

Univerzita Karlova

Pedagogická fakulta

Katedra biologie a environmentálních studií

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Rezistence bakterií na antibiotika

Bacterial Resistance to Antibiotics

Lucie Morávková

Vedoucí práce: RNDr. Lenka Pavlasová, Ph.D.

Studijní program: Biologie, geologie a environmentalistika se zaměřením na
vzdělávání (B0114A030006)

Studijní obor: B BI-CH 20 (0114RA030006, 0114RA130005)

Odevzdáním této bakalářské práce na téma Rezistence bakterií na antibiotika potvrzuji, že jsem ji vypracovala pod vedením vedoucího práce samostatně za použití v práci uvedených pramenů a literatury. Dále potvrzuji, že tato práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

Praha, 2024

Ráda bych poděkovala především RNDr. Lence Pavlasové, Ph.D. za její velkou ochotu, vřelý přístup a cenné rady, které mi s prací velmi pomohly. Dále bych ráda poděkovala své rodině a přátelům za jejich podporu a trpělivost.

ABSTRAKT

Bakalářská práce je zaměřena na neustále se vyvíjející problematiku vzrůstající míry bakteriální rezistence na antibiotika, která je jedním z největších problémů moderní medicíny. Hlavním cílem je popis vzniku, šíření a funkcí jednotlivých mechanismů rezistence, které bakterie k obraně před antibiotiky využívají. Dále práce zmiňuje jednotlivé typy rezistence a objasňuje pojmy, které se na toto hlavní téma úzce pojí. Práce se také zabývá metodami zaměřenými na zábranu vzniku či na eliminaci bakterií, odolných vůči antibiotikům, a infekcí, které tyto bakterie způsobují.

KLÍČOVÁ SLOVA

Bakterie, antibiotikum, rezistence

ABSTRACT

The thesis focuses on a persistently developing issue of a rising bacteria resistance to antibiotics rate which is one of the major problems of modern medicine. The main goal is a description of origin, proliferation, and individual resistance mechanisms functions which bacteria utilize for defence against antibiotics. Furthermore, the thesis mentions individual resistance types and clarifies terms which are closely associated with the main topic. The thesis also deals with methods focused on an inhibition of creation or elimination of bacteria, resistant to antibiotics, and infections which are caused by the above mentioned bacteria.

KEYWORDS

Bacterium, antibiotics, resistance

Obsah

| | |
|---|----|
| Úvod | 9 |
| 1 Bakterie..... | 11 |
| 1.1 Morfologie bakteriální buňky | 11 |
| 1.1.1 Cytoplazmatická membrána | 11 |
| 1.1.2 Buněčná stěna..... | 11 |
| 1.1.3 Membránové vezikuly | 14 |
| 1.1.4 Fimbrie..... | 17 |
| 1.1.5 Poriny..... | 18 |
| 1.1.6 Efluxní pumpy | 18 |
| 1.1.7 Extracelulární vrstvy..... | 19 |
| 1.2 Genetika bakteriální buňky | 19 |
| 1.2.1 Plazmidy | 20 |
| 1.2.2 Transpozony | 21 |
| 1.2.3 Genové ostrovy a genové kazety | 21 |
| 1.2.4 Intergony | 22 |
| 1.2.5 ISCR | 22 |
| 2 Antibiotika | 24 |
| 2.1 Antibiotika a chemoterapeutika | 24 |
| 2.2 Farmakologie antibiotik | 25 |
| 2.3 Dělení antibiotik..... | 25 |
| 2.3.1 Antibiotika podle šíře účinnosti..... | 25 |
| 2.3.2 Antibiotika podle intenzity působení..... | 26 |
| 2.3.3 Antibiotika podle chemické struktury | 27 |
| 2.3.4 Antibiotika podle mechanismu působení | 27 |

| | | |
|-------|---|----|
| 3 | Citlivost bakterií vůči antibiotikům | 28 |
| 3.1 | Metody pro určení citlivosti bakterií..... | 28 |
| 3.1.1 | Kvalitativní stanovení bakteriální citlivosti..... | 28 |
| 3.1.2 | Kvantitativní stanovení bakteriální citlivosti..... | 29 |
| 3.2 | Účinek antibiotik na bakterie | 31 |
| 3.2.1 | Subinhibiční účinek antibiotik..... | 31 |
| 4 | Bakteriální rezistence vůči antibiotikům | 33 |
| 4.1 | Přirozená bakteriální rezistence vůči antibiotikům..... | 33 |
| 4.2 | Získaná bakteriální rezistence vůči antibiotikům | 33 |
| 4.3 | Mechanismy bakteriální rezistence vůči antibiotikům | 35 |
| 4.3.1 | Modifikace cílové struktury..... | 35 |
| 4.3.2 | Inhibice přístupu antibiotika k cílovému místu | 36 |
| 4.3.3 | Aktivní transport antibiotik z bakteriální buňky..... | 36 |
| 4.3.4 | Enzymatická inaktivace antibiotika..... | 37 |
| 4.3.5 | Vytvoření cílových míst v nadbytku | 38 |
| 4.3.6 | Náhrada zablokované metabolické dráhy..... | 38 |
| 4.3.7 | Zábrana aktivace antibiotika..... | 39 |
| 4.4 | Přenos bakteriálního genetického materiálu | 39 |
| 4.4.1 | Vertikální přenos bakteriálního genetického materiálu..... | 39 |
| 4.4.2 | Horizontální přenos bakteriálního genetického materiálu..... | 39 |
| 5 | Bakteriální multirezistence vůči antibiotikům..... | 42 |
| 6 | Bakteriální extenzivní rezistence vůči antibiotikům a panrezistence | 44 |
| 7 | Bakteriální perzistence a tolerance vůči antibiotikům..... | 45 |
| 7.1 | Bakteriální tolerance vůči antibiotikům..... | 45 |
| 7.2 | Bakteriální perzistence vůči antibiotikům | 45 |

| | | |
|-------|---|----|
| 7.2.1 | Perzistentní infekce..... | 46 |
| 7.3 | Rozdíl mezi bakteriální rezistencí, perzistencí a tolerancí vůči antibiotikům | 47 |
| 8 | Biofilm..... | 48 |
| 9 | Zábrana vzniku a eliminace infekcí způsobených odolnými bakteriemi | 51 |
| 9.1 | Eliminace bakteriální rezistence a multirezistence vůči antibiotikům..... | 51 |
| 9.2 | Eliminace bakteriální perzistence vůči antibiotikům | 52 |
| 9.3 | Eliminace biofilmu..... | 53 |
| | Závěr..... | 54 |
| | Seznam použitých informačních zdrojů | 55 |

Úvod

Bakteriální rezistence vůči antibiotikům představuje jeden z největších celosvětových problémů moderní medicíny. Míra rezistence a multirezistence neustále vzrůstá, a pokud bude její růst nadále pokračovat stejným tempem, hrozí selhání antibiotické léčby (Jiří, 2018; Kolář a kol., 2020). „*Je vhodné zdůraznit prohlášení Valného shromáždění OSN ze září 2016 – Lze odhadnout, že pokud se bude bakteriální rezistence zvyšovat stejným tempem jako doposud, budou v roce 2050 neléčitelné infekce vyvolané multirezistentními bakteriemi nejčastější příčinou úmrtí*“ (Kolář a kol., 2020: 14).

Bakteriální rezistence je evoluční odpovědí na antibiotickou terapii. Dokud bude léčba antibiotiky probíhat, bakterie budou nuceny se selekčnímu tlaku přizpůsobit prostřednictvím adaptací v podobě tvorby či příjmu genů odpovědných za rezistenční mechanismy. Jediným způsobem, jak zabránit kolapsu léčby infekcí způsobených rezistentními bakteriemi, je neustálé vytváření nových antibakteriálních látek a hledání nových mechanismů, které pomohu zabránit, nebo alespoň zpomalit, rozvoj rezistence v bakteriálních populacích, neboť je jen otázkou času, kdy se nyní používaná antibiotická léčba stane z velké části neúčinnou (Jiří, 2018; Kolář a kol., 2020).

K poklesu rezistence výrazně přispívá zodpovědná antibiotická léčba. Léčba pomocí antibiotik se od léčby jinými léky liší zejména jejím přesahem, který má epidemiologický rozměr. Antibiotická terapie nemá vliv pouze na pacienta, který je pomocí ní léčen, ale, díky neustálé výměně bakterií mezi jedinci a okolním prostředím, má mnohem širší dopad. Je tedy důležité, aby lékaři předepisovali antibiotickou medikaci jen v případě, kdy je to nezbytně nutné, a zvolili její vhodnou podobu. Pacienti musí dodržovat předepsané dávkování a i po odeznění příznaků infekce léčbu předčasně neukončovat, pokud jim nebude lékařem řečeno jinak (Jiří, 2018; Kolář a kol., 2020).

Nezodpovědným užíváním jsou antibiotika nejen v medicíně, ale například i v potravinářském průmyslu, uvolňována do okolního prostředí. Pokud se jejich množství pohybuje v natolik malých dávkách, že antibiotikum bakterie poškodí, ale neusmrtí, jedná se o subinhibiční účinek antibiotik, který je převážně reverzibilního charakteru. Po ustoupení selekčního tlaku způsobeného antibiotiky jsou bakterie po opravě poškozených struktur opět schopny se nadále rozmnožovat a rezistenční mechanismy, které byly nuceny pro své přežití

získat, předávat okolním bakteriím a budoucím bakteriálním populacím (Jiří, 2018; Kolář a kol., 2020).

Základem pro efektivnost antibiotické léčby je dostatečná informovanost jak odborníků, tak i veřejnosti o dané problematice (Jiří, 2018; Kolář a kol., 2020).

Cílem této bakalářské práce je popsat problematiku bakteriální rezistence, zahrnující její vznik, šíření a mechanismy, jimiž probíhá. Práce je zaměřena na definici základních pojmů, které jsou pro pochopení hlavního tématu nezbytné. Mezi zmíněné pojmy patří bakterie, bakteriální genetika či antibiotika včetně jejich dělení a způsobu účinku. Kromě rezistence práce rozebírá také její formy, jimiž jsou multirezistence, extenzivní rezistence a panrezistence. Práce zmiňuje bakteriální perzistenci a toleranci vůči antibiotikům a tvorbu biofilmu, což jsou další způsoby vzniku bakterií odolných vůči antibiotikům. Pozornost je také věnována testování bakteriální citlivosti. Práce uvádí metody užívané k zábraně vzniku či k eliminaci bakterií, odolných vůči antibiotikům, a infekcí, které tyto bakterie způsobují.

Bakteriální rezistence vůči antibiotikům představuje neustále se rozvíjející oblast výzkumu a je přínosná z hlediska souhrnu aktuálních poznatků, založených na nejnovější literatuře, a to včetně zohlednění nových odborných poznatků.

1 Bakterie

Bakterie jsou všudypřítomné jednobuněčné mikroorganismy mnoha velikostí a tvarů patřící do domén Archea a Bacteria. Doména Bacteria je pro téma rezistence bakterií na antibiotika esenciální, neboť obsahuje pro člověka patogenní druhy (Kolářová a kol., 2020).

1.1 Morfologie bakteriální buňky

Vnitřní prostředí bakteriální buňky je vyplněno cytoplazmou a od extracelulárního prostoru ho odděluje cytoplazmatická membrána, na kterou přiléhá buněčná stěna. Některé bakterie jsou navíc ještě extracelulárně obaleny vrstvou polysacharidů, či v menší míře vrstvou polypeptidů nebo kyseliny hyaluronové tvořící pouzdro (Hurych a kol., 2021; Jiří, 2014).

1.1.1 Cytoplazmatická membrána

Do cytoplazmatické membrány, mající podobu fosfolipidové dvojvrstvy a semipermeabilní charakter, jsou vnořeny proteiny zprostředkovávající selektivní přenos potřebných molekul, které nejsou schopny volného průchodu přes membránu. Jsou v ní ukotveny povrchové útvary, mezi něž patří bičíky, fimbrie, axiální vlákna a sekreční systémy (Hurych a kol., 2021; Jiří, 2014).

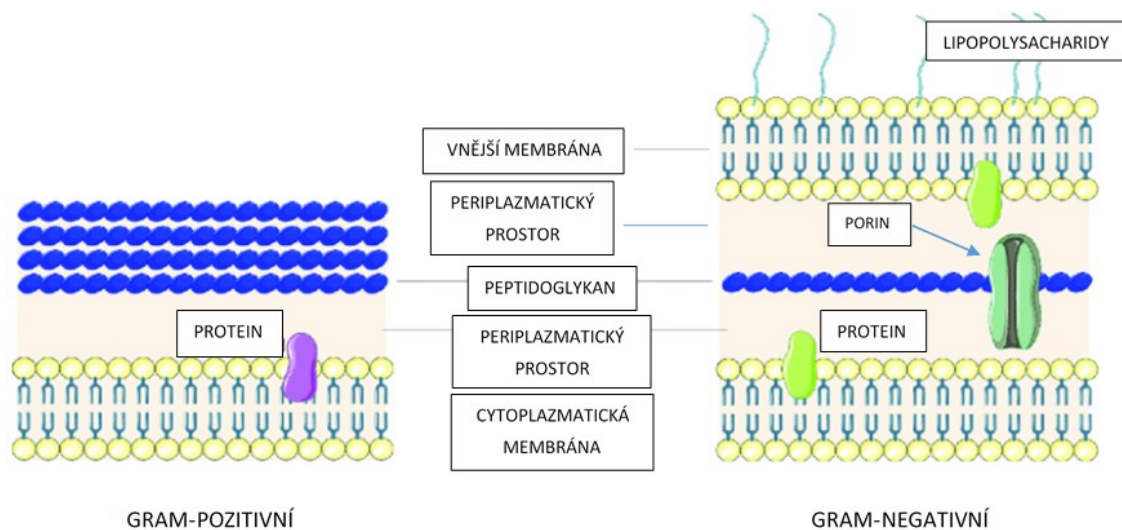
1.1.2 Buněčná stěna

Na cytoplazmatickou membránu z vnější strany přiléhá buněčná stěna chránící buňku před vnějšími chemicko-fyzikálními vlivy, změnou osmotického tlaku a zároveň udržuje její tvar. Základní složku buněčné stěny představuje peptidoglykan, synonymně označován jako glykopeptid nebo také murein. Peptidoglykan nebyl zatím zaznamenán u žádné z eukaryotických buněk, což z něj činí potenciální cíl pro specifické typy antibiotik (Jiří, 2014; Kolářová a kol., 2020).

U některých bakteriálních buněk může docházet k absenci buněčné stěny, tudíž jsou uzavřeny a od okolního prostředí odděleny pouze cytoplazmatickou membránou. Příkladem takovéhoto bakterií je rod *Mycoplasma* (Kolářová a kol., 2020).

Podle struktury buněčné stěny se bakteriální buňky rozdělují na gram-pozitivní a na gram-negativní (viz Obrázek 1). Tyto dva typy od sebe lze rozlišit metodou zvanou Gramovo barvení. Existují však výjimky, které nejsou touto metodou určitelné, neboť z důvodu jejich

specifického složení buněčné stěny, například u určitých druhů rodu *Mycobacterium*, k zabarvení nedochází (Artasensi a kol., 2021; Jiří, 2018; Kolářová a kol., 2020).



Obrázek 1: Buněčná stěna gram-pozitivních a gram-negativních bakterií (převzato z: Artasensi a kol., 2021)

Gramovo barvení

Metoda vyvinutá Hansem Christianem Gramem pomáhá rozlišit, zda je bakteriální buňka gram-pozitivní či gram-negativní na základě její buněčné stěny. Na obarvení buněk je používána buď krystalová violet, nebo methylová modř, ke které je přidán roztok jodu. Reakcí barviva a jodu dojde k vytvoření komplexu, který zabraňuje snadnému uvolnění barvy z buňky. Po vymytí odbarvovačem, nejčastěji ethanolem, lze u gram-negativních buněk pozorovat jejich odbarvení, zatímco buňky gram-pozitivní jsou stále zbarveny původním barvivem od fialova přes purpurovou až do modra. Záleží na zvoleném barvivu. Pro lepší identifikaci je následně k buňkám přidáno kontrastní barvivo safranin či fuschin. Gram-negativní bakterie se zbarví do růžova a gram-pozitivní buňky budou mít stále barvu prvního barviva (Breijyeh a kol., 2020; Coico, 2006; Tripathi & Sapra, 2020).

U gram-negativních bakterií nedochází k uchování původního barviva, jelikož jejich stěna je tvořena z velké části lipidy, které barvu sice zachytí, ale při promývání alkoholem či acetonem jsou lipidy rozpouštěny a zbarvení mizí spolu s nimi. Vytvoří se tím možnost pro barvení sekundárním barvivem. Gram-pozitivní bakterie mají tlustší buněčnou stěnu,

kteřou odbarvovací rozpoušředlo dehydratuje a uzavře tak její póry. Primární barvivo je uzavřeno uvnitř a nedochází k jeho úniku (Breijyeh a kol., 2020; Tripathi & Sapra, 2020).

Problém by mohl nastat, pokud by délka odbarvování byla příliš dlouhá. Došlo by k porušení stěn a vymytí původního barviva u obou typů bakterií (Tripathi & Sapra, 2020).

Gram-negativní bakterie

Gram-negativní bakterie se vyznačují složitou stavbou buněčné stěny, skládající se ze tří vrstev. Od gram-pozitivních buněk se odlišují přítomností zevní membrány. Její vnitřní strana je tvořena fosfolipidovou vrstvou a zvenčí je pokryta lipopolysacharidy. Jsou do ní vnořeny proteiny sloužící k regulaci vstupu molekul do vnitřního prostoru buňky, poriny. Poriny představují jednu z možných obran bakteriální buňky proti určitým typům antibiotik (Breijyeh a kol., 2020; Jiří, 2018; Jiří, 2014; Kolářová a kol., 2020).

Vnitřní prostor buňky je ohraničen fosfolipidovou vnitřní membránou zodpovědnou například za transport látek a biosyntetické funkce. Na ní z vnější strany nasedá tenká peptidoglykanová buněčná stěna udržující tvar buňky (Breijyeh a kol., 2020; Kolářová a kol., 2020).

Mezi buněčnou stěnou a vnější membránou se nachází periplazmatický prostor obsahující gelovitou periplazmu, jejíž obsah se mění podle metabolického stavu buňky a okolního prostředí. Přítomnost periplazmatického procesu se jeví jako jasný benefit, jelikož do něj mohou gram-negativní bakterie při vystavení se antibiotikům vysílat enzymy sloužící k jejich metabolizaci či inaktivaci (Beveridge, 1999; Jiří, 2018; Kolářová a kol., 2020).

Příkladem gram-negativních bakterií může být *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* či *Salmonella enterica* (Hurych a kol., 2021; Kolářová a kol., 2020).

Gram-pozitivní bakterie

Gram-pozitivní bakterie se vyznačují tlustou buněčnou stěnou tvořenou peptidoglykanem obohaceným o teichoovou a lipoteichoovou kyselinu. Absence vnější membrány má za následek kromě nepřítomnosti porinů zprostředkovávajících selekci molekul putujících do buňky, také odhalení polypeptidové vrstvy, která obsahuje speciální enzymy syntetizující peptidoglykan. Jedná se o takzvané *pennicilin-binding proteins*. Tyto enzymy jsou cílovým místem β -laktamových antibiotik, například z nich nejznámějšího penicilinu, kterým je

umožněno se na ně navázat. Způsobí tak inhibici výroby buněčné stěny, což je pro bakterii letální (Jiří, 2018; Jiří, 2014; Kolářová a kol., 2020).

Gram-pozitivní bakterie nemají periplazmický prostor. Při kontaktu s antibiotiky sekrece enzymů k jejich obraně probíhá do extracelulárního prostoru. V okolí mimo bakteriální buňku neustále dochází k proudění tekutiny, která odnáší enzymy pryč a bakterie je neustále nucena k tvorbě dalších, než selekční tlak způsobený antibiotikem ustane. Pro bakteriální buňku je to nejen energeticky velice nevýhodné, ale je to nevýhodné i z konkurenčního hlediska, jelikož enzymy vyloučené do okolního prostředí chrání i bakterie v okolí buňky, která je vysyntetizovala (Hurych a kol., 2021; Jiří, 2018; Kolářová a kol., 2020).

Mezi gram-pozitivní bakterie patří například *Streptococcus pneumoniae*, *Bacillus anthracis* a *Lactobacillus acidophilus* (Kolářová a kol., 2020).

1.1.3 Membránové vezikuly

Membránové vezikuly jsou obvykle 20-250 nm velké membránové váčky uvolňované z gram-negativních i gram-pozitivních bakteriálních buněk (Lee a kol., 2022; MacNair & Tan, 2023).

U gram-negativních bakterií je hlavním mechanismem jejich vzniku odtrhávání výstupků na vnější membráně obalující periplazmu. K tomuto procesu dochází za předpokladu vzniku poruchy buněčného obalu, například při jejím růstu. Vnější membrána se oddělí od peptidoglykanu a vzniká vnější membránová vezikula (OMVs¹), která v sobě obsahuje periplazmické elementy buňky. Při lýze buňky, vyvolané endolyziny prostřednictvím fágů či jiných látek, degraduje peptidoglykan a ostatní části buňky se automaticky uspořádávají do komplexních struktur. Mezi tyto struktury patří dvoumembránové vnější-vnitřní membránové vezikuly (IOMVs²) a explozivní vnější membránové vezikuly (EOMVs³). Tyto dva typy membránových vezikul uvnitř obsahují cytoplazmatické prvky, jako je například chromozomální DNA či plazmid (Beveridge, 1999; Lee a kol., 2022; MacNair & Tan, 2023).

U gram-pozitivních buněk, majících pouze jednu membránu, se při degradaci peptidoglykanu uvolňuje pouze jeden typ membránových vezikul, a tím jsou

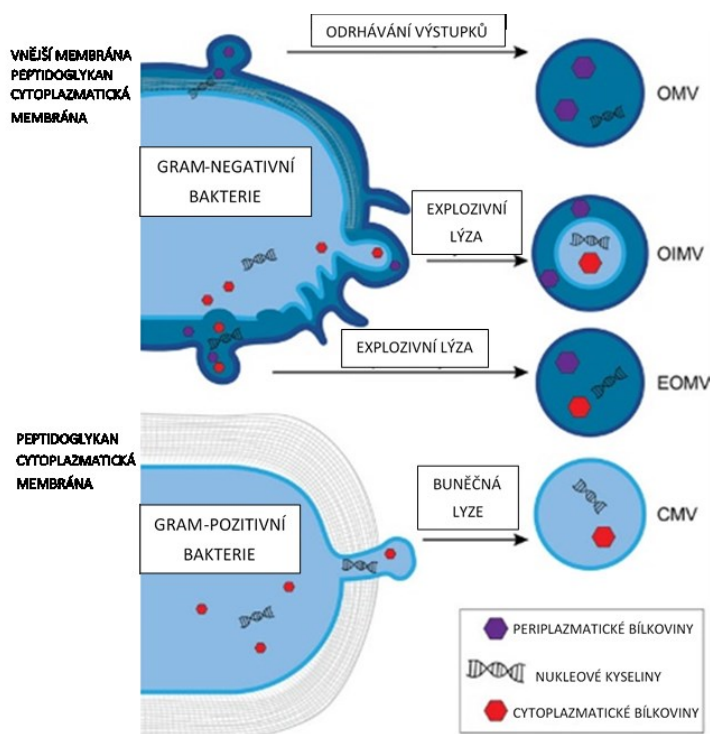
¹ OMVs – vnější membránové vezikuly (z anglického *outer membrane vesicles*)

² IOMVs – vnější-vnitřní membránové vezikuly (z anglického *outer-inner membrane vesicles*)

³ EOMVs – explozivní vnější membránové vezikuly (z anglického *explosive outer membrane vesicles*)

cytoplazmatické membránové vezikuly (CMVs⁴). Uvnitř nich jsou obsaženy cytoplazmatické složky (Lee a kol., 2022; MacNair & Tan, 2023).

Složení membránových vezikul je závislé na jejich typu, způsobu vzniku a také na jednotlivých komponentech obsažených v buňce, od níž jsou oddělovány (viz Obrázek 2). Lipidy, proteiny a nukleové kyseliny jsou hlavními složkami vyskytujícími se převážně ve všech těchto strukturách. Proto lze všechny jednotlivé variety shrnout pod jedno společné obecné označení membránové vezikuly (MVs⁵) (MacNair & Tan, 2023).



Obrázek 2: Vznik jednotlivých typů membránových vezikul u gram-negativních a gram-pozitivních bakterií (převzato z: MacNair & Tan, 2023)

Membránové vezikuly mohou obsahovat také autoliziny podílející se společně s *penicilin-binding proteins* na tvorbě peptidoglykanové vrstvy během bakteriálního růstu, či endoliziny produkované bakteriofágy. Oba tyto enzymy mají schopnost štěpit peptidoglykan a v případě jejich přítomnosti v MVs získávají tyto membránové vezikuly schopnost lyzovat ostatní bakterie, především pokud jsou tyto bakterie vystaveny nepříznivým okolním podmínkám a nedostatku živin. Působí jak na gram-negativní, tak i na

⁴ CMVs – cytoplazmatické membránové vezikuly (z anglického *cytoplasmic membrane vesicles*)

⁵ MVs – membránové vezikuly (z anglického *membrane vesicles*)

gram-pozitivní bakterie a jejich účinnost je závislá na chemotypu peptidoglykanu napadených buněk (Beveridge, 1999; Lee a kol., 2022; MacNair & Tan, 2023).

U gram-pozitivních bakterií se membránové vezikuly přichytí k jejich buněčné stěně a následně praskají. Na místě adheze dochází k hydrolýze peptidoglykanu, a to i v případě, že by bakterie byla kryta slizovou vrstvou. U gram-negativních bakteriálních buněk MVs s její vnější membránou splynou a celý svůj obsah, tedy i hydrolázy peptidoglykanu, uvolní do periplazmického prostoru. Zde dále difundují a způsobují lyzi peptidoglykanové vrstvy na více místech (Beveridge, 1999).

Ne vždy je těchto enzymů obsaženo dostatečné množství pro rozložení bakteriální struktury. Někdy se v peptidoglykanu vytvoří pouze otvor, kterým MVs, či jeho jednotlivé složky, vstoupí do buňky a následně je tento otvor uzavřen dosyntetizováním chybějícího peptidoglykanu. Membránové vezikuly se tak sloučí s bakterií, která získává jejich obsah. Jelikož membránové vezikuly mohou obsahovat také chromozomy či plasmidy s rezistenčními geny, můžeme tedy předpokládat, že transport rezistenčních genů pomocí membránových vezikul je dalším potenciálním mechanismem přenosu bakteriální rezistence k antibiotikům (Beveridge, 1999; Lee a kol., 2022; MacNair & Tan, 2023).

Další funkcí produkce membránových vezikul je extracelulární ochrana bakterií před antibiotiky. MVs s rezistenční funkcí se po oddělení od buňky pohybují v extracelulárním prostoru, kde jsou schopny zachytávat, absorbovat a následně inaktivovat daná antibiotika, čímž sníží jejich koncentraci a selekční tlak působící na bakterie (Beveridge, 1999; MacNair & Tan, 2023).

V případě proniknutí antibiotik či jiných toxických látek do periplazmického prostoru gram-negativních buněk mohou být tyto substance pomocí vezikul odstraňovány. MVs v gram-negativních bakteriích slouží také k eliminaci odpadních látek narušujících buněčný metabolismus, zahrnujících například fragmenty peptidoglykanu či lipopolysacharidu, z periplazmy (Lee a kol., 2022; MacNair & Tan, 2023).

Stresem způsobeným antibiotiky jsou bakteriální buňky podněcovány ke zvýšení tvorby MVs několika způsoby. Baktericidní antibiotika způsobují poškození bakterie, což aktivuje takzvanou SOS odpověď, zajišťující syntézu a opravu poškozeného bakteriálního genomu.

Důsledkem této odpovědi je aktivace různých genů vedoucí ke změnám v buněčném procesu včetně narušení syntézy lipopolysacharidu, jedné z hlavních složek vnější membrány gram-negativních buněk, a tím k tvorbě většího množství membránových vezikul. Antibiotika štěpící peptidoglykan podporují zvýšenou tvorbu MVs prostřednictvím snížení spojení mezi vnější membránou a peptidoglykanem. Dalším typem jsou taková antibiotika, jejichž cílovým místem je vnější membrána a jež mohou ovlivnit její zakřivení, čímž vzniká více výstupků, ze kterých poté vznikají membránové vezikuly. Pro shrnutí lze říci, že čím větší expozici antibiotik jsou bakterie vystaveny, tím intenzivněji dochází k tvorbě membránových vezikul (MacNair & Tan, 2023).

Membránové vezikuly v lékařství

Při výzkumu *Pseudomonas aeruginosa* bylo zjištěno, že přidáním antibiotika gentamicinu na povrch jejich membrány se zvýšila produkce membránových vezikul až trojnásobně. Takto vzniklé MVs byly označeny jako g-MVs⁶ a vznikla teorie tvrdící, že by mohly být využity jako nosiče antibiotik do bakteriálních buněk, kam by tato antibiotika za normálních okolností pronikala velice obtížně (Beveridge, 1999).

Gentamicin inhibuje syntézu bílkovin u bakteriálních buněk. Patří mezi aminoglykosidová antibiotika, vůči kterým je například *Pseudomonas aeruginosa* obvykle odolná, ale pomocí g-mVs, které splynou s její membránou a vypustí gentamicin do periplazmy, by mohlo docházet k jeho snadnějšímu vstupu do bakterie za předpokladu, že by ho bakterie nestihla pomocí MVs zase opět vyloučit. Tato teorie je pouze hypotetická a k jejímu podložení či vyvrácení by bylo třeba více studií (Beveridge, 1999).

1.1.4 Fimbrie

Fimbrie jsou šroubovitě uspořádané bílkovinné výběžky nacházející se převážně u gram-negativních bakterií jako jsou například *Echtherichia coli* nebo *Salmonella enterica*. Slouží k adhezi na povrch hostitele, k neživím podkladům nebo mezi jednotlivými bakteriálními buňkami a částečně se podílejí na ochraně před fagocytózou. Podle jejich struktury a konkrétních funkcí je lze dále dělit do jednotlivých skupin (Hurych a kol., 2021; Thanassi a kol., 2007).

⁶ g-MVs – membránové vezikuly obsahující gentamicin

Fimbriální vlákna jsou výrazně tenčí než vlákna bičků, mají průměr mezi 2 a 8 nm. Fimbrie jsou běžně přítomny ve velkém počtu s rozsahem sto až tisíc vláken, výjimkou jsou F pili, kde dochází k vytvoření pouze jednoho až tří vláken na buňku. Označení fimbrie a pili jsou prakticky synonyma, ale termín pilus se primárně používá v souvislosti s přenosem plazmidů (Hurych a kol., 2021; Jiří, 2014; Thanassi a kol., 2007).

F pili

F pili či konjugativní pili je označení pro typ bakteriálních povrchových útvarů, které jsou schopny zprostředkovávat přenos genetické informace mezi bakteriemi prostřednictvím tvorby kontaktu mezi buňkou donorovou a recipientní. Jsou nesené pouze buňkami, které mají F plazmidy obsahující geny pro jejich syntézu (Jiří, 2014).

1.1.5 Poriny

Poriny jsou bílkovinné jednotky nacházející se ve vnější membráně gram-negativních bakterií. U gram-pozitivních buněk z důvodu absence vnější membrány nejsou přítomny. Poriny jsou místem vstupu pro hydrofilní částice, které jsou jinak odpuzovány lipopolysacharidy pokrývajícími vnější membránu. Porinové kanálky jsou tvořeny z molekul porinů přiléhajících k sobě. Kanálkům se jinak říká póry a prostřednictvím nich, pokud je molekula dostatečně malá, může docházet k jejímu pasivnímu průchodu do periplazmického prostoru. Pór může být také jednou z cest průchodu antibiotik, například β -laktamů do bakteriální buňky. Poriny se dělí na několik typů, zejména podle jejich specifčnosti (specifické či nespecifické) a podle jejich velikosti a struktury (z kolika jednotek se skládají) (Hurych a kol., 2021; Pagès a kol., 2008).

1.1.6 Efluxní pumpy

Efluxní pumpy se nacházejí jak u gram-pozitivních, tak i u gram-negativních bakteriálních buněk v cytoplazmatické membráně. Efluxní pumpy jsou transmembránové systémy zprostředkovávající aktivní transport škodlivých látek i proti koncentračnímu spádu z buňky do extracelulárního prostředí. energii pro transport získávají buď v podobě ATP⁷ či prostřednictvím protonového gradientu. Podle zdroje této energie jsou efluxní pumpy rozdělovány do dvou kategorií po jednotlivých skupinách. Do skupin jsou tříděny dle jejich

⁷ ATP – adenosin trifosfát

typu. První kategorie získává energii hydrolýzou ATP a patří do ní skupina ABC⁸ pump. Druhá kategorie získává energii pomocí protonového gradientu a patří do ní efluxní pumpy skupin označovaných jako MFS⁹, MATE¹⁰, RND¹¹ a SMR¹² a nově došlo k objevení skupiny PACE¹³. Efluxní pumpy mohou vykazovat selektivitu pro konkrétní molekulu nebo mohou sloužit k transportu různorodých strukturně nesouvisejících sloučenin, například antibiotik různých druhů (Baran a kol., 2023; Du a kol., 2018; Hassan a kol., 2018; Higgins a kol., 2004; Hurych a kol., 2021; Webber & Piddock, 2003).

1.1.7 Extracelulární vrstvy

Na povrchu některých bakterií mohou být přítomny navíc extracelulární vrstvy polysacharidové či bílkovinné povahy plnící ochrannou funkci, mezi něž patří k buňce pevně přilnutá slizová vrstva, či ve vodě nerozpustné pouzdro. Kromě ochrany před fagocytózou může sloužit extracelulární vrstva také k adhezi buněk, a tím napomáhat tvorbě biofilmu (Hurych a kol., 2021; Kolářová a kol., 2020).

1.2 Genetika bakteriální buňky

Bakterie patří mezi prokaryotní organismy vyznačující se absencí buněčného jádra. Svou genetickou informaci mají uloženou v podobě stočené, membránou neohrazené, do sebe uzavřené dvoušroubovice DNA. Výjimečně může docházet k výskytu této molekuly v lineární podobě, jako je tomu například u rodu *Borrelia*. Struktura, v níž se chromozom nachází, se nazývá nukleoid. Nukleoid nadále také obsahuje malé množství RNA. Aby nedošlo k rozpadu tohoto celku, je zpevněn bílkoviny. Nukleoid není jediným zdrojem genetické informace buňky. Bakteriální genetická výbava se skládá z provozních, takzvaných *house-keeping*¹⁴, genů nezbytných pro její život a z genů přídatných neboli akcesorních¹⁵. Akcesorní geny pro bakterii sice nejsou esenciální, avšak mohou kódovat užitečné vlastnosti, například patogenitu či rezistenci. Přídatné geny se vyskytují

⁸ ABC skupina – z anglického *ATP-binding cassette family*

⁹ MFS skupina – z anglického *major facilitator superfamily*

¹⁰ MATE skupina – z anglického *multidrug and toxin extrusion family*

¹¹ RND skupina – z anglického *resistance-nodulation-cell division family*

¹² SMR skupina – z anglického *small multidrug resistance family*

¹³ PACE skupina – z anglického *proteobacterial antimicrobial compound efflux family*

¹⁴ House-keeping geny – geny nezbytné pro funkci bakteriální buňky

¹⁵ Akcesorní geny – přídatné geny v bakteriální buňce

v bakteriálním chromozomu, ale primárně jsou kumulovány v plazmidech (Hurych a kol., 2021; Jiří, 2014; Kolářová a kol., 2020).

1.2.1 Plazmidy

Plazmidy jsou extrachromozomální cirkulární molekuly DNA převážně obsahující důležitou, ne však nepostradatelnou, genetickou informaci. Jsou schopny autonomní replikace nezávisle na chromozomu. Zvláštním typem plazmidu je epizom, který se vyznačuje svou schopností jak nezávislé existence v bakteriální buňce, tak integrace do bakteriálního chromozomu (Bennett, 2008; Kolářová a kol., 2020).

Plazmidy se liší svou velikostí, počínaje dvěma nebo třemi geny, až po délku, která je ekvivalentní deseti nebo více procentům hlavního bakteriálního chromozomu. Zde obsažené geny mohou být zodpovědné za široké spektrum různých benefitů, které díky nim buňka získá, například schopnost bakterií využívat konkrétní živiny, schopnost produkce toxinů či odolnost vůči některým těžkým kovům jako je rtuť, kadmium nebo stříbro. Plazmidy, které nesou geny determinující rezistenci proti antibiotikům, jsou označovány jako R-plazmidy (Bennett, 2008; Jiří, 2014).

R-plazmidy patří z větší části do takzvaných konjugativních plazmidů, tedy do skupiny těch, které jsou schopny svého přenosu z jedné bakteriální buňky do druhé. Přenos je možný pouze jednostranně. Probíhá ze strany donorové buňky, označované jako F^+ , do buňky recipientní, označované F^- . Jejich distribuce je zprostředkována pomocí konjugativních pilusů (Bennett, 2008; Hurych a kol., 2021).

Plazmidy s absencí genů nezbytným k samostatnému přenosu do recipientní buňky se vyznačují menší velikostí způsobené kódováním velice omezeného počtu genů. Jejich genetická informace může být stále mobilizovatelná, ale pouze za pomoci výše zmíněných konjugativních plazmidů nacházejících se ve stejné bakteriální buňce (Bennett, 2008; McManus, 1997; Nikaido, 2009).

Velikost plazmidů je dále odvíjena od typu bakteriální buňky, která je pro ně cílovou. Gram-negativní bakterie se vyznačují složitější stavbou buněčné stěny a obsahují navíc vnější membránu. Pro průnik do nich je tedy potřeba složitějšího systému a z tohoto důvodu

konjugativní plazmidy gram-negativních bakterií obsahují větší množství genů, než plazmidy nacházející se u bakterií gram-pozitivních (Bennett, 2008).

V bakteriální buňce se mohou plazmidy vyskytovat v malém počtu či v mnoha kopiích. Jejich množství je úzce spojeno s okolním prostředím. Pokud pro bakterii vznikne potenciální ohrožení, například prostřednictvím antibiotik, jednou z možných odpovědí na vzniklou situaci bude její příjem R-plazmidů. Výskyt R-plazmidů znamená pro bakteriální buňku velký energetický výdej, který může vést ke snížení jejího fitness. Jakmile již není vystavena selekčnímu tlaku, plazmidy pro ní představují spíše zátěž než výhodu a dochází k jejich vyloučení (Bennett, 2008; Jiří, 2018; Kolářová a kol., 2020).

1.2.2 Transpozony

Transpozony jsou genetické elementy, které jsou schopny svého vyčlenění z DNA, přesunu a zpětné integrace do struktury dvoušroubovice. Jejich pohyb může mít jak intermolekulární, tak i intramolekulární charakter. Intermolekulární charakter zahrnuje pohyb integronů z jednoho místa na chromozomu či plazmidu na jiné v rámci jedné molekuly, zatímco při intermolekulárním transportu se mohou integrony přesouvat z plazmidu na chromozom, z chromozomu na plazmid, či z jednoho plazmidu na plazmid jiný. Svou schopností zabudovat se do chromozomálního DNA se na rozdíl od plazmidů (vyjma epizomů) mohou stát jeho stálou součástí. Pro tyto mechanismy není většinou vyžadována homologie DNA mezi původním místem a místem jejich včlenění. Existují příklady, kdy mají transpozony preference pro určité nukleotidové sekvence, ale většinou jsou vkládány na nová místa spíše náhodně (Bennett, 2008; Jiří, 2018).

Transpozony lze nalézt v mnoha formách, kdy se odlišují svou strukturou či mechanismem transpozice. Transpozony mohou mimo jiné nést také geny kódující rezistenci vůči antibiotikům (Bennett, 2008; Jiří, 2018).

1.2.3 Genové ostrovy a genové kazety

V bakteriálním chromozomu lze pozorovat tendenci shlukování a uspořádávání genů s rezistencí vůči antibiotikům do sekvencí, které jsou označovány jako genové ostrovy rezistence. Pokud mají tyto genové úseky úvodní sekvenci umožňující jim komparabilní přesuny s přesuny transpozonů, nazývají se genové rezistentní kazety. Jejich vznik byl

podmíněn selekčním tlakem způsobeným antibiotiky, na něž bakterie reagovaly vytvořením této adaptace, neboť je pro ně výhodný přesun ve formě jednoho celku, který zlepší její potenciální fitness (Bennett, 2008; Hurych a kol., 2021; Jiří, 2018).

1.2.4 Intergrony

Intergrony jsou genetické struktury se schopností zachytávat a včleňovat genové kazety do bakteriálního genomu. Mohou se vyskytovat na chromozomu či být součástí mobilních genetických elementů, do nichž patří plazmidy či transpozony, bez kterých nejsou schopny individuálních přesunů (Bennett, 2008; Hurych a kol., 2021).

Intergrony jsou rozdělovány do čtyř tříd podle genu integrázy (*intI*). S mobilitou a největší pravděpodobností obsahu rezistentních genových kazet jsou spojovány integrony s genem *intI1* patřící do třídy 1. Vyznačují se svou charakteristickou stavbou. Jejich první konec (5'-CS) obsahuje integrazim, gen zodpovědný za syntézu enzymu integráza umožňující specifickou rekombinaci mezi integronem a genovou kazetou. Místo pro vložení kazety je označováno jako *attI1*. Druhý konec integronu (3'-CS) obsahuje geny na obranu proti kvartérním amonným sloučeninám, sulfoamidům a dalším látkám. Mezi těmito konci se nachází střední variabilní část poskytující prostor pro včlenění genových kazet. Genové kazety se mohou přesouvat mezi jednotlivými integrony či v rámci jednoho a mohou být také vkládány za sebe, a tím tvořit takzvané pole genových kazet. Pokud se genové pole utvoří na chromozomu, je vzniklý genetický element nazýván jako super integron (Bennett, 2008; Deng a kol., 2015; Hurych a kol., 2021).

Akumulace nových rezistenčních, genů umožňuje bakteriím lépe reagovat na kontakt s antibiotiky a pomáhá k vývoji rezistence vůči nim (Bennett, 2008).

1.2.5 ISCR

ISCR¹⁶ neboli inzerční sekvence obsahující společné oblasti (*insertion sequences containing common regions*) jsou malé pohyblivé genové úseky. Společnou oblastí je myšlena část, kterou ISCR sdílí s integronem a je označována jako CR. ISCR jsou rozdělovány podle jejich struktury na ISCR1 až ISCR23. Obvykle jsou součástí integronu 1, kde byly také původně

¹⁶ ISCR – inzerční sekvence obsahující společné oblasti (z anglického *insertion sequences containing common regions*)

detekovány. Kombinací ISCR1 a integronu 1 vzniká komplexní integron. Komplexní integron je zhruba z poloviny tvořen typickým integronem 1 s 5'-CS a 3'-CS. Mezi konci se nachází variabilní část následovaná ISCR1, na kterou opět navazuje další variabilní část integronu (Bennett, 2008; Ilyina, 2012).

Od podobných elementů, IS¹⁷ elementů, se liší absencí jejich ohraničení prostřednictvím krátkých inverzních nukleotidových opakování sloužících k definování jejich konce a místa štěpení. Místo nich obsahují terminální sekvence označené jako oriIS a terIS určující místa iniciace a ukončení replikační fáze. Rozpoznávání terIS vykazuje nepřesnost až 10 %, díky čemuž replikace může probíhat za terIS do přilehlé sekvence, kde je následně více či méně náhodně ukončena. Tento jev je součástí procesu *rolling circle* (RC¹⁸) transpozice a díky tomu je možný transport většího množství genetického materiálu zahrnujícího původní ISCR a sousední část DNA integronu. Je vysoká pravděpodobnost, že pokud ISCR obsahuje rezistenční geny, bude je přilehlá sousední část DNA taktéž obsahovat. Opakovanou transpozicí tak mohou vznikat velké bloky rezistentních genů (Bennett, 2008; Ilyina, 2012).

ISCR se nemusí zaměřovat pouze na vytváření úseků s rezistenčními geny, ale i s patogenními, či jinými kódovanými vlastnostmi (Ilyina, 2012).

¹⁷ IS – inzerční sekvence (z anglického *insertion sequences*)

¹⁸ RC transpozice – transpozice mechanismem valivé kružnice (z anglického *rolling circle transposition*)

2 Antibiotika

Antibiotika jsou chemické látky vykazující schopnost selektivně interferovat s bakteriemi buď inhibicí jejich růstu, nebo způsobením jejich smrti. Jsou klasifikována jako jedna ze skupin antimikrobiálních neboli antiinfektivních látek, což reprezentuje soubor farmakologických látek konstruovaných s cílem potlačit či eliminovat mikroorganismy, jež mohou být zodpovědné za infekční onemocnění. Antiinfektiva jsou rozdělena do čtyř kategorií podle mikroorganismů, proti kterým působí: antibiotika účinkující proti bakteriím, virostatika cílící na viry, antimykotika působící na mikromycety a antiparazitika zaměřená proti parazitům (Hurych a kol., 2021).

2.1 Antibiotika a chemoterapeutika

Antibakteriálně působící látky byly dříve rozdělovány do dvou hlavních samostatných kategorií: antibiotika a chemoterapeutika (Hurych a kol., 2021; Jiří, 2018).

Chemoterapeutika, neboli látky syntetického původu, byla objevena dříve a ve srovnání s přírodními látkami, produkovanými buď plísněmi (například *Penicillium*) nebo některými druhy bakterií (například *Streptomyces*), které dostaly název antibiotika, měla výrazně nižší účinek. Prvním přírodním antibiotikem byl penicilin, objevený v roce 1940 skupinou vědců, kteří navázali na práci Alexandra Fleminga (Hurych a kol., 2021; Jiří, 2018).

Antibiotika a chemoterapeutika se od sebe nelišila pouze svým původem a účinností. Při léčbě byly patrné velké rozdíly v jejich podávaném množství. Účinná dávka chemoterapeutik se pohybovala v gramech, zatímco u antibiotik v miligramovém množství. U chemoterapeutik byla navíc detekována výrazně vyšší toxicita pro lidský organismus, než tomu bylo u antibiotik. Díky pokroku v chemické výrobě a s vývojem semisyntetických přípravků neustále mizely rozdíly mezi těmito kategoriemi a toto rozdělení se přestalo používat. Lze ho najít již jen ve starší literatuře z přelomu století (Jiří, 2018).

Termín chemoterapie se nyní běžně používá v odvětví léčby onkologických onemocnění, zatímco jako antibiotika jsou označovány všechny látky působící proti bakteriím (Jiří, 2018).

2.2 Farmakologie antibiotik

Pro využití v klinické praxi musí antibiotikum vyhovovat přísným farmakologickým požadavkům. Mezi klíčová kritéria patří minimální nebo ideálně žádná toxicita pro makroorganismy. Antibiotikum by mělo vykazovat selektivní toxicitu pouze pro prokaryotní buňky a mechanismus jeho účinku by měl být úzce specifický vůči cílovým bakteriálním strukturám. Na základě této vlastnosti dochází k minimalizaci negativních vlivů vůči hostitelskému organismu. Avšak dopady užívání antibiotik na lidský organismus nejsou nikdy nulové, neboť antibiotikum není jeho přirozenou součástí. Jejich užívání negativně ovlivňuje přirozenou mikroflóru těla. Například narušení té střevní umožňuje přemnožení bakterie *Clostridioides difficile*, která může potencionálně vyústit ve vznik kolitidy. Častý je také jejich hepatotoxický či nefrotoxický účinek (Jiří, 2018; Jiří, 2014; Kolářová a kol., 2020).

Dalšími podmínkami pro splnění určených kritérií je nízká účinná dávka pohybující se v mg/l, dostatečná distribuce do cílových tkání, nízká pravděpodobnost nežádoucích reakcí s jinými léky, dostupnost léčiv ve formě jak perorální, tak parenterální, pomalý vznik bakteriální rezistence a nástup účinku v relativně krátkém časovém úseku (Hurych a kol., 2021; Jiří, 2018; Jiří, 2014).

2.3 Dělení antibiotik

Antibiotika lze dělit do skupin podle různých aspektů. Systematizují se podle nejdůležitější cílové bakterie, podle jejich chemické struktury, rozpustnosti (lipofilní nebo hydrofilní), mechanismu působení, formy užívání (parenterální, orální a lokálně/zevně podávaná), šíře účinnosti, intenzity působení a podle jejich původu (přírodní či syntetická) (Hurych a kol., 2021; Jiří, 2018).

2.3.1 Antibiotika podle šíře účinnosti

Antibiotika se dle šíře svého působení dělí na selektivní, úzkospektrá a širokospektrá. V literatuře lze najít i označení antibiotika s úzkým až středním spektrem účinnosti, která jsou ale obecně zařazována pod antibiotika úzkospektrá (Heinz a kol., 2012; Hurych a kol., 2021; Kolářová a kol., 2020).

Selektivní antibiotika jsou antibiotika s účinkem proti jednomu konkrétnímu patogenu, například antituberkolika cílící na *Mycobacterium tuberculosis*. Léčiva interferující s určitým typem nebo skupinou bakterií, například s gram-negativními druhy, jsou definována jako antibiotika úzkospektrá a látky působící na většinu bakterií při vzniklé infekci jsou nazývána jako širokospektrá, do nich patří například tetracykliny, fluorochinony či chloramfenikol (Heinz a kol., 2012; Hurych a kol., 2021; Jiří, 2018).

Širokospektrální antibiotika jsou, vzhledem k jejich rozsáhlému spektru působení, často nasazována v případě akutních infekcí, kde není známa přesná patogenní bakterie a je nutné neprodleně zahájit léčbu. Po jejich aplikaci je vhodné provést odběr vzorku mikrobů způsobujících onemocnění a co nejdříve je identifikovat, aby se mohlo přistoupit na cílenou léčbu, neboť širokospektrá antibiotika ve větší míře negativně ovlivňují vnitřní mikroflóru těla a vytváří selekční tlak i na bakterie, které v tuto chvíli pro lidské tělo patogenní nejsou. Tyto bakterie zlepšují své fitness, nepříznivé podmínky přežívají primárně k těmto antibiotikům rezistentní bakteriální buňky, anebo dochází k sekundárnímu získávání jejich rezistentních vlastností. Pokud by později tyto bakterie způsobily onemocnění, původní léčba již nebude fungovat (Hurych a kol., 2021; Jiří, 2018; Kolářová a kol., 2020).

2.3.2 Antibiotika podle intenzity působení

Baktericidní antibiotika bakterie usmrcují, zatímco látky s bakteriostatickým účinkem zastavují jejich růst a dělení. Pro použití v praxi jsou antibiotika vybírána podle stupně závažnosti infekce. Pokud se jedná o infekci vážnou či život ohrožující, je nutná léčba pomocí baktericidních antibiotik, která se mimo silnějšího účinku vyznačují také svým rychlejším nástupem. Začátek působení bakteriostatik se pohybuje v průměru okolo dvou až tří dnů, zatímco u baktericidních antibiotik se projevuje již přibližně do 24 hodin po jejich podání (Hurych a kol., 2021; Jiří, 2018; Kolářová a kol., 2020).

Zda dané antibiotikum patří mezi baktericidní či mezi bakteriostatické látky není vždy jednoznačné. Záleží přímo na konkrétním antibiotiku a bakterii, na kterou je právě cíleno. Jedno konkrétní antibiotikum může působit na jeden druh bakterií bakteriostaticky a na jiný baktericidně. Dalším proměnným faktorem při jejich zařazování je také koncentrace podaného antibiotika. Pro možné jednoznačné třídění byla zavedena umělá arbitrální hranice

v níž jsou antibiotika řazena pole matematického vztahu $MBC^{19}/MIC^{20} \leq 4$ mezi antibiotika baktericidní a ostatní mezi antibiotika bakteriostatická. V praxi většinou ani nelze bakteriostatická antibiotika používat k usmrcení bakterií, neboť by ho bylo třeba takové množství, které by již mohlo překročit hranici snášenlivosti dané látky pro lidské tělo (Hurych a kol., 2021; Jiří, 2018; Kolářová a kol., 2020).

2.3.3 Antibiotika podle chemické struktury

Jedním ze způsobů dělení je kategorizace založená na základě podobnosti chemické struktury jednotlivých antibiotik. Nejpočetnější a nejpoužívanější skupinou jsou β -laktamy, které obsahují β -laktamový kruh. Do této skupiny patří podskupina peniciliny, cefalosporiny, karbapenemy a monobaktamany. Dalšími příklady jsou tetracykliny vyznačující se svou čtyřcyklickou strukturou, nebo aminoglykosidy skládající se ze složité struktury aminokyselin a cukrů (Garneau-Tsodikova & Labby, 2016; Kolářová a kol., 2020; Nelson & Levy, 2011; Varela a kol., 2021).

2.3.4 Antibiotika podle mechanismu působení

Každé antibiotikum má cílové místo či cílová místa, s kterými interaguje, a bakterii tak poškozuje. Podle cílové struktury a jejich mechanismu působení jsou antibiotika dělena na inhibitory syntézy buněčné stěny, inhibitory syntézy kyseliny tetrahydrofolové, inhibitory funkce nukleových kyselin, antibiotika poškozující buněčnou membránu, oxidačně působící antibiotika a inhibitory syntézy bílkovin. U jednotlivých kategorií a rozdělení antibiotik do nich se mohou vyskytovat mírné rozdíly v závislosti na literatuře. V této bakalářské práci bylo zvoleno třídění dle knihy Antibiotika: systematika, vlastnosti, použití od Jiřího Beneše z roku 2018 (Baran a kol., 2023; Hurych a kol., 2021; Jiří, 2018).

¹⁹ MBC – minimální baktericidní koncentrace antibiotika

²⁰ MIC – minimální inhibiční koncentrace antibiotika

3 Citlivost bakterií vůči antibiotikům

Bakteriální buňky se podle reakce na interakci s antibiotiky rozdělují na citlivé, intermediální a rezistentní. Bakterie označené jako citlivé reagují na antibiotickou léčbu účinně. Intermediální bakterie vykazují míru citlivosti, pohybující se mezi bakteriemi citlivými a rezistentními. Jejich odezva na antibiotika nedosahuje míry bakterií citlivých, avšak na rozdíl od rezistentních nejsou zcela imunní. Rezistentní bakteriální buňky jsou proti antibiotické léčbě odolné a nijak na ni nereagují (Jiří, 2018).

Pro určování bakteriální citlivosti je používána hodnota MIC neboli minimální inhibiční koncentrace antibiotika udávaná v g/l, při které již nedochází k viditelnému růstu bakterií. Dělení bakterií je řízeno podle pravidel utvořených skupinou odborníků, pro Evropu se skupina nazývá EUCAST²¹ a v USA je tým označován zkratkou NCCLS²². U Evropské a Americké kategorizaci může dojít k odlišnostem, které vznikají primárně v souvislosti nestanovení definice pojmu běžná infekce, pro kterou je koncentrace antibiotika měřena. V normách určujících zařazení bakterií je uvedeno do jaké hodnoty MIC se bakterie pro běžnou infekci považuje za citlivou a kdy za rezistentní. Hraniční hodnota je označována jako *breakpoint*. *Breakpoint* je stanovován pomocí mnoha in vitro testů a jeho hodnota je určena konkrétnímu antibiotiku. Například podle EUCAST je pro bakterie *Escherichia coli* a antibiotikum ampicilin *breakpoint* definován na množství 8 mg/l. Kromě hodnoty MIC může být udáván v závislosti na metodě zjišťování i v mililitrech (Hurych a kol., 2021; Jiří, 2018; Kolářová a kol., 2020).

3.1 Metody pro určení citlivosti bakterií

3.1.1 Kvalitativní stanovení bakteriální citlivosti

Kvalitativní metody slouží ke zjištění, zda je bakterie citlivá či rezistentní, tudíž zda bude zvolená antibiotická léčba účinná či nikoliv (Hurych a kol., 2021).

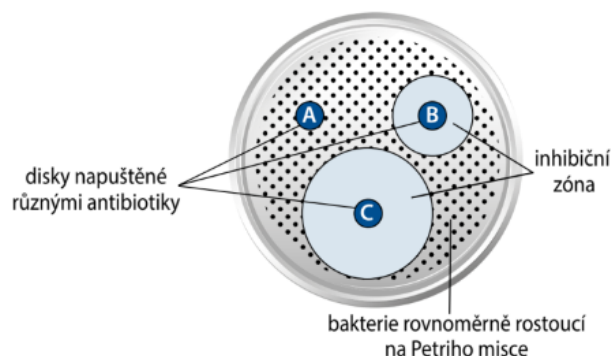
²¹ EUCAST – akronym pro Evropský výbor pro testování antimikrobiální citlivosti (z anglického *The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*)

²² NCCLS – akronym pro Národní výbor pro standardy klinických laboratoří (z anglického *National Committee for Clinical Laboratory Standards*)

Disková difúzní metoda

Princip metody spočívá v tom, že je analyzovaná bakterie plošně naočkována na agar a po její kultivaci je na povrch položeno antibiotikum ve formě disku (viz Obrázek 3). Pokud se kolem disku antibiotika vytvoří takzvaná inhibiční zóna, neboli zóna kde je růst bakterií potlačen, je porovnána s referenčním rozmezím stanoveným na základě standardních hodnot pro konkrétní antibiotikum a bakterii. Pokud je inhibiční zóna větší než zóna referenční, jedná se o bakterii citlivou. V případě převažující referenční zóny nad inhibiční je bakterie řazena mezi rezistentní kmeny. Jestliže nedojde k vytvoření žádné inhibiční zóny, je bakterie považována za zcela rezistentní (Hurych a kol., 2021).

Touto metodou se nedá měřit přesná míra rezistence, neboť při ní nelze zcela dodržet potřebné podmínky, i když disky a agarové půdy podléhají nutné pravidelné kontrole prostřednictvím standardních kmenů s ověřenou citlivostí (Hurych a kol., 2021).



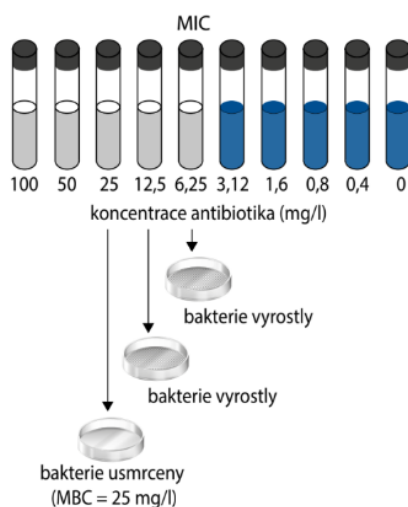
Obrázek 3: Disková difúzní metoda (převzato z: Jiří, 2018) „Antibiotikum C vytváří největší inhibiční zónu, je tedy *in vitro* nejúčinnější. Antibiotikum A je vůči vyšetřovanému kmenu bakterií neúčinné (Jiří, 2018: 35).“

3.1.2 Kvantitativní stanovení bakteriální citlivosti

Kvantitativní metody určují stupeň citlivosti bakterií, a tedy míru účinnosti antibiotické léčby. K popisu výsledků je používána hodnota MIC, ale také minimální baktericidní koncentrace MBC. MBC je stejně jako MIC měřena v g/l a určuje minimální koncentraci antibiotika potřebnou pro usmrcení bakterií (Hurych a kol., 2021; Jiří, 2018).

Diluční bujónová metoda

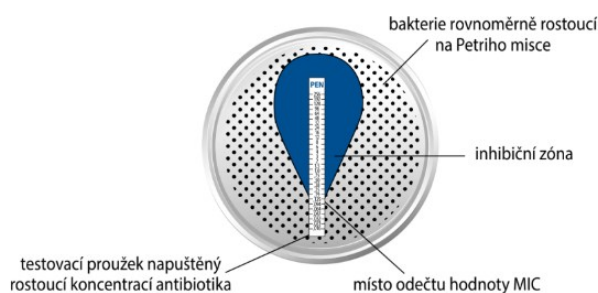
Diluční bujónová metoda je postavena na periodicky vzrůstající koncentraci antibiotik v řadě zkumavek vyplněných bujónem (viz Obrázek 4). Analogií pro zkumavkový test může být také manuální provedení pomocí mikrotitrační destičky s jamkami vyplněnými bujónem se stoupajícím množstvím antibiotik. Do všech zkumavek či jamek je následně přidáno stejné množství testované bakterie. První hodnota koncentrace ve zkumavce či v jamce, ve které se nevytvoří viditelný zákal způsobený růstem bakterií, se rovná MIC. MBC je zjištěna po naočkování obsahu jamek či zkumavek bez viditelného zákalu na agar. Bakterie, s nejnižší hodnotou antibiotika, jenž k nim byla přidána, které po kultivaci nevyrostou, označují hodnotu MBC (Hurych a kol., 2021).



Obrázek 4: Diluční bujónová metoda (převzato z: Jiří, 2018)

E-test

Na povrch agarové pŕdy naočkované testovanou bakterií se položí papírek se stupnicí čísel označující postupnou klesající koncentraci antibiotika, kterým je nasycen (viz Obrázek 5). Nejnížší hodnota antibiotika, u kterého nedojde po kultivaci k růstu bakterií, se rovná MIC. E-test není v praxi preferovanou metodou z důvodu jeho vysoké ceny způsobené náročnou výrobou papírku (Hurych a kol., 2021; Jiří, 2014).



Obrázek 5: E-test (převzato z: Jiří, 2018)

3.2 Účinek antibiotik na bakterie

Antibiotický účinek lze dělit na subinhibiční, inhibiční a baktericidní. Toto dělení velice úzce souvisí s dělením antibiotik na baktericidní a bakteriostatická, které je popsáno v podkapitole Antibiotika podle intenzity působení. Baktericidní antibiotika mající baktericidní účinek způsobují bakteriím smrt. Pod antibiotika bakteriostatická se dá zařadit jak převážně reverzibilní subinhibiční, tak i inhibiční účinek zodpovědný za zastavení jejich dalšího množení (Jiří, 2018).

3.2.1 Subinhibiční účinek antibiotik

Pro subinhibiční účinek musí koncentrace antibiotika dosahovat minimální antibakteriální koncentrace MAC²³. MAC je nejnížší možná koncentrace, která má vliv na chování či strukturu bakteriální buňky. Tato hodnota je spíše teoretická a v praxi k jejímu stanovování nedochází z důvodu její vysoké obtížnosti. Zejména z důvodu špatné detekovatelnosti této hodnoty je subinhibiční účinek tak nebezpečný, neboť není jisté, v jaký moment již dochází k jeho vzniku (Jiří, 2018).

²³ MAC – minimální antibakteriální koncentrace

Při subinhibičním účinku antibiotik na bakterie dochází k poškození jejich struktury, avšak nedostatečně na to, aby nebyly schopny přežít a nadále se dělit. Většinou je deformace reverzibilní a bakteriální buňka je do určité míry schopna své regenerace. Bakterie bude po určitou dobu poškozena a oslabena, což může sice vést ke snížení míry její patogenity, ale v důsledku selekčního tlaku budou zasažené bakteriální buňky nuceny k tvorbě adaptací nezbytných pro jejich přežití a k tvorbě nových mechanismů rezistence proti antibiotikům, kterým jsou vystaveny. Díky selekčnímu tlaku tedy dojde ke zlepšení fitness bakteriální populace a takto zvýhodněné rezistenční bakterie budou lépe přežívat, budou schopny se dělit a předávat rezistenční vlastnosti dále (Jiří, 2018).

Čím déle jsou bakterie subinhibičnímu účinku vystavovány, tím je jejich rezistence vůči nim vyšší, což může být velice problematické u chronických onemocnění. Nejrizikovějšími jsou však případy, kdy antibiotika v malých koncentracích unikají mimo lidské tělo do okolí, například ve zdravotnictví či ve velkochovech zvířat, kde interagují s mnohými bakteriemi, a umožňují jim tak tvorbu rezistence proti nim. Následně mohou tyto bakterie způsobit onemocnění a léčba na ně již nebude zabírat (Jiří, 2018).

4 Bakteriální rezistence vůči antibiotikům

Rezistence je geneticky determinovaná vlastnost bakterií, díky které se stávají odolnými vůči antibiotické léčbě za použití standardních koncentrací antibiotik. I při vystavení antibiotikům jsou rezistentní bakterie schopné svého rozmnožování ve stejné míře, jako při jeho nepřítomnosti. Rezistenci můžeme dělit na přirozenou a získanou a její míru lze měřit v MIC (Jirí, 2018).

4.1 Přirozená bakteriální rezistence vůči antibiotikům

Přirozená rezistence je stabilní vrozený genetický jev zakódovaný v chromozomální DNA, který sdílí celá populace daného druhu, jejíž primárními důvody je chybějící cílová struktura pro vazbu antibiotik, transportní systém přenášející molekulu ATB²⁴ do buňky či přirozená přítomnost rezistenčního mechanismu. Bakterie rodu *Mycoplasma* jsou přirozeně rezistentní k β -laktamovým antibiotikům cílícím na PBP²⁵, který rod *Mycoplasma* z důvodu absence buněčné stěny nemá. U gram-negativních bakterií, aby se antibiotikum dostalo do vnitřních prostor buňky, musí projít přes vnější membránu, a pokud je pro něj nepropustná, jako například pro vankomycin, mohou v případě dostatečně malých molekul pronikat poriny, které jsou v ní umístěny. Molekula vankomycinu je však příliš velká, aby poriny prošla, a proto jsou k němu gram-negativní bakterie přirozeně rezistentní. Přirozené rezistence se využívá, například když je potřeba vykultivovat konkrétní druh bakterie, a tak se na živnou půdu obsahující více druhů bakterií přidá antibiotikum, na které je vybraný druh pro kultivaci přirozeně rezistentní, a tím je zajištěno, že se ostatní bakterie, které jsou na antibiotikum citlivé, nerozmnoží a zahynou. Dále je tato vlastnost používána při procesu identifikace neznámé bakterie (Hurych a kol., 2021; Kolářová a kol., 2020; McManus, 1997; Todar, 2011).

4.2 Získaná bakteriální rezistence vůči antibiotikům

Získaná rezistence je později nabytá vlastnost, kterou si bakteriální buňka vyvinula či ji přijala jako adaptaci na stres způsobený antibiotiky. Získaná rezistence vzniká změnou bakteriální DNA s možností vyústění ve vznik nové fenotypové vlastnosti, buď mutací své

²⁴ ATB – antibiotikum

²⁵ PBP – *penicilin-binding proteins*

DNA, nebo získáním nové DNA nesoucí genetické informace obsahující rezistenci (Hurych a kol., 2021; McManus, 1997; Todar, 2011).

K mutaci může dojít indukovaně vnějšími vlivy či spontánně při buněčném dělení, například chybou při replikaci DNA, delecí, insercí či duplikací nukleotidu nebo nukleotidů. Míra spontánní mutace je uváděna jako 0,0033 mutace na jednu replikaci DNA. V každé populaci se vyskytuje určitý počet bakterií s modifikací všech vlastností, které jsou u jednotlivých bakterií možné. „*Frekvence mutantů je u bakterií kolem 10^{-8} . V 1 ml kultury např. *Echerichia coli*, kde je 10^9 citlivých buněk, lze předpokládat, že je 10 buněk rezistentních*“ (Jiří, 2014: 144). Pokud se zvýší tlak působení antibiotik, začnou vznikat mutace indukované a populace se začne stávat rezistentní (Abebe a kol., 2016; Hurych a kol., 2021; Jiří, 2014; McManus, 1997).

Přijetí cizí DNA obsahující přenosné genetické elementy kódující rezistenční vlastnosti může probíhat jedním ze tří mechanismů horizontálního procesu zahrnujícího konjugaci, transdukcii a transformaci (Hurych a kol., 2021; McManus, 1997).

Získaná antibiotická rezistence je důsledkem vystavení bakterií antibiotikům. Z bakterií citlivých se vhodnými mechanismy stávají bakterie rezistentní. K vzniku rezistence nedochází ihned při kontaktu bakteriální buňky a antibiotického přípravku, ale až poté co koncentrace antibiotika dosáhne takzvané kritické hranice. Při nízkém selekčním tlaku je pro buňku nevýhodné přijímat genetický materiál navíc, neboť jejím cílem je co nejrychlejší množení, v čemž ji může nadstandardní genetická výbava zpomalovat. Pokud je však koncentrace antibiotika tak vysoká, že by již mohla bakterii ohrožovat, bude nucena k získání rezistenčních vlastností v zájmu jejího přežití, i když by to znamenalo snížení její fitness. Snížení fitness může být jen dočasné a po ústupu selekčního tlaku se může bakterie přebytečných genů zbavit. Pokud to není možné a rezistenční vlastnosti jsou trvale včleněny do jejího genomu, může dojít k vytlačení tohoto typu bakterií bakteriemi nerezistentními, u kterých bude množení probíhat rychleji. Čím déle antibiotický stres přetrvává, tím je větší pravděpodobnost, že si bakterie vytvoří alternativní kompenzační mutace a rezistentní vlastnosti ji již nebudou nadále zatěžovat, čímž se stane rezistence trvalou a bakterie, které touto vlastností disponují, budou tvořit převážnou, ne-li celou část jejich populace (Jiří, 2018).

4.3 Mechanismy bakteriální rezistence vůči antibiotikům

Bakterie se proti účinku antibiotik brání různými mechanismy, mezi něž patří modifikace cílové struktury, na kterou antibiotika cílí, inhibice přístupu antibiotika k cílovému místu, aktivní transport antibiotik z bakteriální buňky, enzymatická inaktivace antibiotika, vytvoření cílových míst pro antibiotikum v nadbytku, náhrada zablokované bakteriální metabolické dráhy a zábrana aktivace antibiotika (Jiří, 2018).

4.3.1 Modifikace cílové struktury

Změny buněčných struktur, na které jsou antibiotika cílena, zahrnují modifikace enzymů, ribozomů nebo stavebních prvků buněčné stěny. Proti antibiotikům se bakteriální buňka nemůže bránit eliminací těchto cílových struktur z důvodu jejich důležitosti pro svou existenci, tudíž je pro ní jediným řešením jejich změna do takové míry, aby nemohly nadále interagovat s antibiotiky, ale zároveň si zachovaly svou funkci. Modifikace je umožněna pomocí přenosu genů kódujících tyto inovace mezi jednotlivými bakteriemi, nebo mutací genů původních. Příkladem je mutace genů kódujících syntézu enzymů RNA polymeráz a DNA gyráz, jejíž výsledkem je vznik rezistentních buněk proti rifamycinům a chinolonům, což jsou antibiotika cílící na tyto enzymy. Dalším příkladem může být změna stavby *penicilin-binding proteins*, která zabrání vazbě penicilinu. Změnou cílové bakteriální struktury dojde k absenci její afinity s antibiotiky a ke ztrátě jejich účinnosti (Hurych a kol., 2021; Jiří, 2018; Lambert, 2005; McManus, 1997).

U gram-negativních bakterií jsou častým místem modifikace vnější vrstvy buněčné stěny tvořící lipopolysacharidy, oligosacharidy a konkrétně jejich součástí – lipid A, jenž je cílovým místem pro kladně nabitá antibiotika polymixin B a colistin. Lipid A má záporný náboj, který způsobují záporně nabitě fosfátové skupiny. Jejich odstraněním se snižuje negativní náboj celé molekuly, a tím i její afinita k polymixinu B a colistinu (Garcia Vello a kol., 2022; T. Li a kol., 2023).

U gram-pozitivních bakterií je pozměňována zejména záporně nabitá kyselina lipoteichová takzvanou D-alanylací, tedy přidáním kladným D-alanylových zbytků k její struktuře, což snižuje její citlivost ke kladně nabitým antibiotikům polymixinu B, colistinu a dalším kationtovým antimikrobiálním peptidům, například magaininu (Garcia-Vello a kol., 2022; T. Li a kol., 2023).

4.3.2 Inhibice přístupu antibiotika k cílovému místu

Zamezit antibiotiku, aby se dostalo ke svému cílovému místu, může bakteriální buňka několika způsoby. Jedním způsobem je tvorba extracelulárních obalů, jako je například pouzdro nebo slizová vrstva, přes které má antibiotikum problém proniknout (Hurych a kol., 2021; Jiří, 2018).

Dalším způsobem je snížení permeability buněčné membrány. Gram-negativní bakterie ve své vnější membráně obsahují poriny, které mohou sloužit mimo příjmu jiných hydrofilních molekul také ke vstupu antibiotik do jejich periplazmického prostoru. Čím více má bakterie porinů, tím je citlivější k určitým druhům antibiotik. Pro redukci citlivosti při expozici antibiotiky omezuje bakterie počet porinů snížením exprese genů, které je kódují, či přímo odstraněním jednotlivých porinů. Kromě těchto úprav může také bakterie změnit u porinů jejich selektivitu, náboj nebo propustnost pomocí zúžení póru (Baran a kol., 2023; Hurych a kol., 2021; Pagès a kol., 2008; Zhang & Cheng, 2022).

U gram-pozitivních buněk s nízkým počtem guanino-cytosinových párů v chromozomální DNA, například u stafylokoků, mohou mutace v genech kódujících komponenty regulačního systému vést k syntéze buněčné stěny s vyšším obsahem peptidoglykanu. Dochází tak ke zvýšení tloušťky jejich buněčné stěny, a to znemožňuje průnik antibiotik do vnitřních prostor buňky (Baran a kol., 2023).

4.3.3 Aktivní transport antibiotik z bakteriální buňky

Aktivní transport antibiotik z bakteriálních buněk probíhá pomocí efluxních pump. Gram-negativní buňky disponují výhodou v podobě periplazmického prostoru, do kterého pronikají antibiotika nejdříve, a až pokud nedojde k jejich inaktivaci či vyloučení, dostávají se do cytosolu. U gram-pozitivních bakterií dochází k antibiotickému průniku do cytosolu rovnou (Baran a kol., 2023; Breijyeh a kol., 2020; Hurych a kol., 2021).

Pomocí efluxních pump nedochází k zneškodnění antibiotik či k přímému zabránění jejich účinnosti, antibiotikum je pouze po svém vstupu do intracelulárního prostoru z buňky vypuzeno. Jelikož je efluxní pumpa schopna za daný časový úsek vyloučit pouze určitý počet antibiotik, může se stát, že některé molekuly ATB již dosáhnou svého cílového místa a bakterii poškodí. Na aktivní transport je také potřeba množství energie, což je dalším omezujícím faktorem pro jejich výkonnost. K omezení jejich funkce může také dojít

prostřednictvím inhibice pump některými léky, například rezerpinem či omeprazolem. Naopak výhodou efluxních pump je jejich schopnost zbavování se několika druhů antibiotik najednou (Baran a kol., 2023; Jiří, 2018; Marquez, 2005; Webber & Piddock, 2003).

Efluxní pumpy jsou původní součástí bakterií, ale může také docházet k jejich dodatečnému šíření horizontálním přenosem. Častější je však přenos vertikální, u kterého selekčnímu tlaku podlehnou bakterie, které si nebyly schopny vyvinout vhodnou adaptaci, v tomto případě mutaci genů způsobujících zvýšenou tvorbu efluxních pump. Přeživší buňky s větším počtem efluxních pump zvyšujících jejich fitness se budou množit a tuto predispozici předávat dále (Baran a kol., 2023; Webber & Piddock, 2003).

Efluxní pumpy se dělí do šesti skupin (ABC²⁶, RND²⁷, MATE²⁸, MFS²⁹, SMR³⁰, PACE³¹), přičemž každá z nich interferuje s jinými druhy antibiotik. Efluxní pumpy z rodiny PACE jsou omezeny pouze na vylučování běžně používaných biocidů, například chlorhexidinu (Baran a kol., 2023; Hassan a kol., 2018).

U většiny gram-negativních bakterií jsou pumpy skupiny RND a některé pumpy skupin ABC, MATE a MFS složeny ze tří jednotlivých složek prostupujících celým buněčným obalem. Jsou umístěné ve vnitřní membráně a interagují s proteiny ve vnější membráně pomocí fúzních proteinů v periplazmatickém prostoru sloužících právě k propojení vnitřní a vnější membrány. Tyto efluxní pumpy transportují molekuly ATB přímo do extracelulárního prostoru, odkud je pro ně těžší vrátit se zpět do cytosolu. Převážný počet efluxních pump skupiny MSF a SMR je složen pouze z jednoho proteinového transportéru, umístěného v cytoplazmatické, tedy vnitřní, membráně a pumpuje antibiotika z cytosolu pouze zpět do periplazmatického prostoru (Baran a kol., 2023).

4.3.4 Enzymatická inaktivace antibiotika

Inaktivace antibiotik pomocí enzymů probíhá jejich hydrolýzou, redoxním procesem nebo připojením postranní skupiny. Těmito procesy dochází buď k rozštěpení, nebo k modifikaci

²⁶ ABC skupina – z anglického *ATP-binding cassette family*

²⁷ RND skupina – z anglického *resistance-nodulation-cell division family*

²⁸ MATE skupina – z anglického *multidrug and toxin extrusion family*

²⁹ MFS skupina – z anglického *major facilitator superfamily*

³⁰ SMR skupina – z anglického *small multidrug resistance family*

³¹ PACE skupina – z anglického *proteobacterial antimicrobial compound efflux family*

struktury antibiotika před dosažením jeho cílového místa, čímž se stává neaktivní. Enzymatický způsob rezistence je jedním z nejčastějších mechanismů bakteriální obrany z důvodu jeho efektivity a nízké spotřeby energie. Enzymy se snadno šíří do okolí a jedna jejich molekula dokáže deaktivovat velké množství antibiotik (Baran a kol., 2023; Jiří, 2018; Varela a kol., 2021; Zhang & Cheng, 2022).

Hydrolytický proces je charakteristický pro β -laktamázy, což jsou enzymy štěpící antibiotika patřící mezi β -laktamy. Sekrece enzymů je kódována chromozomálními či plazmidovými geny a mezi bakteriemi šířena pomocí přenosných genetických prvků. β -laktamázy se mohou kovalentně vázat na karbonylovou skupinu antibiotik, tím narušit jejich cyklickou strukturu a způsobit jejich degradaci. Lze u nich pozorovat i nehydrolytický způsob vazby, kdy po navázání antibiotika pouze znemožňují jeho vazbu na cílové místo. Bakterie vylučují různé typy β -laktamáz a každý z nich je schopný hydrolyzovat specifické β -laktamové kruhy. Kromě β -laktamových antibiotik je enzymatická hydrolyzační aktivita typická pro další antibiotika, například makrolidy, které jsou štěpeny pomocí specifických enzymů esteráz (Baran a kol., 2023; Varela a kol., 2021; Zhang & Cheng, 2022).

Inaktivace antibiotik přidáním postranní skupiny, zejména acylové, glykosydové, ribosylové, fosforylové nebo thiolové, změní strukturu antibiotik a ty se již nemohou vázat na cílové místo (Varela a kol., 2021).

Redoxní způsoby jsou bakteriemi využívány spíše výjimečně, například u bakterie *Bacteroides fragilis*, kdy jsou tetracykliny oxidovány enzymem TetX (Wright, 2005).

4.3.5 Vytvoření cílových míst v nadbytku

Při kontaktu s antibiotikem může bakterie začít syntetizovat větší množství enzymů či struktur, na něž je antibiotikum cíleno. Tento druh rezistence je pro bakterii energeticky nevýhodný a může ho z části nahradit výrobou molekulárních mimiker poskytujících antibiotikům náhradní terče. Příkladem je produkce peptidů MfpA mykobakteriemi, které napodobují DNA a brání se tak proti účinkům fluorochinolonů (Jiří, 2018).

4.3.6 Náhrada zablokované metabolické dráhy

Při inhibici metabolické dráhy může dojít k tvorbě dráhy alternativní, která původní nahradí. Náhradní dráha může vykazovat nižší účinnost, ale minimálně dočasně ochrání bakterii před

její smrtí. Některé metabolické syntézy lze také kompenzovat příjmem syntetizované látky z extracelulárního prostoru. Například enterokoky při vystavení antibiotikům zastaví výrobu kyseliny tetrahydrolistové a přejdou k jejímu příjmu z hostujícího organismu (Jiří, 2018; Zhang & Cheng, 2022).

4.3.7 Zábřana aktivace antibiotika

Antibiotika mohou být rozšířena v těle v jejich neaktivní formě profarmak (*prodrug*). K jejich aktivaci může dojít prostřednictvím jak neenzymatických, tak i enzymatických reakcí. Pokud je antibiotikum aktivováno bakteriálními enzymy, může přechodu do jeho účinné formy bakteriální buňka zabránit zastavením či snížením vylučování aktivačního enzymu, anebo jeho modifikací, aby s profarmaky neinteragoval (Jiří, 2018; Jubeh a kol., 2020; Yang a kol., 2011).

4.4 Přenos bakteriálního genetického materiálu

Přemístování částí genetického materiálu probíhá jak intrabakteriálně, tak i interbakteriálně. Intrabakteriální přenosy jsou přesuny části genomu uvnitř jedné bakteriální buňky transpozicí či rekombinací DNA. Transpozice probíhá pomocí transpozičních elementů vyčleněním, přeskokem a včleněním genů z jednoho místa na jiné. Rekombinace je proces včlenění extrachromozomálního DNA do chromozomu bakterie. Interbakteriální přenos je transport genetického materiálu z jedné bakteriální buňky do druhé (Hurych a kol., 2021).

4.4.1 Vertikální přenos bakteriálního genetického materiálu

Vertikální přenos je generační proces, kdy jsou rezistenční geny přenášeny z mateřské buňky na buňky dceřiné během buněčného dělení při replikaci DNA. Bakterie s rezistenčními geny budou mít v procesu rozmnožování nad bakteriemi citlivými výhodu, postupně bude jejich zastoupení v populaci převládat a v krajních případech jimi budou k antibiotiku citlivé bakterie zcela nahrazeny (Hurych a kol., 2021; Jiří, 2018; Jiří, 2014; Todar, 2011).

4.4.2 Horizontální přenos bakteriálního genetického materiálu

Horizontální přenos je proces, při kterém je genetický materiál transportován z jedné bakteriální buňky do jiné pomocí akcesorních genů v přenosných genetických elementech, kterými jsou plazmidy či transpozony. Na rozdíl od vertikálního je horizontální transfer umožněn i mezidruhově a často se vyskytuje i mezi prakticky nepříbuznými bakteriemi.

Mezi nejčastější přenášené mechanismy spadají ty, u kterých je možné získání rezistence pomocí pouze jednoho genu, například mechanismus syntézy enzymů inaktivující antibiotika. K tomu, aby mohlo dojít například ke změně pro antibiotikum cílového místa v bakterii, je zapotřebí z důvodu složitosti procesu získání většího počtu genů. Aby mohlo docházet ke vznikům i komplikovanějších typů rezistence, vytvořily si bakterie adaptaci pro shlukování takovýchto genů do úseků nazývaných genové ostrovy nebo genové kazety. Více je tomu věnováno v podkapitole Genové ostrovy a genové kazety (Hurych a kol., 2021; Jiří, 2018).

Přenos jednoho genu je sice pro bakterii jednodušší, nese však i jisté nevýhody, jako je například nadprodukce látky sloužící k rezistenci v důsledku nepřítomnosti regulačních struktur. Tato nadprodukce bakterii zatěžuje a zhoršuje její fitness. Pokud je rezistence přenášena společně s regulačními geny, hovoříme poté o takzvané indukibilní rezistenci, což znamená, že rezistentní mechanismus se spustí až poté, co dojde ke kontaktu s antibiotiky. Pokud jsou rezistentní mechanismy aktivní stále, jedná se o trvalou neboli konstitutivní rezistenci, jejíž geny jsou primárně umístěny v plazmidech, kterých se bakterie, jakmile pro ni přestanou znamenat výhodu a začnou ji naopak zatěžovat, může zbavit (Jiří, 2018).

Podle způsobu, kterým horizontální přenos probíhá, se dělí na transformaci, transdukcii a konjugaci (Hurych a kol., 2021; Jiří, 2018).

Transformace

Při transformaci bakteriální buňka absorbuje část holé DNA z vnějšího prostředí a integruje ji do svého genomu. DNA pochází primárně z uhynulých bakterií, které podlehly lyzi. Bakteriální buňka extracelulární DNA nemusí pokaždé přijmout, molekula pro ni není vždy kompatibilní, i když je prokázáno přijímání genetické informace i od nepříbuzných druhů. Nová DNA již také mohla podlehnout částečné degradaci způsobené například nukleázami. Schopnost přirozené transformace se vyskytuje pouze u některých zástupců, jako je *Streptococcus pneumoniae*. U dalších bakterií, například u *Escherichia coli*, ji lze vyvolat uměle (Abebe a kol., 2016; Hurych a kol., 2021; Sun, 2018; Todar, 2011).

Transformace probíhá u gram-negativních i u gram-pozitivních bakterií s tím rozdílem, že u gram-negativních buněk musí molekula DNA překonat navíc vnější membránu a periplazmický prostor, zatímco u buněk gram-pozitivních jí v cestě brání tlustá a pevná

petidoglykanová stěna, která musí být před vstupem nové genetické informace do vnitřních prostor buňky oslabena. Z původně dvouvláknové DNA je jedno vlákno translokováno do cytoplazmy bakterie a druhé je degradováno. Vlákno proniklé do cytoplazmy je následně zabudováno do bakteriálního chromozomu (Sun, 2018).

Transdukce

Transdukční mezibakteriální přenos je zprostředkován virem napadajícím bakterie: bakteriofágem. Jeho genetická informace je tvořena DNA či RNA uzavřenou v bílkovinném obalu nazývaném kapsida. Bakteriofág se bičíkovými vlákny přichytí k povrchu bakterie, zanoří do ní bazální ploténku a pomocí vysunutí duté bičíkové pochvy je umožněn průnik nukleové kyseliny viru z kapsidy do infikované bakterie, kde probíhá jeho reprodukce. Bakteriofágy se dělí na virulentní, které se po vstupu do hostitelské buňky rychle množí, čímž zapříčiňují její lýzu, a na bakteriofágy temperované. Temperované bakteriofágy včleňují po infikování bakteriální buňky svou nukleovou kyselinu do jejího DNA. Replikace virů probíhá společně s replikací bakterie, dokud nedojde k jejich aktivaci vnějšími faktory a nezačnou se množit a bakterii lyzovat. Fágy tím takzvaně přejdou z lyzogenního cyklu do lytického (Hurych a kol., 2021).

Při množení bakteriofágů může být do jejich genetického materiálu integrována z části i bakteriální DNA. Integrace může být cílená, v tom případě se jedná o specializovanou transdukci, či zcela náhodná, nazývaná jako transdukce generalizovaná. Množství včleněné genetické informace závisí na velikosti viru. Poté, co se bakteriofágy z buňky uvolní, infikují okolní bakterie včleněním své nukleové kyseliny do jejich genomu, čímž mohou předávat i část DNA předchozího hostitele. Bakteriofágy mají úzké spektrum hostitelů a nejsou tedy příliš účinné při šíření rezistence mezi bakteriemi (Hurych a kol., 2021; McManus, 1997).

Konjugace

Konjugace je přímé jednostranné předávání plazmidového či části chromozomálního genetického materiálu mezi donorovou a recipientní buňkou. Donorová buňka obsahující konjugativní F plazmid je označována jako F⁺ a bakteriální buňka F⁻, u níž F plazmid chybí, je vždy recipientem. F plazmid řídí proces předávání genetického materiálu a nese geny pro tvorbu F pilusů zprostředkovávajících přenos. Přenos může být uskutečněn i napříč druhy bakterií (Hurych a kol., 2021; Jiří, 2014; McManus, 1997).

5 Bakteriální multirezistence vůči antibiotikům

Pokud je bakterie rezistentní k příbuzným antibiotikům, vyznačujícím se podobnou chemickou strukturou a mechanismem účinku, je její odolnost nazývána jako rezistence zkřížená. Pokud je bakterie rezistentní k více antibiotikům s odlišnou chemickou strukturou a mechanismem účinku, jedná se o rezistenci sdruženou, mezi kterou se řadí i multirezistence (MDR³²) (Hurych a kol., 2021).

Bakteriální multirezistence je typ rezistence, při které je daný kmen bakterií odolný minimálně ke třem nepříbuzným skupinám antibiotik, přičemž v každé ze skupin musí tuto vlastnost vykazovat alespoň jedno konkrétní antibiotikum. Jako příklad lze uvést bakterii *Pseudomonas aeruginosa*, která je rezistentní k cefalosporinům, konkrétně k ceftazimidu, dále k fluorochinonům v zastoupení ciproflaxinu a ke karbapenemům (patřícím mezi β -laktamy), specificky k imipenemu (Jiří, 2018; Kolářová a kol., 2020).

Multirezistence vzniká dvěma mechanismy. Prvním je kumulace různých rezistentních genů, přičemž každý gen, nebo minimálně alespoň tři z nich, kódují odlišný typ mechanismu rezistence ke konkrétnímu antibiotiku. Druhým mechanismem je mutace či příjem genetického materiálu zodpovědného za syntézu a zvýšenou expresi efluxních pump (Hurych a kol., 2021; Nikaido, 2009; Sun a kol., 2014).

Efluxní pumpy, nazývané také anglicky *multidrug efflux pums*, díky své polysubstrátové specifitě dokáží z bakteriální buňky vylučovat široké spektrum antibiotik. Efluxní pumpy přispívají k multirezistenci, zejména vůči tetracyklinům, chloramfenikolu, β -laktamům, aminoglykosidům, chinolonům, sulfonamidům nebo trimethoprimu. Syntéza bílkovin pro výrobu efluxních pump je ale z energetického hlediska náročná, což bakterii zatěžuje a může to snížit její konkurenceschopnost a virulenci. Při nadměrné expresi pump byla u některých druhů bakterií zaznamenána kompenzace vyvinutím specifické adaptace. Například *Neisseria gonorrhoeae* či *Pseudomonas aeruginosa* jako odpověď na vysokou koncentraci chloramfenikolu spojeným s nadvýrobou RND efluxních pump změnilы svůj uhlovodíkový metabolismus z oxidačního stavu, vyžadujícího kyslík, na anaerobní

³² MDR – multirezistence (z anglického *multiple drug resistance*)

fermentativní metabolismus, a částečně tak vykompenzovaly stres způsobený antibiotikem a míru vydané energie (Baran a kol., 2023; Du a kol., 2018; Sun a kol., 2014).

Bakteriální geny rezistence vůči antibiotikům mají tendence se shlukovat do rezistenčních genových kazet, jak to je již popsáno v podkapitole Genové ostrovy a genové kazety. Bakterie, které obsahují více genů rezistence, budou odolnější vůči více druhům antibiotik a mají větší šanci na přežití (Bennett, 2008; Jiří, 2018).

Kazety s rezistentními geny se často včleňují do integronů. Integrony schopné způsobit multirezistenci patří do třídy 1, 2 nebo 3. Tyto tři třídy jsou schopny získávat stejné genové kazety díky jejich podobné rekombinační platformě. Nejčastěji se však rezistenční kazety nacházejí u integronů třídy 1. V jednom integronu lze najít až 8 různých genů rezistence. Integrony jsou obvykle součástí transpozonů, které jim umožňují transporty v rámci bakteriálního genomu, ale společně s plazmidy zajišťují i jejich přenos mezi jednotlivými bakteriemi (Bennett, 2008; Deng a kol., 2015; Ilyina, 2012; Nikaido, 2009).

K vzniku multirezistence také mohou značně přispívat ISCR³³. Díky jejich specifické opakované transpozici mohou vznikat obrovské mobilizovatelné bloky genů, obsahující velký počet rezistentních genů (Bennett, 2008; Deng a kol., 2015; Ilyina, 2012; Nikaido, 2009).

³³ ISCR – inzerční sekvence obsahující společné oblasti (z anglického *insertion sequences containing common regions*)

6 Bakteriální extenzivní rezistence vůči antibiotikům a panrezistence

Roku 2012 vznikla standardizovaná mezinárodní terminologie, kterou vytvořilo Evropské středisko pro kontrolu nemocí (ECDC³⁴) společně se Středisky pro kontrolu a prevenci nemocí (CDC³⁵). Podle tohoto systému existují kromě MDR ještě dvě kategorie, a to XDR³⁶ a PDR³⁷ (Basak a kol., 2016; Jiří, 2018).

Extenzivní rezistence (XDR) bakterií vůči antibiotikům je popsána jako odolnost na minimálně jedno antibiotikum ze všech antibiotických skupin vyjma maximálně dvou (Basak a kol., 2016; Jiří, 2018).

Panrezistence (PDR) je definována jako necitlivost k úplně všem známým skupinám antibiotik (Basak a kol., 2016; Jiří, 2018).

³⁴ ECDC – akronym pro Evropské středisko pro kontrolu nemocí (z anglického *European Centre for Disease Prevention and Control*)

³⁵ CDC – akronym pro Střediska pro kontrolu a prevenci nemocí (z anglického *Centers for Disease Control and Prevention*)

³⁶ XDR – extenzivní rezistence (z anglického *extensively drug resistance*)

³⁷ PDR – panrezistence (z anglického *pandrug resistance*)

7 Bakteriální perzistence a tolerance vůči antibiotikům

7.1 Bakteriální tolerance vůči antibiotikům

Tolerance je stav bakterií, kdy sice dochází k jejich usmrcování prostřednictvím antibiotik, ale výrazně pomaleji, než by tomu bylo za normálních okolností. Tolerance může být důsledkem buď dědičné mutace, nebo častěji je odpovědí na stres způsobený například hladověním. Při hladovění nemá bakterie energii na obvyklou míru tvorby bílkovin a peptidoglykanu, tudíž antibiotika, pro něž jsou tato místa cílová, nemohou být tolik efektivní a jejich účinek je patrný až po delší době. Jakmile je stresor odstraněn, buňky opět začnou normálně růst a jejich citlivost k antibiotikům je obnovena. Pokud jsou bakterie tolerantní k více antibiotikům najednou, stav je nazýván jako multitolerance. Tolerance může také vzniknout jako důsledek perzistence, kdy se z citlivých buněk postupně stávají perzistori, až následně tvoří téměř celou či dokonce celou populaci živých bakterií (Berti & Hirsch, 2020; Jiří, 2018; Melter, 2021).

7.2 Bakteriální perzistence vůči antibiotikům

Zatímco se tolerance, stejně jako rezistence, týká celé bakteriální populace, perzistence se naopak vztahuje jen k malé části bakteriálních buněk, která nebývá vyšší než 1 %. Z bakteriální populace je vyčleněna část takzvaných perzistorů, které jsou vůči antibiotikům odolné. Peristentní buňky nejsou schopny se množit či růst po celou dobu antibiotického stresu, ale zůstávají životaschopné. Tyto odolné buňky přežívají antibiotickou léčbu a po jejím skončení se začnou opět množit, a tvoří tak novou bakteriální populaci, jejíž zástupci, kromě pár perzistorů, budou vůči antibiotikům citliví. Pokud však budou bakterie antibiotiku vystaveny dlouhodobě a v tak malých dávkách, aby mohlo docházet k jejich proliferaci, budou mít tendence se stát rezistentními (Jiří, 2018; Melter, 2021).

Perzistence se dělí na dva typy. Perzistence I. typu neboli perzistence indukovaná vzniká vlivem vnějších podmínek, jako je například změna pH, nedostatek živin, změny teplot či přítomnost antibiotik. Jejich frekvence výskytu v populaci se pohybuje okolo 10^{-6} . Perzistence II. typu se nazývá perzistence náhodná či přirozená. Její vznik není přímo ovlivněn okolními podmínkami, ale dochází k němu chybou metabolické funkce bakterie, která však mimo jiné může být také důsledkem vlivu například antibiotik. Její četnost

v populaci je přibližně 10^{-9} . Náhodné perzistenci se jinak také říká strategie „na jistotu“, neboť může zachránit budoucí existenci citlivých bakteriálních populací v infikovaném organismu při antibiotické terapii (Melter, 2021).

Mechanismů perzistence, které bakterie využívají, je mnoho a jsou často specifické pro určité bakteriální druhy. Mezi nejběžnější mechanismy patří dormace či zábrana kontaktu antibiotika s bakterií. Aby nedošlo k interakci antibiotika a dané bakterie, mohou bakterie dočasně přežívat v jiných buňkách organismu, například v makrofágách, nebo mohou být součástí biofilmu. Dormace je uměle navozený stav bakterií připomínající spánek, způsobený snížením metabolismu a utlumením či úplným zastavením jednotlivých funkcí buňky. V tomto stavu na buňku široké spektrum antibiotik neúčinkuje, i když je na ně bakterie jinak citlivá. Příkladem může být bakterie *Burkholderia thailandensis*, která do dormativního stavu přejde depolarizací membrány a snížením své metabolické aktivity, čímž se stává odolnou vůči antibiotikům cílícím na inhibici syntézy DNA a proteinů (Hurych a kol., 2021; Jiří, 2018; Melter, 2021).

Každá bakteriální populace, která byla kdy prozkoumána, vždy obsahovala i zástupce perzistentních buněk. Jejich míru lze však velmi těžko určovat, neboť MIC je pro perzistentní buňky stejná jako pro buňky citlivé. Pro jejich laboratorní stanovení se používá výpočet $\frac{MBC^{38}}{MIC^{39}} \geq 32$ (Melter, 2021).

7.2.1 Perzistentní infekce

Jako perzistentní jsou označovány takové infekce, které nebyly z hostitelského organismu úspěšně odstraněny a stále v něm přetrvávají. Infekcí, za něž jsou zodpovědné perzistentní bakterie, je pouze jejich malá část. Většina z chronických či rekurentních infekcí vzniká z jiných důvodů na straně hostitele, například kvůli snížené imunitě. Z důvodu nízkého počtu infekcí způsobených perzistencí stále není perzistence brána v úvahu při výběru léčby pro pacienta. Každá bakteriální populace má sice určité zastoupení perzistentních jedinců, kteří v hostiteli přežívají i po antibiotické léčbě, ale pokud se jedná pouze o malý počet těchto buněk, zdravý imunitní systém hostitelského organismu je schopen jejich eliminace.

³⁸ MBC – minimální baktericidní koncentrace antibiotika

³⁹ MIC – minimální inhibiční koncentrace antibiotika

Dlouhodobým působením stresorů na perzistory může také dojít ke snížení míry jejich virulence, avšak to může dát prostor pro vznik a šíření rezistence (Melter, 2021).

7.3 Rozdíl mezi bakteriální rezistencí, perzistencí a tolerancí vůči antibiotikům

Rezistence je stav, kdy je bakteriální populace vystavena antibiotikům a všechny bakterie mají tendenci tvorby či získávání genů rezistence, díky čemuž mají šanci antibiotický selekční tlak přežít. Po jeho ukončení velká část z nich zůstává rezistentními. U tolerance dochází k dočasné odolnosti bakteriální populace, kterou nejčastěji způsobuje vliv vnějších podmínek, jako je například hladovění, a po ústupu těchto faktorů jsou opět bakterie k antibiotiku citlivé. Perzistence se na rozdíl od výše uvedených dvou termínů liší tím, že jde o stav pouze malého počtu buněk z celkové populace (Melter, 2021).

Perzistentní a tolerantní buňky nejsou na rozdíl od buněk rezistentních schopny proliferace, pokud dojde k jejich kontaktu s baktericidním antibiotikem a nenachází se u nich strukturální geny, které jsou zodpovědné za jejich odolnost (Melter, 2021).

8 Biofilm

Biofilm je komplexní struktura bakterií pevně spojená s povrchem. Může být složen z jednoho druhu bakterie, ale častější jsou takzvané biofilmy smíšené, obsahující několik různých bakteriálních druhů. Biofilm vzniká počátečním přichycením bakterií k biotickému či abiotickému podkladu. Adheze může být zprvu reverzibilní za pomoci slabých vazebných sil, ale následně se stává trvalou. K trvalému zachycení dochází prostřednictvím struktur na povrchu buněk, například u bakterií rodu *Salmonella* jsou adheziny nejčastěji fimbrie I. typu. Po stabilizaci těchto primárních kolonizátorů, jak jsou bakterie zakládající biofilm nazývány, dochází k jejich růstu a rozmnožování, čímž dávají vzniku mikrokolonií. Když hustota bakterií dosáhne bodu prahové hodnoty, spustí se tím *quorum-sensing* (QS⁴⁰) systém. QS systém je komunikační systém mezi bakteriemi koordinující jejich chování na základě hustoty populace pomocí změny genové exprese. Tento systém funguje na základě vysílání signálních molekul, které jsou pro každý druh bakterií specifické, a pomocí nich dochází k monitoringu populace. Pokud dosáhne hustota populace již zmíněného hraničního bodu, je umožněn začátek tvorby biofilmu (Dufour a kol., 2010; Hurych a kol., 2021; P. Li a kol., 2023; Miller & Bassler, 2001).

Bakterie v biofilmu se vyznačují tvorbou biofilmového matrixu slizového charakteru, který může tvořit 80-85 % jeho celkového objemu. Je tvořen extracelulární DNA (eDNA⁴¹) nezbytnou pro mezibuněčné spojení, matricovými proteiny a z největší části extracelulárními polysacharidy pomáhajícími udržovat strukturu biofilmu a přispívajícími k tvorbě trojrozměrných struktur. Zralý biofilm se vyznačuje strukturou mnoha dutin a kanálků zaplněných vodou, které slouží k distribuci živin, zbavování se odpadních látek a přenosu molekulárních signálů, sloužících ke komunikaci jednotlivých buněk. Struktura biofilmu je často přirovnávána k podobě makroorganismů, eukaryotických tkání či k městu, kdy buňky společně kooperují, aby byl společný celek, jehož jsou součástí, funkční (Dufour a kol., 2010; Hurych a kol., 2021; P. Li a kol., 2023; Melter, 2021).

⁴⁰ QR systém — z anglického *quorum-sensing system*

⁴¹ eDNA — extracelulární DNA

Z biofilmu často dochází k uvolňování jednotlivých planktonických⁴² buněk či jejich skupin. Tento proces může být aktivní nebo pasivní. Aktivní uvolňování je způsobeno stresem z nedostatku živin, ze změny prostředí nebo z důvodu antibiotické léčby. Pasivní proces je ovlivněn změnami struktur v biofilmu, například jsou buňky nuceny přejít do planktonického stavu za předpokladu, že dojde k degradaci biofilmového matrixu. Oddělené bakterie mohou zůstat v planktonickém stavu, připojit se k jinému biofilmu či se stát primárními kolonizátory biofilmu nového (Dufour a kol., 2010; Hurych a kol., 2021; P. Li a kol., 2023).

Pokud je to možné, dávají bakterie přednost životu v biofilmu, který je pro ně na rozdíl od existence ve formě planktonických buněk mnohem výhodnější. Dle studií mají bakterie v biofilmu stokrát až tisíckrát větší šanci na přežití. Bakterie jsou chráněny matrixem, který zabraňuje pronikání molekul antibiotika k jednotlivým buňkám a zároveň může neutralizovat kladně nabitá antibiotika, například aminoglykosidy, svým záporným nábojem. Dalším mechanismem, kterým může biofilm bakterie chránit, je hromadění velkého množství enzymů tvořených jeho maticí, kupříkladu β -laktamáz, které mají schopnost inaktivace některých druhů antibiotik. Rezistenční schopnosti biofilmu nejsou genetického původu, ale jsou způsobené jeho fenotypem. Jednotlivé bakterie jsou ale stále schopné autonomní tvorby rezistenčních mechanismů a jejich přenos mezi buňkami je mnohem jednodušší, než když jsou v planktonickém stavu (Dufour a kol., 2010; P. Li a kol., 2023).

Biofilm je také ideálním místem pro vznik perzistentních buněk. Koncentrace kyslíku ve svrchních vrstvách biofilmu je vysoká, což tvoří ideální podmínky pro rychlý metabolismus bakterií, které se zde vyskytují. Čím níže, tedy blíže k podkladu však bakterie jsou, tím nižší množství kyslíku mají k dispozici, což má za následek zpomalení či dočasné zastavení jejich metabolismu a stávají se tak perzistentními (Dufour a kol., 2010; Hurych a kol., 2021; P. Li a kol., 2023).

V lékařství je biofilm důležitým pojmem, neboť se odhaduje, že způsobuje přibližně 60 % všech bakteriálních infekcí a až 80 % chronických infekcí. Biofilm se tvoří nejen v těle na

⁴² Planktonické bakteriální buňky – volně se pohybující bakteriální buňky

přirozených místech, jako je sliznice zažívacího traktu nebo dýchací ústrojí, ale jeho tvorba je typická zejména pro umělé povrchy, jakými jsou katétry nebo chirurgické implantáty. Mimo tělo vznikají biofilmy hlavně na lékařských nástrojích (Dufour a kol., 2010; Hurych a kol., 2021; P. Li a kol., 2023).

9 Zábřana vzniku a eliminace infekcí způsobených odolnými bakteriemi

9.1 Eliminace bakteriální rezistence a multirezistence vůči antibiotikům

Léčba infekcí způsobených rezistentními bakteriemi je obtížná, a proto je důležité jejich vzniku co nejvíce předcházet. Antibiotická léčba neovlivňuje pouze jednotlivce, nýbrž má širší epidemiologický rozměr. Antibiotika jsou často nasazována zbytečně, jelikož s některými druhy bakterií si je lidský imunitní systém schopen poradit sám, popřípadě s lehkou pomocí bakteriostatických antibiotik, která pouze zpomalí či zastaví jejich růst. Baktericidní léčba je poté vhodná, pokud imunitní systém hostitele selže. Nesprávné použití typu antibiotické léčby, její intenzity či délky vede k rozvoji rezistence a multirezistence u bakterií. Před předepsáním antibiotické léčby pacientovi by měl lékař vyhodnotit všechny okolnosti, a rozhodnout tak o následném správném postupu. K vzdělávání lékařů ohledně tohoto problému je vytvořen speciální program nazývaný *antibiotics stewardship*⁴³, který má za cíl zabránit nadměrnému užívání antibiotik, oddálit nástup rezistence, zvýšit efektivitu a bezpečnost antibiotické léčby a snížit její náklady (Hurych a kol., 2021; Jiří, 2018; Kolář a kol., 2020).

U pacientů je zásadní dodržování přesné léčby předepsané lékařem. I po ústupu symptomů infekce je nezbytné pokračovat v užívání předepsaných antibiotik, pokud není na základě konzultace s lékařem doporučeno jinak. Tímto způsobem lze předejít návratu infekce a snížit riziko vzniku mechanismů bakteriální rezistence vůči antibiotikům (Hurych a kol., 2021; Jiří, 2018; Kolář a kol., 2020).

Důležité je rovněž dodržování hygienicko-epidemiologických předpisů, osvědčenost odborníků, informovanost veřejnosti o situaci a systematické monitorování jejího vývoje. Sledováním vzniku a výskytu rezistenčních kmenů se zabývá v České republice Státní zdravotní ústav (SZÚ⁴⁴), konkrétně Národní antibiotický program (NAP⁴⁵). Pro Evropskou

⁴³ Antibiotics stewardship – termín nemá český překlad, ale je volně definován jako sada opatření směřujících k rozumnému využití antibiotik, která zahrnuje jejich vhodný výběr, správnou délku léčby a vhodný způsob podávání (převzato z: Kolář a kol., 2020)

⁴⁴ SZÚ – Státní zdravotní ústav

⁴⁵ NAP – Národní antibiotický program

unii existuje internetová stránka EARS-Net⁴⁶ sbírající informace o těchto osmi bakteriích: *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecium*, *Acinetobacter species* a *Klebsiella pneumoniae*, o nichž tam jsou každý rok zveřejňovány aktuální informace týkající se jejich výskytu, rezistence atd. (Hurych a kol., 2021; Kolář a kol., 2020).

Pokud již bakterie obsahují rezistenční mechanismy a jsou tedy rezistentní vůči některým druhům antibiotik, je nutné zjistit vůči jakým a to pomocí odebrání vzorku těchto bakterií a provedením testů citlivosti. Na základě výsledků testů je možné zvolit léčbu vhodným antibiotickým přípravkem (Hurych a kol., 2021; Kolář a kol., 2020).

Jelikož míra rezistence bakterií vůči antibiotikům neustále stoupá, je nezbytný vývoj nových druhů antibiotik, ale i dalších typů terapií, například pomocí bakteriofágů, polypeptidů či nanočástic, a neustálé hledání nových vhodných cílových míst pro antibakteriální přípravky. V opačném případě je pravděpodobné, že v budoucnu již léčba nebude účinkovat (Hurych a kol., 2021; Kolář a kol., 2020; Varela a kol., 2021).

9.2 Eliminace bakteriální perzistence vůči antibiotikům

Odstranění bakteriálních perzistentních buněk je možné jejich přímou eliminací, senzibilací k antibiotikům pomocí resuscitace nebo zabráněním jejich vzniku. Při přímé eliminaci je použita látka vůči níž perzistor odolný není a způsobuje jeho lyzi. Mezi takové látky patří například antimikrobiální peptidy či lytické fágy a jejich enzymy, endolyziny. U senzibilace antibiotik pomocí resuscitace je nejdříve třeba do hostitele vpravit senzibilátor. Senzibilátor je látka obnovující struktury bakterie, například molekuly DNA, které byly narušeny stresem způsobeným vnějšími podmínkami. Antibiotika, pro která jsou tyto struktury cílovým místem, se na ně nemohou z důvodu poškození vázat a interagovat s nimi. Po jejich opravě je však přístup antibiotik k cílovým místům obnoven a bakterie se stává k danému antibiotiku opět citlivou. Zabránění vzniku perzistorů je umožněno podáním účinné látky, například oxidu dusného, což zabrání vzniku a dopadu stresových odpovědí, které by měly za následek vznik indukované perzistence. Bakterie na stresové podmínky vznikem perzistence reagují velice rychle, a proto by měly být účinné látky podávány ideálně preventivně (Melter, 2021).

⁴⁶ EARS-Net – akronym z anglického *European Antimicrobial Resistance Surveillance Network*

9.3 Eliminace biofilmu

K odstranění biofilmu jsou používány vysoké dávky antibiotik. Tato metoda ale často není účinná a navíc zvyšuje pravděpodobnost vzniku rezistence na použité medikamenty. Nejlepším způsobem je tedy, pokud možno, co nejvíce vzniku biofilmů předcházet. Pokud je biofilm přítomen na umělých implantátech a antibiotická léčba nezabírá, řešením je jejich chirurgická výměna (P. Li a kol., 2023).

Aby se zabránilo vzniku biofilmu na biomateriálech vpravovaných do těla, je na jejich povrch nanášen antibakteriální povlak. Antibakteriální povlaky se dělí na aktivní a pasivní. Aktivní povlaky zabraňují infekci pomocí postupného uvolňování antimikrobiálních látek, které obsahují. Nejvíce používanými jsou antibiotické povlaky anebo povlaky vyrobené z nanomateriálů produkující volné radikály či vyvolávající oxidační stres, čímž způsobují degradaci bakteriální DNA. Příkladem nanomateriálů jsou často využívané nanočástice stříbra. Mechanismem pasivních povlaků je zábrana přilnutí bakterií na jejich stěny díky použití hydrofilních materiálů na jejich výrobu. Mezi používané hydrofilní materiály patří kupříkladu kyselina hyaluronová, hydrogelový povlak nebo heparinový povlak (P. Li a kol., 2023).

V nedávné době byl testován povlak vytvořený kombinací kvarterního chitosanu majícího baktericidní účinky, enzymu acylázy zasahujícího do komunikace a regulace aktivit bakteriálních buněk včetně jejich tendence tvořit biofilm a kyseliny hyaluronové s hydrofilní povahou. Kromě inhibice tvorby biofilmu, lze povlak, konkrétně v něm obsažený chitosan, použít na výrobu gelu, který regeneruje kostní tkáň. Povlak by tedy mohl být velice efektivní nejen pro prevenci vzniku biofilmu, ale i pro léčbu kostních tkání. Tato léčba by mohla znamenat menší chirurgické zásahy do lidského těla, a tedy nižší šanci vzniku infekcí (P. Li a kol., 2023).

Negativem antibakteriálních povlaků je jejich krátká doba účinnosti a také fakt, že značná část materiálů na jejich výrobu byla zatím testována pouze in vitro a klinický výzkum musí být ještě proveden (P. Li a kol., 2023).

Dlouhotrvající, avšak méně účinnou, je fyzikální metoda úpravy povrchu implantátu, kdy dochází ke snižování jeho hrubosti. Obecným předpokladem totiž je, že čím je nižší hrubost povrchu materiálu, tím těžší pro bakterie adheze na něj je (P. Li a kol., 2023).

Závěr

Bakteriální rezistence vůči antibiotikům představuje neustále se vyvíjející celosvětový problém, o kterém je třeba rozšiřovat povědomí nejen mezi odborníky, ale i mezi veřejností. Antibiotická léčba jednice či využití antibiotik v různých průmyslových odvětvích má zároveň vždy i epidemiologický přesah. Aby byla antibiotická terapie účinná a efektivní i v budoucích letech, je třeba, aby se každý jedinec k této problematice stavěl zodpovědně a nepřispíval k jejímu zhoršování. Vývoj a testování nových antimikrobiálních přípravků je velice zdoluhavý proces, a proto je nutné zbytečnému vzniku odolných bakterií vůči již existujícím medikamentům předcházet.

Práce shrnuje téma rezistentních bakterií vůči antibiotikům, vysvětluje základní pojmy, které se problematiky týkají, a zabývá se také možnými způsoby zábrany vzniku odolných bakterií a jejich případnou eliminací. Rešeršní práce byla psána za použití aktuální literatury zahrnující nové výzkumy a objevy, které přispívají k dalšímu posunu v tomto oboru.

Neustálé provádění nových výzkumů a studií je nutností pro udržení účinnosti antibiotické terapie a pro prevenci jejího potencionálního selhání.

Seznam použitých informačních zdrojů

- Abebe, E., Tegegne, B., & Tibebe, S. (2016). A review on molecular mechanisms of bacterial resistance to antibiotics. *European Journal of Applied Sciences*, 8(5), 301-310.
- Artasensi, A., Mazzotta, S., & Fumagalli, L. (2021). Back to basics: Choosing the appropriate surface disinfectant. *Antibiotics*, 10(6), 613.
- Baran, A., Kwiatkowska, A., & Potocki, L. (2023). Antibiotics and Bacterial Resistance—A Short Story of an Endless Arms Race. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(6), 5777.
- Basak, S., Singh, P., & Rajurkar, M. (2016). Multidrug Resistant and Extensively Drug Resistant Bacteria: A Study. *J Pathog*, 2016, 4065603.
- Bennett, P. M. (2008). Plasmid encoded antibiotic resistance: acquisition and transfer of antibiotic resistance genes in bacteria. *British journal of pharmacology*, 153(S1), S347-S357.
- Berti, A. D., & Hirsch, E. B. (2020). Tolerance to antibiotics affects response. *science*, 367(6474), 141-142.
- Beveridge, T. J. (1999). Structures of gram-negative cell walls and their derived membrane vesicles. *Journal of bacteriology*, 181(16), 4725-4733.
- Brejyeh, Z., Jubeh, B., & Karaman, R. (2020). Resistance of gram-negative bacteria to current antibacterial agents and approaches to resolve it. *Molecules*, 25(6), 1340.
- Coico, R. (2006). Gram staining. *Current protocols in microbiology*(1), A. 3C. 1-A. 3C. 2.
- Deng, Y., Bao, X., Ji, L., Chen, L., Liu, J., Miao, J., Chen, D., Bian, H., Li, Y., & Yu, G. (2015). Resistance integrons: class 1, 2 and 3 integrons. *Annals of clinical microbiology and antimicrobials*, 14, 1-11.
- Du, D., Wang-Kan, X., Neuberger, A., Van Veen, H. W., Pos, K. M., Piddock, L. J., & Luisi, B. F. (2018). Multidrug efflux pumps: structure, function and regulation. *Nature Reviews Microbiology*, 16(9), 523-539.

- Dufour, D., Leung, V., & Lévesque, C. M. (2010). Bacterial biofilm: structure, function, and antimicrobial resistance. *Endodontic Topics*, 22(1), 2-16.
- Garcia-Vello, P., Di Lorenzo, F., Zucchetta, D., Zamyatina, A., De Castro, C., & Molinaro, A. (2022). Lipopolysaccharide lipid A: A promising molecule for new immunity-based therapies and antibiotics. *Pharmacology & Therapeutics*, 230, 107970.
- Garneau-Tsodikova, S., & Labby, K. J. (2016). Mechanisms of resistance to aminoglycoside antibiotics: overview and perspectives. *Medchemcomm*, 7(1), 11-27.
- Hassan, K. A., Liu, Q., Elbourne, L. D., Ahmad, I., Sharples, D., Naidu, V., Chan, C. L., Li, L., Harborne, S. P., & Pokhrel, A. (2018). Pacing across the membrane: the novel PACE family of efflux pumps is widespread in Gram-negative pathogens. *Research in Microbiology*, 169(7-8), 450-454.
- Heinz, L., Klaus, M., & Lutz, H. (2012). *Barevný atlas farmakologie-Překlad 4. anglického, zcela přepracovaného a rozšířeného vydání*. Grada Publishing as.
- Higgins, M. K., Bokma, E., Koronakis, E., Hughes, C., & Koronakis, V. (2004). Structure of the periplasmic component of a bacterial drug efflux pump. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(27), 9994-9999.
- Hurych, J., Štícha, R., Hanzalová, I., Křížová, L., & Tichá, K. (2021). *Lékařská mikrobiologie: repetitorium*. Stanislav Juhaňák-Triton.
- Ilyina, T. (2012). Mobile ISCR elements: structure, functions, and role in emergence, increase, and spread of blocks of bacterial multiple antibiotic resistance genes. *Molecular Genetics, Microbiology and Virology*, 27, 135-146.
- Jiří, B. (2018). *Antibiotika: systematika, vlastnosti, použití*. Grada Publishing as.
- Jiří, S. (2014). *Mikrobiologie: Pro studenty zdravotnických oborů, 2., doplněné a přepracované vydání*. Grada Publishing as.
- Jubeh, B., Breijyeh, Z., & Karaman, R. (2020). Antibacterial prodrugs to overcome bacterial resistance. *Molecules*, 25(7), 1543.
- Kolář, M., Rejman, D., & Bardoň, J. (2020). *Zásady antibiotické léčby*. Palacký University Olomouc.

- Kolářová, L., Adámková, V., Dolejská, M., Dřevínek, P., Haber, J., Hamal, P., Hrabák, J., Hubáček, P., Kletenská, B., Mallátová, N., Nyč, O., Petanová, J., Posová, H., Stejskal, F., Stříž, I., Šimečková, E., & Urbášková, P. (2020). *Obecná a klinická mikrobiologie*. Galén.
- Lambert, P. A. (2005). Bacterial resistance to antibiotics: modified target sites. *Advanced drug delivery reviews*, 57(10), 1471-1485.
- Lee, A. R., Park, S. B., Kim, S. W., Jung, J. W., Chun, J. H., Kim, J., Kim, Y. R., Lazarte, J. M. S., Jang, H. B., & Thompson, K. D. (2022). Membrane vesicles from antibiotic-resistant *Staphylococcus aureus* transfer antibiotic-resistance to antibiotic-susceptible *Escherichia coli*. *Journal of applied microbiology*, 132(4), 2746-2759.
- Li, P., Yin, R., Cheng, J., & Lin, J. (2023). Bacterial biofilm formation on biomaterials and approaches to its treatment and prevention. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(14), 11680.
- Li, T., Wang, Z., Guo, J., de la Fuente-Nunez, C., Wang, J., Han, B., Tao, H., Liu, J., & Wang, X. (2023). Bacterial resistance to antibacterial agents: mechanisms, control strategies, and implications for global health. *Science of The Total Environment*, 860, 160461.
- MacNair, C. R., & Tan, M. W. (2023). The role of bacterial membrane vesicles in antibiotic resistance. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1519(1), 63-73.
- Marquez, B. (2005). Bacterial efflux systems and efflux pumps inhibitors. *Biochimie*, 87(12), 1137-1147.
- McManus, M. C. (1997). Mechanisms of bacterial resistance to antimicrobial agents. *American Journal of Health-System Pharmacy*, 54(12), 1420-1433.
- Melter, O. (2021). *Bakteriální perzistence vůči antibiotikům*. Charles University in Prague, Karolinum Press.
- Miller, M. B., & Bassler, B. L. (2001). Quorum sensing in bacteria. *Annual Reviews in Microbiology*, 55(1), 165-199.

- Nelson, M. L., & Levy, S. B. (2011). The history of the tetracyclines. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1241(1), 17-32.
- Nikaido, H. (2009). Multidrug resistance in bacteria. *Annual review of biochemistry*, 78, 119-146.
- Pagès, J.-M., James, C. E., & Winterhalter, M. (2008). The porin and the permeating antibiotic: a selective diffusion barrier in Gram-negative bacteria. *Nature Reviews Microbiology*, 6(12), 893-903.
- Sun, D. (2018). Pull in and push out: mechanisms of horizontal gene transfer in bacteria. *Frontiers in microbiology*, 9, 2154.
- Sun, J., Deng, Z., & Yan, A. (2014). Bacterial multidrug efflux pumps: mechanisms, physiology and pharmacological exploitations. *Biochemical and biophysical research communications*, 453(2), 254-267.
- Thanassi, D. G., Nuccio, S.-P., Shu Kin So, S., & Bäumler, A. J. (2007). Fimbriae: classification and biochemistry. *EcoSal Plus*, 2(2), 10.1128/ecosalplus. 1122.1124. 1122.1121.
- Todar, K. (2011). Bacterial resistance to antibiotics (page 3). *Todar's online textbook of bacteriology*, 4.
- Tripathi, N., & Sapra, A. (2020). Gram staining.
- Varela, M. F., Stephen, J., Lekshmi, M., Ojha, M., Wenzel, N., Sanford, L. M., Hernandez, A. J., Parvathi, A., & Kumar, S. H. (2021). Bacterial resistance to antimicrobial agents. *Antibiotics*, 10(5), 593.
- Webber, M., & Piddock, L. (2003). The importance of efflux pumps in bacterial antibiotic resistance. *Journal of antimicrobial chemotherapy*, 51(1), 9-11.
- Wright, G. D. (2005). Bacterial resistance to antibiotics: enzymatic degradation and modification. *Advanced drug delivery reviews*, 57(10), 1451-1470.
- Yang, Y.-h., Aloysius, H., Inoyama, D., Chen, Y., & Hu, L.-q. (2011). Enzyme-mediated hydrolytic activation of prodrugs. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 1(3), 143-159.

Zhang, F., & Cheng, W. (2022). The mechanism of bacterial resistance and potential bacteriostatic strategies. *Antibiotics*, *11*(9), 1215.