutím. Takto se už v dávné minulosti nazývaly obecně nemoci s podobnými klinickými projevy. ^{6,21}

Označení „tuberkulóza“ vzniklo až roku 1834 díky profesorovi Schönleinovi, a to díky poznatkům, že se při onemocnění v orgánech těla, majoritně v plicích, tvoří ložiska a hrboly nazývané tuberkula. Etiologii vzniku tuberkulů, i samotné nemoci, objasnil 24. 3. 1882, taktéž německý mikrobiolog, Robert Koch (Kochův bacil), který prokázal infekčního původce onemocnění. Pan Koch měl snahu vytvořit i vakcínu proti TBC a připravil z buněčné stěny mykobakterií látku tuberkulín. Bohužel jako očkovací látka nenavozoval potřebnou tvorbu protilátek. Tuberkulín se však začal používat v diagnostice TBC. ^{6,21}

Co se léčby týče, byl v padesátých letech 20. století podáván nemocným streptomycin a kyselina paraaminosalicylová (PAS) a velká část nemocných byla léčena léky i kolapsoterapií tzv. kurativním pneumotoraxem. Roku 1953 byla zavedena povinná kalmetizace, díky níž ubylo těžkých forem nemoci. Cílené rentgenologické snímkování ze štítu bylo velkou pomocí v padesátých a šedesátých letech. Po roce 1960 začala být používána trojkombinace antituberkulotik v délce léčby 12 měsíců. RFM, jako dosud nejúčinnější lék na TBC, přišel na trh až v 80. letech. Časem byla zjištěna velmi dobrá účinnost čtyřkombinace antituberkulotik, díky níž se začal redukovat počet preventivních radiologických vyšetření. Pro dohled nad nemocí byl vytvořen Registr TBC. ⁶

6.3.2 Patogeneze a patologie

TBC je způsobena mykobakteriemi, které se šíří vzduchem při kašláním či kýcháním infikovaných osob vlivem masivního aerosolu infekčních částic. Onemocnění primárně postihuje plíce, ale může se rozšířit do celého těla. U velké části infikovaných mohou přežívat bakterie v těle v neaktivní formě dlouhé roky a nemoc se nemusí nikdy klinicky projevit. Po vdechnutí vzniká v plicích primární ohraničené ložisko (první kontakt hostitele s mykobakteriální infekcí), které se opouzdří, a proces ustane. K takovému spontánnímu zhojení dochází díky rozvoji buněčné imunity asi v 90 % případů a jedinou známkou prodělané infekce je přecitlivělost na tuberkulín. V případě, že časem nebyly v organismu zlikvidovány všechny mykobakterie imunitním systémem, je i po řadě let možný vznik postprimární (chronické) TBC, a to zejména pokud dojde k výraznějšímu oslabení imunitního systému např. u pacientů po transplantaci, podvyživených, HIV pozitivních či starších osob. Chronická TBC je spojená s destrukcí tkáně kolem ložiska a možným rozsevem do dalších orgánů (miliární cestou). Druhou možností vzniku sekundární TBC je opakovaná expozice s inhalací nových mykobakterií. Aktivní TBC se z celkového počtu infikovaných rozvine u cca 10 %, a tím se z nich stávají přenašeči nemoci. Aktivovaná TBC způsobí, že v plicích začne vznikat difúzní infiltrát, který se hematogenní a lymfogenní cestou může roznést do těla, u lymfatické cesty je to prasknutím uzliny, jejíž obsah se vyplaví i do krve. V některých případech dochází ke vzniku drobných četných lézí, které jsou plné mykobakterií a znamenají rychle progredující smrtelnou formu (kryptická diseminovaná TBC).^{5, 6, 14}

Mykobakterie mají tendenci se množit v místech s nejvyšší kyslíkovou tenzí, proto je daná orgánová dispozice k TBC (plicní vrcholy, růstové zóny dlouhých kostí, ledviny).^{2, 15}

TBC má dva základní morfologické projevy – tuberkulózní uzlík a tuberkulózní exsudát. Oba projevy se kombinují a mohou propadnout kaseózní nekróze.⁶

Tuberkulózní uzlík jako projev produktivní fáze je kulovité ložisko o velikosti 1-2 mm a je tvořen buňkami epiteloidními a Langhansovými, periferie je majoritně tvořena lemlem lymfocytů. Uzlík se může samovolně zresorbovat a zahojit jizvou nebo *ad integrum*, v nejhorším případě podléhá kaseózní nekróze.⁶

Tuberkulózní exsudát nejčastěji vzniká na serózních blanách či sliznici, ale může postihnout jakýkoliv orgán. Exsudát je tvořen serózním materiálem, velkým množstvím fibrinu, makrofágů a lymfocytů. Při podlehnutí kaseózní nekróze jsou postiženy i okolní struktury – dochází k šíření do celého těla. ⁶

6.3.3 Rezistentní formy

Multirezistentní TBC

Multirezistentní forma TBC (MDR-TB) je vážný celosvětový problém zapříčiněný nedodržováním zásad léčby. Tato forma neodpovídá na léčbu dvou hlavních antituberkulotik – INH a RFM, proto je potřeba pro úspěšnou léčbu použít jedno z antituberkulotik první linie společně s další linií a léky, které se určí na základě stanovení citlivosti kmene na antituberkulotika. Výsledná léčba čtyřkombinací léků již není tolik účinná, je mnohem toxičtější, dražší, trvá měsíce ale i roky, má mnoho vedlejších účinků a léčebný efekt lze očekávat pouze u 60-80 % nemocných. ^{5,6}

Extenzivně rezistentní TBC

Extenzivně rezistentní forma onemocnění (XDR-TB) vzniká z multirezistence nedodržováním dostatečně kontrolovaného léčebného režimu. Z první skupiny léčiv je rezistentní na RFM a INH, z druhé řady byla vytvořena rezistence na všechny tři injekční antituberkulotika (amikacin, kapreomycin, kanamycin) i jedno z fluorochinolonových antituberkulotik. Léčba je ještě nákladnější než u multirezistentní formy a její úspěšnost se pohybuje okolo 40 % případů. Pro zachování relativně přijatelného výsledku léčby je nezbytné udržet citlivost na kapreomycin. ⁶

6.3.4 Prevence – protiepidemická opatření

TBC je velice těžká nemoc, které však lze zabránit a vymýtit ji – hlavně prevencí v podobě vakcinace, snížením vlivu rizikových faktorů, účinnou terapií a v neposlední řadě včasnou detekcí. Velmi důležité je aktivní a cílené vyhledávání rizikových příznaků a časných stádií nemoci v celosvětové populaci. Nedostatečná informovanost a osvěta populace vede k pozdnímu příchodu k lékaři a nezačínání včasné léčby. Nejvyšší riziko je stále v zemích třetího světa z mnoha socioekonomických důvodů, které se z pohledu prevence v blízké budoucnosti razantně nezlepší. ¹⁵

Vakcinace

Zavedení očkování má v dané oblasti okamžitý vliv na incidenci závažných infekčních i neinfekčních forem TBC dětí. Aby se účinnost očkování projevila v plném rozsahu na incidenci nemoci, musela by se populace očkovat plošně několik desetiletí. Pokud plošná proočkovanost začne klesat pod 90 %, budou vystaveny riziku i osoby již očkované.¹⁵

Vakcína Bacille Calmette-Guérin (BCG) je živá, oslabená a připravovaná z kmene *Mycobacterium bovis*. Protektivní účinek této vakcíny byl již prokázán mnohými studii. Síla účinku se liší podle oblasti aplikace, tento rozdílný účinek je vysvětlován odlišnou expozicí populace mykobakteriím v prostředí. Z toho důvodu je upřednostňováno očkování novorozenců intrakutánně.^{2,15}

Chemoprophylaxe

V pravém slova smyslu jsou při chemoprophylaxi aplikovány léky neinfikované osobě, která je v přímém styku s nemocným. V běžném významu označuje terapeutické podávání léčiva infikované osobě, která nemá příznaky aktivní nemoci. Ve většině případů se chemoprophylaxe provádí v zemích, kde není povinné očkování proti TBC (např. USA).¹⁵

6.3.5 Diagnostika a léčba

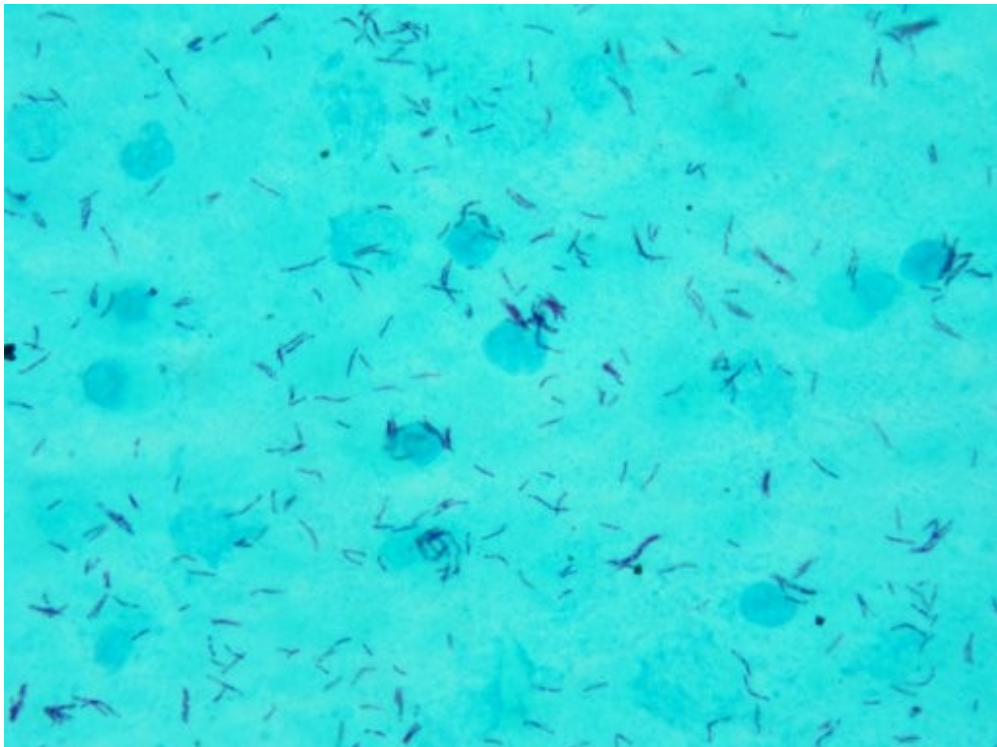
Mykobakteriologická diagnostika má jedinečnou úlohu při zjišťování mykobakteriálních infekcí i při vyhodnocování účinnosti opatření pro jejich kontrolu. Diagnostika je založena na obsáhlých znalostech biologie původců, které jsou výhodou při jejich průkazu a samozřejmě i při jejich druhové identifikaci. Co se týká metodické stránky diagnostiky, upřednostňuje se celosvětově co nejkvalitnější průzkumu původců a reprodukovatelnost izolačních a identifikačních technik.²²

Ke stanovení diagnózy TBC je potřeba vyšetřit biologický materiál (sputum, sediment tekutin) a prokázat přítomnost tuberkulózních mykobakterií. Definitivní diagnóza TBC je dána přímým průkazem – mikroskopicky a kulturačně. Samotný RTG snímek s viditelnými změnami (obr. 6) není dostačující a podezření je nutno potvrdit další metodou.^{6,15}



Obrázek 6 - RTG diseminované makronodulární plicní TBC ²³

Ze vzorků se nejčastěji vyšetřuje sputum, v případě, že nelze odebrat, je další možností bronchiální laváž, bronchoskopický výtěr, biopsie nebo laryngeální výtěr. U tekutin jako likvor, exsudáty a moč se po centrifugaci vyšetřuje sediment. ¹⁵

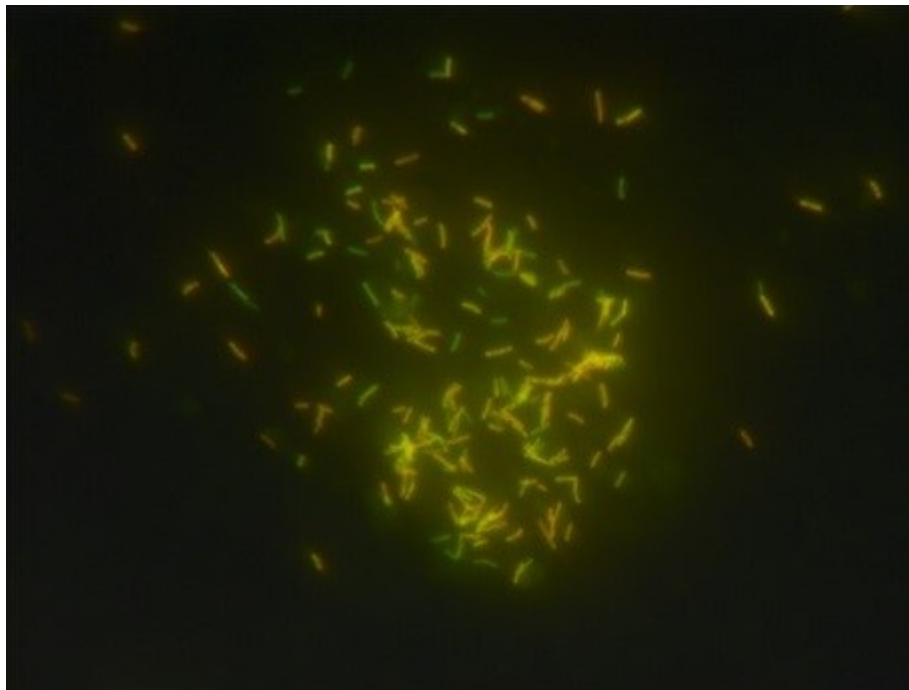


Obrázek 7 - Mykobakterie obarveny podle Ziehl Neelsena pod mikroskopem ²⁴

pozn.: červené mykobakterie na modrém podkladu (metylenová modř), prohlíží se 100 zorných polí při zvětšení 1000x imerzním objektivem

Pro **mikroskopii** mykobakterií se nevyužívá základní Gramovo barvení, ale barvení podle Ziehl-Neelsena, které spočívá v obarvení teplem fixovaného preparátu přelitím roztoku karbolfuchsinu a zahřátím do výstupu par. Preparát se opláchnou vodou a přelévá etanolem a kyselinou sírovou pro odbarvení nadbytečného karbolfuchsinu. Následuje další opláchnutí a dobarvení kontrastním barvivem (malachitová zeleň, metylenová modř). Mykobakterie se barví červeně a pozadí zeleně či modře viz. obr. 7. Fluorescenční barviva se používají pro barvení bioptického materiálu tkání. Nejčastěji je využíváno selektivního barvení auraminem O a rhodaminem B, díky vysoké afinitě k mykolovým kyselinám. Jak je vidět na obr. 8, preparát se žlutě či jasně oranžově svítícími mykobakteriemi na tmavém pozadí je prohlížen fluorescenčním mikroskopem. Mikroskopie stěru je ztížena v případech současné infekce virem HIV, z tohoto důvodu se může stát, že se léčba zahájí pozdě. Mikroskopie je nejrychlejší vyšetření, ale jeho citlivost není vysoká – pro průkaz je potřeba 50 000-100 000 mykobakterií v 1 ml sputa.

5, 6, 15, 24



Obrázek 8 - *Mycobacterium tuberculosis* pod fluorescenčním mikroskopem, zvětšení 400x, barvení auramin-rhodamin ²⁵

Pro **kultivační metody** je potřeba v klinickém materiálu odstranit jakoukoliv kontaminaci (jiné druhy bakterií, houby). Petroffova metoda spočívá ve smísení se 4 % hydroxidem sodným, poté 15-30minutové neutralizaci fosforečnanem sodným a centrifugací. Vzniklý sediment se očkuje nejčastěji na Löwenstein-Jensenovu půdu

nebo jinou vhodnou půdou a inkubuje se při 35-37 °C. Kultivace je 1000x citlivější metoda než mikroskopie, ale časově náročnější – trvá i několik týdnů. ^{6,15}

Nejcitlivější metody v současné době jsou molekulárně biologické, konkrétně PCR, DNA fingerprinting, použití genetických sond nebo přímý test cílený na tuberkulózní mykobakterie. ⁶

Tuberkulín, dnes jako doplňková metoda, měl původně sloužit jako očkovací látka, ale po zjištění, že není příliš vhodný, se uplatnil v diagnostice, kde v některých případech může sloužit ke zjištění, zda byl člověk infikován tuberkulózním bacilem. V ČR se tento test používá ke kontrole účinku očkování u dětí (podle charakteru místní reakce se dá zjistit, jestli se již pacient někdy s tuberkulózním bacilem setkal). Jeho použitelnost je však omezena, protože nedokáže vždy odlišit, zda se jedná o aktivní, neaktivní onemocnění, anebo o stav po očkování BCG – pro odlišení se používá měření velikosti indurace v místě vpichu, které ale není vždy průkazné. Slabou reakci tuberkulínu mohou také zapříčinit některé druhy mykobakterií z prostředí. ^{15,21}

TERAPIE

Základem léčby tohoto infekčního onemocnění je dlouhodobé podávání kombinace antituberkulotik. Délka léčby závisí na rozsahu postižení, přidružených chorobách a kombinaci použitých antituberkulotik. Antituberkulózní léky se užívají buď denně nebo v daném režimu (intermitentně) po dobu 6 až 12 měsíců. Délka léčby a kombinace více látek je důležitá z důvodu heterogenity populace mykobakterií a pro vyšší procento primárně rezistentních mutant. Akceptovatelný léčebný režim je v případě, že procento recidiv není vyšší než 5 % a účinnost režimu bude minimálně 95 %. Pokud jsou pacienti rezistentní vůči nejúčinnějším ATB první linie, jedná se o multirezistentní TBC a nasazují se i antituberkulotika linie druhé. ^{2,5,6,15}

Terapie má 3 fáze. V první fázi dochází k potlačení aktivity většiny mykobakterií a pacient se stává neinfekčním. V druhé fázi jsou usmrcovány méně aktivní mykobakterie v makrofázích, kaseifikované tkáni a zánětlivých ložiscích s kyselou reakcí. Ve třetí fázi jsou usmrcovány všechny mykobakterie v průběhu jedné krátké metabolické aktivace. Relapsy onemocnění jsou způsobeny citlivými mykobakteriemi. Krátkodobější režimy jsou pro pacienty šetrnější a jsou lépe snášeny, než režimy delší než 1 rok. ^{2,5,6,15}

6.4 ANTITUBERKULOTIKA

Antituberkulotika jsou léky s mykobakteriostatickým či mykobaktericidním a sterilizačním účinkem. Jejich podáváním se snažíme docílit zničení mykobakterií a sterilizaci tuberkulotických poškození. Rezistenci k lékům často způsobují mutace, ke kterým dochází jednou za 108 buněčných dělení, a právě k zábraně vzniku mutantů slouží kombinace antituberkulotik. ^{6, 15}

Největší mykobaktericidní účinek má INH, RFM a streptomycin. Nejsilnější sterilizační účinek má pyrazinamid, RFM, ale i INH. Užívá se i lék mykobakteriostatický a to etambutol. ⁶

6.4.1 Léková citlivost a rezistence

Testování **lékové citlivosti** se provádí u každého nově izolovaného kmene *M. tuberculosis* nebo podle dohody s lékařem. Při prvním testování se určuje citlivost na antituberkulotika první linie, v případě rezistentních kmenů se testují další linie. ⁶

Příčinami vzniku **rezistence** na léčbu jsou neadekvátní léčebný režim, nesprávné dávkování, nekontrolovaná léčba, intolerance preparátů, předčasné ukončení léčby, nespolupráce pacienta, genetická mutace mykobakterií, migrace populace, neúčinná léčba a selekce a pomnožení rezistentních mutantních kmenů. Genetická mutace, selekce a pomnožení rezistentních mutantních kmenů jsou již sekundárními procesy rezistence zapříčiněné právě nesprávnou léčbou, migrací atd. O primárně rezistentní infekci se jedná v případě, že pacient dříve neprodělal léčbu TBC delší dobu než jeden měsíc. Monorezistence se vyskytuje tehdy, jeli při *in vitro* testování kmen rezistentní pouze na jedno antituberkulotikum první řady. Pojem multirezistence je v tomto případě definován jako rezistence mykobakterií na dvě nejúčinnější antituberkulotika – RFM a INH. ^{5, 26}

Je čím dál více bakterií působících onemocnění, které se stávají rezistentní vůči používaným léčivům a v některých případech již nejsou k dispozici prakticky žádná ATB a možnostmi jsou pouze experimentální přípravky a potenciálně toxická léčba. Tyto situace vybízí výzkumná pracoviště k hledání nových léčivých látek a tímto způsobem snížení počtu rezistencí. ²⁷

Bakteriální mechanismy rezistence na ATB

Antibiotická rezistence může být inherentním rysem bakterie (vlastností, např. určitý typ struktury buněčné stěny) a ten ji činí přirozeně rezistentní nebo může být získána mutací ve vlastní DNA. Sekundární rezistence vzniká získáním rezistence z jiné DNA. Jakmile se u bakterie vyvinou geny rezistence, jsou během replikace DNA přeneseny přímo do potomků bakterie – vertikální přenos genů. Horizontální přenos genů (HGT) je proces, při kterém lze genetický materiál obsažený v DNA přenášet mezi jednotlivými bakteriemi stejného druhu nebo dokonce mezi různými druhy. Existují přinejmenším tři možné mechanismy HGT – transdukce, transformace nebo konjugace.

27

U bakterií se vyvinulo několik mechanismů, které jim poskytují rezistenci vůči ATB. Tyto mechanismy mohou buď chemicky modifikovat ATB, učinit ho neaktivním fyzickým odstraněním z buňky nebo modifikovat cílové místo tak, aby nebylo rozpoznáno ATB. Nejběžnějším způsobem je enzymatická inaktivace ATB. Stávající buněčný enzym je modifikován tak, aby reagoval s ATB způsobem, že již neovlivňuje mikroorganismus. Alternativní strategie využívaná mnoha bakteriemi je změna cílového místa ATB.²⁷

6.4.2 Dělení podle linií

U první skupiny léčiv je možno podávat všechny zástupce samostatně nebo v kombinacích. U druhé a třetí skupiny se podává vždy pouze jeden zástupce, viz tabulka 2.²⁸

Tabulka 2 – Původní řazení antituberkulotik podle terapeutické účinnosti^{26, 28}

LINIE	LÉKY
1.	isoniazid, rifampicin, pyrazinamid, etambutol, streptomycin
2.	kanamycin, amikacin, kapreomycin, viomycin fluorochinolony – ciprofloxacin, ofloxacin, levofloxacin, etionamid, prothionamid, cykloserin, PAS
3.	podpůrné léky klaritromycin, linezolid, klofamizin, amoxicilin

6.4.2.1 První linie

Isoniazid je vysoce selektivní antituberkulotikum s majoritně baktericidním účinkem, které bylo poprvé syntetizováno v Praze roku 1912 Meyerem a Malým a až roku 1950 byl popsán jeho účinek na mykobakterie. Účinek chemoterapeutika spočívá v kompetitivním vytěsňování metabolitů a koenzymů z buňky, na základě jejich podobnosti s INH. Při nesprávné terapii na něj rychle vzniká rezistence, proto je využíván v různých kombinacích, obzvláště v iniciační fázi terapie TBC. Lék je relativně levný, snadný na výrobu, dobře vstřebatelný a vysoce účinný, díky čemuž je nejpoužívanějším lékem na TBC. Toxicita je ojedinělá, ale relativně vysoká a v závislosti na koncentraci se mohou projevit neurotoxické a hepatotoxické projevy, alergie či obtíže gastrointestinálního traktu. Kontraindikace jsou u nemocných s epilepsií a jaterními poruchami. Podáváním pyridoxinu (vitamín B6) při léčbě se snižuje neurotoxický účinek. Výzkumy prokázaly, že s rezistencí INH je spojen katalázo-peroxidázový enzym.^{2,6,29}

Rifampicin je semisyntetické širokospektré ATB s mykobaktericidním a sterilizačním účinkem, jež spočívá v inhibici DNA-dependentní RNA polymerázy mykobakterií s nízkou metabolickou aktivitou. Z 60-80 % je v těle vázán na proteiny a tělesné tekutiny barví do oranžova. Léčba RFM je většinou dobře tolerována a stejně jako INH lze podávat v období gravidity. Jeho nevýhodami jsou relativně vysoká cena a množství vedlejších účinků, na druhou stranu je v současné době nejúčinnějším antituberkulotikem.⁶

Pyrazinamid je syntetický pyrazinový analog nikotinamidu, jehož účinky jsou převážně baktericidní. Účinek spočívá v likvidaci fagocytovaných mykobakterií v kyselém prostředí – perzistorů. Taková vlastnost chemoterapeutika je využívána především v prvních 2 měsících léčby, díky čemuž se zkracuje režim léčby na 4-6 měsíců. Toto perorálně podávané specifické antituberkulotikum je hepatotoxické, snižuje tubulární sekreci kyseliny močové a vyvolává kožní alergický exantém. Pyrazinamid je lékem první volby u krátkodobých režimů, ale s relativně rychlou se rozvíjející rezistencí. Bývá používáno při postižení CNS vzhledem k příznivé farmakokinetice.^{2,6}

Etambutol je synteticky připravené antituberkulotikum s bakteriostatickým účinkem nejvhodnější na mykobakterie s rychle progredující rezistencí. Výhodou

chemoterapeutika je velmi málo nepříznivých vedlejších účinků a nehepatotoxicita. Většinou se podává v kombinaci s INH. Je vylučován tubulární sekrecí a glomerulární filtrací, proto je potřebná obezřetnost u nemocných s poruchou ledvin. U pacientů je velmi dobře tolerovaný a lze jej užívat i dlouhodobě. Nevýhodou je vysoká cena. Před zahájením léčby je potřeba provést oční vyšetření včetně perimetru a barvocitu a to z důvodu sice vzácného, ale závažného vedlejšího účinku – retrobulbární neuritidy s poruchami visu a barvocitu.^{2,6}

Streptomycin, jako první lék působící proti TBC, byl objeven roku 1943 pod vedením Selmana Waksmana izolací z bakterie *Streptomyces griseus*. Na terapeutickou hladinu se lze dostat pouze parenterálním podáním. Lék působí baktericidně na extracelulárně uložené mykobakterie v alkalickém prostředí a v aerobním prostředí. Streptomycin je výrazně ototoxický, nefrotoxický, vyvolává kožní alergické reakce a poškozuje nervus vestibulocochlearis, což může způsobit závratě, poruchu i nenávratnou ztrátu sluchu. Míra toxicity stoupá s věkem. Tento typ aminoglykosidového ATB působí na proteosyntézu bakterií (inhibitor syntézy proteinů). Jeho rezistence vzniká alterací ribozomů, snížením propustnosti buněčné stěny nebo modifikací molekul bakteriálními enzymy (fosforylací, acetylací či adenylací).^{6,15}

6.4.2.2 Druhá linie

Tabulka 3 – Schéma léků užívaných k léčbě RFM rezistentní a multirezistentní TBC od roku 2018³⁰

Skupina A	Skupina B	Skupina C
levofloxacin/ moxifloxacin	klofazimin	etambutol
bedaquiline	cycloserin/ terizidon	delamanid
linezolid		pyrazinamid
		imipenem-cilastatin/ meropenem
		amikacin
		ethionamid/ prothionamid
		PAS

pozn.: Měly by být zahrnuty všechny tři léčiva skupiny A. Jeden nebo oba léky skupiny B. Léky skupiny C by měly být podávány, pokud nelze použít léky ze skupin A a B.

V případě, že nelze k léčbě využít některé z pěti hlavních antituberkulotik, přistupuje se k léčbě antituberkulotiky druhé linie. Jedno z doporučených schémat léčby je znázorněno v tabulce 3. Důvodem může být věk nemocného, přidružené choroby, rezistentní kmen, neúspěšná předchozí léčba TBC z různých důvodů. **Ethionamid** a **prothionamid** jsou perorálními bakteriostatickými látkami, které často vyvolávají zažívací potíže. Etionamid je navíc neurotoxický. **Cykloserin** je ATB se širokospektrým účinkem produkované bakterie *Streptomyces orchidaceus*. Jeho baktericidní účinek vzniká inhibicí syntézy buněčné stěny. Kvůli vedlejším účinkům jako je centrální neurotoxicita jej nelze kombinovat s INH. **Kanamycin**, **amikacin** a **kapreomycin** jsou aminoglykosidová ATB s mykobaktericidním účinkem, které se řadily do druhé linie do změny, kterou provedla WHO v prosinci 2018. Se streptomycinem mají zkříženou rezistenci a podobají se mu i vedlejšími projevy (ototoxicita, nefrotoxicita). **Thiacetazon** je antituberkulotikum s nízkou cenou, proto se využívá v rozvojových zemích. Užívá se v kombinacích s INH a slouží jako doplňková léčba.^{6, 30}

6.4.3 Nová léčiva

Vývoj nových, účinných kombinačních režimů pro léčbu TBC je poměrně zdoluhavý a nákladný. Léčba TBC rezistentní vůči lékům dosahuje v posledních letech značného úspěchu. Vývoj nových, kratších režimů pro MDR-TB a rostoucí dostupnost nových nebo původních upravených léčiv, předpokládají, že bude více pacientů schopno léčbu absolvovat i se vyléčit. Všechny tyto látky vyžadují pečlivé zacházení v kontextu individuálních režimů pod pečlivým klinickým a laboratorním monitorováním. Při jakémkoliv testování léčby nesmí být navržený nový lék proti TBC užíván samostatně. Musí být užíván s nejméně dvěma dalšími existujícími léky proti TBC nebo s jinými novými léky proti TBC. Pokud se léčivy nebude plýtvat a budou se důsledně dodržovat léčebné režimy, je velká šance, že se podaří vytvořit nový univerzální léčebný režim a časem se TBC vymýti.^{31, 32}

U nových léků proti TBC je požadováno:

- kratší, jednodušší, ale stále cenově dostupné léčebné režimy léků pro TBC citlivou na léky
- kratší, účinnější, méně toxické a méně nákladné režimy TBC rezistentní na léky
- krátké, jednoduché, dobře snášené a bezpečné režimy latentní TBC
- léky s takovými interakcemi, že mohou být bezpečně užívány lidmi s antivirovou terapií HIV³²

Delamanid, léčivá látka testovaná ve stejné časové linii jako bedachilin, kdy oba léky obdržely zrychlené schválení pro terapii MDR-TB na základě údajů fáze IIb v roce 2012 a 2014. Delamanid byl roku 2017 výsledkem III fáze schválen jako doplněk základní dlouhodobé léčby. Doporučení WHO je používat delamanid jako součást dlouhodobé léčby MDR-TB u dospělých i dětí od 6-ti let, za všech bezpečnostních opatření. V současnosti se nachází v testování orálních režimů léčby, léčba dětí mladších 6-ti let, a plánuje se studie jeho použití v prevenci při kontaktu s osobami MDR-TB pozitivními. V testovacích fázích byl tento lék skupiny nitroimidazolů nazývaný OPC-67683.^{4,31}

Lék **Pretomanid** (PA-824) je nitroimidazol, který se již testuje pro použití v léčbě jak TBC citlivé na léky, tak rezistentní, včetně XDR-TB. Kombinace pretomanidu, moxifloxacinu a pyrazinamidu měla největší časnou baktericidní aktivitu. V testech vykazuje aktivitu proti latentní i aktivní TBC, ale v poslední fázi se objevily obavy o jaterní bezpečnost.^{4, 31, 32}

V roce 2012 vedlo prozatímní testování ke schválení antituberkulotického léku – **bedachilinu**, který byl identifikován pomocí screeningu s využitím *M. smegmatis*. Bedachilin je léčivý přípravek schválený pro kombinovanou léčbu dospělých s plicní multirezistentní TBC. Momentálně není indikován pro léčbu nerezistentních forem, v důsledku vážných vedlejších účinků pozorovaných na zvířecích modelech a zvýšeného počtu úmrtí pozorovaných během prvních klinických studií publikovaných na skupině pacientů, léčených v té době standardním způsobem. Toto doporučení WHO bylo nadále zachováno i po další studii v roce 2016. Avšak v těchto testech léčby nerezistentní formy výrazně zkrátit dobu potřebnou ke sterilizaci tkáňových poškození TBC. V testování z předchozích let byl bedachilin účinný proti kmenům *M. tuberculosis* rezistentním na RFM, INH, streptomycin, etambutol i pyrazinamid. Samotný nebo v kombinaci s různými látkami druhé linie, byl aktivnější než režimy druhé linie bez něj. Jeho zahrnutí do režimu doporučeného WHO pro MDR-TB snižuje čas potřebný ke sterilizaci TBC. Výsledky třetí části studie, která zahrnuje použití u dětí s MDR, perorální léčbu a léčbu TBC citlivé na léčbu, se očekávají v roce 2020.^{4, 31, 33}

Delpazolid (LCB01-0371) je oxazolidinon, který v roce 2017 vstoupil do II fáze testování.⁴

AZD5847 je potenciálním novým antiTBC lékem. V prosinci 2012 bylo oznámeno, že první pacientka byla zařazena do IIa fáze studie.³²

Telacebec (Q203) je imidazopyridin, kandidátní sloučenina, která cílí mykobakteriální respirační řetězec, jež postoupila do testovací fáze II.^{4,31}

SQ109 je strukturní derivát etambutolu, zaměřující se na mykobakteriální transportní protein MmpL3, v současné době je v probíhající studii ve fázi II. Má 3 jedinečné mechanismy účinku, které jsou odlišné od jiných ATB používaných k léčbě TBC. V předchozích laboratorních studiích SQ109 prokázal vynikající aktivitu proti MDR-TB i XDR-TB. Také zlepšil aktivitu léků INH, RFM a bedachilinu a zkrátil o více než 30 % čas potřebný k vyléčení myši v experimentech s TBC. SQ109 by mohl nahradit jeden nebo více současných léčiv TBC, zjednodušit terapii a zkrátit současný čas léčby.^{4, 31, 34}

6.4.4 Látky ve vývoji

Od srpna 2017 je zaznamenán nárůst 11 nových sloučenin pro léčbu TBC – contezolid, delpazolid, GSK-3036656, macozinon, OPC-167832, pretomanid, Q203, SQ109, sutezolid, TBA-7371 a TBI-166. V dalším testování je 7 již používaných léků s novým použitím – klofazimin, linezolid, levofloxacin, moxifloxacin, nitazoxanid, RFM (vysoká dávka) a rifapentin. V testovacích fázích je i několik kombinovaných režimů s novými nebo upravenými léky. A za zmínku určitě stojí i skutečnost, že v klinických studiích se nachází dvanáct kandidátů na vakcíny.⁴

Nové sloučeniny

Contezolid, neboli MRX4 je oxazolidinové ATB, momentálně v USA v první fázi studie, účinné na grampozitivní bakterie. Podle prozatímních modelových výsledků vykazoval v perorální formě stejnou nebo vyšší účinnost než linezolid.⁴

GSK-3036656 je nová sloučenina oxaborolu, která se nachází v I fázi testování od března 2017.⁴

Macozione (PBTZ169) je benzothiazinon s dokončenou fází I v Rusku, kde byla zahájena i fáze II. V roce 2018 byla současně zahájena fáze I s novou formulací ve Švýcarsku.⁴

OPC-167832 je karbostyryl s baktericidním účinkem proti rostoucím i intracelulárním mikrobům. Byla dokončena jediná studie vzestupné dávky. V roce 2018 je plánována studie s vícenásobným vzestupným a časným baktericidním účinkem u léčivé látky samotné a v kombinaci s delamanidem.⁴

Sutezolid (PNU-100480) je oxazolidinon, odvozený od linezolidu, způsobuje méně nežádoucích účinků, a proto může být lépe tolerován při dlouhodobých léčebných cyklech.^{4,31}

TBA-7371 je inhibitor enzymu DprE1, který je nezbytný při syntéze složek mykobakteriálních buněčných stěn. Ukázalo se, že tento inhibitor je účinný proti kmenům *M. tuberculosis* rezistentním vůči známým TBC léčivům. Aliance TBC realizuje studii fáze I. v USA.⁴

TBI-166 byla identifikována spojením 4 společností. Tato riminofenazinová sloučenina má zlepšené fyzikálně-chemické a farmakokinetické vlastnosti (aby se zabránilo zabarvení kůže) s účinností podobnou klofaziminu. Klinická studie fáze I začala v lednu 2018 v Číně.⁴

Roku 2019 byl publikován nový lék, nazvaný **AN12855**, který jak je udáváno by měl být účinnější než INH. Toto nové experimentální ATB proti TBC vykazovalo ve studiích na myších mnohem nižší tendenci vyvíjet rezistenci a setrvává déle ve tkáních, ve kterých se *M. tuberculosis* nachází v nejvyšším počtu a zabíjí je účinněji. Nyní bude potřeba, aby se tento úspěch projevil ve zlepšení léčby lidských onemocnění, což bude předmětem dalších studií.³⁵

Původní léky s upravenou možností použití

Některé kombinace zahrnují léky, které byly registrovány pro jiné indikace, než je léčba TBC, jsou změněny a upraveny a používány pro léčbu vysoce rezistentních případů. Lze říci, že důkazů podporujících upravené léky přibývá, i když jejich většina je pouze z pozorovacích studií.³¹

Přínos léku lepry, **klofaziminu**, je v léčbě MDR-TB. Je to riminofenazin testovaný jako součást léčebných režimů pro MDR-TB ve studiích fáze III.^{4,31}

Levofloxacin je testovaný na různé dávkování v léčbě MDR-TB u dospělých s plicní formou. Testují se čtyři dávky 11, 14, 17 a 20 mg/kg/den jako součást

optimalizovaného režimu. Studie již byla ukončena a data se analyzují.⁴

Linezolid je oxazolidinon se silnou antituberkulózní aktivitou. Je široce používán při léčbě rezistentní TBC a existuje důkaz, že zlepšuje rychlost konverze a sterilizace kultury po přidání do léčebných režimů. Vzhledem k tomu, že léčivo má úzké terapeutické okno, byla provedena studie fáze II, která vyhodnotila mykobaktericidní aktivitu, bezpečnost, snášenlivost a farmakokinetiku pěti dávek linezolidu u dospělých s plicní TBC.⁴

Moxifloxacin z fluorochinolonů je zařazen do několika studií nových režimů pro léčbu TBC citlivé na léky i rezistentních kmenů.⁴

Nitazoxanid je antiparazitický lék s aktivitou proti *M. tuberculosis* testovaný ve fázi II studie na Haiti.⁴

O **RFM** (vysoká dávka) z vícečetného, vícefázového testu TBC (MAMS-TB) z roku 2017 bylo zjištěno, že při podávání 35 mg/kg RFM během 12 týdnů došlo ke zkrácení doby konverze kultury z 62 na 48 dní. Tato studie může pomoci připravit půdu pro zrychlené testování nových léčebných režimů TBC při snížení nákladů.⁴

Rifapentin, vázaný na proteiny s dlouhodobým účinkem, je nadějný jako možný lék proti TBC pro zkrácení léčby a pro intermitentní léčbu TBC v probíhajících klinických studiích. Účinnost rifapentinu při léčbě TBC vnímavé na léky se zkoumá ve třech studiích. Studie TB Trial Consortium (TBTC) 31 / ACTG A5349 je studie fáze III, která zkoumá použití rifapentinu s moxifloxacinem nebo bez ke zkrácení léčby plicní TBC citlivé na léky po dobu 4 měsíců. Studie TBTC 35 fáze II se týká farmakokinetiky nových, ve vodě dispergovatelných pediatrických přípravků obsahujících rifapentin. Studie TBTC 37 je studií fáze III bezpečnosti a účinnosti 6-ti týdenního režimu léčby latentní tuberkulózní infekce u HIV negativních osob v prostředí s nízkou zátěží TBC. Je porovnáván s lokálně dostupným režimem na bázi rifamycinu ve věku 3-4 měsíců.

4, 31, 32, 36

Nedávná studie *in vitro* prokázala, že **meflochin** (antimalarikum) vykazuje slibnou aktivitu proti kmenům způsobujícím TBC a MDR-TB, díky vynikajícímu pronikání do tkáně a dlouhému poločasu rozpadu, který bývá dobře tolerován.³¹

Nové léčebné režimy pro citlivé i rezistentní TBC

Studie **NIX-TB** je první klinická studie TBC pro testování nové kombinace léčiv, která může zkrátit dobu léčby. Kombinace Nix-TB je tvořena léčivy pretomanid, bedachilin a linezolid. Předpokládá se, že tato kombinace léků bude schopna léčit XDR-TB v šesti až devíti měsících. Primárním koncovým bodem je bakteriologické selhání, relaps nebo klinické selhání během 6-ti měsíčního sledovacího období po ukončení léčby. U prvních 15 pacientů bylo hlášeno 87 % vyléčení. Následná studie nazvaná ZeNix zkoumá nižší dávky a kratší dobu působení linezolidu, aby se minimalizovala toxicita. ^{4,32}

Studie **ACTG A5343 DELIBERATE** testuje kardiotoxicitu režimů obsahujících samostatný delamanid nebo bedachilin, s kombinací ve studiích farmakokinetiky a interakce léčivo-léčivo. ⁴

Studie **endTB** vznikla v roce 2017 – porovnává několik režimů léčby pro MDR-TB nebo XDR-TB se současným delším léčebným režimem pro MDR-TB doporučeným WHO. Testované režimy zahrnují bedachilin nebo delamanid (nebo obojí), moxifloxacin nebo levofloxacin a pyrazinamid plus linezolid nebo klofazimin (nebo oba) v různých kombinacích. ⁴

Studie **MDR-END** zkoumá 9-12 měsíční režim delamanidu, linezolidu, levofloxacinu a pyrazinamidu pro léčbu MDR-TB u pacientů s TBC bez rezistence na fluorochinolony. ⁴

Studie **NeXT** testuje 6–9 měsíční režim neinjekčního podávání bedaquilinu, ethionamidu nebo vysokodávkovaného INH, linezolidu, levofloxacinu a pyrazinamidu u pacientů s MDR-TB ve srovnání s režimem léčby 21–24 měsíců. ⁴

Studie **STREAM** Stage 1 srovnává 9-ti měsíční režim pro MDR-TB s delšími režimy a to 18–24 měsíců v Etiopii, Mongolsku, Jižní Africe a Vietnamu. Jedná se o studii fáze III, pro kterou bylo v roce 2018 dokončeno zařazení a sledování. Externí odborníci, kteří prozkoumali prozatímní zjištění, doporučili, aby národní programy TBC a další zúčastněné strany i nadále používaly kratší režim MDR-TB za stejných podmínek, jaké byly doporučeny v pokynech WHO vydaných v roce 2016. Konečné výsledky studie STREAM Stage 1 informovaly o aktualizaci pokynů WHO v léčbě MDR-TB v roce 2018. ⁴

V roce 2018 byl zadán výzkum, který se zaměřil na zkrácení doby léčby pacientů s TBC. Studie na myších a na tkáňových kulturách ukázaly, že podávání **vitaminu C** současně s léky proti TBC by mohlo snížit délku času, kterou tyto léky potřebují k eradikaci tohoto patogenu.³⁷

6.5 METODY PRŮKAZU MYKOBAKTERIÍ

Přehled diagnostických postupů v mykobakteriologii:

I. PŘÍMÝ PRŮKAZ

A. Mikroskopie

- nativní preparát, zástin, jednoduché barvení, diagnostické barvení
- rychlý, jednoduchý a ekonomicky výhodný postup, který doplňuje kultivační vyšetření, výsledek je kvalitativní
- přítomnost acidorezistentních tyček v nátěru je potřeba vždy hodnotit ke vztahu ke klinickému obrazu pacienta
- dvě metody – fluorescenční (fluorochromy) nebo světelná (Ziehl-Nielsen)

¹⁸

B. Izolace mykobakterie

a. Kultivace

- na pevných vaječných půdách a půdách tekutých s nativní bílkovinou (sérem) např. Šulova, Löwenstein-Jensenova
- pro růst většiny kmenů je potřeba těsné uzavření zkumavek
- inokulace jednoho vzorku se dělá na 3-4 půdy různého složení
- hodnocení se provádí nejdříve po 2 týdnech, ale standardně po 3 týdnech kultivace¹⁸

b. Pokus na zvířeti

- biologický průkaz na morčeti
- slouží jako doplňující vyšetření
- výtěžnost je malá a z etického hlediska ne příliš podporovaná¹⁸

c. Identifikace izolovaného kmene – vzhled kolonií, citlivost na látky, biochemická aktivita, patogenita, fagotypizace, molekulárně biologická typizace, ...

- d. Citlivost na ATB – kvalitativní test, kvantitativní test
- e. Kontrola účinnosti antibakteriální terapie

C. Průkaz bakteriálních složek ve vyšetřovaném vzorku

- a. Průkaz antigenu – latexová aglutinace, koaglutinace, ELISA, imunofluorescence
- b. Průkaz toxinů

c. Průkaz typických chemických složek bakterie

- průkaz metabolismu rostoucích mykobakterií v uzavřeném systému tzv. urychlená kultivace
- stanovení produktů metabolismů mykobakterií při růstu v tekutých kultivačních médiích (detekcí $^{14}\text{CO}_2$, stanovením změny pH půdy atd).¹⁸

d. Průkaz bakteriálních nukleových kyselin – průkaz DNA bez amplifikace, průkaz DNA s amplifikací, průkaz RNA

- základem molekulárně biologického průkazu nukleových kyselin komplexu *M. tuberculosis* je přímý průkaz mykobakterií v biologických vzorcích po amplifikaci sekvencí specifických NK
- amplikony jsou hybridizovány se specifickými značenými sondami, které umožňují detekci vzniklých hybridů (Gen-Probe, AMTD)¹⁸

II. NEPŘÍMÝ PRŮKAZ

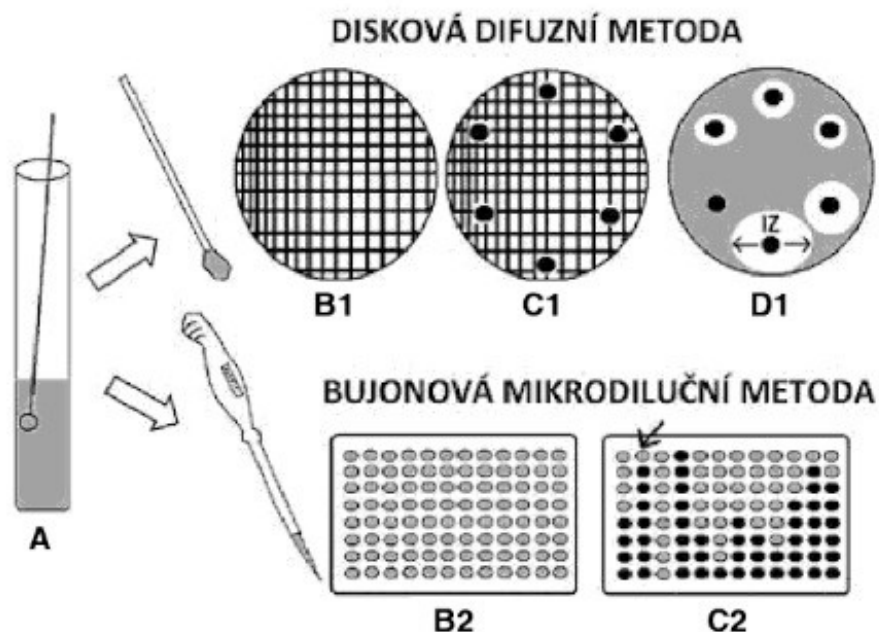
- A. Precipitace
- B. Aglutinace – na nosičích
- C. Vazba komplementu
- D. Neutralizace
- E. Metody se značenými složkami – imunofluorescence, ELISA, Western blot³⁸

7. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

7.1 METODY TESTOVÁNÍ

7.1.1 Kvalitativní – difúzní metoda

Diskový difúzní test je nejpoužívanější metoda kvalitativního stanovení a jde o měření stupně citlivosti. V běžných laboratorních provozech zastupuje standardní metodu v určování citlivosti na ATB. Určování výsledku spočívá ve vytvoření inhibiční zóny okolo disku, přiloženého k tuhé půdě. Daný kmen je k diskovému ATB buď citlivý nebo rezistentní. Nevýhodou této metody je nepoužitelnost pro pomalu rostoucí náročné bakterie i anaeroby, dále pro některé klinicky závažné stavy či stavy s poruchou imunitního systému. Zjišťuje se, v jakém vztahu je citlivost kmene vzhledem k breakpointu. Menší průměr inhibiční zóny, než je obecně standardizovaný limit ukazuje, že dané ATB je v léčbě bezpředmětné a daný mikrob je vůči němu rezistentní. ^{38, 39}



Obrázek 9 - Disková difúzní metoda a bujónová mikrodiluční metoda ⁴⁰

7.1.2 Kvantitativní – diluční metoda

Diluční metoda je kvantitativní způsob testování, který lze plně automatizovat i standardizovat. V této metodě je standardní inokulum testovaného organismu naočkováno do tekuté půdy s různými koncentracemi ATB/antituberkulotik, které mají danou počáteční koncentraci a jsou ředěny geometrickou řadou. Po inkubaci vyšetřovaného kmene se stanovuje růst a určuje se MIC, která je definována jako nejnižší koncentrace inhibující viditelný růst, i minimální baktericidní koncentrace (MBC). Mikroorganismus je označován jako citlivý či rezistentní k testované látce na základě hodnoty breakpointu ($\mu\text{g/ml}$) a MIC, které jsou interpretovány podle mezinárodních organizací pro standardizaci (CLSI, EUCAST). Účinná látka může být rozpuštěna v agaru (agarová diluční metoda) nebo v bujónu (bujónová diluční metoda). Porovnání obou metod je v obrázku 9.^{14, 40, 41}

MIC značí hodnotu vyjadřující citlivost bakterie vůči ATB. Takováto hodnota označuje nejnižší koncentraci antimikrobní látky, která během 24hodinové inkubace inhibuje viditelný růst bakterií a je udávána v jednotkách $\mu\text{g/ml}$ a mg/l .^{28, 41, 42}

MBC označuje hodnotu koncentrace antimikrobní látky, která je z 99,9 % schopna mikroba usmrtit. MBC je udávána v jednotkách $\mu\text{l/mg}$ nebo mg/l a nemůže nikdy dosáhnout hodnot nižších než je MIC, může se jí rovnat nebo být vyšší.⁴¹

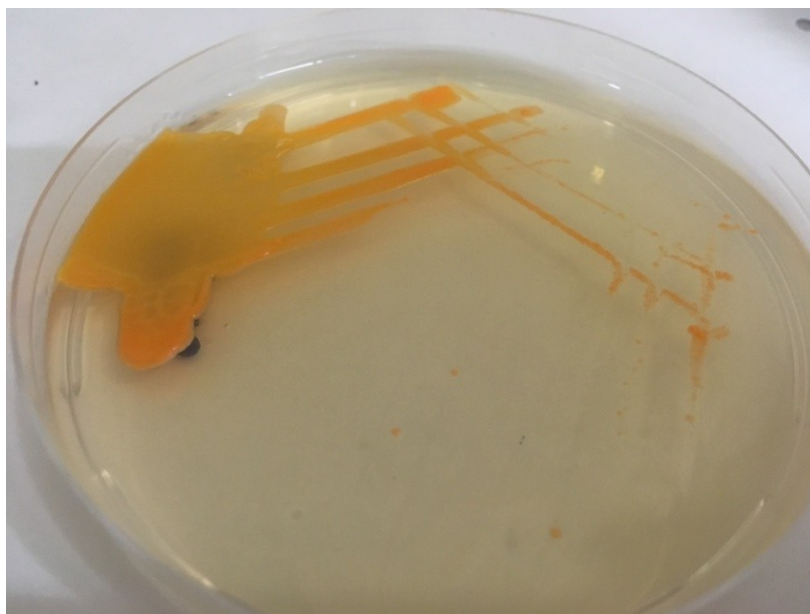
Diluční metoda v bujónu

Bujónové diluční metody jsou dvojího typu – makrodiluční s testovaným objemem nad 1 ml a mikrodiluční s objemem desetiny mililitru. Podle rozdílného objemu jsou metody prováděné ve zkumavkách nebo mikrotitračních destičkách. Jako růstové médium je používán pro aerobní a fakultativně anaerobní bakterie Mueller-Hintonův bujón a inokulum je připravováno o koncentraci 0,5 podle stupnice McFarlanda. Hodnocení se provádí pomocí MIC, kdy se odečítá první jamka s inhibovaným růstem. Výhodou je možnost testování více antimikrobiálních látek vůči jednomu kmenu najednou na jedné destičce. Nevýhodou je možnost horší hodnotitelnosti v případě bakteriální kontaminace. Mikro metoda má velkou výhodu v jednoduchosti a v současnosti je nejdostupnější, nejpřesnější i nejlevnější citlivostní metoda v rutinní analýze.^{14, 38, 41}

7.2 TESTOVANÉ KMENY

7.2.1 *Mycobacterium aurum*

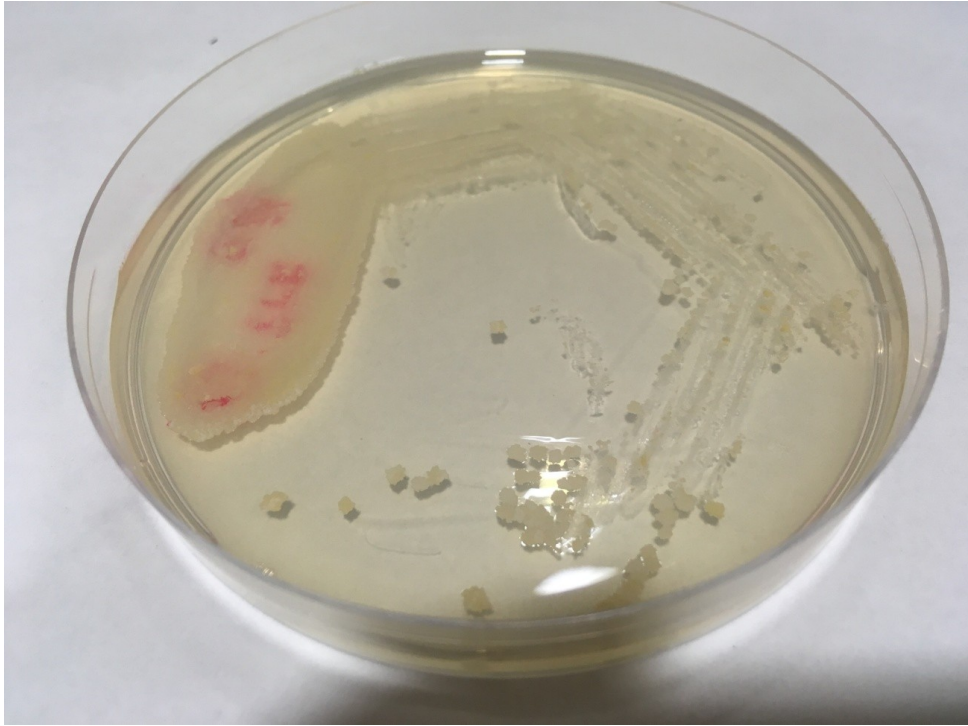
Mycobacterium aurum (obr. 10) je acidorezistentní bakterie vyskytující se v okolním prostředí, obzvláště ve vlhku. Díky mykolovým kyselinám obsaženým v buněčné stěně vykazuje podobnost jako *M. tuberculosis* v citlivosti k antituberkulotikům. Jedná se o rychle rostoucí, oportunní mykobakterii, dříve považovanou za nepatogenní. Dnes je již známo, že u imunodeficientních osob či pacientů může vyvolávat onemocnění. Na rozdíl od jiných rychle rostoucích mykobakterií, jako je *Mycobacterium smegmatis*, má schopnost přežít v makrofázích, z tohoto důvodu se využívá pro úspěšné intracelulární screeniny léků, což umožnilo posoudit schopnost sloučenin proniknout buněčnou membránou a jejich stabilitu uvnitř buňky. Rychlost růstu a nízká patogenita podporují použití *M. aurum* ve studiích antimikrobiální aktivity antituberkulotik místo vysoce patogenní *M. tuberculosis*. Studie genomické analýzy posledních let podporují použití *M. aurum* jako potenciálního modelového organismu pro poskytnutí přehledu o biologii *M. tuberculosis*, zejména pro vývoj nových léčiv, které by mohly vést k novým kontrolním opatřením pro onemocnění TBC. Znalost bakteriálního genomu by v neposlední řadě mohla zlepšit porozumění molekulárnímu základu rezistence vůči lékům. Další významný pohled může být získán ze sekvence genomu dalších kmenů a příbuzných mykobakterií.^{17, 29}



Obrázek 10 – *Mycobacterium aurum* na Middlebrook 7H9 agaru použitý v testování (zdroj autor práce)

7.2.2 *Mycobacterium smegmatis*

Mycobacterium smegmatis (obr. 11) se řadí mezi aerobní, rychle rostoucí, saprofytické, acidorezistentní, nepatogenní nebo jen zřídka patogenní netuberkulózní mykobakterie. Vytváří jemně vrásčité a krémově bílé kolonie, asi po 48 hodinách růstu se jeho barva změní na nepigmentovanou krémově žlutou s voskovitým povrchem. Má bacilovitý tvar o velikosti 3,0 až 5,0 μm . Tato bakterie se běžně vyskytuje v biofilmu ve vodě, půdě a na rostlinách. *M. smegmatis* se hojně vyskytuje v okolním prostředí, nevyskytuje se u zvířat a v laboratořích ho lze izolovat jako kontaminaci vzorků. Díky různorodé morfologii bývá občas náročnější jeho druhová identifikace. Objeveno bylo již roku 1884, ale současný název dostalo až roku 1899. Využívá se ve výzkumu jiných druhů mykobakterií, díky nepatogenitě a rychlému růstu. Výzkum ukázal, že mutovaný kmen mc 2155 je nejvhodnější pro testování molekulárně biologickými metodami. Velkou výhodou pro výzkum je, že není potřeba vyšší bezpečnosti než BSL 2. V případě imunosuprimovaných pacientů může způsobovat infekce ran a bakteriémií. (6, 17, 43, 44, 45, 46)



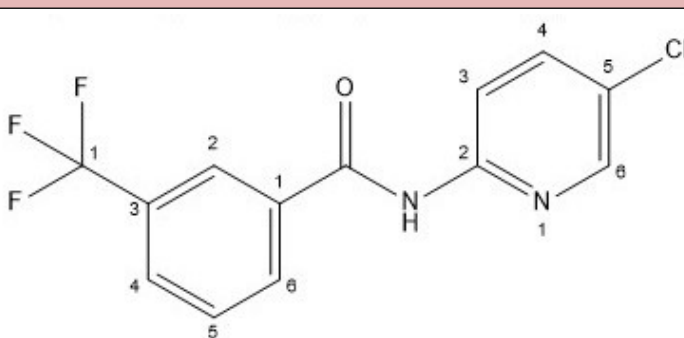
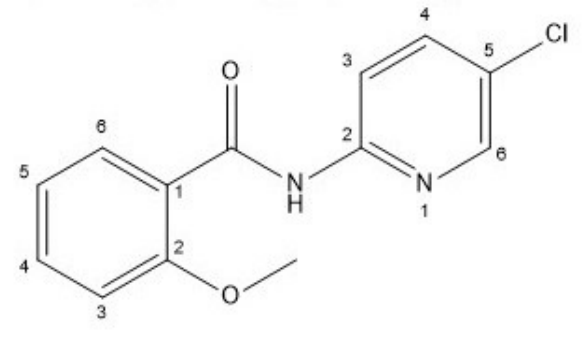
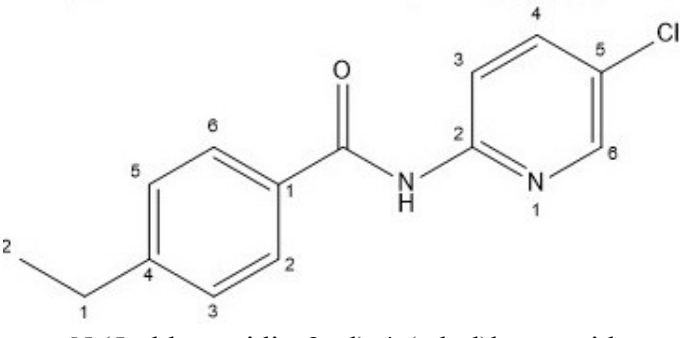
Obrázek 11 – Mycobacterium smegmatis na Middlebrook 7H9 agaru použitý v testování (zdroj autor práce)

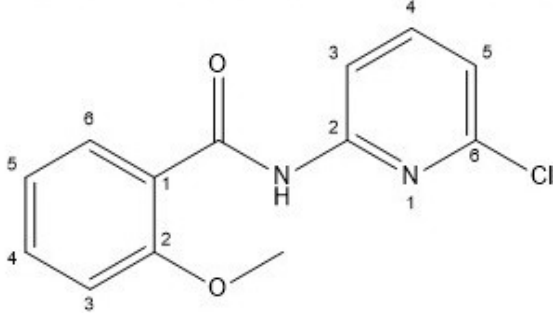
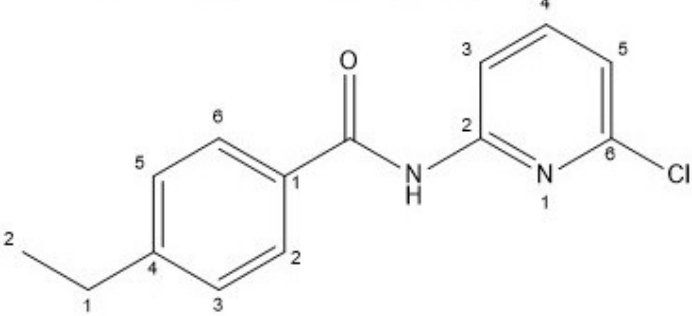
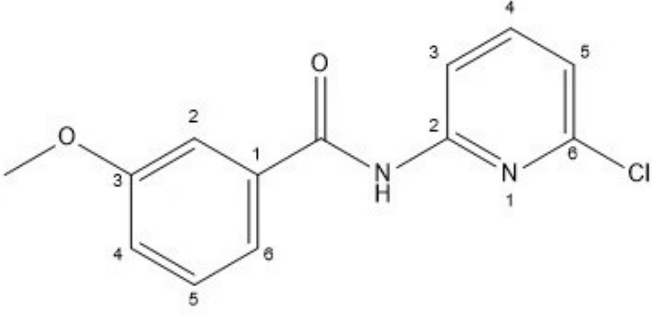
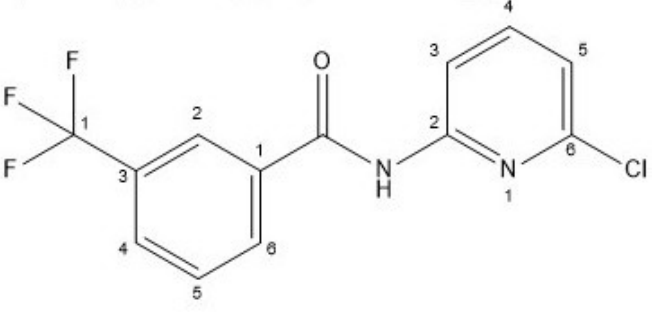
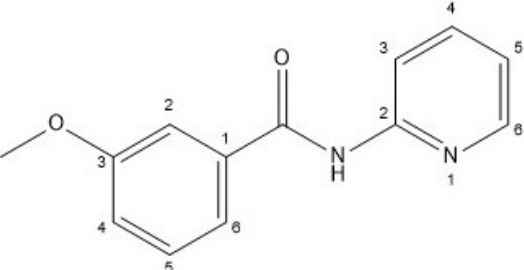
7.3 TESTOVANÉ LÁTKY

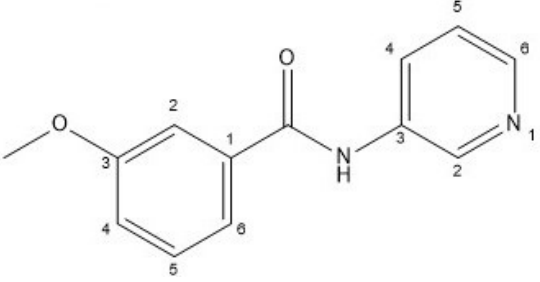
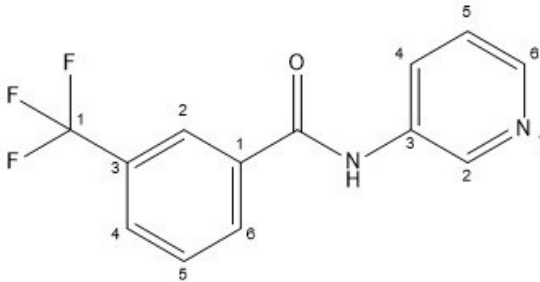
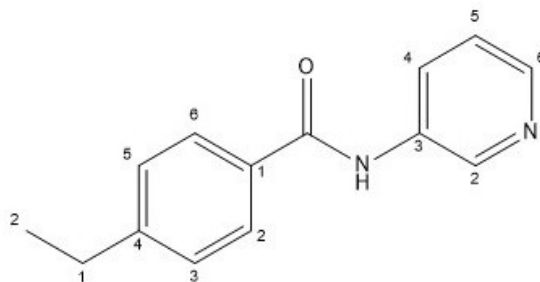
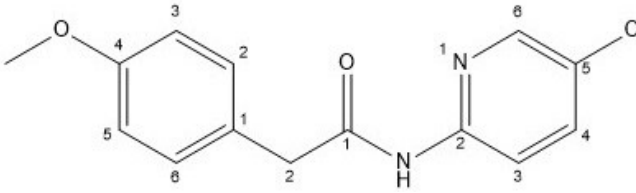
7.3.1 Sloučeniny dodané

Z důvodu větší přehlednosti byly testované látky rozděleny do pěti skupin podle podobnosti struktur, a tedy i jejich vlastností.

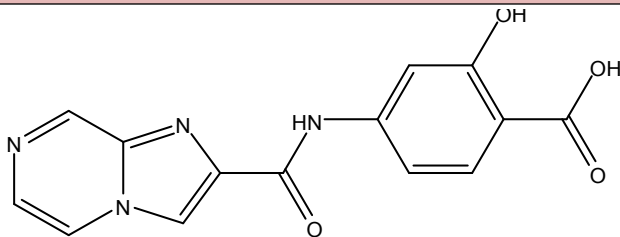
Tabulka 4 – 1. skupina látek

KÓD LÁTKY	VZOREC A NÁZEV
D.A	 <p><i>N</i>-(5-chloropyridin-2-yl)-3-(trifluormethyl)benzamid</p>
D.B	 <p><i>N</i>-(5-chloropyridin-2-yl)-2-(methoxy)benzamid</p>
D.C	 <p><i>N</i>-(5-chloropyridin-2-yl)-4-(ethyl)benzamid</p>

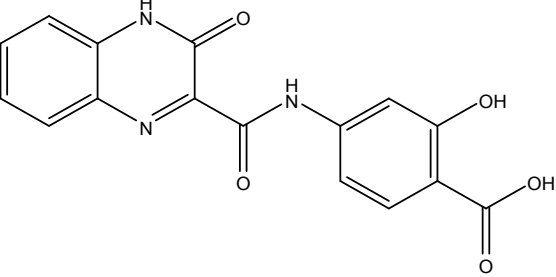
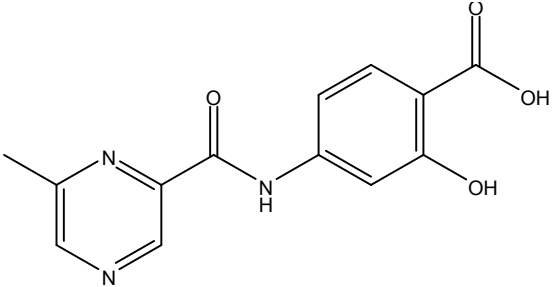
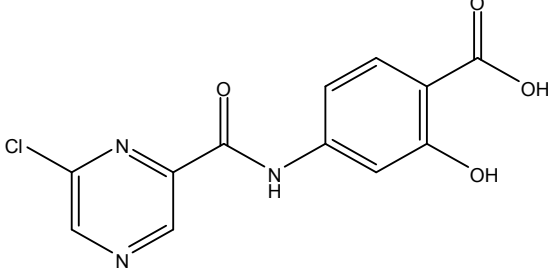
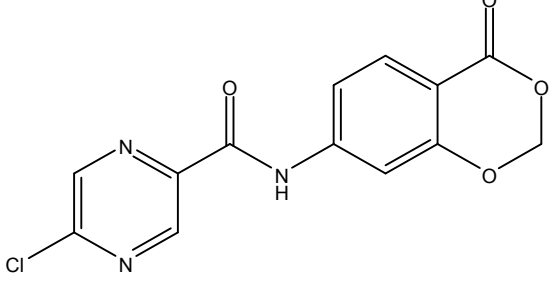
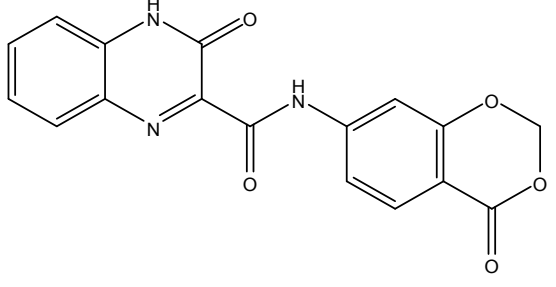
D.E	 <p><i>N</i>-(6-chloropyridin-2-yl)-2-(methoxy)benzamid</p>
D.F	 <p><i>N</i>-(6-chloropyridin-2-yl)-4-(ethyl)benzamid</p>
D.G	 <p><i>N</i>-(6-chloropyridin-2-yl)-3-(methoxy)benzamid</p>
D.H	 <p><i>N</i>-(6-chloropyridin-2-yl)-3-(trifluoromethyl)benzamid</p>
D.I	 <p><i>N</i>-(pyridin-2-yl)-3-(methoxy)benzamid</p>

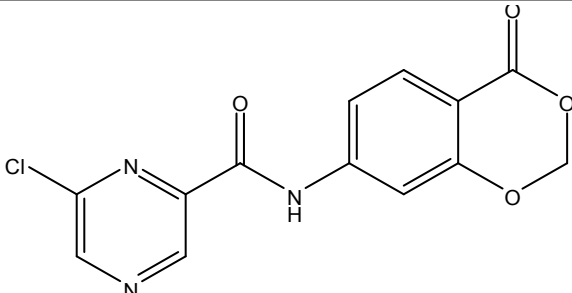
D.J	 <p style="text-align: center;"><i>N</i>-(pyridin-3-yl)-3-(methoxy)benzamid</p>
D.M	 <p style="text-align: center;"><i>N</i>-(pyridin-3-yl)-3-(trifluormethyl)benzamid</p>
D.P	 <p style="text-align: center;"><i>N</i>-(pyridin-3-yl)-4-(ethyl)benzamid</p>
D.S	 <p style="text-align: center;"><i>N</i>-(5-chloropyridin-2-yl)-2-(4-methoxyfenyl)acetamid</p>

Tabulka 5 – 2. skupina látek

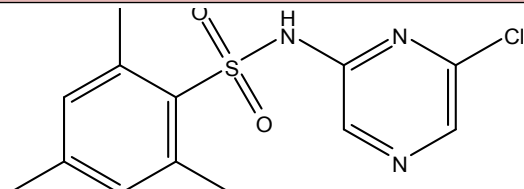
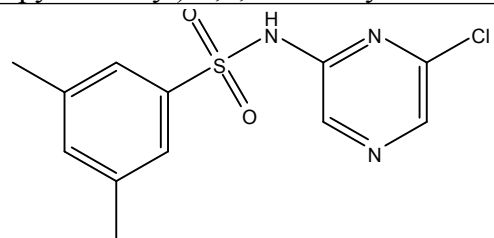
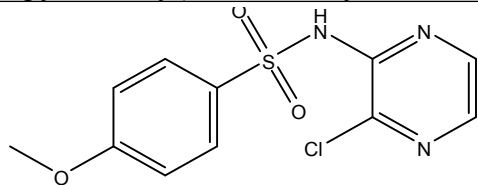
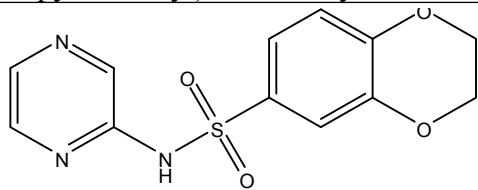
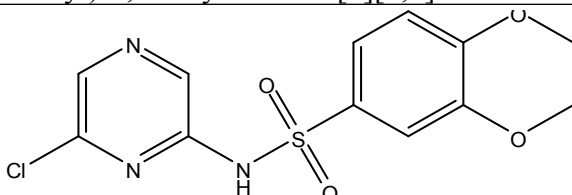
KÓD LÁTKY	VZOREC A NÁZEV
BBPS3.R	 <p style="text-align: center;">2-hydroxy-4-(imidazo[1,2-<i>a</i>]pyrazin-2-karboxamid)benzoová kyselina</p>

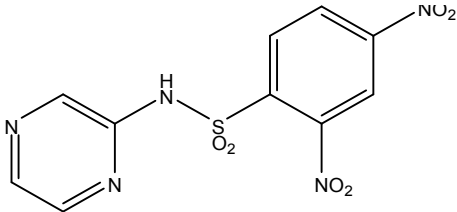
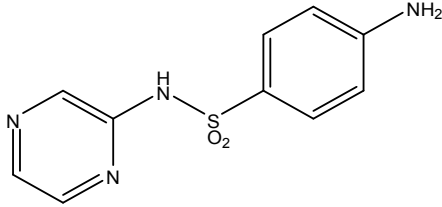
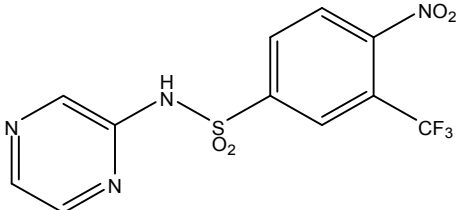
BBPS4	<p>4,4'-((pyrazin-2,3-dikarbonyl)bis(azanediy))bis(2-hydroxybenzoová kyselina)</p>
BBPS7	<p>4-(3-aminopyrazin-2-karboxamid)-2-benzoová kyselina</p>
BBPS8	<p>4-(3,5-dichlorpyrazin-2-karboxamid)-2-hydroxybenzoová kyselina</p>
BBPS9	<p>2-hydroxy-4-[(3-oxo-3,4-dihydropyrazin-2-yl)karbamoyl]benzoová kyselina</p>

BBPS10	 <p>2-hydroxy-4-(3-oxo-3,4-dihydroquinoxalin-2-karboxamid)benzoová kyselina</p>
BBPS12	 <p>2-hydroxy-4-(6-methylpyrazin-2-karboxamid)benzoová kyselina</p>
BBPS14	 <p>4-(6-chlorpyrazin-2-karboxamid)-2-hydroxybenzoová kyselina</p>
BBPS19.1 a BBPS19.2	 <p>5-chloro-<i>N</i>-(4-oxo-4<i>H</i>-benzo[<i>d</i>][1,3]dioxin-7-yl)pyrazin-2-karboxamid</p>
10CYC	 <p>3-oxo-<i>N</i>-(4-oxo-4<i>H</i>-benzo[<i>d</i>][1,3]dioxin-7-yl)-3,4-dihydroquinoxalin-2-karboxamid</p>

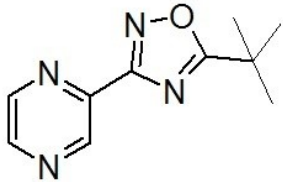
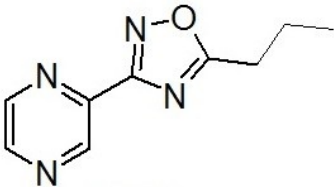
<p>14CYC neboli BBPS17</p>	 <p>6chloro-<i>N</i>-(4-oxo-4<i>H</i>-benzo[<i>d</i>][1,3]dioxin-7-yl)pyrazin-2- karboxamid</p>
--------------------------------	---

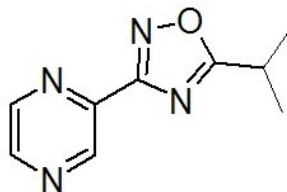
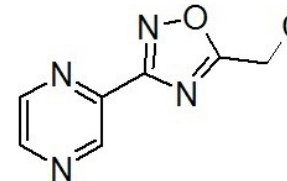
Tabulka 6 – 3. skupina látek

KÓD LÁTKY	VZOREC A NÁZEV
EM18C	 <p><i>N</i>-(6-chloropyrazin-2-yl)-2,4,6-trimethylbenzensulfonamid</p>
EM29	 <p><i>N</i>-(6-chloropyrazin-2-yl)-3,5-dimethylbenzensulfonamid</p>
EM32C	 <p><i>N</i>-(3-chloropyrazin-2-yl)-4-methoxybenzensulfonamid</p>
EM34C	 <p><i>N</i>-(pyrazin-2-yl)-2,3-dihydrobenzo[<i>b</i>][1,4]dioxin-6-sulfonamid</p>
EM35C	

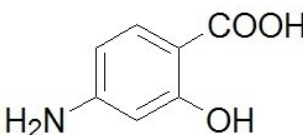
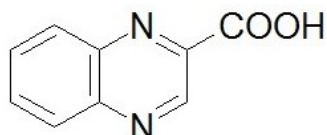
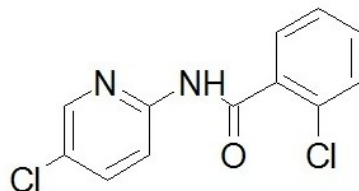
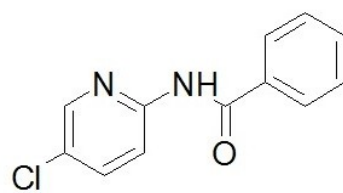
	<i>N</i> -(6-chlorpyrazin-2-yl)-2,3-dihydrobenzo[<i>b</i>][1,4]dioxin-6-sulfonamid
EM41R	 <p>2,4-dinitro-<i>N</i>-(pyrazin-2-yl)benzenesulfonamid</p>
EM42.1	 <p>4-amino-<i>N</i>-(pyridin-2-yl)benzenesulfonamid</p>
EM43R2	 <p>4-nitro-<i>N</i>-(pyrazin-2-yl)-3-(trifluormethyl)benzenesulfonamid</p>

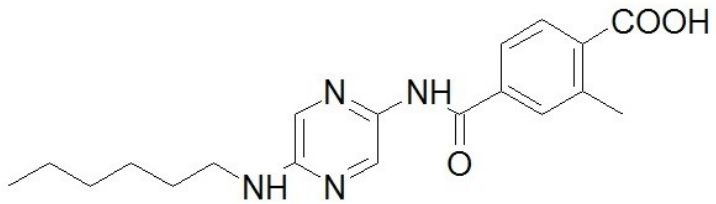
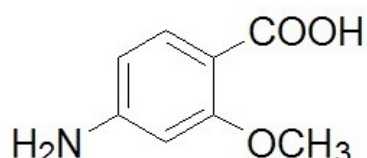
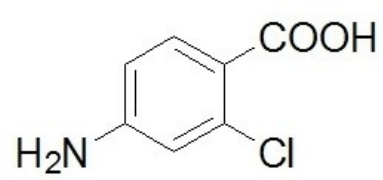
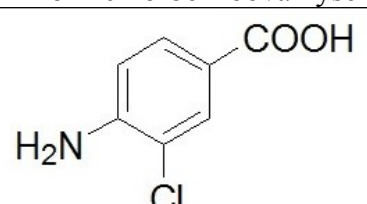
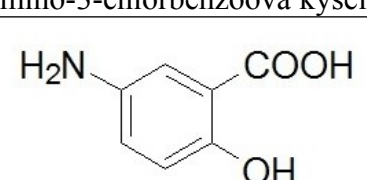
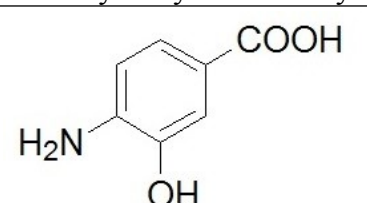
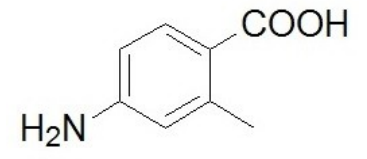
Tabulka 7 – 4. skupina látek

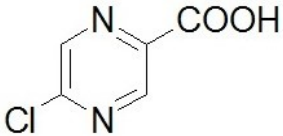
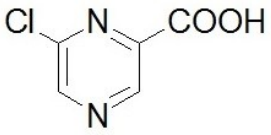
KÓD LÁTKY	VZOREC A NÁZEV
OX-0b	 <p>5-(<i>t</i>-butyl)-3-(pyrazin-2-yl)-1,2,4-oxadiazol</p>
OX-0d	 <p>5-propyl-3-(pyrazin-2-yl)-1,2,4-oxadiazol</p>

OX-0e	 <p>5-isopropyl-3-(pyrazin-2-yl)-1,2,4-oxadiazol</p>
OX-0g	 <p>5-(chloromethyl)-3-(pyrazin-2-yl)-1,2,4-oxadiazol</p>

Tabulka 8 – 5. skupina látek

KÓD LÁTKY	VZOREC A NÁZEV
PAS	 <p>4-amino-2-hydroxybenzoová kyselina</p>
QXA	 <p>chinoxalin-2-karboxylová kyselina</p>
JZ-EV1	 <p>2-chloro-N-(5-chlorpyridin-2-yl)benzamid</p>
JZ-EV2	 <p>N-(5-chlorpyridin-2-yl)benzamid</p>

JZ-OZ-14	 <p>4-[(5-(hexylamino)pyrazin-2-yl)karbamoyl]-2-methylbenzoová kyselina</p>
2-OCH3-PAB	 <p>4-amino-2-methoxybenzoová kyselina</p>
2-Cl-PAB	 <p>4-amino-2-chlorbenzoová kyselina</p>
3-Cl-PAB	 <p>4-amino-3-chlorbenzoová kyselina</p>
5-NH2-PAB	 <p>5-amino-2-hydroxybenzoová kyselina</p>
3-OH-PAB	 <p>4-amino-3-hydroxybenzoová kyselina</p>
2-CH3-PAB	 <p>4-amino-2-methylbenzoová kyselina</p>

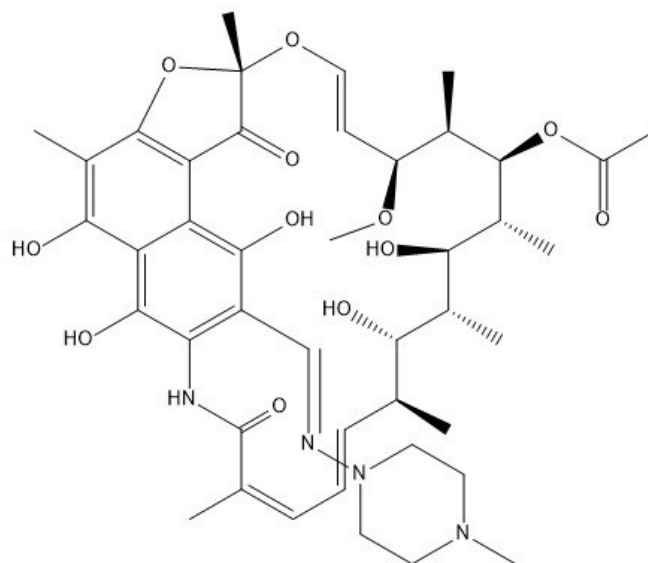
5-Cl-POA	 5-chloropyrazin-2-karboxylová kyselina
6-Cl-POA	 6-chloropyrazin-2-karboxylová kyselina

7.3.2 Standardy antituberkulotik

RFP

sumární vzorec: $C_{43}H_{58}N_4O_{12}$

molární hmotnost: 822,94 g/mol

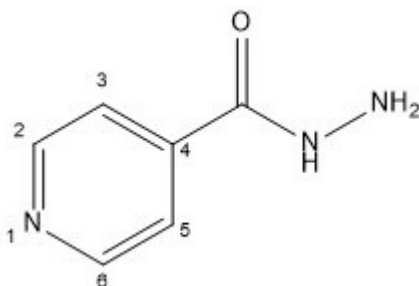


Obrázek 12 – Strukturní vzorec RFP

INH

sumární vzorec: $C_6H_7N_3$

molární hmotnost: 137,17 g/mol

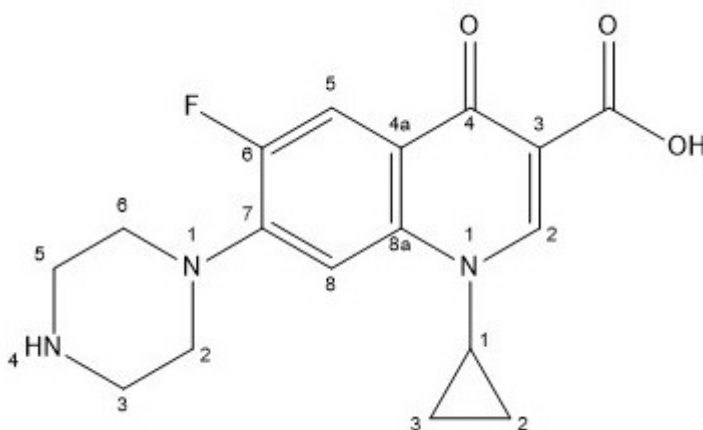


Obrázek 13 – Strukturální vzorec INH

CPX

sumární vzorec: $C_{17}H_{18}FN_3O_3$

molární hmotnost: 331,346 g/mol



Obrázek 14 – Strukturální vzorec CPX

7.4 LABORATORNÍ VYBAVENÍ

Přístroje:

- laminární box
- analytické váhy
- vortex
- denzitometr
- termostat
- centrifuga

Pomůcky:

- mikropipeta 50 μ l, 200 μ l, 5 ml
- 12ti kanálová pipeta
- mikrotitrační destičky s víčky
- laboratorní špičky
- korýtko
- ependorfky
- centrifugační zkumavky
- zkumavky
- stojánky na zkumavky a ependorfky
- fólie na destičky

Chemikálie:

- dimethylsulfoxid (DMSO)
- Middlebrook 7H9 bujón
- sterilní voda
- suspenze testovaných kmenů
- Alamar Blue

7.5 POSTUP TESTOVÁNÍ

1) Příprava látek

- látky dodané z katedry Farmaceutické chemie a farmaceutické analýzy a standardy se rozpustí ve vypočítaném množství DMSO podle vztahu:

$$\text{navážka v mg} \times 50 = ? \mu\text{l DMSO}$$

- promíchají se na vortexu do úplného rozpuštění nebo vytvoření homogenní suspenze, pokud se látka nechce rozpustit, naředí se ještě jednou stejným objemem DMSO (výsledná koncentrace léčivé látky bude o polovinu nižší)
- případně se přidají další 2 ekvivalenty rozpouštědla, pokud se látka nerozpustí ani tehdy, nepokračuje se v jejím testování
- tekutá látka se již dále neředí

2) Příprava roztoků sloučenin v bujónu

- z připravených roztoků látek v DMSO se odebere určité množství a doředí se bujónem na požadovanou koncentraci – pro standardy CPX a RFM se používá větší ředění z důvodu nižší MIC
 - RFM – 25 µl naředěného roztoku + 2,475 ml bujónu
 - CPX – 20 µl naředěného roztoku + 980 µl DMSO → 25 µl naředěného roztoku + 2,475 ml bujónu
 - INH – 50 µl naředěného roztoku + 450 µl bujónu
 - testované látky - 50 µl naředěného roztoku + 450 µl bujónu
- vše se důkladně promíchá na vortexu

3) Příprava destičky

- destička se popíše zkratkami testovaných látek, pozitivní a negativní kontrolou a kmenem, který bude na destičku použit
- do obvodových jamek destičky se napipetuje 300 µl sterilní H₂O, kvůli zábraně vysychání
- do sloupců 2-9 a 11 se napipetuje 100 µl bujónu
- do sloupce 10 se napipetuje 200 µl bujónu

4) Pipetování látek

- do druhého sloupce se napipetuje 100 µl dané látky v duplikátu (3 látky na destičku)
- provede se dvojkové ředění – napipetovaná látka se promíchá pomocí pipety s bujónem již připraveným v destičce, odebere se 100 µl promíchané látky s bujónem a přenese se do další jamky. Tento krok se provede v dalších sloupečcích až do sloupce 9. Z poslední jamky se 100 µl přenese do odpadu

5) Příprava suspenze

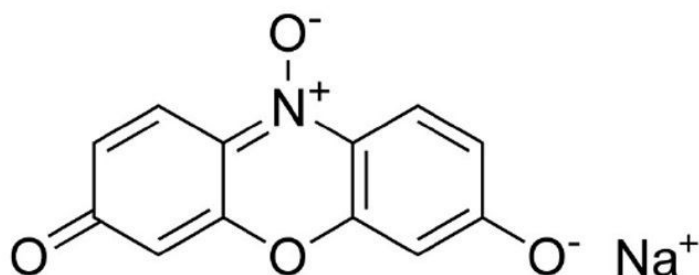
- suspenze se vytvoří z inokula příslušného bakteriálního kmene narostlého v bujónu (kultivace 48–72 hodin pro *M. smegmatis* a 96–120 hodin pro *M. aurum*)
- suspenze se stočí na centrifuze (4500 ot/min, 20 min), slije se bujón a peleta se rozsuspenduje v cca 4 ml čerstvého bujónu

- změní se optická denzita – hodnota 1,0 McFarlanda (0,6 bujónu + 1,0 suspenze → 1,6 výsledná hodnota)
- v případě potřeby se naředí bujónem
- pracovní suspenze se vytvoří naředěním – v poměru 1:20 (výsledný objem suspenze 42 ml)
- napipetuje se 100 µl výsledné suspenze do každé jamky mikrodestičky kromě negativní kontroly (sloupec číslo 10)

6) Inkubace

- destičky se zalepí fólií
- nechají se inkubovat při 37 °C – *M. smegmatis* 2 dny, *M. aurum* 3 dny
 - o po 2 dnech se zakapou destičky s *M. smegmatis* indikátorem Alamar Blue - 20 µl do každé jamky kromě vody, a odečítají se po 2,5 hodinách
 - o po 3 dnech se zakapou destičky s *M. aurum* indikátorem Alamar Blue – 20 µl do každé jamky kromě vody, a odečítají po 3–4 hodinách

7.6 HODNOCENÍ



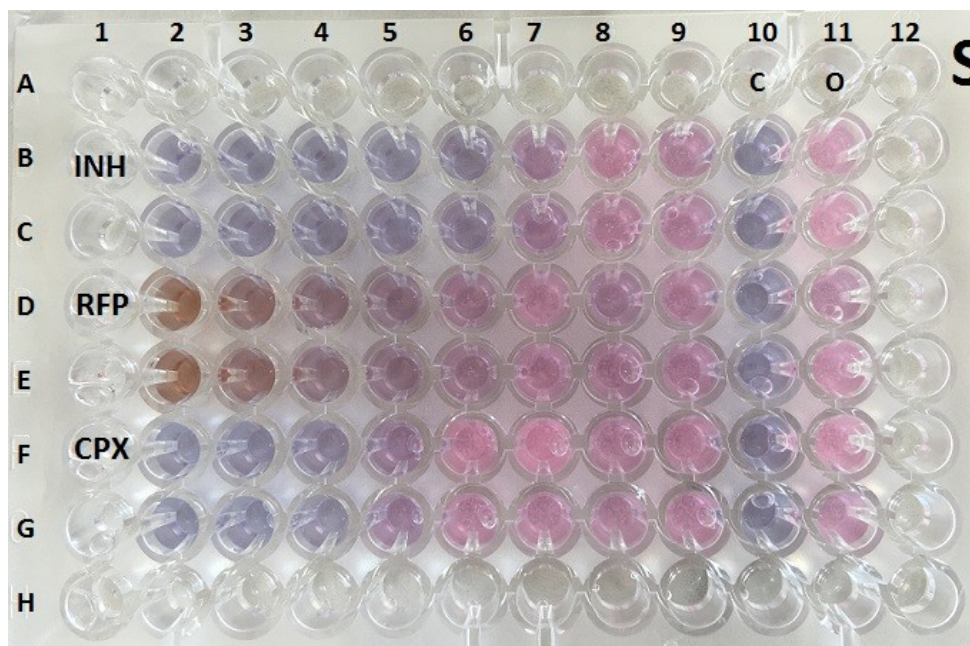
Obrázek 15 - Strukturní vzorec resazurinu ⁴⁷

Alamar Blue (resazurin nebo 7-hydroxy-10-oxidofenoxazin-10-ium-3-on) je modré fluorogenní barvivo používané jako redoxní indikátor ke stanovení životaschopnosti a proliferace bakterií, kvasinek a savčích buněk, jehož struktura je znázorněna na obr. 15. Po uplynutí inkubační doby a zakapání mikrotitrační destičky pro daný kmen, se vizuálně hodnotí změna barvy indikátoru, díky níž určíme MIC a tedy účinnost testované látky. Modré zbarvení v jamkách značí dostatečnou koncentraci

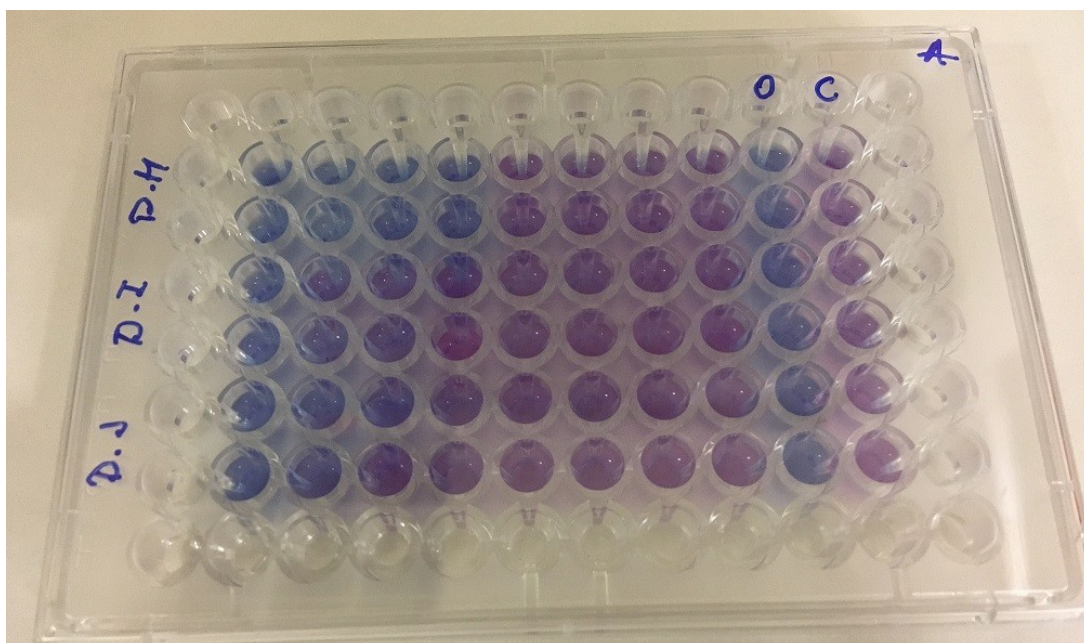
zkoumané látky a první jamka s růžovou barvou je brána jako nedostačující a neúčinná. Je potřeba kontrolovat, jestli v negativní kontrole růst není a v pozitivní naopak je. Výsledné zbarvení po inkubaci testovaných destiček je na obr. 16 a 17.⁴⁷

Modrá forma barviva je nevratně redukována enzymy v životaschopných buňkách za vzniku výrazně červeně fluoreskujícího produktu, resorufinu, který má emisní maximum při 595 nm. Změna je úměrná aerobní respiraci a je detekována průtokovou cytometrií, fluorimetricky, fluorescenční mikroskopií nebo vysoce účinnými screeningovými metodami. Resazurin je pro živé buňky minimálně toxický, proto je vhodný i pro dlouhodobé testování buněčných kultur.^{47, 48, 49, 50}

Barvivo se také využívá k testování L-glutamátu a k měření metabolické aktivity mitochondrií, kde je účinně redukován. Dalším použitím je jako indikátor oxidačně-redukčních reakcí v testu životaschopnosti buněk aerobního a anaerobního dýchání, kdy je při pH pod 3,8 oranžový a nad pH 6.5 fialový. Obecně je vhodný pro kolorimetrické a fluorescenční testy. Komerčně je dostupný jako sodná sůl.^{48, 49, 50, 51}



Obrázek 16 – Inkubovaná destička *M. smegmatis* s Alamar Blue pro standardy INH, RFM a CPX (zdroj autor práce)



Obrázek 17 – Inkubovaná destička M. aurum s Alamar Blue pro testované látky D.H, D.I, a D.J (zdroj autor práce)

8. VÝSLEDKY

Pro větší přehlednost výsledků byly látky rozděleny do pěti skupin + standardy. V tabulkách jsou vždy uvedeny MIC pro danou látku a testovaný kmen. Hodnoty s označením \geq tzn. „více nebo rovno“ značí, že je hodnota MIC větší než nejvyšší koncentrace látky a látka je v daném ředění neúčinná.

Tabulka 9 – Výsledky 1. skupiny testovaných látek

Označení	D.A	D.B	D.C	D.E	D.F	D.G
MIC <i>M. smeg.</i> ($\mu\text{g/mL}$)	15.625	250	≥ 500	≥ 500	15.625	62.5
MIC <i>M. aurum</i> ($\mu\text{g/mL}$)	31.25	≥ 500	≥ 500	≥ 500	250	62.5
Označení	D.H	D.I	D.J	D.M	D.P	D.S
MIC <i>M. smeg.</i> ($\mu\text{g/mL}$)	31.25	250	250	125	125	62.5
MIC <i>M. aurum</i> ($\mu\text{g/mL}$)	31.25	250	125	250	125	31.25

V tabulce č. 9 jsou výsledné MIC derivátů benzamidů a acetamidu, z nichž dobrou účinnost vykazovaly látky s kódy D.A, D.G, D.H a D.S. Látka D.F měla dobrou účinnost na kmen *M. smegmatis*, ale u *M. aurum* byla účinnost slabší. Slabší účinnost byla zaznamenána taky u látek D.B, D.I, D.J, D.M a D.P. Ostatní látky se jeví jako neúčinné.

Tabulka 10 – Výsledky 2. skupiny testovaných látek

Označení	BBPS3.R	BBPS4	BBPS7	BBPS8	BBPS9	BBPS10
MIC <i>M. smeg.</i> ($\mu\text{g/mL}$)	≥ 500	≥ 500	≥ 500	≥ 500	≥ 250	≥ 250
MIC <i>M. aurum</i> ($\mu\text{g/mL}$)	≥ 500	≥ 500	62.5	≥ 500	≥ 250	125
Označení	BBPS12	BBPS14	BBPS19.1	BBPS19.2	10CYC	14CYC /BBPS17
MIC <i>M. smeg.</i> ($\mu\text{g/mL}$)	≥ 500	≥ 500	≥ 250	≥ 500	≥ 250	≥ 500
MIC <i>M. aurum</i> ($\mu\text{g/mL}$)	250	125	≥ 250	≥ 500	≥ 250	≥ 500

Tabulka č. 10 obsahuje skupinu látek, které se v testování s *M. smegmatis* projeví jako neúčinné. V testech s *M. aurum* vykazovala dobrou účinnost pouze látka BBPS7 a slabou účinnost látky BBPS10, BBPS12 a BBPS14. Ostatní látky byly neúčinné. Látky BBPS9, BBPS10, BBPS19.1 a 10 CYC byly použity ve dvojnásobném ředění z důvodu horší rozpustnosti.

Tabulka 11 – Výsledky 3. skupiny testovaných látek

Označení	EM18C	EM29	EM32C	EM34C	EM35C	EM41R
MIC <i>M. smeg.</i> (µg/mL)	≥ 500	≥ 500	≥ 500	≥ 500	≥ 500	125
MIC <i>M. aurum</i> (µg/mL)	≥ 500	125	125	250	125	31.25
Označení	EM42.1	EM43R2				
MIC <i>M. smeg.</i> (µg/mL)	≥ 500	250				
MIC <i>M. aurum</i> (µg/mL)	250	250				

Z výsledků třetí skupiny látek obsažených v tabulce č. 11 je zřejmé, že MIC testovaných látek na *M. smegmatis* jsou většinou za hranicí účinnosti. Slabou účinnost projevily pouze látky EM41R a EM43R2. Nejúčinnější látkou v testech s *M. aurum* byla látka EM41R. Slabou účinnost projevily všechny zbývající látky, kromě EM18C, která se projevila jako neúčinná na obou mykobakteriálních kmenech.

Tabulka 12 – Výsledky 4. skupiny testovaných látek

Označení	OX-0b	OX-0d	OX-0e	OX-0g
MIC <i>M. smeg.</i> (µg/mL)	62.5	≥ 500	≥ 500	125
MIC <i>M. aurum</i> (µg/mL)	31.25	≥ 500	≥ 500	15.625

Tabulka č. 12 ukazuje 4 látky, z nichž jsou dvě neúčinné. Látka OX-0b je středně účinná na oba testované kmeny, OX-0g je vůči *M. aurum* účinná středně a vůči *M. smegmatis* pouze slabě.

Tabulka 13 – Výsledky 5. skupiny testovaných látek

Označení	PAS	QXA	JZ-EV1	JZ-EV2	JZ-OZ-14
MIC <i>M. smeg.</i> (µg/mL)	≥ 500	≥ 250	≥ 500	250	62.5
MIC <i>M. aurum</i> (µg/mL)	≥ 500	≥ 250	≥ 500	≥ 500	62.5
Označení	2-OCH3-PAB	2-Cl-PAB	5-NH2-PAB	3-OH-PAB	3-Cl-PAB
MIC <i>M. smeg.</i> (µg/mL)	≥ 500	≥ 500	≥ 500	≥ 500	≥ 500
MIC <i>M. aurum</i> (µg/mL)	≥ 500	≥ 500	250	125	250
Označení	2-CH3-PAB	6-Cl-POA	5-Cl-POA		
MIC <i>M. smeg.</i> (µg/mL)	≥ 500	≥ 500	≥ 500		
MIC <i>M. aurum</i> (µg/mL)	≥ 500	≥ 500	≥ 500		

V rámci páté skupiny (tabulka č. 13) bylo testováno 13 látek, z nichž bylo 8 neúčinných na oba mykobakteriální kmeny. Jediná látka JZ-OZ-14 byla po dvojnásobném naředění v obou případech účinná. Dvojnásobné ředění bylo taktéž provedeno u látky QXA.

Proti *M. smegmatis* už byla z této skupiny slabě účinná jen látka JZ-EV2. Na *M. aurum* byly dále slabě účinné látky 5-NH₂-PAB, 3-OH-PAB a 3-Cl-PAB.

Tabulka 14 – Výsledky testování standardů v sériích s látkami – 4 opakování

Označení	INH	RFM	CPX	INH	RFM	CPX
MIC <i>M. smeg.</i> (µg/mL)	15.625	12.5	0.03125	15.625	25	0.125
MIC <i>M. aurum</i> (µg/mL)	3.91	0.78	0.015625	3.91	0.78	0.015625
Označení	INH	RFM	CPX	INH	RFM	CPX
MIC <i>M. smeg.</i> (µg/mL)	15.625	12.5	0.03125	15.625	12.5	0.125
MIC <i>M. aurum</i> (µg/mL)	3.91	0.78	0.015625	3.91	0.39	0.015625

V tabulce č. 14 jsou výsledné hodnoty standardů – INH, RFM a CPX, které byly testovány v každé sérii. Jejich hodnoty odpovídají známé citlivosti. Zároveň lze na základě stejných výsledků (rozdíl max. 1 jamka) říct, že se systém chová standardně a výsledky jsou tak validní.

9. DISKUSE

Rezistence – jeden z největších problémů nejen mikrobiologie, přerůstá celosvětově ve velmi obtížně řešitelnou situaci. Každý člověk by si měl uvědomit vážnost této situace a nepodceňovat skutečnost, že problém rezistence není pouze teoretický, ale týká se nás všech. Pomyslný pocit bezpečí civilizovaného kontinentu Evropy, je čím dál více narušován, a se zvyšováním migrace se stejně tak zvyšuje i riziko nákazy nebezpečnými či méně známými nemocemi.

Pokud se má lidstvo chránit před vážnými, neznámými, zmutovanými či jinak nebezpečnými nemocemi, bude zapotřebí, aby se uchovala citlivost na co největší množství léčiv. V široké veřejnosti panuje často názor, že když přestane být jedno ATB účinné, začne se používat jiné nebo se vytvoří nové. Důkladnější osvěta populace je jedním z prvních a základních kroků, které by mohly pomoci k dodržování léčebných režimů, poslouchání lékaře, neinhibování účinku alkoholem či kontraindikovanými látkami, atd. Jak bylo již zmíněno v úvodu, lidé vědí, co je daná nemoc, ale pod jejím názvem si mimo odbornou veřejnost málokdo uvědomí vážnost onemocnění a jeho důsledky.

Vytvoření nového léku je velmi nákladný a zdlouhavý proces, který musí projít několika fázemi studií, než je umožněno aplikovat látku člověku a ani v této fázi ještě není vyhráno. I po vydání léku do oběhu se stále pozorují účinky, které nejsou vždy pozitivní. Každá osoba je individuální a individuální je i účinek látky na ni, proto je potřeba zvažovat klady i zápory, které léčba přináší i z důvodu neznámého mechanismu účinku látek.

Cílem této diplomové práce bylo otestovat 49 látek s potencionálně antimykobakteriálním účinkem. Testované vzorky byly syntetizovány na katedře Farmaceutické chemie a farmaceutické analýzy Farmaceutické fakulty Univerzity Karlovy. Co se týká výsledků testovaných látek, lze říci, že nejsou zrovna příznivé. Z celkového počtu látek bylo 21 prakticky neúčinných a pouze 5 látek vykazalo účinnost vůči *M. smegmatis* i *M. aurum*, jmenovitě látky D.A, D.G, D.H, D.S a OX-0b.

Jak je patrné z testování standardů – INH, RFM a CPX, větší citlivost vykazoval kmen *Mycobacterium aurum* oproti *M. smegmatis* a to i o několik řádů. Při nejnižší

koncentraci 0,015625 $\mu\text{g/mL}$ vykazoval citlivost *M. aurum* na CPX, *M. smegmatis* při koncentraci 0,03-0,125 $\mu\text{g/mL}$. Citlivost na RFM byl u *M. aurum* při koncentraci 0,78 $\mu\text{g/mL}$ a u *M. smegmatis* 12,5 $\mu\text{g/mL}$. Na INH byl *M. aurum* citlivý v koncentraci 3,91 $\mu\text{g/mL}$ a *M. smegmatis* při 15,625 $\mu\text{g/mL}$.

Pro lepší přehlednost byly testované látky rozděleny do pěti skupin podle chemické struktury a v rámci těchto skupin lze říci, že nejlepší účinnost byla zaznamenána v první skupině dvanácti derivátů benzamidů a acetamidu, u nichž byla zaznamenána dostatečná účinnost ve čtyřech případech. Všechny 4 látky obsahovaly ve své struktuře chlorpyridin-2-yl, což může být důvodem účinku. Zároveň byla společným znakem i substituce v poloze 3- a 4- fenylového jádra trifluormethylovou nebo methoxy skupinou. Kombinace těchto substitucí by mohla být zásadní pro účinnost a bylo by vhodné využít např. i další substituenty. K účinné MIC standardů se nejvíce přiblížila látka D.A, která inhibovala *M. aurum* 31,25 $\mu\text{g/mL}$ při a *M. smegmatis* 15,625 $\mu\text{g/mL}$. Látka D.F vykazala MIC pro *M. smegmatis* 15,625 $\mu\text{g/mL}$, což je dobrá účinnost, ale pro *M. aurum* byla tato hodnota až 250 $\mu\text{g/mL}$, což je již velice slabý účinek.

Druhou skupinu tvoří deriváty benzoové kyseliny a karboxamidu, u nichž nebyl skoro žádný účinek a jestliže se nějaký projevil, pak velmi slabý. Nejlepší MIC dosáhla látka BBPS7 s *M. aurum* 62,5 $\mu\text{g/mL}$, ale s *M. smegmatis* byla neúčinná. Díky malému počtu účinných sloučenin nelze vyvodit žádné závěry ohledně vztahů mezi strukturou a účinností (SAR).

Třetí skupinou jsou deriváty benzensulfonamidů a dioxinsulfonamidů. Z osmi látek projevily účinnost vůči *M. smegmatis* pouze 2 látky a to slabě. Nejúčinnější látka EM41R měla hodnotu MIC pro *M. smegmatis* 125 $\mu\text{g/mL}$ a pro *M. aurum* 31,25 $\mu\text{g/mL}$. Ostatní látky byly méně účinné. Zde platí stejný závěr ohledně SAR.

Čtvrtá skupina obsahuje 4 deriváty oxadiazolu. Látky OX-0d a OX-0e byly neúčinné. Látka OX-0b měla MIC pro *M. smegmatis* 62,5 $\mu\text{g/mL}$ a pro *M. aurum* 31,25 $\mu\text{g/mL}$. A látka OX-0g měla MIC pro *M. smegmatis* 125 $\mu\text{g/mL}$, ale pro *M. aurum* dokonce 15,625 $\mu\text{g/mL}$. Svůj vliv na účinnost měl typ použitých substituentů, jelikož poloha na oxadiazolu je stejná. Použitý *t*-butyl byl už dříve úspěšně využit ke zvýšení aktivity – zvýšení lipofility, ideální konformace pro obsazení vazebných míst,...

Poslední skupinu tvoří deriváty benzoové kyseliny, karboxylové kyseliny a benzamidů. Většina látek se využila jako výchozí suroviny pro syntézu nových sloučenin, jako např. látka JZ-OZ-14. Z 13 látek této skupiny bylo 8 neúčinných na oba testované kmeny. Látka JZ-OZ-14 byla jako jediná účinná na *M. smegmatis* i *M. aurum* při MIC 62,5 µg/mL po dvojitým ředění. Na *M. aurum* byly dále slabě účinné látky 5-NH₂-PAB, 3-OH-PAB a 3-Cl-PAB. A na *M. smegmatis* byla lehce účinná látka JZ-EV2.

Z mnoha důvodů, které již byly v práci řečeny, se pro testování používají jiné než tuberkulózní kmeny, proto se taktéž může lišit účinnost vyvozená tímto výzkumem od účinnosti na kmenu *M. tuberculosis* i samotného původce nemoci. S látkami s prokázanou účinností by bylo vhodné na testování navázat s kmenem *M. tuberculosis*.

Svou úlohu, samozřejmě, při testování mohl hrát i lidský faktor, nesprávné odečtení výsledku není pravděpodobné, ale výsledné hodnocení každé sloučeniny je vždy individuální v rámci jejích dalších účinků např. toxicity, proto dobrá účinnost v prvotním testování ještě nemusí znamenat úspěch v léčbě.

10. ZÁVĚR

V této diplomové práci bylo otestováno 49 látek s potenciálním antimykobakteriálním účinkem mikrodiluční bujónovou metodou na katedře Biologických a lékařských věd Farmaceutické fakulty Univerzity Karlovy v Praze.

Z celkového počtu látek pouze 5 vykazalo dobrou účinnost na obou testovaných kmenech – *Mycobacterium aurum* a *Mycobacterium smegmatis*.

Z pěti skupin látek měla nejlepší účinnost první skupina derivátů benzamidů a acetamidu. Jako nejúčinnější látka se hodnotami MIC projevil *N*-(5-chlorpyridin-2-yl)-3-(trifluormethyl)benzamid s dobrou účinností na oba mykobakteriální kmeny.

Nejméně účinné se projevíly druhá a pátá skupina látek. Druhou skupinu tvoří deriváty benzoové kyseliny a karboxamidu a pátou skupinu tvoří deriváty benzoové kyseliny, karboxylové kyseliny a benzamidů.

Z použitých mykobakteriálních kmenů byl *M. smegmatis* mnohem méně citlivý než *M. aurum*, ale ve srovnání s hodnotami standardů jsou takovéto hodnoty odpovídající.

Pro potvrzení výsledků by se mělo testování opakovat, aby se vyloučily vlivy vnějších faktorů.

S určitostí nelze vyslovit závěr o tom, jestli je očekávaný antimykobakteriální účinek dostatečný. K potvrzení či vyvrácení účinnosti těchto látek by bylo potřeba provést rozsáhlejších výzkumů.

11. SEZNAM TABULEK

Tabulka 1 - Několik států světa s vysokým výskytem TBC k lednu 2019 dle WHO ⁸ ...	14
Tabulka 2 – Původní řazení antituberkulotik podle terapeutické účinnosti ^{26,28}	29
Tabulka 3 – Schéma léků užívaných k léčbě RFM rezistentní a multirezistentní TBC od roku 2018 ³⁰	31
Tabulka 4 – 1. skupina látek.....	44
Tabulka 5 – 2. skupina látek.....	47
Tabulka 6 – 3. skupina látek.....	49
Tabulka 7 – 4. skupina látek.....	51
Tabulka 8 – 5. skupina látek.....	52
Tabulka 9 – Výsledky 1. skupiny testovaných látek.....	61
Tabulka 10 – Výsledky 2. skupiny testovaných látek.....	61
Tabulka 11 – Výsledky 3. skupiny testovaných látek.....	62
Tabulka 12 – Výsledky 4. skupiny testovaných látek.....	62
Tabulka 13 – Výsledky 5. skupiny testovaných látek.....	62
Tabulka 14 – Výsledky testování standardů v sériích s látkami – 4 opakování.....	63

12. SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1 - Globální trendy v odhadovaném počtu incidence a úmrtnosti na TBC ⁴	12
Obrázek 2 - Odhadovaná incidence výskytu TBC v roce 2017 ⁴	13
Obrázek 3 - Předpokládaná křivka incidence a mortality, které jsou nezbytné pro dosažení "End TB" v průběhu let 2015-2035 ⁴	16
Obrázek 4 - Grampozitivní mykobakteriální tyčinky ¹³	17
Obrázek 5 - Mykobakterie na Löwenstein-Jensenově půdě ³	19
Obrázek 6 - RTG diseminované makronodulární plicní TBC ²³	25
Obrázek 7 - Mykobakterie obarveny podle Ziehl Neelsena pod mikroskopem ²⁴	25
Obrázek 8 - Mycobacterium tuberculosis pod fluorescenčním mikroskopem, zvětšení 400x, barvení auramin-rhodamin ²⁵	26
Obrázek 9 - Disková difúzní metoda a bujónová mikrodiluční metoda ⁴⁰	40
Obrázek 10 – Mycobacterium aurum na Middlebrook 7H9 agaru použitý v testování (zdroj autor práce).....	42
Obrázek 11 – Mycobacterium smegmatis na Middlebrook 7H9 agaru použitý v testování (zdroj autor práce).....	43
Obrázek 12 – Strukturní vzorec RFM.....	54
Obrázek 13 – Strukturní vzorec INH.....	55
Obrázek 14 – Strukturní vzorec CPX.....	55
Obrázek 15 - Strukturní vzorec resazurinu ⁴⁷	58
Obrázek 16 – Inkubovaná destička M. smegmatis s Alamar Blue pro standardy INH, RFM a CPX (zdroj autor práce).....	59
Obrázek 17 – Inkubovaná destička M. aurum s Alamar Blue pro testované látky D.H, D.I, a D.J (zdroj autor práce).....	60

13. POUŽITÁ LITERATURA

1. ZEMANOVÁ, I. 24. březen 2018 – Světový den tuberkulózy, World TB Day. *Státní zdravotní ústav* [online]. Praha, 2018 [cit. 2019-01-25]. Dostupné z: <http://www.szu.cz/tema/prevence/24-brezen-2018-svetovy-den-tuberkulozy-world-tb-day>
2. BUCHTA, V. *Základy mikrobiologie a parazitologie pro farmaceuty*. Praha: Karolinum, 1998, 192 s. Učební texty Univerzity Karlovy v Praze. ISBN 80-7184-565-5.
3. TODAR, K. *Mycobacterium tuberculosis and Tuberculosis. Todar's Online Textbook of Bacteriology* [online]. Madison, Wisconsin, 2012 [cit. 2018-12-27]. Dostupné z: <http://textbookofbacteriology.net/tuberculosis.html>
4. *Global Tuberculosis Report 2018* [online]. Geneva: World Health Organization, 2018 [cit. 2019-02-02]. ISBN 978-92-4-156564-6. Dostupné z: <http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/274453/9789241565646-eng.pdf?ua=1>
5. Tuberkulóza. *Lékaři bez hranic: Médecins Sans Frontières in Czech Republic* [online]. Praha, 2018 [cit. 2019-01-26]. Dostupné z: <https://www.lekari-bez-hranic.cz/tuberkuloza>
6. HOMOLKA, J. a V. VOTAVA. *Tuberkulóza*. 4., upr. vyd. Praha: Univerzita Karlova v Praze, nakladatelství Karolinum, 2012, 74 s. Učební texty Univerzity Karlovy v Praze. ISBN 978-80-246-2070-1.
7. Tuberculosis. *World Health Organization* [online]. Geneva, 2018 [cit. 2019-01-09]. Dostupné z: https://www.who.int/gho/tb/tb_text/en/
8. FABIÁNOVÁ, K. Země s vyšším výskytem tuberkulózy aktualizace leden 2019. *Státní zdravotní ústav* [online]. Praha, 2019 [cit. 2019-02-20]. Dostupné z: <http://szu.cz/tema/vakciny/zeme-s-vyssim-vyskytem-tuberkulozy>
9. Registr tuberkulózy (RTBC). *Ústav zdravotnických informací a statistiky České republiky* [online]. Praha [cit. 2019-01-12]. Dostupné z: <https://www.uzis.cz/registry/organu-ochrany-verejneho-zdravi/registr-tuberkulozy>
10. Základní přehled epidemiologické situace ve výskytu tuberkulózy v České republice v roce 2017. In: *Ústav zdravotnických informací a statistiky České republiky* [online]. Praha, 2018 [cit. 2019-01-25]. Dostupné z: http://www.uzis.cz/system/files/tbc2017_cz.pdf

11. *World health statistics 2018: monitoring health for the SDGs, sustainable development goals* [online]. Geneva: World Health Organization, 2018 [cit. 2019-02-15]. ISBN 978-92-4-156558-5. Dostupné z: <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/272596/9789241565585-eng.pdf?ua=1>
12. HRNČÍŘOVÁ, K. *Příprava rekombinantních glykosyltransferas z Mycobacterium tuberculosis* [online]. Brno, 2006 [cit. 2019-03-26]. Dostupné z: https://is.muni.cz/th/faggw/k_hrnairova_dp_2006.txt Diplomová práce. Masarykova univerzita, Přírodovědecká fakulta.
13. Tuberkulóza – stále známý nepriateľ. In: *Alpha medical* [online]. Martin, 2016 [cit. 2019-02-20]. Dostupné z: https://www.alphamedical.sk/files/styles/article_image_detail/public/2015_04_tuberkuloza-1.jpg?itok=S3uRDy0y
14. SCHARFEN, J. *Diferenciální diagnostika v klinické mikrobiologii*. Praha: Nucleus HK, 2013, 223 s. Mikrobiologie. ISBN 978-80-87009-32-1.
15. GREENWOOD, D., PEUTHERER J. F. a R. C. B. SLACK. *Lékařská mikrobiologie: přehled infekčních onemocnění: patogenese, imunita, laboratorní diagnostika a epidemiologie*. Vyd. 1. české. Praha: Grada, 1999, 686 s. ISBN 80-7169-365-0.
16. BEDNÁŘ, M. *Lékařská mikrobiologie: bakteriologie, virologie, parazitologie*. Praha: Marvil, 1999, 558 s.
17. SOLOVIČ, I. Mykobakteriózy vyvolané netuberkulóznými mykobaktériami – poznatky pre klinickú prax. *Dermatológia pre prax* [online]. Ružomberok, 2018, **12**(1), 26-30 [cit. 2019-01-07]. Dostupné z: <http://www.solen.sk/pdf/9dcf9775585848d165717553e2a86c93.pdf>
18. *Doporučené standardní metody v mikrobiologii mykobakteriálních infekcí*. Praha: Národní referenční laboratoř pro mykobaktérie, 1998, 48 s. ISBN 80-7071-109-4.
19. VOTAVA, M. *Lékařská mikrobiologie: vyšetřovací metody*. Brno: Neptun, 2010, 495 s. ISBN 978-80-86850-04-7.
20. DHANDAYUTHAPANI, S., ZHANG Y., MUDD M. H. a V. DERETIC. Oxidative stress response and its role in sensitivity to isoniazid in mycobacteria: characterization and inducibility of ahpC by peroxides in Mycobacterium smegmatis and lack of expression in M. aurum and M. tuberculosis. *Journal of Bacteriology*. 1996, **178**(12), 3641-3649. DOI: 10.1128/jb.178.12.3641-3649.1996. ISSN 0021-9193. Dostupné také z: <http://jb.asm.org/lookup/doi/10.1128/jb.178.12.3641-3649.1996>
21. JIREŠ, J. *Albertinum: boj proti tuberkulóze a jiným nemocem*. Hradec Králové: ECC Servis, 2005, 111 s. ISBN 80-86857-03-4.

22. KUBÍN, M. *Vyšetřovací metody u mykobakteriálních infekcí*. Praha: Avicenum, 1986, 122 s. Mikrobiologické vyšetřovací metody.
23. Hrudník, PA projekce. In: *Univerzita Karlova v Praze, 3. Lékařská fakulta* [online]. Praha [cit. 2019-02-27]. Dostupné z: <http://katalog.lf3.cuni.cz/katalog/items/25-full.jpg>
24. Barvení acidorezistentních bakterií. *Ústav laboratorní diagnostiky* [online]. Praha [cit. 2019-02-06]. Dostupné z: <http://mikrobiologie.lf3.cuni.cz/bak/uceb/obsah/ziehl/ziehl.htm>
25. Auramine-Rhodamine Staining for AFB : Principle, Procedure, Reporting and Limitations. *Laboratory info*[online]. 2019 [cit. 2019-04-21]. Dostupné z: <https://laboratoryinfo.com/wp-content/uploads/2016/01/auramine-rhodamine-staining-afb.jpg>
26. BÁRTŮ, V. Tuberkulóza a její rezistentní formy. *Interní medicína pro praxi* [online]. Praha: Pneumologická klinika, Fakultní Thomayerova nemocnice Praha, 2007, 9(9), 372-373 [cit. 2019-02-06]. Dostupné z: <https://www.internimedcina.cz/pdfs/int/2007/09/02.pdf>
27. TODAR, K. Bacterial Resistance to Antibiotics. *Todar's Online Textbook of Bacteriology*[online]. Madison, Wisconsin, 2012 [cit. 2018-12-26]. Dostupné z: <http://textbookofbacteriology.net/resantimicrobial.html>
28. TERAPIE – LÉKY DRUHÉ LINIE, PREVENCE. *Vzdělávání zdravotníků* [online]. [cit. 2019-03-22]. Dostupné z: https://www.ipvz.cz/e-kurzy/2015/bakterialni_infekce/23727.html
29. PHELAN, J., MAITRA A., MCNERNEY R., NAIR, M., GUPTA, A., COLL, F., PAIN, A., BHAKTA, S., a T. G. CLARK. The draft genome of *Mycobacterium aurum*, a potential model organism for investigating drugs against *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium leprae*. *International Journal of Mycobacteriology*. 2015, 4(3), 207-216. DOI: 10.1016/j.ijmyco.2015.05.001. ISSN 22125531. Dostupné také z: <http://www.ijmyco.org/article.asp?issn=2212-5531;year=2015;volume=4;issue=3;spage=207;epage=216;aulast=Phelan>
30. Second Line Drugs - Fluoroquinolones, second line injectable drugs. *Kanabus, Annabel "Information about Tuberculosis"* [online]. England: GHE, 2018 [cit. 2019-03-01]. Dostupné z: <https://www.tbfacts.org/second-line-drugs/>
31. FIELD, S. K. Bedaquiline for the treatment of multidrug-resistant tuberculosis: great promise or disappointment?. *Therapeutic Advances in Chronic Disease*. 2015, 6(4), 170-184. DOI: 10.1177/2040622315582325. ISSN 2040-6223. Dostupné také z: <http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/2040622315582325>
32. New TB drugs - Trials, bedaquiline, delamanid, Pretomanid (PA-824). *Kanabus, Annabel "Information about Tuberculosis"* [online]. England: GHE, 2018 [cit. 2019-03-01]. Dostupné z: <https://www.tbfacts.org/new-tb-drugs/>

33. NAMOUCHI, A., CIMINO, M., FAVRE-ROCHEX, S., CHARLES, P. a B. GICQUEL. Phenotypic and genomic comparison of *Mycobacterium aurum* and surrogate model species to *Mycobacterium tuberculosis*: implications for drug discovery. *BMC Genomics*. 2017, **18**(1). DOI: 10.1186/s12864-017-3924-y. ISSN 1471-2164. Dostupné také z: <http://bmcgenomics.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12864-017-3924-y>
34. SQ109. *Working Group on New TB Drugs* [online]. New York, 2017 [cit. 2019-03-22]. Dostupné z: <https://www.newtbdrugs.org/pipeline/compound/sq109>
35. New Tuberculosis Drug May Shorten Treatment Time for Patients. *The American Society for Microbiology* [online]. Washington, 2019 [cit. 2019-04-01]. Dostupné z: <https://www.asm.org/Press-Releases/2019/February/New-Tuberculosis-Drug-May-Shorten-Treatment-Time-f>
36. FERNANDES, G., MAN CHIN, Ch. a J. DOS SANTOS. Advances in Drug Discovery of New Antitubercular Multidrug-Resistant Compounds. *Pharmaceuticals*. 2017, **10**(4). DOI: 10.3390/ph10020051. ISSN 1424-8247. Dostupné také z: <http://www.mdpi.com/1424-8247/10/2/51>
37. Tuberculosis Drugs Work Better With Vitamin C. *The American Society for Microbiology* [online]. Washington, 2018 [cit. 2019-04-01]. Dostupné z: <https://www.asm.org/Press-Releases/tuberculosis-drugs-work-better-with-vitamin-c>
38. VOTAVA, M. *Lékařská mikrobiologie II: přehled vyšetřovacích metod v lékařské mikrobiologii*. Brno: Masarykova univerzita, 2000, 309 s. ISBN 80-210-2272-8.
39. Diskový difúzní test. *Ústav laboratorní diagnostiky* [online]. Praha [cit. 2019-02-05]. Dostupné z: <http://mikrobiologie.lf3.cuni.cz/bak/uceb/obsah/disktest/disktest.htm>
40. MELTER, O. a A. MALMGREN. *Principy a praktika lékařské mikrobiologie*. Praha: Karolinum, 2014. ISBN 978-80-246-2414-3.
41. Diluční metoda. *Ústav laboratorní diagnostiky* [online]. Praha [cit. 2019-03-25]. Dostupné z: <http://mikrobiologie.lf3.cuni.cz/bak/uceb/obsah/mic/mic.htm>
42. Minimální inhibiční koncentrace. *Velký lékařský slovník* [online]. Praha [cit. 2019-01-25]. Dostupné z: <http://lekarske.slovniky.cz/pojem/minimalni-inhibicni-koncentrace>
43. GORDON, R. E., a M. M. SMITH. Rapidly growing, acid fast bacteria. I. Species' descriptions of *Mycobacterium phlei* Lehmann and Neumann and *Mycobacterium smegmatis* (Trevisan) Lehmann and Neumann. 1953 *Journal of bacteriology*, **66**(1), 41–48. [PMC357089](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/13069464/), PMID: [13069464](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/13069464/)

44. KING, G. M. Uptake of Carbon Monoxide and Hydrogen at Environmentally Relevant Concentrations by Mycobacteria. *Applied and Environmental Microbiology*. 2003, **69**(12), 7266-7272. DOI: 10.1128/AEM.69.12.7266-7272.2003. ISSN 0099-2240. Dostupné také z: <http://aem.asm.org/cgi/doi/10.1128/AEM.69.12.7266-7272.2003>
45. RAMANIUK, V. *Růst Mycobacterium smegmatis na agarovém médiu a agarovém médiu pokrytém celofánovou folií – morfologická a proteomová studie* [online]. 2012 [cit. 2019-01-29]. Dostupné z: <https://is.cuni.cz/webapps/zzp/download/120098772/?lang=cs>. Diplomová práce. Univerzita Karlova, Přírodovědecká fakulta.
46. Mycobacterium smegmatis. *MicrobeWiki* [online]. Gambier, Ohio, 2011 [cit. 2019-03-26]. Dostupné z: https://microbewiki.kenyon.edu/index.php?title=Mycobacterium_smegmatis&oldid=61380
47. Resazurin (Sodium Salt). *Stemcell Technologies* [online]. Vancouver [cit. 2019-02-16]. Dostupné z: <https://www.stemcell.com/resazurin-sodium-salt.html>
48. Resazurin. In: *Wikipedia: the free encyclopedia* [online]. San Francisco (CA): Wikimedia Foundation, 2019 [cit. 2019-02-26]. Dostupné z: <https://en.wikipedia.org/wiki/Resazurin>
49. CHEN, J. L., STEELE, T. W. J. a D. C. STUCKEY. *Modeling and Application of a Rapid Fluorescence-Based Assay for Biotoxicity in Anaerobic Digestion*. 2015, **49**(22), 13463-13471. DOI: 10.1021/acs.est.5b03050. ISSN 0013-936X. Dostupné také z: <http://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.est.5b03050>
50. ANOOPKUMAR-DUKIE, S., CAREY, J. B. , CONERE, T., O'SULLIVAN, E., VAN PELT, F. N. a A. ALLSHIRE. Resazurin assay of radiation response in cultured cells. *The British Journal of Radiology*. 2005, **78**(934), 945-947. DOI: 10.1259/bjr/54004230. ISSN 0007-1285. Dostupné také z: <http://www.birpublications.org/doi/10.1259/bjr/54004230>
51. GONZÁLEZ-PINZÓN, R., HAGGERTY, R., MYROLD, D. D., O'SULLIVAN, E., VAN PELT, F. N. a A. ALLSHIRE. Measuring aerobic respiration in stream ecosystems using the resazurin-resorufin system. *Journal of Geophysical Research: Biogeosciences*. 2012, **117**(G3), n/a-n/a. DOI: 10.1029/2012JG001965. ISSN 01480227. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1029/2012JG001965>