

**UNIVERZITA KARLOVA**

FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

KATEDRA BIOLOGICKÝCH A LÉKAŘSKÝCH VĚD



DIPLOMOVÁ PRÁCE

**STUDIUM VLIVU VZÁJEMNÉ INTERAKCE VYBRANÝCH  
ANTIBAKTERIÁLNÍCH LÉČIV *IN VITRO* NA AKTIVITU  
VŮČI ENTEROKOKŮM**

Nina Netíková

Vedoucí diplomové práce: RNDr. Klára Konečná, Ph.D.

Hradec Králové, 2024

## **Prohlášení**

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

V Hradci Králové dne 14.5.2024

---

Nina Netíková

## **Poděkování**

Ráda bych poděkovala své vedoucí paní RNDr. Kláře Konečné, Ph.D. za odborný dohled, laskavý přístup, cenné rady a ochotu vždy pomoci při zpracování diplomové práce.

# Obsah

Abstrakt .....	7
Abstract .....	9
1 Úvod .....	11
2 Zadání diplomové práce – cíl .....	12
3 Teoretická část .....	13
3.1 Antibiotická rezistence u ESKAPE patogenů .....	13
3.1.1 Bakterie rodu <i>Enterococcus</i> .....	15
3.1.2 Rezistence bakterií vůči antibakteriálním látkám .....	15
3.1.2.1 Mechanismy rezistence u bakterií skupiny ESKAPE .....	16
3.1.2.2 Tvorba bakteriálních biofilmů .....	18
3.2 Infekční onemocnění způsobená enterokoky .....	20
3.2.1 Patogeneze enterokokových infekcí .....	20
3.2.2 Vybraná infekční onemocnění způsobená enterokoky .....	22
3.2.2.1 Bakteriémie .....	22
3.2.2.2 Endokarditida .....	22
3.2.2.3 Infekce močových cest .....	22
3.3 Antimikrobiální terapie .....	23
3.3.1 Terapeutické možnosti při léčbě enterokokových infekcí .....	23
3.3.1.1 Vankomycin .....	24
3.3.1.2 Linezolid .....	26
3.3.1.3 Tigecyklin .....	27
3.3.1.4 Daptomycin .....	27
3.3.2 Kombinovaná léčba antibiotiky se zaměřením na infekce vyvolané bakteriemi skupiny ESKAPE .....	29
3.3.2.1 Vybrané kombinace antibiotik v terapii infekcí vyvolaných bakteriemi skupiny ESKAPE .....	30
3.4 Hodnocení citlivosti bakterií na antibakteriální léčiva .....	31

3.4.1	Interpretace výsledků testů citlivosti .....	32
3.4.2	Disková difúzní metoda .....	32
3.4.3	E-test .....	34
3.4.4	Makrodiluční a mikrodiluční technika .....	35
3.4.5	Hodnocení aktivity antimikrobiálních látek v kombinacích .....	36
4	Experimentální část.....	39
4.1	Použitý materiál .....	39
4.2	Stanovení minimální inhibiční koncentrace .....	40
4.3	Metodický postup pro studium antibakteriální aktivity dvou antibiotik v kombinaci <i>in vitro</i> .....	41
4.3.1	Hodnocení metabolické aktivity bakterií pomocí metabolického indikátoru Alamar Blue.....	44
4.4	Výsledky.....	45
4.4.1	Stanovení minimální inhibiční koncentrace vybraných antibiotik vůči dvěma vybraným kmenům bakterií rodu <i>Enterococcus</i> .....	45
4.4.2	Studium vlivu kombinace volených antibiotik na antibakteriální aktivitu vůči dvěma vybraným kmenům .....	46
4.4.2.1	Studium antibakteriální aktivity daptomycinu a tigecyklinu v kombinaci vůči <i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212.....	46
4.4.2.2	Studium antibakteriální aktivity daptomycinu a linezolidu v kombinaci vůči <i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212 .....	49
4.4.2.3	Studium antibakteriální aktivity daptomycinu a vankomycinu v kombinaci vůči <i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212 .....	51
4.4.2.4	Studium antibakteriální aktivity daptomycinu a tigecyklinu v kombinaci vůči klinickému izolátu <i>Enterococcus faecium</i> .....	53
4.4.2.5	Studium antibakteriální aktivity daptomycinu a linezolidu v kombinaci vůči klinickému izolátu <i>Enterococcus faecium</i> .....	54
4.4.2.6	Studium antibakteriální aktivity daptomycinu a vankomycinu v kombinaci vůči klinickému izolátu <i>Enterococcus faecium</i> .....	56
5	Diskuse .....	57

6	Závěr.....	61
7	Seznam použitých zkratk .....63	63
8	Seznam obrázků.....66	66
9	Seznam grafů .....67	67
10	Seznam tabulek.....68	68
11	Použitá literatura .....69	69

# Abstrakt

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra biologických a lékařských věd

Studijní obor: Farmacie

Autor: Nina Netíková

Školitel: RNDr. Klára Konečná, Ph.D.

**Název diplomové práce:** Studium vlivu vzájemné interakce vybraných antibakteriálních léčiv *in vitro* na aktivitu vůči enterokokům

**Cíl práce:** Cílem experimentální části této diplomové práce bylo zhodnotit vliv vzájemné interakce dvou vybraných, v praxi zavedených antibiotik v kombinaci na dva vybrané bakteriální kmeny bakterií rodu *Enterococcus*. Účinek kombinace byl hodnocen prostřednictvím parametru FIC indexu. Na základě výpočtu FIC indexu byla dále vzájemná interakce klasifikována jako synergní, aditivní, indiferentní či antagonistická.

**Metody:** K hodnocení vzájemného působení antibakteriálních léčiv v kombinaci byla vybrána čtyři antibiotika, jež byla dána do dvojkombinace. Stěžejním antibiotikem byl daptomycin, který byl kombinován s tigecyklinem, linezolidem a vankomycinem. Účinek dvojkombinací byl sledován vůči klinickému izolátu *Enterococcus faecium* a vůči sbírkovému bakteriálnímu kmenu *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212). Stanovení hodnot MIC bylo provedeno s využitím mikrodiluční bujónové techniky podle metodiky EUCAST. Pro zjišťování hodnot MIC byl volen způsob odečtu nárůstu bakterií pouhým okem a pomocí spektrofotometrické detekce. Hodnocení probíhalo po 24hodinové, případně 48hodinové inkubaci. U klinického izolátu pro potvrzení antibakteriálního účinku antibiotik v kombinaci byla také volena metoda stanovení metabolické aktivity pomocí indikátoru Alamar Blue. Vzájemná interakce antibiotik v kombinaci byla kategorizována jako synergní, aditivní, indiferentní či antagonistická, a to na základě výpočtu parametru FIC indexu.

**Výsledky:** Byly testovány kombinace antimikrobiálních látek, a to vůči dvěma bakteriálním kmenům (*Enterococcus faecalis* ATCC 29212, klinický izolát *Enterococcus faecium*). Nejslibnější výsledky na základě hodnocení FIC indexu s určením aditivního účinku byly zaznamenány pro kombinaci

daptomycinu a vankomycinu vůči *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212) v koncentračních poměrech 0,25 : 4 (mg/L); 0,5 : 4 (mg/L); 1 : 4 (mg/L); 2 : 2 (mg/L) a 4 : 2 (mg/L). Dále bylo zaznamenáno aditivní působení pro kombinaci daptomycinu s linezolidem, v koncentračním poměru 1 : 4 (mg/L). Pro kombinace daptomycinu a tigecyklinu byla zaznamenána aditiva v poměrech 0,25 : 4 (mg/L) a 0,25 : 0,25 (mg/L). Vůči kmenu *Enterococcus faecium* bylo zhodnoceno aditivní působení u kombinace daptomycinu s linezolidem v koncentračním poměru 2 : 64 (mg/L). V ostatních dalších testovaných koncentračních poměrech vůči obou kmenům pak kombinace antibiotika vykazovala indiferentní efekt. U žádné z vybraných testovaných kombinací nebyl prokázán v jakémkoliv koncentračním poměru synergní účinek.

**Závěr:** Enterokoky se řadí mezi „superbugs“, neboli také mezi kmeny bakterií s vysokou úrovní rezistence vůči několika třídám antibiotik. Nastává tak problém s infekcemi způsobenými enterokoky, které se stávají těžce léčitelnými. Nevhodné a nadměrné užívání antibiotik může vést až k selhání farmakoterapie v důsledku vzniku antimikrobiální rezistence. Proto je žádoucí hledat nové terapeutické možnosti v léčbě enterokokových infekcí. Jedním z možných přístupů pro dosažení úspěšné léčby může být racionální kombinační terapie. Ve snaze navodit racionální kombinační terapii je žádoucí volit do kombinace taková antibiotika, jež vykazují při vzájemné interakci synergní účinek. V rámci hodnocení kombinovaného antienterokokového účinku dvojkombinací, ze čtyř vybraných antimikrobních látek byl prokázán aditivní účinek pro kombinaci antibiotik daptomycinu s vankomycinem. Dále byl aditivní účinek prokázán u kombinace daptomycinu s linezolidem a daptomycinu s tigecyklinem vůči sbírkovému kmenu *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 a u kombinace daptomycinu s linezolidem vůči klinickému izolátu *Enterococcus faecium*. U žádné z vybraných kombinací v žádném koncentračním poměru vybraných antimikrobiálních látek nebyl zaznamenán synergní účinek.

**Klíčová slova:** enterokoky, checkerboard studie, ESKAPE, mikrodiluční bujónová technika



# Abstract

Charles University

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Biological and Medical Sciences

Study program: Pharmacy

Author: Nina Netíková

Supervisor: RNDr. Klára Konečná, Ph.D.

**Title of diploma thesis:** The study of the impact of the mutual interaction of selected antibacterial drugs *in vitro* on activity against enterococci

**Background:** The point of the experimental part of this thesis was to evaluate the effect of the mutual interaction of two selected, clinically approved antibiotics in combination on two selected bacterial strains of genus *Enterococcus*. The effect of the combination was evaluated using the FIC index. Based on the calculation of the FIC index, the mutual interaction was further classified as synergistic, additive, indifferent or antagonistic.

**Methods:** To evaluate the interaction of antibacterial drugs in combination, four antibiotics were selected and employed to a pair-wise combinations. The main antibiotic was daptomycin, which was combined with tigecycline, linezolid and vancomycin. The effect of pair-wise combinations was monitored against the clinical isolate *Enterococcus faecium* and against the collection bacterial strain *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212). Determination of MIC values was performed using the microdilution broth technique according to the EUCAST methodology. To determine the MIC values, the growth of bacteria was monitored with the naked eye and by using spectrophotometric detection. The evaluation was carried out after a 24-hour or 48-hour incubation. For the clinical isolate strain, also the method of metabolic activity evaluation using the Alamar Blue indicator was chosen to confirm the antibacterial effect of antibiotics in combination. The mutual drug interactions of the antibiotics in combination were classified as synergistic, additive, indifferent or antagonistic, based on the calculation of the FIC index parameter.

**Results:** Pair-wise combinations of antimicrobial agents were tested against two bacterial strains (*Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Enterococcus faecium* clinical isolate). The most promising results

based on the evaluation of the FIC index with the determination of the additive effect were revealed for the combination of daptomycin and vancomycin against *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212) in concentration ratios of 0.25 : 4 (mg/L); 0.5 : 4 (mg/L); 1 : 4 (mg/L); 2 : 2 (mg/L) and 4 : 2 (mg/L). Additionally, an additive effect was recorded for the combination of daptomycin with linezolid, in a concentration ratio 1 : 4 (mg/L). For the combinations of daptomycin with tigecycline, there were additive effects in ratios of 0.25 : 4 (mg/L) and 0.25 : 0.25 (mg/L). The additive effect of the combination of daptomycin with linezolid in a concentration ratio 2 : 64 (mg/L) was evaluated against the *Enterococcus faecium* strain. In the other tested concentration ratios of pair-wise combinations acting against both strains, the indifferent effect was revealed. No synergistic effect was demonstrated in any concentration ratio for any of the tested combinations.

**Conclusion:** Enterococci are classified as "superbugs", or strains of bacteria with a high level of resistance to several classes of antibiotics. This resulted in difficulties with the treatment of the infections caused by enterococci. Inappropriate use of antibiotics can possibly lead to failure of pharmacotherapy due to antimicrobial resistance. Thereby it is desirable to look for new therapeutic options in the treatment of enterococcal infections. One of the possible approaches for successful treatment is represented by rational combination therapy. Within the rational combination therapy implementation, it is necessary to choose combinations of antibiotics, which show a synergistic effect. As a part of the evaluation of the combined antienterococcal effect of pair-wise combinations of four selected antimicrobial substances, additive effect was demonstrated for the drug combination of daptomycin with vancomycin. Furthermore, the additive effect was demonstrated in combination of daptomycin with linezolid and daptomycin with tigecycline against the collection strain *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, and in the combination of daptomycin with linezolid against the clinical isolate *Enterococcus faecium*. No synergistic effect was noted for any of the selected combinations in any concentration ratio of the selected antimicrobial compounds.

**Keywords:** enterococci, checkerboard test, ESKAPE, microdilution broth method

# 1 Úvod

Dle dostupných informací je možné předpokládat, že bez dalších opatření by mohlo do roku 2050 každým rokem umírat přibližně 10 miliónů jedinců na infekce vyvolané rezistentními kmeny, které by se tak staly nejčastější příčinou úmrtí vůbec. [1] Jednu z možností, jak se snažit tomu předcházet představuje vývoj nových alternativních přístupů v léčbě, ať už prostřednictvím nově syntetizovaných antibakteriálních léčiv nebo racionální využití již existujících léčiv v kombinacích. Způsobem, kterým lze získat informace o nových terapeutických možnostech v rámci racionální terapie, je i testování vzájemného působení různých antibiotických léčiv.

Na začátku teoretické části je sepsána kapitola o aktuální problematice antibiotické rezistence u patogenů skupiny ESKAPE se zaměřením zejména na enterokoky. Kromě obecných mechanismů rezistence vůči antimikrobiálním léčivům je zde popsána tvorba biofilmových společenství, jež mohou představovat problém při léčbě enterokokových infekcí. Vybraná infekční onemocnění, která se stávají těžce zvladatelnými kvůli vznikající rezistenci, jsou charakterizována v dalším úseku této práce. Důležitou součástí teoretické části představuje kapitola antimikrobiální terapie, jež se věnuje hledání nových terapeutických strategií či alternativ v současné terapii bakteriálních infekcí se zaměřením na kombinovanou léčbu antibiotik u ESKAPE patogenů. Zmíněné metody, které se využívají při hodnocení citlivosti bakterií na antibakteriální látky, byly vybrány s důrazem na problematiku hodnocení synergního antibakteriálního působení. Představení hodnotícího parametru pro působení antibakteriálních látek v kombinaci tvoří poslední úsek teoretické části.

Další částí diplomové práce je experimentální část, jež je věnována studiu vlivu vzájemné interakce vybraných antibakteriálních léčiv ve dvojkombinacích na jejich aktivitu vůči enterokokům *in vitro*. Testování probíhalo v laboratořích na Katedře biologických a lékařských věd Farmaceutické fakulty Univerzity Karlovy v Hradci Králové. Za účelem posouzení antibakteriální aktivity byl nejprve stanoven parametr FIC indexu, který sloužil k samotnému určení vzájemného působení antibiotik v kombinaci vůči dvěma kmenům rodu *Enterococcus*.

## 2 Zadání diplomové práce – cíl

Tato diplomová práce se v teoretické části zabývá úvodem do problematiky antibiotické rezistence u bakteriálních patogenů skupiny ESKAPE. Podrobněji je pak popsána problematika týkající se bakterií rodu *Enterococcus*. Poslední kapitoly v teoretické části se věnují antibiotické terapii infekcí vyvolaných enterokoky a metodám, které lze využít pro stanovení citlivosti mikrobů vůči antiinfekčním látkám.

Experimentální část práce je zaměřena na hodnocení antibakteriálního účinku dvou vybraných antibiotik v kombinaci na dva vybrané kmeny bakterií z rodu *Enterococcus*. Cílem bylo určit, zda antibiotika ve zvolené kombinaci vykazují synergní efekt. Míra růstu bakterií exponovaných vybraným antibiotikům v kombinaci byla odečítána spektrofotometricky, a to po 24hodinové, případně 48hodinové inkubaci. Hodnocení efektu bylo provedeno prostřednictvím výpočtu parametru FIC indexu, na jehož základě lze stanovit, zda se jedná o působení synergní, aditivní, indiferentní či antagonistické.

## 3 Teoretická část

### 3.1 Antibiotická rezistence u ESKAPE patogenů

ESKAPE (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* a *Enterobacter* species) je skupina grampozitivních a gramnegativních bakteriálních patogenů, které s ohledem na míru jejich rezistence představují hrozbu pro lidskou populaci. Jedná se o bakterie, které často vykazují multirezistenci<sup>1</sup> (MDR, Multidrug-Resistant), a které v roce 2017 uvedla Světová zdravotnická organizace (WHO, World Health Organisation) na globální seznam patogenů s označením „prioritní status“, u kterých je naléhavé se zaměřit na výzkum a vývoj nových antibiotických léčiv. [2] Zároveň v roce 2019 antimikrobiální rezistence (AMR, Antimicrobial Resistance) obsadila dle WHO desáté místo největších hrozeb pro veřejné zdraví. [3, 4]

Bakterie ze skupiny ESKAPE se z velké části podílí na vzniku život ohrožujících nozokomiálních infekcí po celém světě. Americká společnost pro infekční nemoci (IDSA, The Infectious Diseases Society of America) tuto skutečnost uvedla ve svých výzkumech a označila patogeny ESKAPE jako patogeny nozokomiální. Mezi nejčastěji uváděná bakteriální agens ze skupiny ESKAPE patogenů, která představují hrozbu v rámci AMR patří zejména vankomycin-rezistentní na enterokoky (VRE, Vancomycin-Resistant *Enterococcus*), meticilin-rezistentní *Staphylococcus aureus* (MRSA, Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*), MDR *Pseudomonas aeruginosa* nebo skupina bakterií taxonu *Enterobacterales* rezistentních vůči karbapenemu (CRE, Carbapenem-Resistant *Enterobacterales*)

Podle dostupných informací neexistuje žádný systematický mezinárodní dohled nad AMR. V Evropě kvůli AMR zemře každý rok přibližně 35 000 lidí. Ve Spojených státech amerických (USA, United States of America) bylo dle průzkumu nemocničních infekcí v roce 2011 hlášeno nejméně 75 000 úmrtí za rok souvisejících s nozokomiálními infekcemi. [3] Incidence nozokomiálních infekcí v USA šplhá až ke 2 milionům případů za rok. Data pro Českou republiku nejsou úplně známa, ale situace se odhaduje velmi podobně. [5] Podle dostupných informací WHO se odhaduje, že celkově AMR byla v roce 2019 zodpovědná za 1,27 milionu úmrtí po celém světě a k dalším 4,95 milionům úmrtí přispěla. V rozvojových zemích jsou tyto nemoci stále hlavní příčinou úmrtí. Důvodem může být zejména nízká úroveň tamějšího zdravotnictví, nejistá diagnostika, nízký hygienický standard, nedostatečná kontrola infekcí v nemocnicích a klinikách, dále nadužívání či nevhodné užívání antibiotik a jejich dostupnost i bez lékařského předpisu. [2, 6]

---

<sup>1</sup> Multirezistentní bakterie představují pojem označující odolnost bakterie vůči více než třem třídám antibiotik.



**Obr. 1** Představitelé bakteriálních agens ze skupiny ESKAPE. [7] – upraveno

Legenda: **VRE** (vankomycin-rezistentní *Enterococcus*), **CRAsp** (druhy bakterie *Acinetobacter*, rezistentní vůči karbapenemu), **MRSA** (meticilin-rezistentní *Staphylococcus aureus*), **CRE** (bakterie taxonu *Enterobacterales* rezistentní vůči karbapenemu), **ESBL** – skupina bakterií taxonu *Enterobacterales*, rezistentních vůči cefalosporinům, **MDR** (multirezistentní *Pseudomonas aeruginosa*).

Obecně je velmi obtížné získat reprezentativní údaje o AMR. Často se lze setkat se zaměřením pouze na úzké spektrum patogenů a na hlášení fenotypových laboratorních výsledků pro specifické mikroorganismy, které jsou izolované z klinických infekcí u lidí. Tyto postupy tak nevedou k relevantnímu zachycení AMR. V rámci boje proti tomuto problému bylo přijato několik světových zdravotnických projektů a vládních opatření. [8] Existuje mnoho organizací, které se zaměřují na monitorování rezistence i na spotřebu antimikrobiálních látek. Skrze WHO byl vytvořen koncept s názvem „jedno zdraví“ (z anglického originálu „One Health Approach“), u něhož je důležitá celosvětová spolupráce a komunikace mezi organizacemi z jednotlivých oborů. V roce 2015 vznikl dokument Globální akční plán (GAP-AMR, Global Action Plan on Antimicrobial Resistance) zaměřený na rezistenci, což vedlo ke spuštění Globálního systému pro sledování antimikrobiální rezistence (GLASS, Global Antimicrobial Resistance Surveillance System), který slouží ke shromažďování dat nejenom na území Evropy. O první známou dlouhodobou studii zaměřenou na odhady spotřeby antibiotik, se zasloužil projekt Globální výzkum na antimikrobiální rezistenci (GRAM, Global Research on Antimicrobial Resistance). Do studie, která trvala mezi lety 2000–2018, bylo zahrnuto tehdy 204 zemí. [9] Dozor nad sledováním AMR vykonává Evropská síť pro sledování antimikrobiální rezistence (EARS-Net, The European Antimicrobial Resistance Surveillance Network), která je také nástrojem Evropského střediska pro prevenci a kontrolu nemocí (ECDC, European Centre for Disease Prevention and Control), v jehož zájmu jsou zejména infekční choroby. Do těchto projektů se zapojují členské státy Evropské unie (EU, European Union) společně s Norskem a Islandem. Evropská síť pro sledování spotřeby antimikrobiálních látek (ESAC-Net, The European Surveillance of Antimicrobial Consumption Network) sleduje v rámci EU spotřeby antibiotik. O přehled infekcí spojených se zdravotní péčí se stará Systém sledování infekcí spojených se zdravotní péčí (HAI-Net, Healthcare-Associated Infections Surveillance Network). [10, 11]

Všechny tyto projekty mají podobné cíle a zájmy, mezi které je řazen jednak důraz na prevenci u infekčních onemocnění, podporu vědy a výzkumu spojené s financováním boje s AMR, racionální užívání antibiotik, ale také povědomí široké veřejnosti o antibiotické rezistenci. WHO má také snahu tvořit plány pro boj s rezistencí za účelem přehledu situace daného státu, a tím usnadnění její kontroly.

### 3.1.1 Bakterie rodu *Enterococcus*

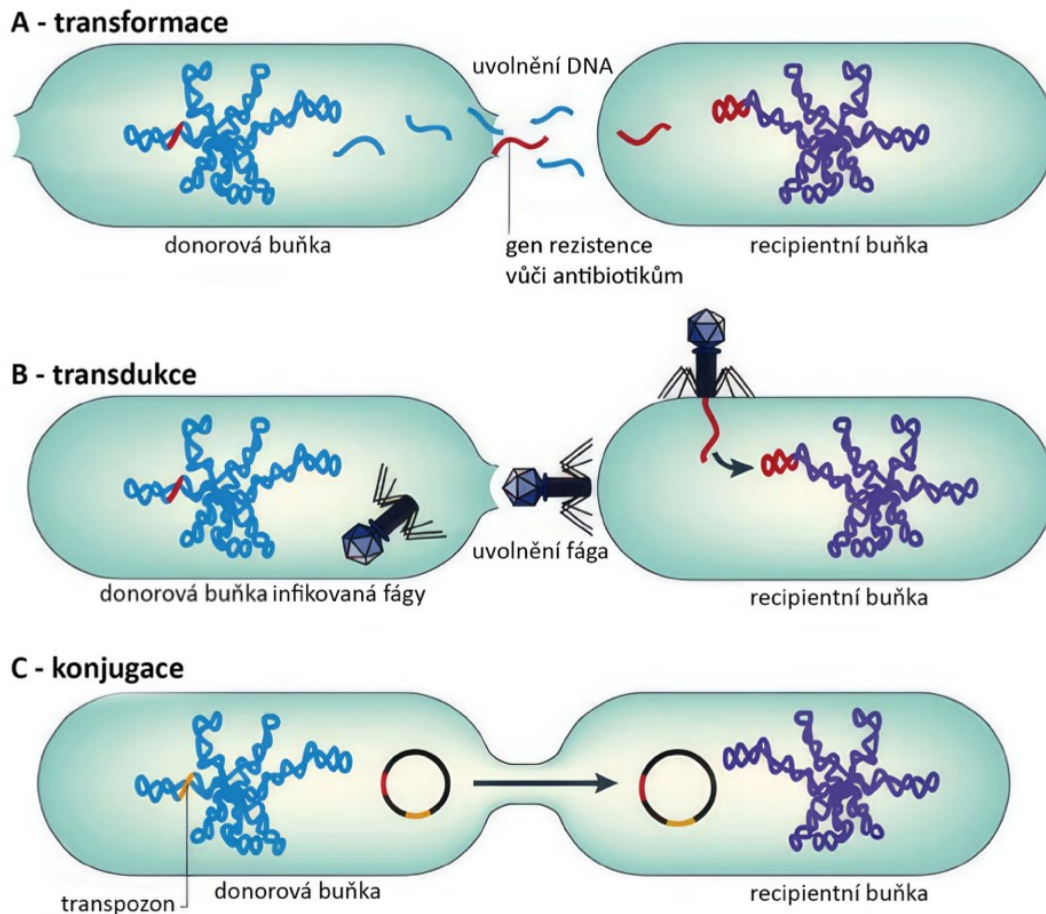
Enterokoky jsou grampozitivní bakterie, které jsou přirozenou součástí gastrointestinálního traktu lidí a různých druhů zvířat (savci, ptáci, plazi a někteří bezobratlí). Někteří zástupci z této skupiny jsou známy také pod názvem „bakterie mléčného kvašení“ s vysokou schopností překonávat nepříznivé podmínky prostředí. Dokážou přežít i několik měsíců v širokém rozmezí teplot (mezi 10–45 °C) a hodnot pH (mezi 4,8–9,6). Mimo kladné účinky enterokoků na lidský a zvířecí organismus, se jedná o oportunní patogeny, zejména druhy *Enterococcus faecalis* (*E. faecalis*) a *Enterococcus faecium* (*E. faecium*). [12]

V současnosti rod *Enterococcus* zahrnuje více než 50 různých bakteriálních druhů. *E. faecalis* a *E. faecium* mají největší zastoupení v lidském střevě, převažují v rámci izolovaných druhů (více než 80 % izolátů) a jsou v žebříčku nejrozšířenějších patogenů na světě na třetím a čtvrtém místě. Oba tyto druhy často vykazují přirozenou rezistenci vůči běžně používaným antibiotikům a snižují tak výběr terapeutických možností léčby enterokokových infekcí. U zdravých jedinců jsou enterokoky prakticky neškodné, problém nastává u imunokompromitovaných pacientů ležících na jednotce intenzivní péče (JIP) a u pacientů se závažnějším onemocněním. Enterokoky vykazují sníženou citlivost zejména k penicilinům, aminoglykosidům, vankomycinu (VAN), polymyxinům a streptograminům. [12]

### 3.1.2 Rezistence bakterií vůči antibakteriálním látkám

AMR je schopnost mikroorganismů odolávat antimikrobiálními látkami. V takové fázi již antibakteriální látky nedokážou bakterie plně zahubit či inhibovat jejich růst a tím se infekční nemoci stávají obtížně léčitelnými či v nejhorším případě smrtelnými. Do jisté míry je výskyt bakteriální rezistence přirozeným jevem, avšak největší hrozbu představuje rezistence získaná, která je potencována z velké části nadměrným a neadekvátním užíváním antibiotik. Přirozená (vnitřní) rezistence popisuje mikroorganismy běžně odolné vůči určitým druhům antibiotik bez jejich předchozí expozice (například rezistence vůči VAN u bakterie *Escherichia coli*). Může to být dáno společnými charakteristickými rysy u mikroorganismů, například nepřítomností buněčné stěny, peptidoglykanu či existencí vnější membrány. Dalším podnětem vzniku vnitřní rezistence je aktivace genů v důsledku působení velkého množství užívaných antibiotik. Rezistence získaná má dvě formy. První způsob je založen na mutaci, která je vertikální cestou přenášena na potomstvo. Druhou cestou získané rezistence je horizontální přenos genů, jež spočívá v předání genetického materiálu dárce do recipientní buňky. Tento způsob zahrnuje procesy konjugace, transformace a transdukce. Konjugace

je typická především pro gramnegativní bakterie, u nichž dochází k přenosu části genetické výbavy z jedné bakteriální buňky do druhé. Při transformaci bakterie ochotně přijímá extracelulární DNA od donorové buňky. Přenos je možný pouze u geneticky vybavených druhů (například bakterie rodu *Haemophilus*, *Streptococcus pneumoniae* atd.). Princip transdukce spočívá v přenosu donorové DNA do druhé bakterie pomocí bakteriofágu. [4, 13]



**Obr. 2** Horizontální přenos genetické informace u bakterií. [14] – upraveno

Mezi možnosti přenosu genů patří bakteriální transformace (A), transdukce (B) či konjugace (C).

### 3.1.2.1 Mechanismy rezistence u bakterií skupiny ESKAPE

Bakterie skupiny ESKAPE, které často vykazují MDR, představují celosvětový problém z hlediska AMR. Patogeny spadající do této skupiny si vytvořily různé obranné mechanismy, kterými se chrání před aktivitou antibiotik. Mechanismus rezistence obecně nelze popsat jedním dějem, mechanismy totiž spadají hned do několika kategorií. Mezi ty hlavní patří chemická modifikace léčiva, modifikace vazebných míst pro antibiotika, změny v permeabilitě buňky či zvýšená exprese genů kódujících efluxní pumpy, které se podílí na vypuzení antibiotika z buňky. Zvláštní formu rezistence pak představuje tvorba bakteriálního biofilmu. [15]

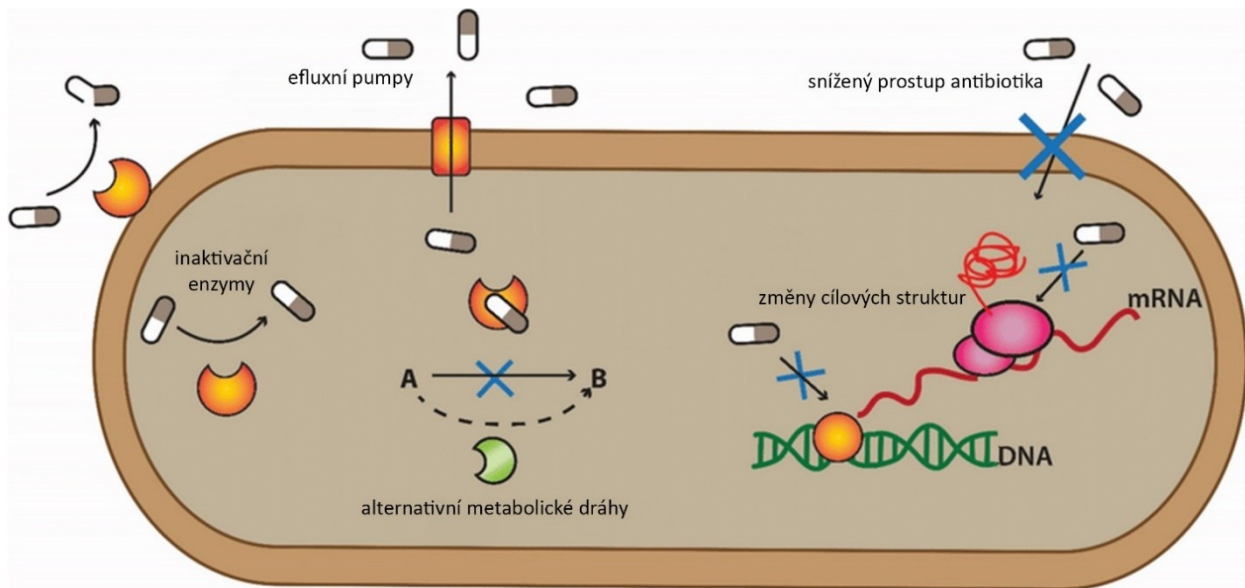


Chemickou modifikací léčiva je myšlen rozklad, změna nebo také inaktivace antibiotika enzymy. Mezi nejvíc studované enzymy patří  $\beta$ -laktamázy, které mají schopnost štěpit čtyřčlenný  $\beta$ -laktamový kruh přítomný v penicilínech, cefalosporínech, cefamycínech, monobaktamech a karbapenemech. Často se proto  $\beta$ -laktamová antibiotika dávají do kombinace s inhibitory katalytické aktivity těchto enzymů (příkladem inhibitorů  $\beta$ -laktamáz jsou kyselina klavulanová, sulbaktam, tazobaktam nebo tikarcilin). Bakteriální  $\beta$ -laktamázy je možné rozdělit dvojím způsobem, dle Amblerova schématu vycházejícího z molekulární struktury enzymů či z klasifikace podle Bushové-Jacobyho-Medeirose, založené na charakteristice enzymů dle jejich citlivosti k inhibitorům a jejich substrátové specifitě. [3]

Druhou možností, jak se bakterie chrání před působením antibiotik, je změna cílového místa léčiva. Změna vazebného místa může spočívat v mutaci genu, který kóduje cílový protein, dále změnu původního cíle nebo chemickou obměnu interakčního místa. Například u patogenů *E. faecium* a *E. faecalis* změnou cílového místa se může zvýšit rezistence vůči glykopeptidům (konkrétně k VAN a teikoplaninu). [3]

Dalším mechanismem je omezená permeabilita antibiotika do buňky. Aby došlo k usmrcení bakteriální buňky, je důležitá rovnováha mezi přijatým a eliminovaným množstvím antibakteriální látky, která určuje citlivost patogenu na určitý lék. Bakterie se proto snaží významně potlačit množství léku, které vstoupí do buňky. Jednou z možností, jak snížit vstup léčiva do bakteriální buňky, je snížení počtu transportních membránových proteinů, na jejichž tvorbě se podílí bílkovinné poriny. [3]

V dalším případě hrají roli efluxní pumpy, které vypuzují nakumulované množství léčiva v buňce. Efluxní pumpy pracují velmi rychle a efektivně. Při jejich výrazném zapojení nedochází ke kumulaci antibiotik tak, aby došlo k antibiotickému účinku. Tento způsob mechanismu rezistence je typický například pro MDR bakterie, u kterých byla pozorována zmíněná nadměrná exprese různých typů efluxních pump. Struktura vnější membrány bakterií hraje důležitou roli v rozvoji lékové rezistence. [16]



**Obr. 3** Nejčastější mechanismy rezistence u ESKAPE patogenů. [17] – upraveno

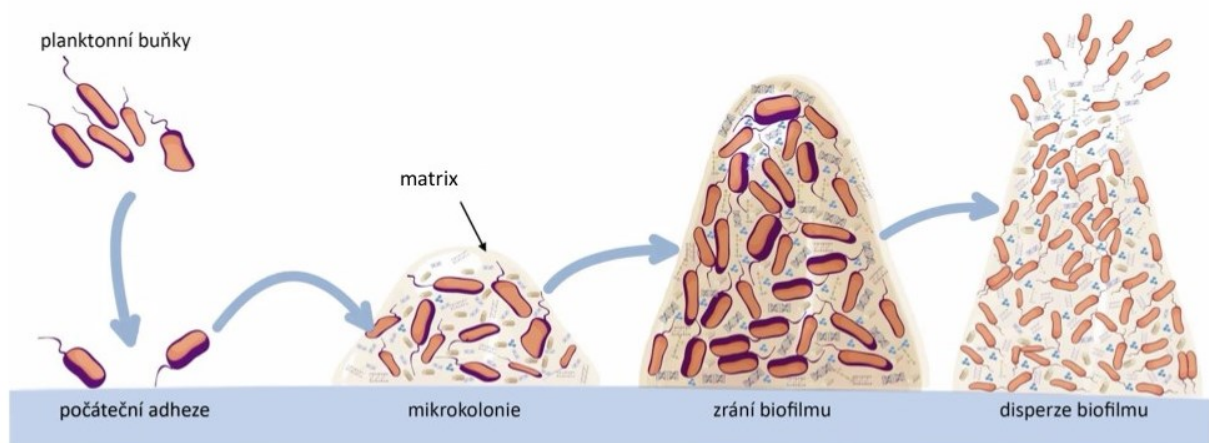
Mezi ty nejčastější mechanismy rezistence můžeme zařadit změnu cílových struktur, omezený vstup antibiotika, enzymatickou inaktivaci léčiva či zvýšenou expresi efluxních pump.

### 3.1.2.2 Tvorba bakteriálních biofilmů

Jedním z klíčových mechanismů virulence a patogeneze u bakterií skupiny ESKAPE je schopnost vytvářet společenství zvané biofilmy. Jedná se o aditivní mechanismus, který velmi často vede k rezistenci biofilm formujících bakterií k antimikrobním látkám. Biofilm je složitá struktura obsahující mikroby, která může být ukotvena na živém i neživém povrchu. Jednotlivé mikroorganismy žijící uvnitř těchto komplexních společenství mohou interagovat mezi sebou navzájem nebo i s okolním prostředím. [18] Biofilm formující mikroorganismy jsou obklopeny extracelulární matrix. Extracelulární matrix může poskytovat ochranu nejenom před působením antibiotik, ale také před imunitními mechanismy, například fagocytózou či oxidačním stresem. Mimo jiné se matrix podílí na vlastnostech společenství, jež vedou k oslabení účinku léčiva. K těmto podmínkám patří například nízké pH, kumulace enzymů degradujících antibiotikum či formace 3D struktury celého společenství, díky čemuž je v jeho hlubších vrstvách snížený obsah kyslíku. Nejedná se o mechanickou bariéru, antibiotikum se dovnitř dostat může, ale většinou jen v určitém množství nebo ne ke všem bakteriím, aby byla infekce dostatečně залéčena. [19] V biofilmech se vyskytuje i populace tzv. perzistentních buněk, které unikají účinkům antimikrobiálních látek. Jsou charakterizovány jako metabolicky neaktivní buňky, projevující se dormancí (z anglického slova „dormant cells“ – spící buňky), tj. jejich rychlost růstu a metabolismus jsou extrémně pomalé nebo až žádné. Tyto buněčné elementy jsou problematické v tom, že po dokončení léčby, se mohou reaktivovat v infekční částice a vyvolat tak danou infekci opakovaně. [20]

Extracelulární matrix je důležitým prvkem pro zrání biofilmu. V její struktuře se vyskytují proteiny, polysacharidy, nukleové kyseliny, lipidy ale i kanály, které mají zajistit přísun vody, živin a vzduchu do všech částech biofilmového společenství.

Tvorba biofilmu na jakémkoli povrchu je vícestupňový proces, který zahrnuje tři klíčové kroky – adhezenci, růst a disperzi. V počáteční fázi dochází k volnému a reverzibilnímu přilnutí planktonní buňky na povrch. Jakmile nastane krok, kdy buňky začnou vylučovat polysacharidové látky, nastává další děj. Ve druhém kroku se mikroorganismy nenávratně přichytí na buňku, čímž si vytvoří ochranu vůči mnoha faktorům, které by se chtěly podílet na zničení biofilmu. Postupným množením a shlukováním mikroorganismů dochází k vytvoření mikrokolonií. [20] Matrix pomáhá s jejich přichytáváním, obklopuje je a stabilizuje celou strukturu finálního, maturovaného biofilmu. Maturovaný biofilm nakonec popraská a mikroorganismy jsou dále rozptýleny a mohou zahájit nový cyklus tvorby biofilmu. Z těchto důvodů by mělo být důkladně vybíráno takové antibiotikum, které je schopno projít biofilmem a eliminovat patogeny, jež jsou díky biofilmovému společenství odolnější. Proto je lepší v případě infekcí sdružených s tvorbou biofilmu spíše volit kombináční terapii léčiv než monoterapii, ideálně pak taková antimikrobní léčiva, která působí rozdílným mechanismem účinku (například jedno antibiotikum zabraňuje růstu bakterií, druhé vykazuje aktivitu i proti dormantům). [20]



**Obr. 4** Životní cyklus biofilmového společenství. [21] – upraveno

Planktonní buňky postupně začínají adherovat k povrchu, shlukováním a množením dochází ke vzniku mikrokolonií. Matrix napomáhá zrání biofilmu, který následně vede k disperzi.

## 3.2 Infekční onemocnění způsobená enterokoky

Enterokoky způsobují celou řadu infekčních onemocnění. Mezi ty nejčastější a klinicky nejvýznamnější původce patří *E. faecium* a *E. faecalis*. Řadí se mezi mikroorganismy, které jsou součástí přirozené střevní mikrobioty, ale zároveň patří mezi oportunní patogeny. Tyto dva druhy společně způsobují přibližně 75 % všech enterokokových infekcí. [12]

Mezi enterokokové infekce vyskytující se hlavně u hospitalizovaných pacientů spadají nejčastěji infekce močových cest (UTI, Urinary tract infection) (častá bývá především UTI u pacientů s katetrem), infekce krevního řečiště, srdečních chlopní u endokarditidy, bakteriémie nebo infekce ran. [12] Již od 20. století je uváděno, že tyto infekce jsou polymikrobiální (vícedruhová) onemocnění a enterokoky se na nich významně podílí. Často s nimi při těchto infekcích mohou být izolovány i další bakteriální agens, mezi které patří *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella* spp. a *Proteus* spp. Podle výsledků Národní sítě pro bezpečnost ve zdravotnictví (NHSN, National Healthcare Safety Network) způsobily enterokoky v období 2011–2014 v USA až 14 % všech nemocničních infekcí, což vyjadřuje značný nárůst oproti roku 2007, kdy byla tato hodnota 11 %. [22]

### 3.2.1 Patogeneze enterokokových infekcí

Patogeneze infekčních onemocnění vyvolaných enterokoky je z velké části podmíněna tvorbou virulentních faktorů těchto oportunních patogenů. Mezi tyto faktory patří molekuly, které pomáhají patogenům připojit se k hostitelské buňce a kolonizovat hostitelské prostředí. Virulence jednotlivých druhů je určena mnoha faktory, mezi které patří schopnost kolonizovat trávicí trakt, schopnost přilnout k epitelům močových cest či v dutině ústní. Enterokoky jsou schopny prostupovat epitelálními buňkami střeva do krve a prostřednictvím lymfatických uzlin se šířit dále do dalších částí organismu. Uvádí se, že *E. faecalis* je virulentnější než *E. faecium*. Mezi faktory virulence lze zařadit agregační substanci, enterokokový povrchový protein (esp), cytolysin, želatinázu, extracelulární superoxydy, serinové proteázy a geny pro rezistenci na antibiotika. [23]

Enterokoky musí nejprve přilnout k hostitelské tkáni, aby mohly způsobit infekci. Agregační substance je označení pro povrchový protein kódovaný na plazmidu *E. faecalis*, který může mít různé funkce. Je odpovědná za přilnutí a navázání se na buňky v trávicím traktu člověka a jejich kolonizaci. Přítomnost agregační substance vede také k modifikaci buněčného povrchu bakterie. [23] Ukazuje se, že tento adhezin má zásluhu na schopnosti enterokoků uniknout mechanismům buněk imunitního systému, makrofágům a neutrofilům (inhibice respiračního vzplanutí). [24]

Cytolysin (hemolysin) je bakteriální toxin, který byl jedním z prvních virulentních faktorů identifikovaný u *E. faecalis* a *E. faecium*. U lidí má  $\beta$ -hemolytické vlastnosti a je baktericidní vůči jiným

grampozitivním bakteriím. I další druhy enterokoků obsahující cytolysin mohou rozkládat makrofágy a neutrofilů, což jim pravděpodobně umožňuje získávat další živiny a vyhýbat se imunitní reakci organismu. [25]

Dalším virulentním faktorem je enterokokový povrchový protein (esp). Jedná se o faktor ukotvený v buněčné membráně přítomný u *E. faecalis* i *E. faecium*. Bylo prokázáno, že na rozdíl od esp *E. faecalis*, jež je hojně rozšířen mezi kmeny, esp *E. faecium* se s vysokou frekvencí nachází v izolátech získaných v nemocnici. Mimo roli v adhezii a schopnosti enterokoků vyhýbat se mechanismům imunitního systému se esp podílí na zvýšené tvorbě biofilmu a na kolonizaci epitelu močového měchýře či na patogenezi endokarditidy. Jakmile je gen esp narušen, ztrácí *E. faecalis* schopnost vytvářet biofilm. [26, 27]

Buněčný povrch enterokoků obsahuje celou řadu dalších složek včetně kyseliny teichoové, kyseliny lipoteichoové či polysacharidů. Kyselina lipoteichoová ulehčuje přenos plazmidů a také ovlivňuje zánětlivou reakci tím, že zvyšuje produkci určitých interleukinů. Želatináza spadá ke skupině hydrolytických enzymů, hydrolyzující kolagen, kasein a hemoglobin. Společně se serinovými proteázami a hyaluronidázou hrají důležitou roli při patogenezi enterokokových onemocnění. Poskytují bakteriím živiny získané rozpadem hostitelských buněk. [28] Hyaluronidáza je degradační enzym poškozující tkáň, čímž usnadňuje šíření enterokoků v hostitelské buňce. Svoji roli má i při tvorbě biofilmu, kde napomáhá přežití nově infikovaných buněk. [29]

Základním předpokladem pro tvorbu biofilmových společenství je schopnost enterokoků přilnout k povrchům. Tato společenství mají kolem sebe matrici. Bakterie v biofilmu jsou schopné odolávat antimikrobním látkám. Mimo jiné jsou pro tvorbu biofilmu důležité pili bakterií, které pomáhají přilnout k mnoha lidským buňkám. Pili bakterií se společně s tvorbou biofilmu řadí mezi dva velmi klíčové procesy v patogenezi bakteriálních enterokokových onemocnění. [30]

Kromě vylučovaných proteinů produkují dva druhy klinicky nejvýznamnějších enterokoků i toxické metabolity kyslíku, které se podílejí na poškození buněk a orgánů. Častěji tomu tak je u kmenu *E. faecalis*, který vylučuje superoxid ( $O_2^-$ ), méně jej tvoří *E. faecium*. [23]

## 3.2.2 Vybraná infekční onemocnění způsobená enterokoky

### 3.2.2.1 Bakteriémie

Mezi běžné původce bakteriémie patří vankomycin-rezistentní *Enterococcus faecium* (VRE<sub>fm</sub>, Vancomycin-Resistant *Enterococcus faecium*). Tato infekce často bývá spojena se zvýšenou mortalitou z důvodu vysokého stupně rezistence tohoto patogenu. Pravděpodobně většina případů bakteriémie je výsledkem schopnosti enterokoků postupovat ze střeva do krevního řečiště. Mimo střevní kolonizaci mezi další rizikové faktory spojené s bakteriémií, zejména u VRE, spadá dlouhodobé užívání antibiotik, závažnost onemocnění, transplantace kostní dřeně, hematologické malignity, zavedení močového katétru, parenterální výživa, chemoterapie či léčba kortikosteroidy. Je prokázáno, že u bakteriémie způsobené VRE dochází ke 2,5násobnému zvýšení mortality než u kmenů citlivých na VAN. Celkově se mortalita nozokomiální enterokokové bakteriémie pohybuje od 25 do 50 %. [23, 31]

### 3.2.2.2 Endokarditida

Druhým nejčastějším a jedním z terapeuticky nejnáročnějších onemocnění způsobené enterokoky je infekční endokarditida. Dochází ke kolonizaci endokardu obklopeného matricí podobnou biofilmu, do níž je obtížné, pro buňky imunitního systému či pro antibiotika, proniknout. Pakliže je způsobená VRE<sub>fm</sub>, je endokarditida spojena s infekcí trikuspidální chlopně. Nozokomiální infekční endokarditida vzniká od 3. po 60. den od přijetí pacienta do nemocnice nebo při dlouhodobějším pobytu v nemocnici s rizikem bakteriémie. [32]

### 3.2.2.3 Infekce močových cest

Enterokoky mohou způsobit nekomplikované i komplikované UTI. Často bývají spojeny s VRE<sub>fm</sub> a vankomycin-rezistentní *Enterococcus faecalis*. Léčba zahrnuje použití širokospektrých antibiotik, jelikož UTI může být často doprovázena komplikacemi, od nekomplikované cystitidy či prostatitidy u mužů, pyelonefritidu až po perinefritický absces. Právě tyto komplikace jsou odpovědné za nozokomiální UTI na JIP, zejména u katéтровých infekcí. V prostředí JIP způsobují enterokoky až 15 % UTI. Jelikož tyto druhy enterokoků jsou schopny vytvářet biofilmy a je náročné je odstranit, léčba bývá složitá a často vede k mnoha chronickým infekcím. Patogeny kolonizují zdravotnické prostředky, včetně katétrů, kardiostimulátorů, ortopedických přístrojů a protetických srdečních chlopní. Biofilmy enterokoků se váží na fibrinogen vytvořený na katétru. [33] V případech infekcí sdružených s tvorbou bakteriálních biofilmů nestačí stanovit pouze citlivost patogenu, tzv. minimální inhibiční koncentraci (MIC, Minimal Inhibitory Concentration), ale je třeba určit hodnotu minimální biofilm inhibující koncentrace (MBIC, Minimal Biofilm Inhibitory Concentration). MBIC lze stanovit kombinací mikrodilučního testu s tzv. Christensenovou metodou, kde se biofilm zviditelní krystalovou violetí. [34]

### 3.3 Antimikrobiální terapie

Antimikrobiální terapie má především za cíl úspěšně eradikovat patogeny v místě infekce. Bakteriální infekce patří k jednomu z nejzávažnějších problémů medicíny a správná volba antibiotika je základní nezbytností pro současnou medicínu. Kvůli neustálému nárůstu rezistence a šíření rezistentních bakterií, a v dnešní době také kvůli omezené dostupnosti efektivních antimikrobiálních léčiv, je žádoucí vývoj nových antimikrobiálních látek či případné další zkoumání již současně používaných léčiv. Nový vývoj antiinfektiv je spojený s velmi zdlouhavým a finančně náročným procesem. Alternativními přístupy mohou být kombinační terapie, či použití již známého léčiva, avšak v nové indikaci. [35, 36]

Objev a zavedení antibiotika do klinické praxe se řadí k jednomu z největších přínosů 20. století, jež pomohl k výraznému snížení morbidity a mortality u infekčních onemocnění. Antibiotika jsou proto často nezbytnou součástí terapie bakteriálních nemocí. Jejich časté a nadměrné užívání má negativní vliv na zvyšování rezistence mnoha organismů. Jednou z možností, jak se snažit tomu předcházet, je racionální užívání antibiotických léčiv. Spotřeba antibiotik je globální problém a každý rok narůstá. Nejvíce se využívají při léčbě UTI a u respiračních nákaz. [37, 38] Zacházení s antibiotiky, zlepšení prognózy nemocných a zamezení tak šíření rezistence MDR patogenů má za úkol tzv. antibiotický „stewardship“. K tomu, aby mohla být léčba antibiotiky úspěšná, je zapotřebí včasné stanovení diagnózy, laboratorní určení původce a stanovení jeho citlivosti k antibiotikům. V ambulantní praxi je možné se častěji setkat s empirickou terapií, kde rozhodují především zkušenosti lékaře a nejčastější patogeny způsobující danou nemoc. Typicky je tomu tak u UTI, kdy se podávají širokospektrální antibiotika, která sama o sobě podporují rozvoj rezistence. Proto je lepší volit cílenou neboli tzv. racionální terapii, kdy se stanoví vhodné antibiotikum dle výsledků antibiogramu daného původce infekčního onemocnění. Pokud nastanou situace, kdy je třeba zahájit bezprostřední léčbu pacienta a není možné čekat na kultivační vyšetření, nasazují se preparáty se širším spektrem účinku a následně, po získání mikrobiologických výsledků, se terapie upraví. Buď se v úvodní terapii setrvá, nebo nastává přechod na jiné, vhodnější antibiotikum s užším spektrem účinku. [39]

#### 3.3.1 Terapeutické možnosti při léčbě enterokokových infekcí

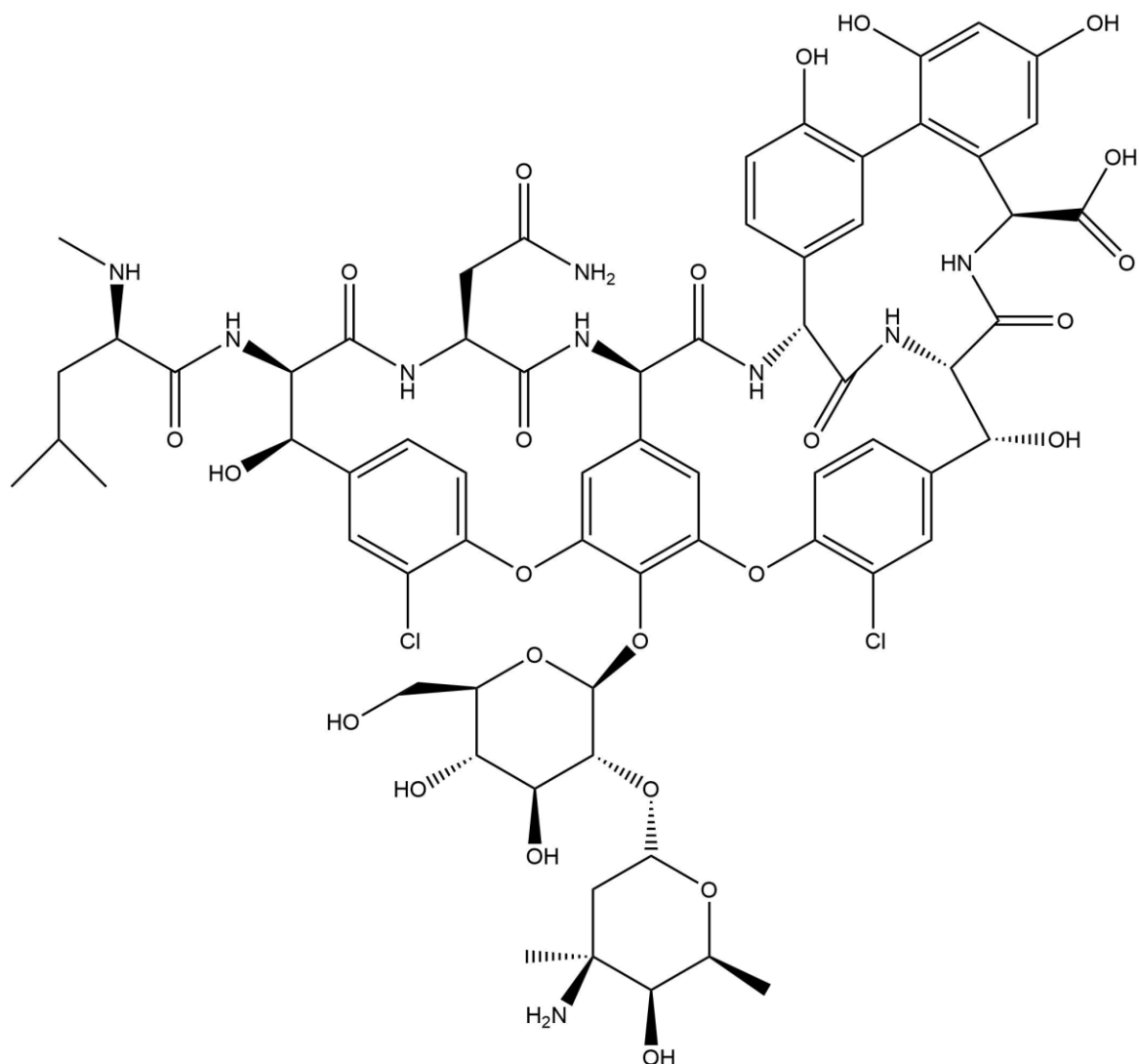
Léčba infekcí způsobená enterokoky představuje jeden z nejnáročnějších celosvětových problémů. Stále více dochází ke zvyšování prevalence bakteriálních kmenů, které jsou rezistentní *in vitro* téměř na všechna antibiotika s baktericidní aktivitou, kvůli čemuž dochází ke snížení terapeutických možností. Dnes se již při každé kultivaci předpokládá tolerance a rezistence na antibiotika, která dříve patřila mezi základní antibiotika k terapii enterokokových infekcí, zejména VAN, ampicilin či aminoglykosidy. V případě rezistence patogenů vůči antibiotiku, je pro jejich usmrcení nutná taková koncentrace

antibiotika, která často značně převyšuje dostupné koncentrace. Toto lze překonat vhodnou kombinací synergně působících antibiotik. V současné době je v nemocničním prostředí rezistentní k antibiotikům první volby většina klinických izolátů enterokoků. Proto k léčbě MDR VRE zbývají terapeutické možnosti v podobě oxazolidinonů (linezolid), novějších tetracyklinů (tigecyklin) a lipopetidů (daptomycin). Ale i u těchto relativně nových léčiv není zaručeno, že v rámci monoterapie nedojde k selhání léčby. Smyslem účelné terapie tedy je provádět další studie zaměřené na nové strategie v terapii závažných infekcí vyvolaných enterokoky, a to zejména kmeny *E. faecalis* a *E. faecium*. [40–42]

### **3.3.1.1 Vankomycin**

VAN je tricyklické glykopeptidové antibiotikum, jehož účinek je omezen na grampozitivní bakterie. Jelikož se jedná o velkou molekulu, nedochází k jeho průniku vnější membránou gramnegativních bakterií. Inhibuje syntézu bakteriální buněčné stěny, čímž působí na patogeny cidně. Je indikován nejčastěji u infekcí vyvolaných rezistentními grampozitivními bakteriemi. Po perorálním podání se nevstřebává a je tudíž podáván nitrožilně, což sebou nese značná rizika. VAN vyžaduje pomalé intravenózní podávání. Rychlé podání (kratší než 1 hodina) VAN vede k tzv. „red man“ syndromu (náhlé zarudnutí horní poloviny těla) a může vést až k anafylaktickému šoku. Zároveň podávání VAN představuje významné riziko nefrotoxicity a ototoxicity. Neutropenie či trombocytopenie nebývá už tolik častá. VAN patří mezi léčiva s úzkým spektrem účinku, proto je nutné monitorování jeho hladin. [43]





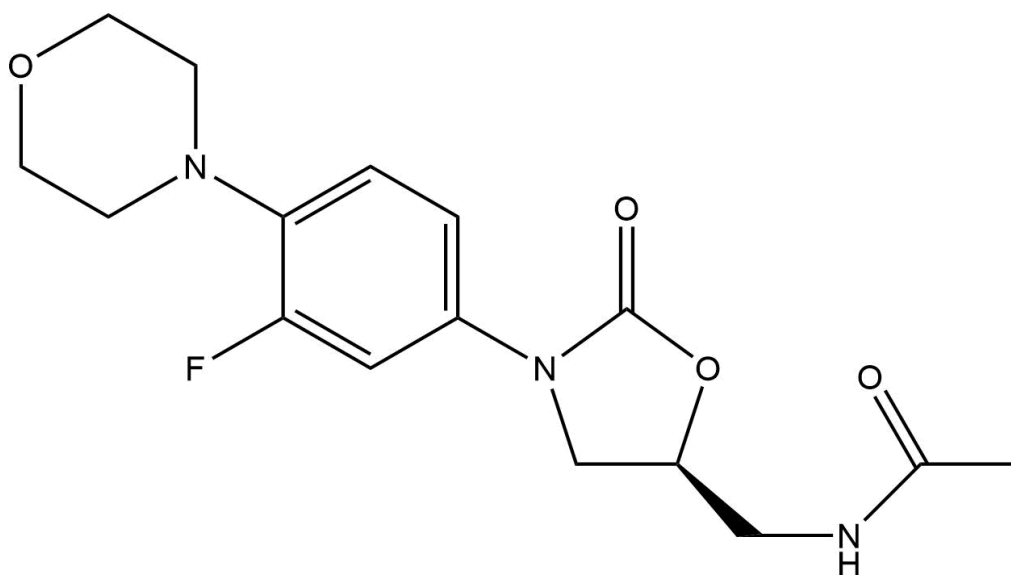
**Obr. 5** Chemická struktura vankomycinu.

Vytvořeno v programu ChemDraw.

VRE byly poprvé v České republice popsány v roce 1997 [44], přičemž úplně první byl kmen VRE izolován v Anglii v roce 1986 a následně ve Francii, kde se jednalo o *E. faecium*. [45] O rok později se k nim přidal i druh *E. faecalis* izolovaný v USA. Za velkou hrozbu s ohledem na AMR je považován zejména VRE<sub>fm</sub>. VRE<sub>fm</sub> způsobuje v USA ročně až 400 úmrtí a přibližně 54 500 hospitalizací. Největší riziko nastává u hospitalizovaných pacientů, kteří mají prodlouženou dobu na JIP, trpí komorbiditami či podstoupili invazivní zákrok. Jakmile dojde ke kolonizaci bakterií VRE, může docházet k jejich přenosu až po dobu několika týdnů. *E. faecium* vykazuje vnitřní i získanou rezistenci k mnoha skupinám antibiotických léčiv, kvůli čemuž se lépe přizpůsobuje nemocničnímu prostředí, kde je užívání antibiotik běžnou záležitostí. Prevalence onemocnění způsobených VRE v USA může být v některých nemocnicích až 50 %. [46]

### 3.3.1.2 Linezolid

Linezolid (LIN) lze považovat za prvního člena spadajícího do skupiny oxazolidinonů. Jedná se o bakteriostatické antibiotikum, které cílí proti grampozitivním bakteriím, včetně MRSA, pneumokokům rezistentním k penicilinu či na vankomycin-rezistentní *Staphylococcus aureus* (VRSA, Vancomycin-Resistant *Staphylococcus aureus*). Mimo jiné byl schválen v roce 2000 Úřadem pro kontrolu potravin a léčiv (FDA, Food and Drug Administration) pro léčbu infekcí způsobených VREfm. LIN se váže na ribozomální podjednotku 50S a inhibuje tvorbu tzv. iniciačního komplexu na počátku proteosyntézy. Kvůli specifickému mechanismu účinku nebyl dosud prokázán vznik zkřížené rezistence vůči jiným inhibitorům proteosyntézy, jež zasahují do inhibice proteosyntézy až v dalším tzv. elongačním cyklu. [47] LIN zabraňuje i expresi virulenčních faktorů a tím pádem má schopnost snížit množství toxinů, které jsou produkovány grampozitivními patogeny. [48] U pacientů s patologickými hematologickými výsledky se doporučuje častější vyšetření krevního obrazu zejména kvůli možnému vzniku anémie či trombocytopenie, jež jsou spojeny přímo s účinkem LIN. [47] Již byla zdokumentována klinická selhání LIN v monoterapii hned v několika případech infekcí vyvolaných VRE. LIN navíc při dlouhodobém užívání může vést k dalším nežádoucím projevům jako je neuropatie, myelosuprese či oční toxicita. [49]

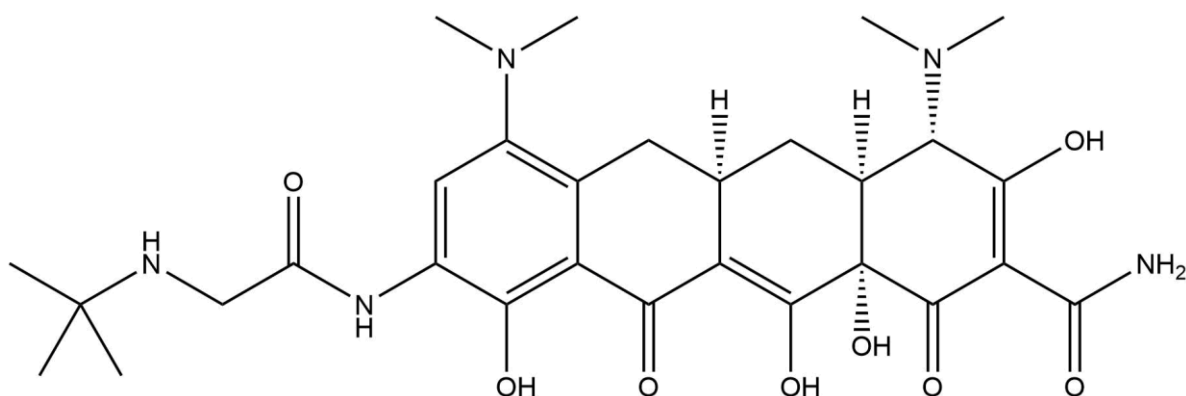


**Obr. 6** Chemická struktura linezolidu.

Vytvořeno v programu ChemDraw.

### 3.3.1.3 Tigecyklin

Tigecyklin (TIG), jako zatím jediný, spadá do skupiny glycylycyklinů. Vykazuje bakteriostatickou aktivitu u onemocnění způsobených vysoce rezistentními gram pozitivními a gram negativními bakteriemi. Dále je volen k terapii infekcí vyvolaných atypickými a anaerobními mikroorganismy. Na bakterie *S. pneumoniae*, *H. influenzae*, *N. gonorrhoeae* má baktericidní účinek. Stejně jako ostatní tetracykliny inhibuje proteosyntézu vazbou na 30S ribozomální podjednotku bakterie, což blokuje inkorporaci aminokyselinových zbytků do prodlužujícího se peptidového řetězce. TIG se váže na místo v ribozomu až pětkrát účinněji než tetracykliny, což má za následek překonání tetracyklinové rezistence založené na ribozomální ochraně a efluxních pumpách. [50] V USA byl schválen FDA ke klinickému použití od roku 2005, v EU pak o rok později, pro léčbu komplikovaných infekcí kůže a nitrobřišních zánětů u osob starších 18 let. [5]

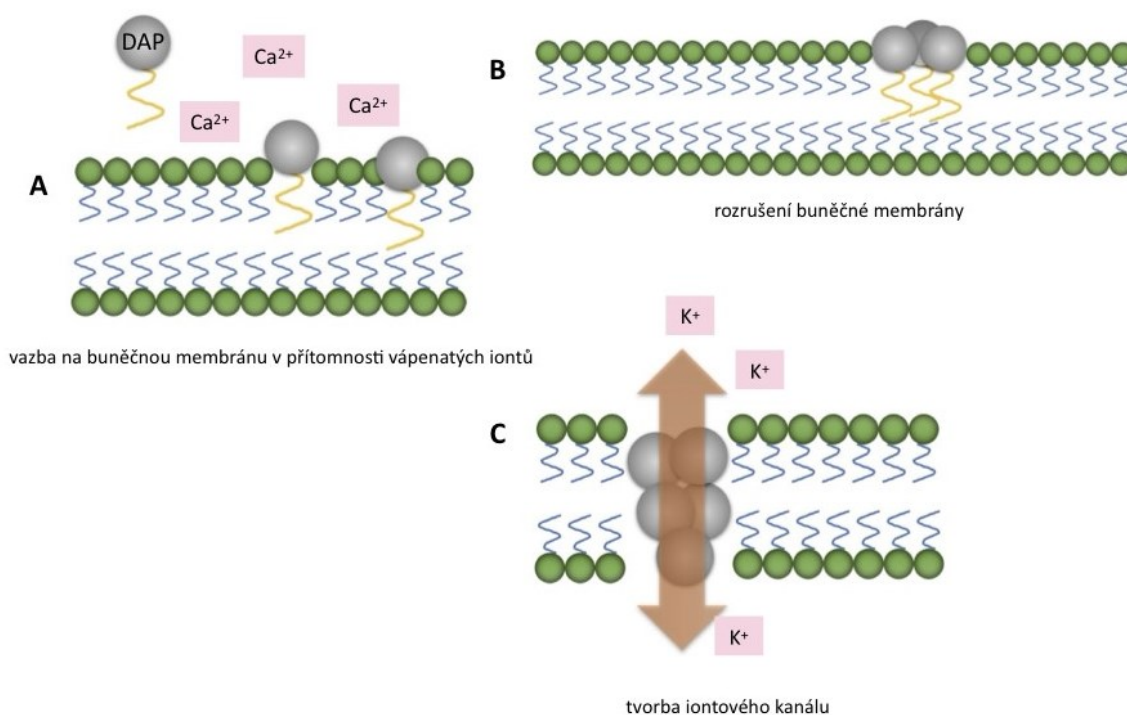


Obr. 7 Chemická struktura tigecyklinu.

Vytvořeno v programu ChemDraw.

### 3.3.1.4 Daptomycin

Daptomycin (DAP) je antibiotikum ze skupiny cyklických lipopeptidů, které vyniká svým jedinečným mechanismem účinku. Váže se na cytoplazmatickou membránu MDR kmenů gram pozitivních bakterií bez toho, aniž by pronikl dovnitř a naruší její funkci, která je pro přežití patogenu nezbytná. Vazba DAP na buněčnou membránu vyžaduje přítomnost vápníkových iontů. Dojde k rozrušení buněčné membrány a vytvoří se iontový kanál, který vede k uvolnění intracelulárních iontů s následným, velmi rychlým usmrcením bakterie v jakékoli fázi jejího růstového cyklu, tj. je schopen působit i na patogeny v klidovém stavu (dormantní buňky). [51, 52]



**Obr. 8** Mechanismus účinku daptomycinu. [53] – upraveno

Daptomycin (**DAP**) přistupuje k buněčné membráně a váže se na ni v přítomnosti vápenatých iontů (**A**). Dochází k rozrušení buněčné membrány (**B**) a vytvoření iontového kanálu (**C**), což vede k vyplavení draslíkových iontů a k následné smrti bakteriální buňky.

Obecnou charakteristikou skupiny lipopeptidů je také imunomodulační účinek. DAP dokáže interagovat s receptory, které rozpoznávají buňky prezentující antigen prostřednictvím lipidové části ve své struktuře. Tato jeho lipidová část v přítomnosti dvojmocných iontů může interagovat s fosfolipidy v membráně, což má za následek proniknutí DAP i do imunitních buněk. Mezi jeho další výhody patří schopnost proniknout do samotného biofilmu tvořeného patogeny a u většiny těchto patogenů navíc dokáže zastavit jeho tvorbu, čehož se hojně využívá u infekcí spojených s cizím tělesem. Jedná se o velmi užitečnou schopnost, jelikož biofilm je častým důvodem vzniku rezistence bakterií a je často spojován s opětovným navrácením infekce. [54] Na rozdíl od jiných antibiotik, příkladem VAN, z bakteriální buňky, která je usmrcena DAP, dochází k uvolnění pouze minimálního množství bakteriálních toxinů, případně jiných fragmentů do krevního oběhu. DAP byl objeven v 80. letech, ale registrován byl až v roce 2003. FDA ho schválila zejména pro léčbu komplikovaných infekcí kůže a nitrobršních zánětů. [52] Mimo jiné je používán při léčbě UTI způsobených VRE. Z důvodu nedostatku klinických informací ohledně využití DAP k terapii enterokokových infekcí, nejsou dle Evropské komise pro testování antimikrobiální citlivosti (EUCAST, European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing) uvedeny hodnoty breakpointů pro DAP. LIN, TIG a DAP jsou většinou využívány jako léky druhé volby, zejména po předchozí léčbě VAN. Rezistence u *E. faecalis*, *E. faecium* a *Staphylococcus aureus*



ESKAPE patogeny obecně patří mezi agens, které rychle získávají rezistenci k jednomu nebo oběma antibiotikům používaným v kombinaci, proto je nutné setrvat i nadále ve výzkumu nových možností. [57]

Existují také látky, tzv. adjuvans či přerušovače rezistence (z anglického slova „resistance breakers“), které v kombinaci s antibiotiky vytvoří z neúčinného léku účinný. Samy o sobě nemají žádný terapeutický účinek, ale dokážou inhibovat efluxní pumpy, změnit fyziologické vlastnosti rezistentních buněk a usnadnit vstup antibiotika skrz bakteriální membránu. Příkladem takové látky je inhibitor  $\beta$ -laktamázy vaborbaktam, který se používá pro obnovení účinku meropenemu. [57] Další možností může být kombinace určitých antibiotik s „*quorum quenching*“<sup>2</sup> molekulami, vedoucí k potenciaci léčby infekčních onemocnění asociovaných s tvorbou biofilmu, kdy dochází k zastavení tvorby biofilmu a v některých případech i zničení perzistentních buněk. Mezi další možnosti, jak se vypořádat s infekcemi způsobenými rezistentními patogeny patří využití bakteriofágů, antimikrobiálních peptidů, nanočástic nebo fotodynamické světelné terapie. [59, 60]

### 3.3.2.1 Vybrané kombinace antibiotik v terapii infekcí vyvolaných bakteriemi skupiny ESKAPE

**DAP a ceftarolin.** U této kombinace byly prokázány vynikající synergní účinky *in vitro* vůči VRE. Ceftarolin je novější  $\beta$ -laktamové antibiotikum, které v kombinaci s DAP zvyšuje vazbu DAP na buněčnou membránu. Navíc, ceftarolin senzitivizuje patogeny vůči peptidu katelicidinu, jež se podílí na obranyschopnosti člověka při bakteriální infekci. Jako u jednoho z mála  $\beta$ -laktamových antibiotik byl u ceftarolinu prokázán účinek proti *E. faecalis* a zároveň synergní aktivita s DAP proti MRSA. [58, 59]

**VAN a  $\beta$ -laktamová antibiotika.** Jedná se o účinnou používanou kombinační terapii při infekcích vyvolaných MRSA. *In vitro* studie navíc prokázaly synergii této kombinace antibiotik i proti VRSA. Ačkoliv není přesný synergní mechanismus této kombinace zcela objasněn, existuje několik teorií, které popisují možné mechanismy synergie.  $\beta$ -laktamová antibiotika prostřednictvím vazby na penicilin-vázající proteiny (PBP, Penicillin-Binding Proteins) bakterie inhibují biosyntézu peptidoglykanu. Při kombinaci s VAN bylo pozorováno ztenčení buněčné membrány *S. aureus*, tím pádem může VAN lépe procházet skrz membránu a zvyšují se tak šance na inhibici cílového místa syntézy. VAN se váže na volné konce peptidového řetězce membrány a zamezuje jejich spojování. Mimo jiné  $\beta$ -laktamy mohou za morfologické změny na povrchu *S. aureus*, čímž zvyšují možnosti VAN se specificky navázat. [63, 64]

---

<sup>2</sup> „*Quorum sensing*“ je označení pro způsob komunikace bakterií v biofilmových společenstvích. „*Quorum quenching*“ je označení pro enzymatickou degradaci molekul, které se podílí na „*quorum sensing*“. [58]

**Dalfopristin a quinupristin.** Jsou to antibiotika ze skupiny streptograminů, účinná a využívaná v praxi v kombinační terapii infekcí vyvolaných kmeny MRSA a u těžkých infekcí vyvolaných VREfm. Mechanismus synergního působení je založen na inhibici syntézy proteinů vazbou na 50S ribozomální podjednotku bakterie, což vede k velmi silné baktericidní aktivitě. Dalfopristin vytvoří vazbu s ribozomem a zamezí prodlužování peptidového řetězce, čímž zablokuje počáteční fázi syntézy. Naproti tomu quinupristin působí až v pozdější fázi proteosyntézy a uvolňuje neúplné peptidové řetězce. Quinupristin a dalfopristin se podávají ve fixní kombinaci v poměru 30 : 70 (150 mg/350 mg). [65]

**Ceftazidim a avibaktam** je kombinace indikovaná k léčbě komplikovaných nitrobřišních infekcí a UTI způsobené MDR kmeny společně ještě s metronidazolem. Ceftazidim je cefalosporin třetí generace s baktericidním účinkem. Některé cefalosporiny třetí a čtvrté generace jsou extenzivně hydrolyzovány  $\beta$ -laktamázy (ESBL, Extended Spectrum  $\beta$ -lactamases). U ceftazidimu tomu tak není, což z něj činí lepší volbu pro terapii těchto infekcí. Avibaktam je non- $\beta$ -laktamový inhibitor  $\beta$ -laktamázy, jež může inaktivovat některé  $\beta$ -laktamázy a ochránit tak ceftazidim před degradací. Ceftazidim tak může působit na širší spektrum kmenů produkujících ESBL. Tato kombinace patří mezi první kombinace cefalosporinu a inhibitoru  $\beta$ -laktamázy s aktivitou proti karbapenemázám. [66]

### 3.4 Hodnocení citlivosti bakterií na antibakteriální léčiva

Stanovení citlivosti bakterií vůči antibiotikům je nedílnou součástí pracovní náplně mikrobiologických laboratoří. Cílem testování citlivosti je zajistit lék volby pro konkrétní infekci, aby se zamezilo použití a zbytečnému plýtvání antibiotiky, která nemusí být při dané infekci účinná. Je také možné odhalit lékovou rezistenci u běžně se vyskytujících patogenů. Existuje mnoho metod, kterými lze stanovit antimikrobiální citlivost (AST, Antimicrobial Susceptibility Testing). [67] Mezi běžně používané metody, které řadíme mezi fenotypové, patří disková difúzní metoda, bujónová diluční metoda, E-test a MALDI-TOF MS. Co se týče stanovení citlivosti jednotlivých bakterií jsou tyto metody velmi přesné, ale často zdlouhavé a relativně drahé, s výjimkou metody MALDI-TOF MS, která proces stanovení citlivosti urychluje. Cíleně podané antibiotikum ale může výrazně omezit vznik a šíření AMR. Většina těchto metod v rámci několika let prošla různými proměnami a řada z nich už je dnes alespoň částečně automatizovaná. Další relativně novější skupinou metod pro AST jsou metody založené na genotypizaci daných bakterií, kam patří například metoda polymerázové řetězové reakce, známá také pod zkratkou PCR. [68]

### 3.4.1 Interpretace výsledků testů citlivosti

Před samotným klinickým použitím antibakteriální látky je nutné určit parametry, které by měly odlišit citlivé kmeny od rezistentních. K těmto účelům slouží tzv. klinické breakpointy. Jedná se o údaje vyjadřující hraniční hodnotu parametru, která definuje, zda je bakterie považována za rezistentní či citlivou vůči testované antimikrobní látce. [69] Tyto parametry jsou mimo jiné závislé i na farmakologii samotného léčiva, tj. na farmakokinetickém chování a biologické dostupnosti než pouze na samotné antimikrobiální aktivitě. Z hlediska interpretace výsledků testů citlivosti lze hodnoty breakpointů rozdělit do tří základních kategorií. První kategorie označuje bakterie jako citlivé (označení C), což znamená, že je možné pacienta léčit běžnými dávkami daného antibiotika dle doporučení. Druhá intermediární (intermediárně-rezistentní, označení I) kategorie zahrnuje takové mikroorganismy, u kterých při běžně podané dávce léčiva může dojít k nižší odezvě než u citlivých izolátů. Proto svoje využití mají zejména na místech v těle (například při infekcích), kde může být dosažena zvýšená koncentrace antibiotika. [70] V roce 2019 organizace EUCAST provedla několik změn v definicích u těchto kategorií, zejména pak u kategorie druhé. S upraveným názvem „citlivá – zvýšená expozice“ se týká takových léčiv, které lze k léčbě infekcí vyvolaných testovanými patogeny využít, ale jen za podmínek vyšší dávky přípravku. [71] U poslední, rezistentní kategorie (označení R) se při klasickém dávkovacím schématu neprojeví dostatečně efektivní účinek léčiva, tím pádem léčba tímto antibiotikem s velkou pravděpodobností nebude úspěšná. [70]

Breakpointy se mohou měnit v souvislosti s novým výzkumem a každá organizace má tyto parametry trochu odlišné. Již zmíněný EUCAST shromažďuje a pravidelně aktualizuje interpretační tabulky s hodnotami breakpointů, jež posléze zveřejňuje na svých webových stránkách, které jsou volně přístupné pro každého. Některé doporučené breakpointy s číselnými hodnotami pro hraniční hodnoty MIC od organizace EUCAST jsou vyšší než ty od organizace Institutu pro klinické a laboratorní standardy (CLSI, The Clinical and Laboratory Standards Institute), které jsou kompletně zpřístupněny pouze za členské příspěvky. [67]

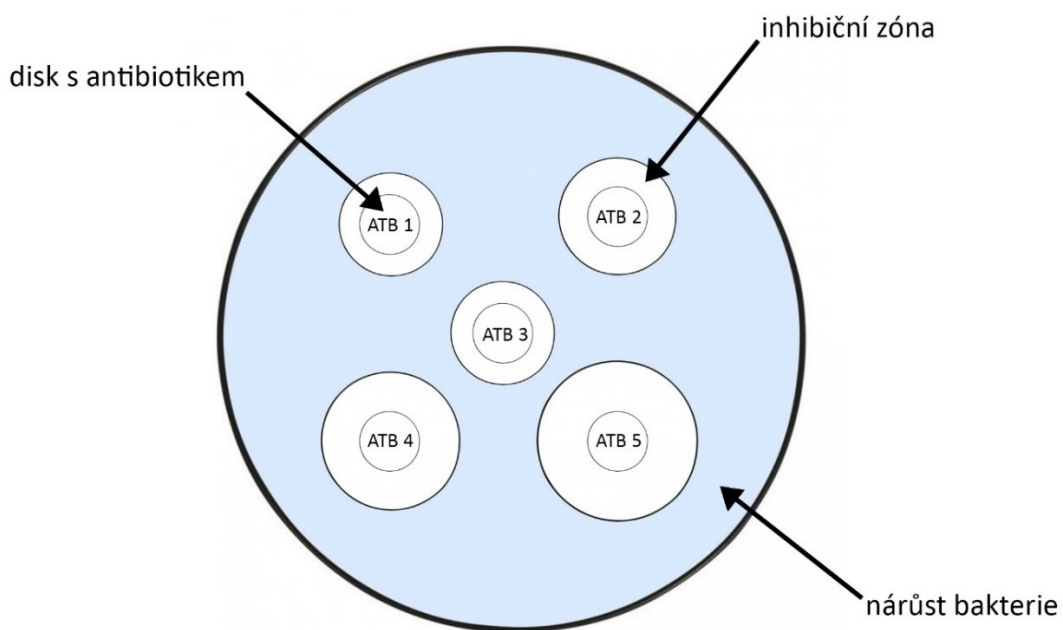
Dalším hodnotícím kritériem jsou tzv. epidemiologické cut-off hodnoty (ECOFF, Epidemiological-Cut Off), které publikuje EUCAST. Tyto parametry zaznamenávají hraniční citlivost pro odlišení kmenů se získanou rezistencí od kmene divokého typu (z anglického výrazu „wild type“). Nejedná se tedy o údaje, které by měly sloužit k rozhodování o vhodnosti terapie. [69]

### 3.4.2 Disková difúzní metoda

Jedná se o jednu z nejrozšířenějších a nejpoužívanějších metod pro AST v mikrobiologických laboratořích. Využívá se u ní papírových disků, které jsou napuštěny určitou koncentrací antibiotik. Antibiotikum se postupně uvolňuje a difunduje do agarové půdy, jež je naočkována bakteriální



suspenzí upravenou na hodnotu odpovídající 0,5 stupně dle McFarlanda (odpovídá přibližně  $1,5 \times 10^8$  CFU/ml). V místě, kde je dostatečná koncentrace přítomného difundovaného antibiotika v gelu, která stačí k potlačení růstu patogenu, se vytvoří zóna inhibice růstu. Po inkubaci se zaznamenává průměr inhibiční zóny, který je úměrný citlivosti patogenu k jednotlivému antibiotiku. EUCAST pro tuto metodu doporučuje kultivační médium Mueller-Hinton agar (MHA). Samotná inkubace probíhá v rámci 16–20 hodin při teplotě 35 °C. Disková difúzní metoda je standardizovaná a řadí se mezi kvalitativní testy, což znamená, že se nejedná o měření stupně citlivosti. Získané hodnoty se porovnávají s tabulkovými hodnotami breakpointů pro jednotlivé kategorie, dostupných na webových stránkách organizací EUCAST a CLSI. Je zde k dohledání rozmezí průměrů inhibičních zón pro určení kategorie citlivosti mikrobů. Test je velmi přesný, poskytuje spolehlivé výsledky a umožňuje jednoduché provedení. Z ekonomického hlediska se jedná o méně nákladnou metodu s možností screeningu i na celou třídu antibiotik. Nevýhodou může být pomalejší získávání výsledků, což by mohlo mít negativní dopad na pacienta, jelikož je žádoucí zahájit léčbu co nejrychleji. [72]



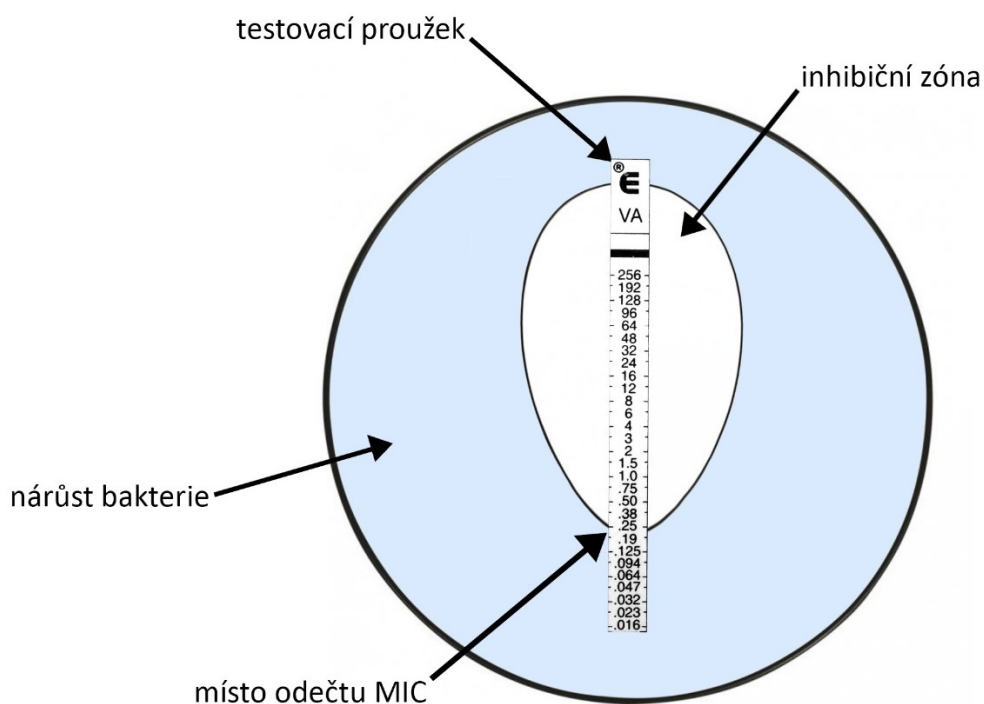
**Obr. 10** Schéma diskové difúzní metody.

V místě, kde je potlačen růst bakterie dochází k vytvoření inhibiční zóny (bílá místa), jejíž průměr je měřen pomocí pravítka v mm. Naměřené hodnoty se následně porovnávají s tabulkovými interpretačními hodnotami organizací EUCAST či CLSI.

**Zdroj:** autor schématu Nina Netíková

### 3.4.3 E-test

E-test je z velké části svým principem podobný diskové difúzní metodě. Využívá se zde místo antibiotického disku speciální proužek se stupnicí, který má v sobě napuštěnou určitou koncentraci daného antibiotika. Metoda se používá pro stanovení MIC. U této metody dojde k vytvoření zóny inhibice růstu ve tvaru kapky a v jejím užším místě, kde zóna protíná stupnici proužku, se odečítá MIC. Dále dochází k porovnání naměřených hodnot s tabulkovými interpretačními hodnotami organizace EUCAST či CLSI, jako u předchozí metody. I tento test je nenáročný na provedení, ovšem nejedná se o standardizovanou metodu. Může proto docházet k odchýlkám u výsledků získaných tímto přístupem v porovnání s výsledky dosaženými standardizovanými postupy. [72]



**Obr. 11** Schématické zobrazení E-testu.

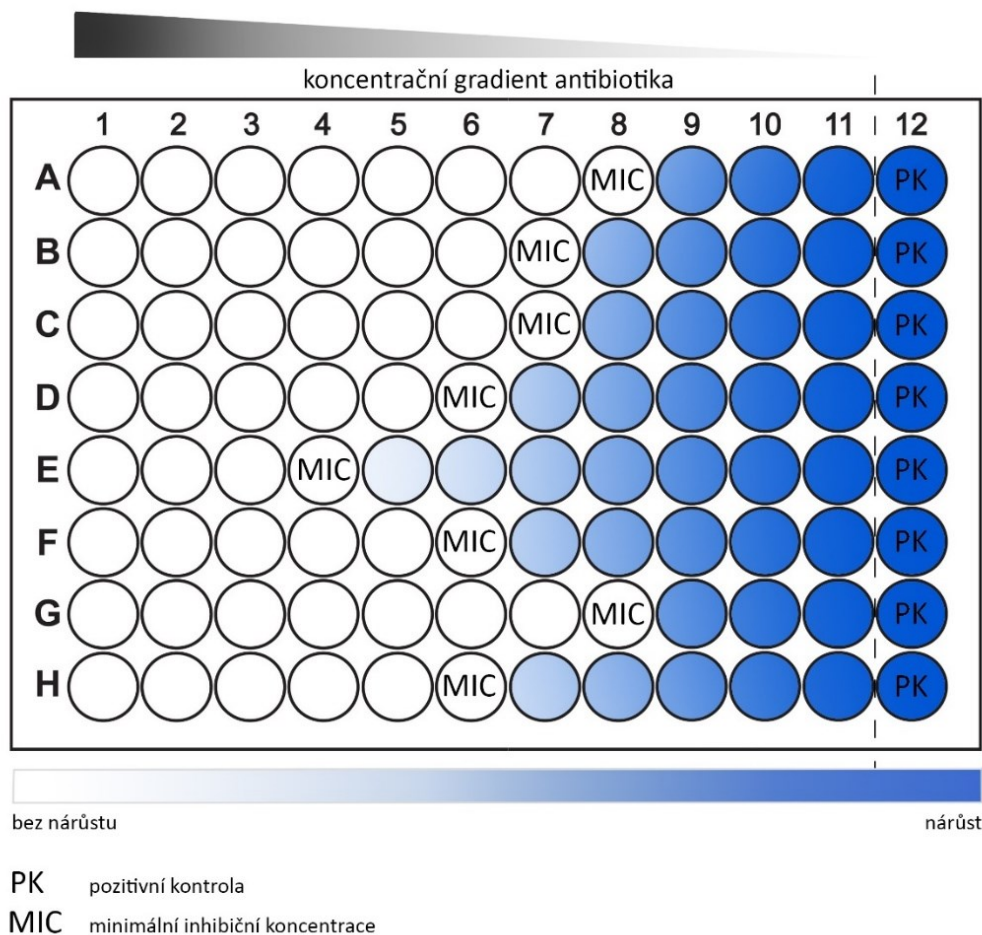
Schéma představuje bakteriální kmen (nárůst bakterie definuje světle modrý prostor), vůči kterému je testována citlivost antibiotika pomocí testovacího proužku. Jakmile dojde vlivem antibiotika k zástavě růstu patogenů, vytvoří se do agaru inhibiční zóna (bílá místo). V místě prolnutí kraje inhibiční zóny a samotného proužku lze odečíst hodnotu MIC.

**Zdroj:** autor schématu Nina Netíková

### 3.4.4 Makrodiluční a mikrodiluční technika

Jednou z vůbec prvních metod pro AST je bujónová diluční technika. Základem je příprava dvojkové ředící řady antibiotik v růstovém bujónu, která se následně aplikuje do zkumavek v případě makrodiluční metody a do jamek v případě metody mikrodiluční. Po inkubaci se hodnotí okem viditelný zákal, což značí bakteriální růst. První zkumavka s nejnižší koncentrací, ve které již není viditelný zákal, představuje hodnotu MIC. Další hodnotou, kterou lze stanovit, je tzv. minimální baktericidní koncentrace (MBC, Minimal Bactericidal Concentration). Tato hodnota nám vymezuje nejnižší koncentraci antibiotika, která již vede k baktericidnímu efektu. Hodnota MBC může být stejná nebo vyšší než hodnota MIC, ale není nižší. [72]

Makrodiluční technika je starší metoda, pro níž je typická delší příprava roztoků antibiotik a větší spotřeba materiálu, a s tím spojené i větší riziko chyb přípravě. Více se dnes uplatňuje technika mikrodiluční, kde se využívají 96jamkové mikrotitrační destičky, které umožňují testování citlivosti mikroba až proti dvanácti antibiotickým léčivům. Tento postup je časově úspornější než makrodiluční technika, a navíc je tato metoda standardizována pro většinu náročných patogenů. [72] Pro ty náročnější bakterie (například *Haemophilus influenzae*, *Listeria monocytogenes*, *Streptococcus pneumoniae* a další). EUCAST doporučuje místo klasického MHB použít tento bujón s přídavkem defibrinované koňské krve a  $\beta$ -NAD ( $\beta$ -nikotinamidadenindinukleotid). Jak již bylo zmíněno výše, výsledky lze hodnotit pouhým okem nebo pomocí spektrofotometrické detekce. [73]



**Obr. 12** Schéma mikrotitrační destičky pro stanovení minimální inhibiční koncentrace mikrodiluční bujónovou technikou. [74] – upraveno

Minimální inhibiční koncentrace je nejnižší koncentrace antimikrobiální látky, která inhibuje růst mikroorganismu.

### 3.4.5 Hodnocení aktivity antimikrobiálních látek v kombinacích

K hodnocení potenciálního synergního působení antimikrobiálních látek se využívá řada metod, mezi které spadají nejčastěji využívané „time-kill“ testy a „checkerboard“ eseje. Nelze s jistotou říct, která metoda poskytuje nejpřesnější výsledky nebo která je nejspolehlivější. V případě testování kombinace dvou a více látek jsou metody modifikovány tak, aby došlo k požadovaným výsledkům. Závěrem každého testu je zhodnocení synergní, aditivní, indiferentní či antagonistické účinnosti kombinace testovaných látek. Antagonismus nastává, pakliže výsledný efekt dvou či více látek v kombinaci je nižší než samotná aktivita jednotlivých antibiotik. Tato kombinace je poté pro klinické využití nevhodná. Indiferentní působení znamená, že se testované látky v kombinaci vzájemně neovlivňují. Pokud účinek kombinace látek odpovídá prostému součtu účinků jedné testované látky s působením látky druhé, může se účinek vyhodnotit jako aditivní. Závěrem synergie, která nastává v případě, kdy je jedno antibiotikum potencováno druhým či naopak. Výsledný efekt je tedy větší než součet účinků jednotlivých testovaných látek. [75]

Pro zjišťování synergie lze využít i metody založené na difúzi, konkrétně již dříve zmíněný E-test, u kterého se v tomto případě využívají dva proužky napuštěné každý jiným antibiotikem. Jednotlivé proužky se na agar umístí kolmo na sebe. Jiný způsob spočívá v použití nejprve jednoho proužku, který po určité časové době se odebere a nahradí se proužkem s druhým antibiotikem a vyhodnotí se jejich vzájemné kombinační působení pomocí frakčního inhibičního indexu (FIC, Fractional Inhibitory Concentration), jak bude popsáno dále. Další možností, jak testovat působení kombinace látek, je pomocí tzv. time-kill testu, který patří mezi pracnější a časově náročnější metody. Obecným principem je stanovení křivky usmrcení bakterií v závislosti na čase čili toto stanovení dokáže zhodnotit i časový průběh viability bakterií pod vlivem antimikrobní látky. Nejprve je třeba zjistit MIC pro každou látku samotnou a následně i pro jejich kombinace. Vzorky jsou odebírány pravidelně v časových intervalech ke kultivaci. Nejpoužívanější postup pro stanovení potenciální synergie látek je tzv. checkerboard metoda. Jedná se modifikovanou mikrodiluční bujónovou metodu, která poskytuje testování dvou antibiotik řaděných dvojkovou ředící řadou. Ke stanovení se využívá 96jamková mikrotitrační destička, do níž se jedna testovaná látka v různých koncentracích pipetuje po řádcích a druhá látka v různých koncentracích je pipetována po sloupcích. Dojde tak k vytvoření různých koncentračních kombinací v určitém koncentračním rozmezí testovaných látek. Výsledky se hodnotí pomocí FIC indexu. Dosažené hodnoty FIC indexů jsou pak porovnávány s hodnotícími kritérii. Synergnímu působení látek odpovídá hodnota FIC indexu méně nebo rovno 0,5, naopak pro antagonismus je pak parametr FIC indexu roven nebo větší než 4,0 (viz. Tab. 1). Touto metodou lze určit i vzájemné působení látek, které nejsou dostupné ve formě proužků, jako jsou třeba u E-testů, avšak jedná se o metodu náročnou na čas a zručnost. [76]

$$FIC = \frac{A}{MIC_A} + \frac{B}{MIC_B} = FIC_A + FIC_B$$

**Obr. 13** Vzorec pro výpočet hodnoty indexu frakční inhibiční koncentrace. [77]

Legenda: **MIC** – minimální inhibiční koncentrace, **FIC** – frakční inhibiční koncentrace; **A (B)** – hodnoty MIC sloučeniny A (B) v kombinaci se sloučeninou B (A); **MIC<sub>A</sub> (MIC<sub>B</sub>)** – hodnoty MIC pro samotné testované látky A (B); **FIC<sub>A</sub> (FIC<sub>B</sub>)** – index frakční inhibiční koncentrace látky A (B).

**Tab. 1** Hodnotící kritéria pro vzájemné působení látek na základě indexu frakční inhibiční koncentrace. [78] – upraveno

Závěrem se stanoví, zda na sebe testované látky vzájemně působí synergně, aditivně, indiferenčně či antagonisticky.

<b>hodnocení efektu vzájemného působení látek</b>	<b>hodnoty FIC indexu</b>
synergie	$\leq 0,5$
aditivita	0,5-1,0
indiference	1-4,0
antagonismus	$\geq 4,0$

## 4 Experimentální část

### 4.1 Použitý materiál

#### Pomůcky:

- Automatické pipety (Fisher Scientific s.r.o.)
- Sterilní zkumavky (Gamedium spol. s.r.o.)
- Stojánky na zkumavky (Gamedium spol. s.r.o.)
- Sterilní špičky (Fisher Scientific s.r.o.)
- Jednorázové očkovací kličky (Gamedium spol. s.r.o.)
- Zkumavky Eppendorf (Gamedium spol. s.r.o.)

#### Přístroje:

- Termostat Binder WTB (Fisher Scientific s.r.o.)
- Laminární box Esco Class II type A2 (Dynex Česká republika)
- Vortex MS2 Minishaker IKA (P-LAB a.s.)
- Densitometr DEN-18 McFarland Densitometer Biosan (P-LAB a.s.)
- Multidetekční reader Synergy HTX, BioTek, USA

#### Chemikálie a média:

- Dimethylsulfoxid (Sigma-Aldrich spol. s.r.o.)
- Metabolický indikátor barvivo AlamarBlue (Sigma-Aldrich spol. s.r.o.)
- Mueller-Hinton bujón (Sigma-Aldrich spol. s.r.o.)

#### Bakteriální kmeny použité pro testování:

Tab. 2 Seznam bakteriálních kmenů.

Legenda: **ATCC** – American Type Cultures Collection (kódové označení pro kmen pocházející ze sbírky neziskové organizace ATCC)

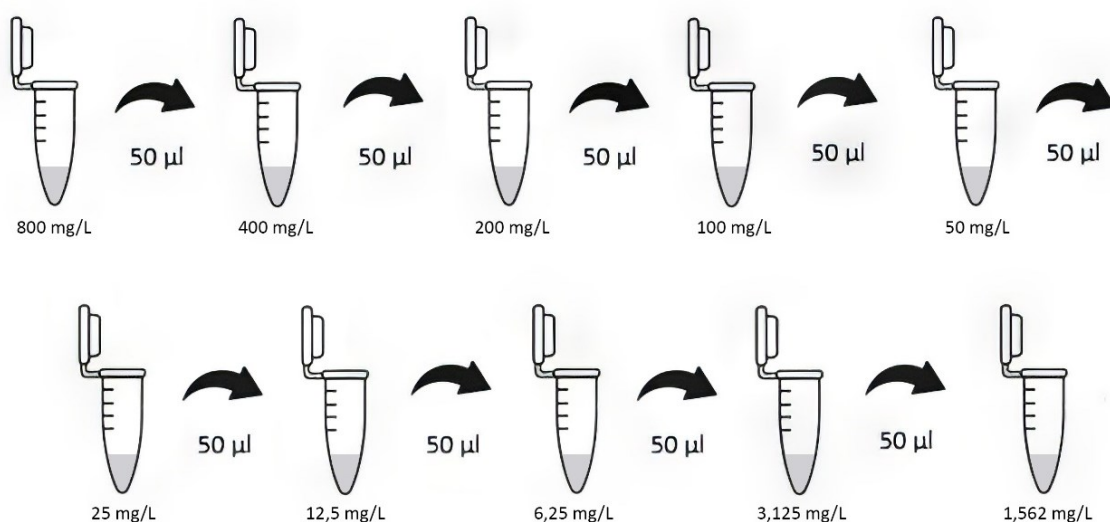
Původ	
klinický izolát z moči	<i>Enterococcus faecium</i>
sbírkový kmen (ATCC 29212)	<i>Enterococcus faecalis</i>

## Seznam antibakteriálních léčiv:

antibiotikum	daptomycin (DAP)	tigecyklin (TIG)	vankomycin (VAN)	linezolid (LIN)
--------------	---------------------	---------------------	---------------------	--------------------

## 4.2 Stanovení minimální inhibiční koncentrace

V první řadě bylo třeba u zvolených antibiotik stanovit MIC u dvou kmenů – *E. faecalis* (ATCC 29212) a *E. faecium* (klinický izolát). Navážených 5 mg každé látky bylo rozpuštěno v 500  $\mu$ l dimethylsulfoxidu (DMSO). Vzniklá koncentrace zásobních roztoků činila 10 000 mg/L. Ředěním byl připraven roztok DAP a TIG o koncentraci 800 mg/L. V případě VAN a LIN se jednalo o koncentraci 3200 mg/L. Následovalo dvojkové ředění ve zkumavkách, tj. bylo přetahováno 50  $\mu$ l roztoku do 50  $\mu$ l DMSO. Následně vždy vznikla koncentrace o polovinu menší. Pro DAP a TIG vznikla koncentrační řada 800-400-200-100-50-25-12,5-6,25-3,125-1,56 (mg/L) (viz. Obr. 14), u VAN a LIN koncentrační řada v rozmezí od 3200 mg/L do 6,25 mg/L.



**Obr. 14** Schéma ředění vybraných antibiotik daptomycinu a tigecyklinu v DMSO.

Dále byla antibiotika převedena do MHB. Pro kontrolu kvality tohoto kultivačního média se zásobní lahev nechávala přes noc v boxu, aby se potvrdila jeho nezávadnost (zákal by značil kontaminaci). Z každé Eppendorť tuby se pipetovalo 20  $\mu$ l roztoku testované látky do 1980  $\mu$ l kultivačního media, což vedlo k vytvoření řady antibiotik o sto nižší cílové koncentraci. Výsledné koncentrační řady tak pro DAP a TIG byly 8-4-2-1-0,5-0,25-0,125-0,0625-0,03125-0,0156 (mg/L). U VAN a LIN 32-16-8-4-2-1-0,5-0,25-0,125-0,0625 (mg/l). Finální koncentrace DMSO v každém roztoku tak činila 1 %. Jedná se o dostatečně

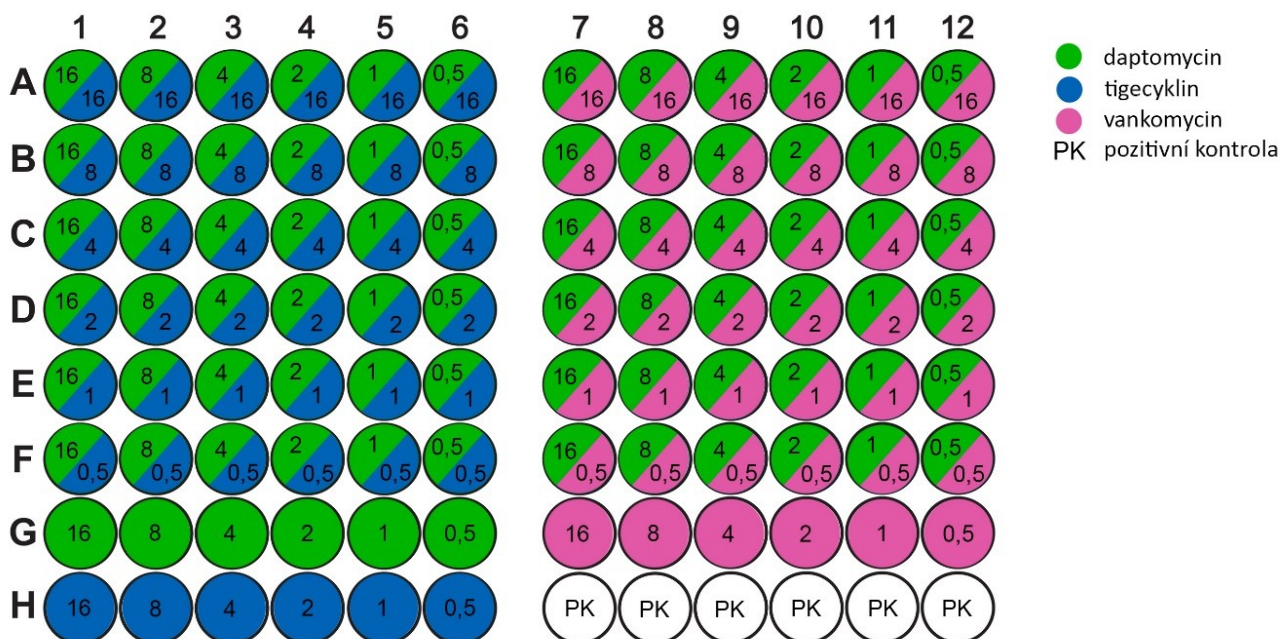


nízkou koncentrací, aby nedocházelo k negativnímu ovlivňování bakterie. Následně byly připraveny suspenze bakteriálních kmenů v MHB s optickou denzitou (OD) 0,5 McFarland. Ty byly dále ředěny v poměru 1 : 10 pomocí MHB. Inkubace probíhala po dobu 24 až 48 hodin v inkubátoru při teplotě 37 °C. Po inkubaci proběhlo měření pomocí multidetekčního readeru při vlnové délce 530 nm. Kontrola růstu v jamkách byla provedena i pouhým okem, ale s ohledem na to, že byly využity destičky s plochým dnem, za směrodatné byly považovány údaje z multidetekčního readeru.

### **4.3 Metodický postup pro studium antibakteriální aktivity dvou antibiotik v kombinaci *in vitro***

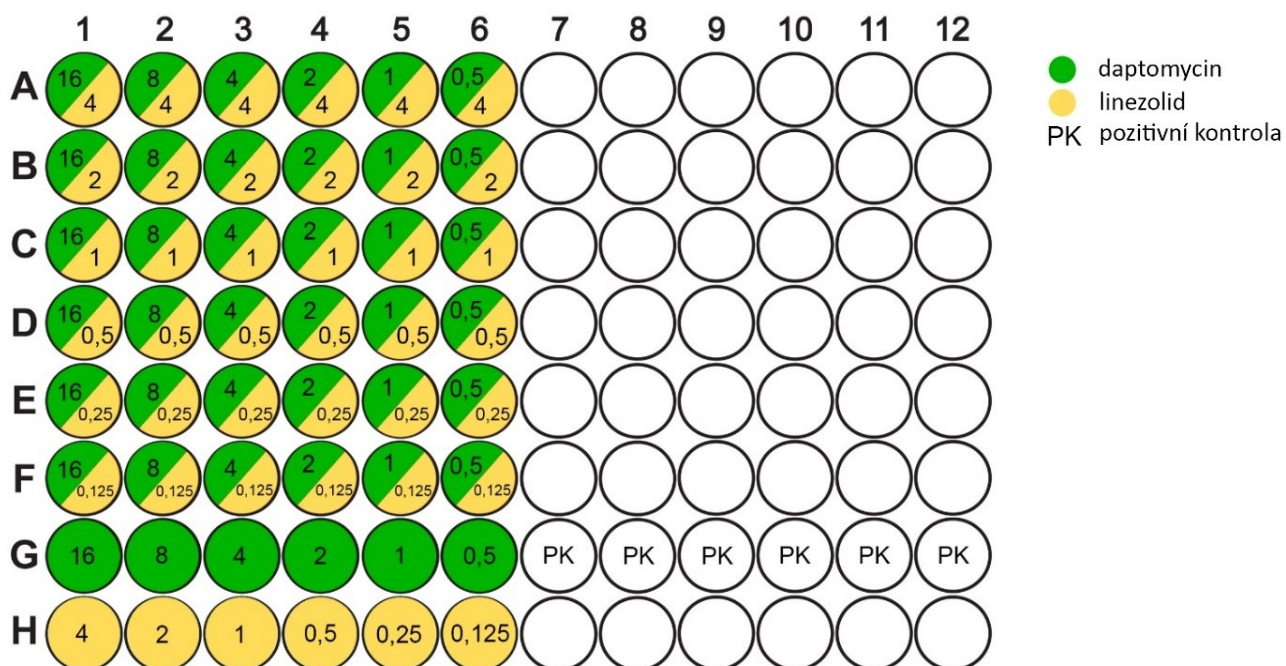
Dle výsledků MIC se připravila řada šesti koncentrací vybraných antibiotik, které se navzájem kombinovaly. Kvůli svému mechanismu účinku byl stěžejní DAP, který byl dán do kombinací s každým antibiotikem. Pro testování aktivity vůči kmenu ATCC (American Type Cultures Collection, kódové označení pro kmen pocházející ze sbírky organizace ATCC) byl ředěním a převedením do MBH připraven roztok DAP, TIG, VAN s požadovanou nejvyšší koncentrací odpovídající 16 mg/L. V případě LIN byl připraven ředěním roztok o nejvyšší koncentraci 4 mg/L. U klinického izolátu pro DAP a TIG se jednalo o koncentrace 16 mg/L a pro LIN a VAN 128 mg/L. Ve výsledku tedy cílové koncentrace jednoho antibiotického léčiva v dané jamce odpovídaly vždy poloviční koncentraci pipetovaného roztoku. Celkový objem v jamce mikrotitrační destičky byl 200 µl (poměr 1 : 1 daných antibiotik), tj. bylo pipetováno 100 µl jednoho antibiotika v kombinaci se 100 µl druhého antibiotika. Byly zde zařazeny pozitivní kontroly, které obsahovaly bujón s testovaným kmenem (antibiotiky neexponované bakterie). Dále bylo pipetováno do každé jamky po 10 µl bakteriální suspenze (připravené dle postupu uvedeném výše, kapitola 4.2). Expozice kmene ATCC byla hodnocena po 24 i 48 hodinách inkubace, u klinického izolátu pouze po 24hodinové inkubaci s následnou detekcí Alamar Blue (AB). U všech kombinací byla pozornost věnována především podhraničním liniím MIC, které určují hodnotu MIC jednotlivých antibiotických léčiv. Testování antienterokokového účinku vybraných antibiotik bylo prováděno v režimu 6×6, tj. celkem bylo studováno pro jednotlivé kombinace 36 různých koncentračních poměrů.

Statistické hodnocení se u studie vzájemného kombinačního účinku antimikrobiálních látek neprovádí.



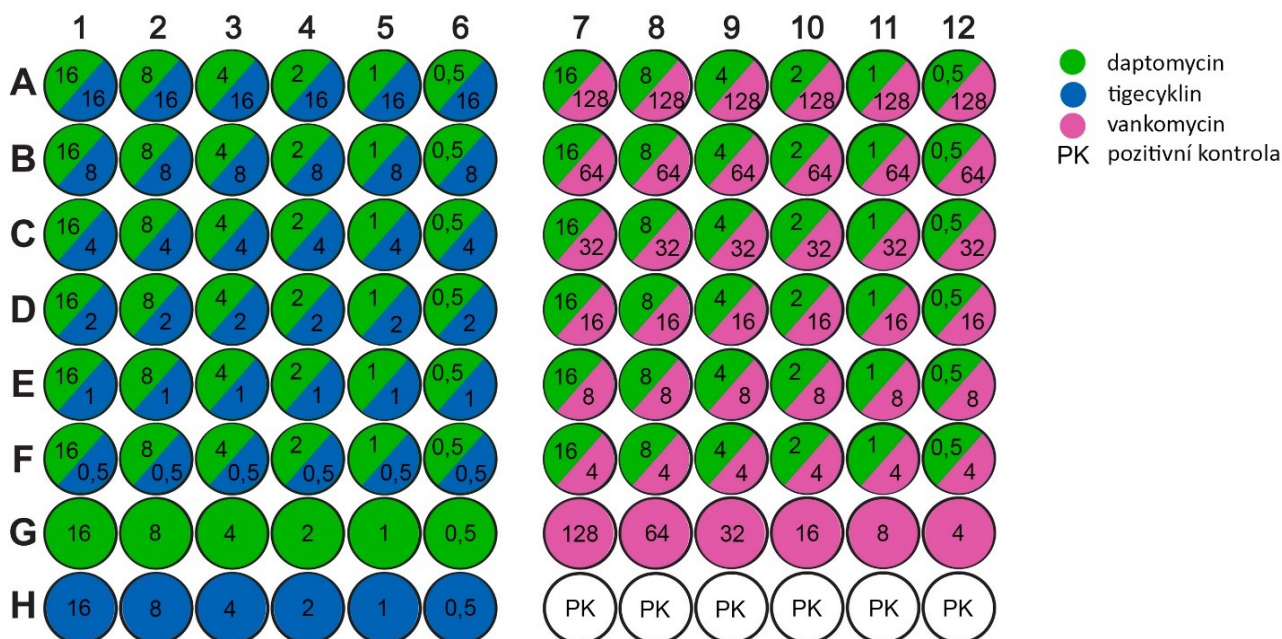
**Obr. 15** Schéma mikrotitrační destičky s kombinací antibiotik, daptomycinu, tigecyclinu a vankomycinu pro testování antibakteriální aktivity vůči kmenu *Enterococcus faecalis* ATCC 29212.

Volené antibiotikum bylo pipetováno po 100  $\mu$ l na jamku. Daptomycin byl pipetován od nejvyšší koncentrace v rámci sloupců, tigecyclin a vankomycin v sestupné koncentraci v rámci řádků. V předposledním a posledním řádku byla pipetována samotná antibiotika a pozitivní kontrola (bakterie v médiu neexponované antibiotiky). Čísla v jednotlivých jamkách označují pipetovanou koncentraci v mg/L daného antibiotika.



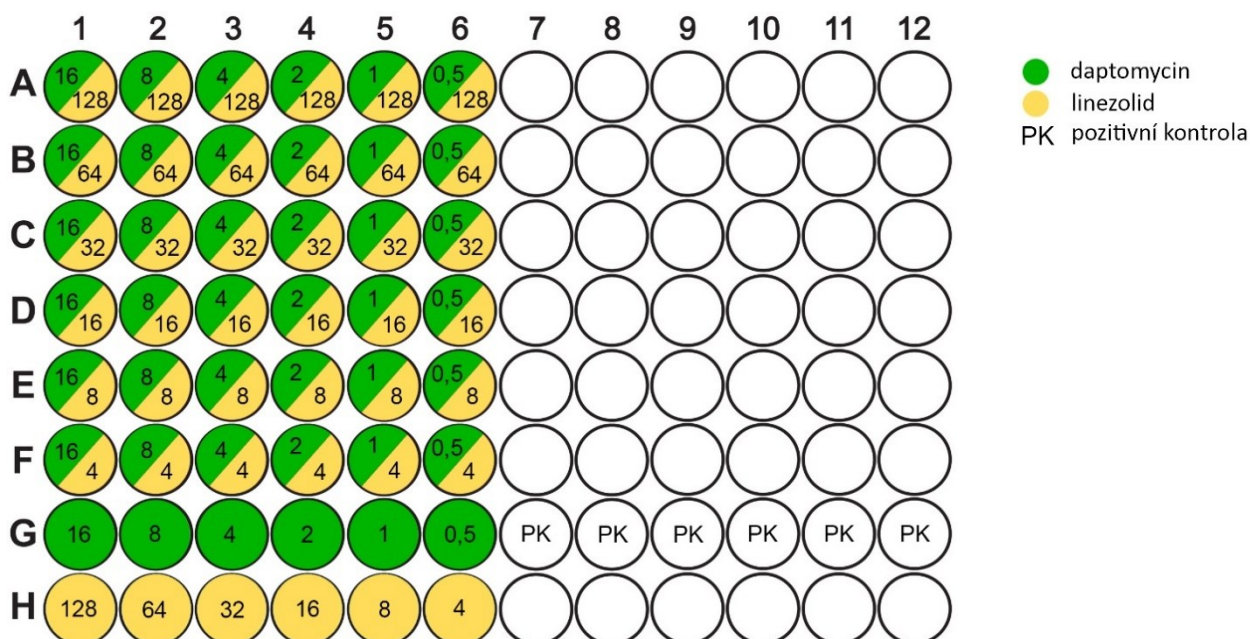
**Obr. 16** Schéma mikrotitrační destičky s kombinací antibiotik, daptomycinu a linezolidu pro testování antibakteriální aktivity vůči kmenu *Enterococcus faecalis* ATCC 29212.

Volené antibiotikum bylo pipetováno po 100  $\mu$ l na jamku. Daptomycin byl pipetován od nejvyšší koncentrace v rámci sloupců, linezolid v sestupné koncentraci v rámci řádků. V předposledním a posledním řádku byla pipetována samotná antibiotika a pozitivní kontrola (bakterie v médiu neexponované antibiotiky). Čísla v jednotlivých jamkách označují pipetovanou koncentraci v mg/L daného antibiotika.



**Obr. 17** Schéma mikrotitrační destičky s kombinací antibiotik, daptomycinu, tigecyclinu a vankomycinu pro testování antibakteriální aktivity vůči klinickému izolátu bakterie *Enterococcus faecium*.

Volené antibiotikum bylo pipetováno po 100 µl na jamku. Daptomycin byl pipetován od nejvyšší koncentrace v rámci sloupců, tigecyclin a vankomycin v sestupné koncentraci v rámci řádků. V předposledním a posledním řádku byla pipetována samotná antibiotika a pozitivní kontrola (bakterie v médiu neexponované antibiotiky). Čísla v jednotlivých jamkách označují pipetovanou koncentraci v mg/L daného antibiotika.



**Obr. 18** Schéma mikrotitrační destičky s kombinací antibiotik, daptomycinu a linezolidu pro testování antibakteriální aktivity vůči klinickému izolátu bakterie *Enterococcus faecium*.

Volené antibiotikum bylo pipetováno po 100 µl na jamku. Daptomycin byl pipetován od nejvyšší koncentrace v rámci sloupců, linezolid v sestupné koncentraci v rámci řádků. V předposledním a posledním řádku byla pipetována samotná antibiotika a pozitivní kontrola (bakterie v médiu neexponované antibiotiky). Čísla v jednotlivých jamkách označují pipetovanou koncentraci v mg/L daného antibiotika.



## 4.4 Výsledky

### 4.4.1 Stanovení minimální inhibiční koncentrace vybraných antibiotik vůči dvěma vybraným kmenům bakterií rodu *Enterococcus*

V rámci pilotních experimentů byly testovány různé kombinace vybraných antibiotik (DAP, TIG, VAN, LIN) vůči dvěma antibakteriálním kmenům rodu *Enterococcus* (klinický izolát *E. faecium* a kmen ATCC 29212 *E. faecalis*). V první fázi byla metodou mikrodiluční bujónové techniky stanovena MIC všech vybraných antibiotik vůči vybraným kmenům enterokoků.

**Tab. 3** Určení hodnoty minimální inhibiční koncentrace pro vybraná antibiotika vůči dvěma vybraným kmenům bakterie rodu *Enterococcus*.

Odečet byl prováděn vizuálně a rovněž spektrofotometricky při vlnové délce 530 nm.

vybrané antibiotikum	doba inkubace	MIC u druhů bakterie z rodu <i>Enterococcus</i>	
		<i>Enterococcus faecalis</i> (ATCC 29212)	<i>Enterococcus faecium</i> (klinický izolát)
DAP	24 hod	8 mg/L	4 mg/L
	48 hod	8 mg/L	8 mg/L
LIN	24 hod	2–4 mg/L	64 mg/L
	48 hod	2–4 mg/L	≥ 64 mg/L
VAN	24 hod	8 mg/L	64 mg/L
	48 hod	8 mg/L	64 mg/L
TIG	24 hod	0,5 mg/L	8 mg/L
	48 hod	1 mg/L	≥ 8 mg/L

Legenda: **DAP** – daptomycin, **LIN** – linezolid, **VAN** – vankomycin, **TIG** – tigecyklin, **ATCC** – American Type Culture Collection (kódové označení pro kmen pocházející ze sbírky neziskové organizace ATCC), **MIC** – minimální inhibiční koncentrace.

Příslušné hodnoty MIC byly využity pro přibližné určení hodnot nejvyšších koncentrací antibiotik ve studovaných kombinacích pro daný kmen.

**Tab. 4** Hodnoty minimální inhibiční koncentrace stanovené mikrodiluční bujónovou technikou, uvedené v podkladech European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) pro referenční kmen *Enterococcus faecalis* ATCC 29212. [81]

Dle doporučení EUCAST se odečet provádí po 16–20hodinové inkubaci.

kmen/ATB	DAP (mg/L)	TIG (mg/L)	VAN (mg/L)	LIN (mg/L)
<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	neuvedeno	0,03–0,125	1-4	1-4

Legenda: **ATB** – antibiotikum, **DAP** – daptomycin, **TIG** – tigecyklin, **VAN** – vankomycin, **LIN** – linezolid, **ATCC** – American Type Culture Collection (kódové označení pro kmen pocházející ze sbírky neziskové organizace ATCC). Hodnoty uvedeny v jednotkách mg/L.

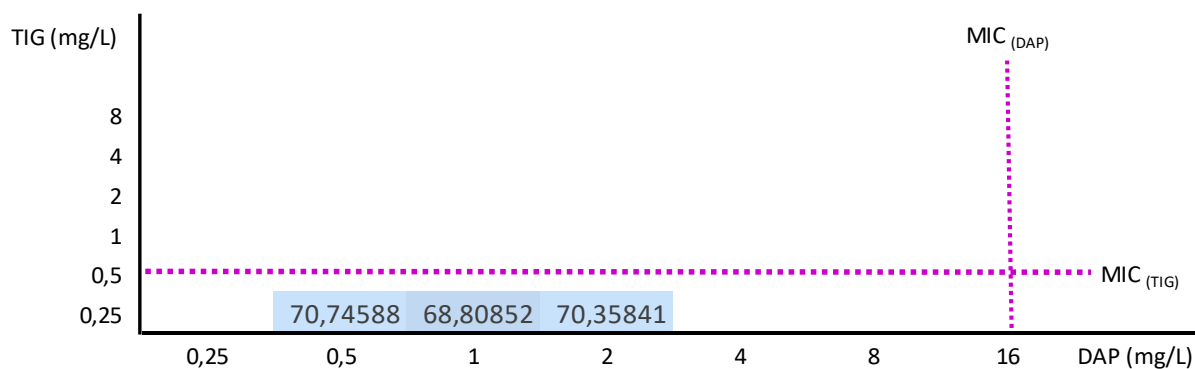
V rámci naší metodiky bylo využito metody mikrodiluční bujónové techniky, která vycházela z doporučení EUCAST. V naší metodice byly zařazeny mírné modifikace, například odečet po 24 hodinách. Jak je zjevné, po porovnání výsledků v Tab. 3 a Tab. 4, námi stanovená hodnota MIC pro TIG byla posunuta o dvě ředění (posun o dvě jamky). Podobně tomu bylo u VAN. U LIN byla stanovena MIC odpovídající koncentračnímu rozmezí uvedenému v dokumentaci EUCAST.

#### 4.4.2 Studium vlivu kombinace volených antibiotik na antibakteriální aktivitu vůči dvěma vybraným kmenům

##### 4.4.2.1 Studium antibakteriální aktivity daptomycinu a tigecyklinu v kombinaci vůči

##### *Enterococcus faecalis* ATCC 29212

Do destičky byl pipetován DAP a TIG o koncentracích dle schématu Obr. 15. Inkubace probíhala po dobu 24 až 48 hodin. Po 24hodinové inkubaci MIC samotného TIG odpovídala koncentraci,  $MIC_{TIG} \geq 0,5$  mg/L.  $MIC_{DAP}$  odpovídala koncentraci 16 mg/L (viz. Tab. 3). Pro hodnocení výsledků pomocí „heat“ mapy se pracovalo  $MIC_{TIG} = 0,5$  mg/L a  $MIC_{DAP} = 16$  mg/L (viz Graf. 1). Optická denzita byla odečtena po 24hodinové inkubaci pomocí multidetekčního readeru při vlnové délce 530 nm. V jamkách, kde byl detekován zákal (nárůst bakteriální masy) byla propočtena míra (procento) inhibice ve srovnání s nárůstem optické denzity pozitivní kontroly (jamky pozitivních kontrol byly v každém experimentu zařazeny v hexaplikátu – viz Obr. 15, Obr. 16, Obr. 17, Obr. 18).



**Graf. 1** „Heat“ mapa. Grafické znázornění antibakteriální aktivity daptomycinu (DAP) a tigecyclinu (TIG) v kombinaci vůči bakterii *Enterococcus faecalis* ATCC 29212.

Expozice bakteriálního kmene probíhala při teplotě 37 °C po dobu 24 hodin. Číselné hodnoty znázorňují procento inhibice růstu ve srovnání s pozitivní kontrolou (bakterie neexponované antibiotiky). Přerušovaná čára znázorňuje hodnotu minimální inhibiční koncentrace (MIC) pro samotná antibiotika,  $MIC_{DAP} = 16$  mg/L a  $MIC_{TIG} = 0,5$  mg/L. Pole bez číselných hodnot odpovídají koncentracím, při kterých nebyl zaznamenán bakteriální nárůst.

Pro klasifikaci vzájemné interakce dvou antimikrobiálních látek byl použit FIC index (viz. kapitola 3.4.5). FIC index byl hodnocen pouze u těch kombinací, kde byla zaznamenána inhibice bakteriálního růstu.

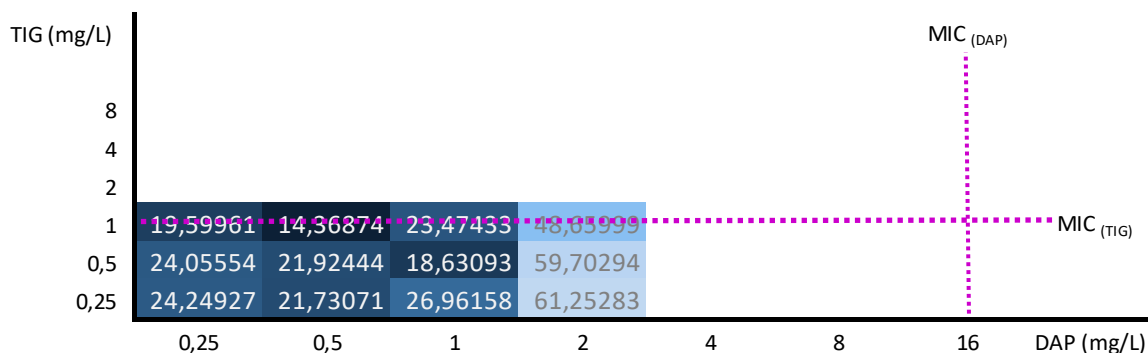
**Tab. 5** Hodnocení kombinovaného účinku látek daptomycinu a tigecyclinu vůči kmenu *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 pomocí výpočtu indexu frakční inhibiční koncentrace.

Účinek byl hodnocen po 24hodinové inkubaci.

MIC (TIG : DAP) mg/L	$\sum FIC = FIC (A) + FIC (B)$	Hodnocení
0,5 : 0,5	1,03125	indiference
0,5 : 1	1,0625	indiference
0,5 : 2	1,125	indiference
0,25 : 4	0,75	aditivita
0,25 : 0,25	0,515625	aditivita

Legenda: **MIC** – minimální inhibiční koncentrace, **TIG** – tigecyclin, **DAP** – daptomycin, **FIC** – frakční inhibiční koncentrace, **MIC (TIG : DAP) mg/L** – poměr minimální inhibiční koncentrace tigecyclinu a daptomycinu vyjádřena v jednotkách mg/L.

Po 48hodinové inkubaci odpovídala  $MIC_{TIG}$  koncentraci 1 mg/L a  $MIC_{DAP}$  hodnotě 16 mg/L. Nárůst bakteriálního kmene byl zaznamenán v dalších dvanácti jamkách (viz. Graf. 2).



**Graf. 2** „Heat“ mapa. Grafické znázornění antibakteriální aktivity daptomycinu (DAP) a tigeicyklinu (TIG) v kombinaci vůči bakterii *Enterococcus faecalis* ATCC 29212.

Expozice bakteriálního kmene probíhala při teplotě 37 °C po dobu 48 hodin. Číselné hodnoty znázorňují procento inhibice růstu ve srovnání s pozitivní kontrolou. Nejtmaší modrá barva představuje nejmenší procento inhibice růstu daného bakteriálního kmene až po nejsvětější modrou barvu, která znázorňuje největším procentuální inhibici bakteriálního růstu. Přerušovaná čára znázorňuje hodnotu minimální inhibiční koncentrace (MIC) pro samotná antibiotika,  $MIC_{DAP} = 16$  mg/L a  $MIC_{TIG} = 1$  mg/L. Pole bez číselných hodnot odpovídají koncentracím, při kterých nebyl zaznamenán bakteriální nárůst.

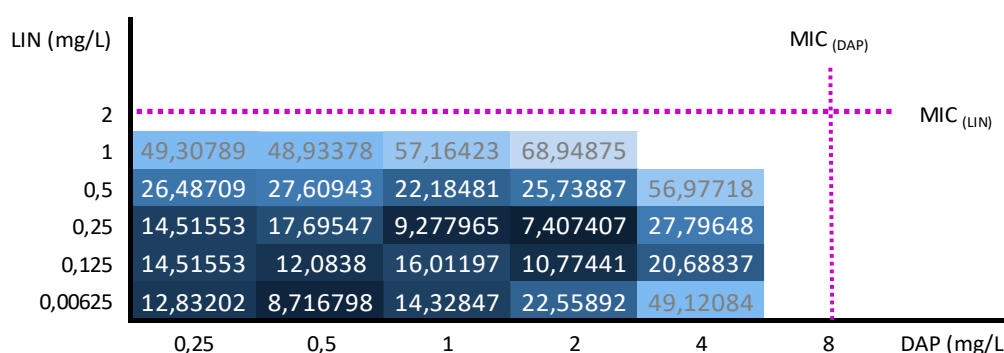
Jak je patrné z Graf. 1, kombinace TIG a DAP, v poměru cílových koncentrací 0,25 : 4 (mg/L), u které byla prokázána aditivita, byla schopna po celkových 48 hodinách inkubace udržet míru aktivity takovou, která zabránila bakteriálnímu růstu. Na základě zkušeností pracoviště z výzkumu orientujícího se na studium nových kandidátních antiinfektiv a jejich antimikrobní aktivity, lze s největší pravděpodobností uvést, že v dané jamce došlo vlivem kombinace volených antibiotik s daným koncentračním poměrem k cidní aktivitě. Cidní aktivita je zaznamenána tehdy, pokud nedochází k posunu hodnoty MIC po prodloužené inkubaci (tj. není rozdíl hodnot MIC odečteného po 24 a 48 hodinách), případně může docházet k posunu jen o jednu jamku (o jedno ředění výše). Hodnota poměru koncentrací antibiotik v kombinaci pak odpovídá hodnotě MBC.

U ostatních kombinací, u kterých byla vyhodnocena po 24hodinové inkubaci indiferentní interakce (viz. Tab. 5) k udržení výrazné aktivity, bez detekce nárůstu pouhým okem, již nedošlo. DAP je deklarován jako baktericidní antibiotikum. U tohoto antibiotika nebyl po prodloužené inkubaci zaznamenán posun v hodnotě MIC. U TIG je deklarován bakteriostatický účinek na stafylokoky. V našem případě došlo po prodloužené inkubaci k posunu MIC z hodnoty 0,5 mg/L na hodnotu 1 mg/L.



#### 4.4.2.2 Studium antibakteriální aktivity daptomycinu a linezolidu v kombinaci vůči *Enterococcus faecalis* ATCC 29212

Dle schématu Obr. 16 byl v různých koncentracích do mikrotitrační destičky pipetován DAP a LIN. Inkubace probíhala opět po dobu 24 až 48 hodin. Po prvních 24 hodinách MIC samotného LIN byla  $MIC_{LIN} = 2\text{--}4\text{ mg/L}$ , pro  $MIC_{DAP}$  odpovídala hodnota koncentraci 8 mg/L (viz. Tab. 3). Pro hodnocení výsledků „heat“ mapy se v případě LIN pracovalo s koncentrací 2 mg/L (viz. Graf. 3). V tomto případě vyšla hodnota  $MIC_{LIN} = 2\text{ mg/L}$  a  $MIC_{DAP} = 8\text{ mg/L}$ . Výsledky vzájemné interakce DAP a LIN po 24hodinové inkubaci jsou znázorněny v Tab. 6.



**Graf. 3** „Heat“ mapa. Grafické znázornění antibakteriální aktivity daptomycinu (DAP) a linezolidu (LIN) v kombinaci vůči bakterii *Enterococcus faecalis* ATCC 29212.

Expozice bakteriálního kmene probíhala při teplotě 37 °C po dobu 24 hodin. Číselné hodnoty znázorňují procento inhibice růstu ve srovnání s pozitivní kontrolou. Nejtmavší modrá barva představuje nejmenší procento inhibice růstu daného bakteriálního kmene až po nejsvětlejší modrou barvu, která znázorňuje největším procentuální inhibici bakteriálního růstu. Přerušovaná čára znázorňuje hodnotu minimální inhibiční koncentrace (MIC) pro samotná antibiotika,  $MIC_{DAP} = 8\text{ mg/L}$  a  $MIC_{LIN} = 2\text{ mg/L}$ . Pole bez číselných hodnot odpovídají koncentracím, při kterých nebyl zaznamenán bakteriální nárůst.

Pro zhodnocení vzájemného působení LIN a DAP v kombinaci byl použit FIC index.

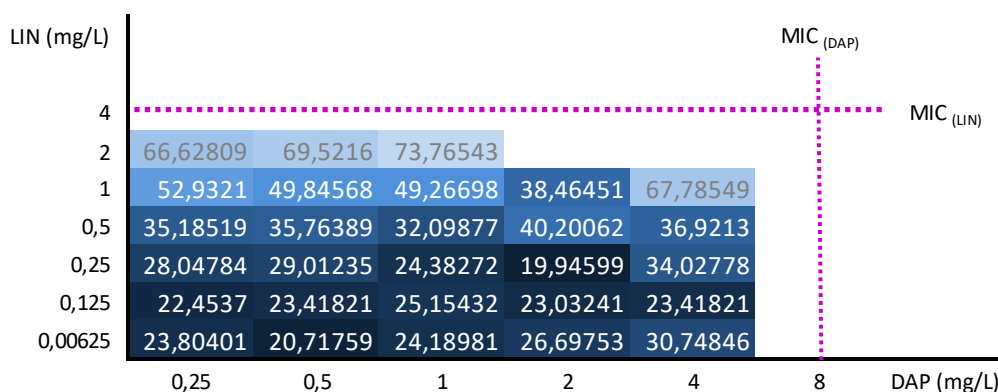
**Tab. 6** Hodnocení kombinovaného účinku daptomycinu a linezolidu vůči kmenu *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 pomocí výpočtu indexu frakční inhibiční koncentrace.

Účinek byl hodnocen po 24hodinové inkubaci.

MIC (LIN : DAP) mg/L	$\Sigma FIC = FIC (A) + FIC (B)$	Hodnocení
2 : 0,25	1,03125	indiference
2 : 0,5	1,0625	indiference
2 : 1	1,125	indiference
2 : 2	1,25	indiference
1 : 4	1	aditivita
0,5 : 8	1,25	indiference
0,25 : 8	1,125	indiference
0,125 : 8	1,0625	indiference
0,0625 : 8	1,03125	indiference

Legenda: MIC – minimální inhibiční koncentrace, LIN – linezolid, DAP – daptomycin, FIC – frakční inhibiční koncentrace, MIC (LIN : DAP) mg/L – poměr minimální inhibiční koncentrace linezolidu a daptomycinu vyjádřena v jednotkách mg/L.

LIN působí na enterokoky bakteriostaticky. [82] Po celkové 48hodinové inkubaci došlo k nárůstu hodnoty MIC<sub>LIN</sub> na hodnotu 4 mg/L, u DAP hodnota MIC zůstala na 8 mg/L (Graf. 4).



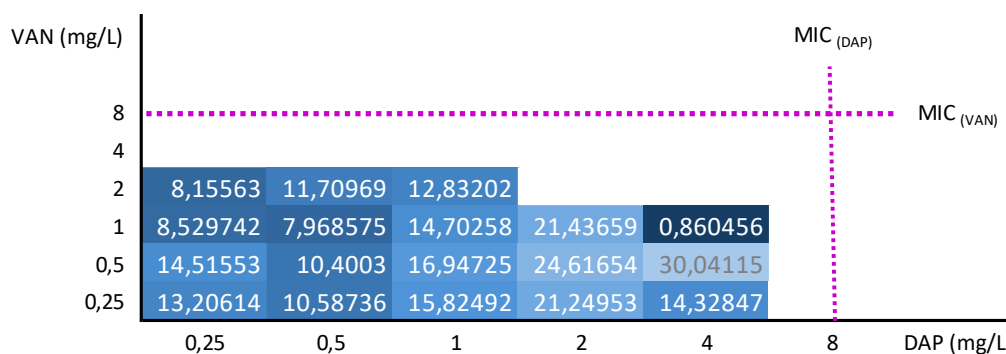
**Graf. 4** „Heat“ mapa. Grafické znázornění antibakteriální aktivity daptomycinu (DAP) a linezolidu (LIN) v kombinaci vůči bakterii *Enterococcus faecalis* ATCC 29212.

Expozice bakteriálního kmene probíhala při teplotě 37 °C po dobu 48 hodin. Číselné hodnoty znázorňují procento inhibice růstu ve srovnání s pozitivní kontrolou. Nejtmaší modrá barva představuje nejmenší procento inhibice růstu daného bakteriálního kmene až po nejsvětější modrou barvu, která znázorňuje největším procentuální inhibici bakteriálního růstu. Přerušovaná čára znázorňuje hodnotu minimální inhibiční koncentrace (MIC) pro samotná antibiotika, MIC<sub>DAP</sub> = 8 mg/L a MIC<sub>LIN</sub> = 4 mg/L. Pole bez číselných hodnot odpovídají koncentracím, při kterých nebyl zaznamenán bakteriální nárůst.

Při srovnání grafu „heat“ mapy po 24 (viz. Graf. 3) a po 48 hodinách (viz. Graf. 4) jsou vidět určité změny. Po 24 hodinách byl zaznamenán aditivní účinek u kombinace LIN a DAP v poměru cílových koncentrací 1 : 4 (mg/L). Při tomto koncentračním poměru došlo po celkových 48 hodinách k nárůstu, tj. nebyla udržena inhibice bakteriálního růstu.

#### 4.4.2.3 Studium antibakteriální aktivity daptomycinu a vankomycinu v kombinaci vůči *Enterococcus faecalis* ATCC 29212

Do destičky byl pipetován DAP a VAN o určitých koncentracích dle schématu Obr. 15. Inkubace probíhala 24 až 48 hodin. Po 24hodinové inkubaci odpovídala samotná MIC<sub>VAN</sub> koncentraci 8 mg/L, a MIC<sub>DAP</sub> byla rovna 8 mg/L. Je zjevné, že DAP přispěl k účinnosti VAN (MIC<sub>VAN</sub> v kombinace s DAP je minimálně na ½ koncentrace VAN působícího samostatně).



**Graf. 5** „Heat“ mapa. Grafické znázornění antibakteriální aktivity daptomycinu (DAP) a vankomycinu (VAN) v kombinaci vůči bakterii *Enterococcus faecalis* ATCC 29212.

Expozice bakteriálního kmene probíhala při teplotě 37 °C po dobu 24 hodin. Číselné hodnoty znázorňují procento inhibice růstu ve srovnání s pozitivní kontrolou. Nejtmaší modrá barva představuje nejmenší procento inhibice růstu daného bakteriálního kmene až po nejsvětější modrou barvu, která znázorňuje největší procentuální inhibici bakteriálního růstu. Přerušovaná čára znázorňuje hodnotu minimální inhibiční koncentrace (MIC) pro samotná antibiotika MIC<sub>DAP</sub> = 8 mg/L a MIC<sub>VAN</sub> = 8 mg/L. Pole bez číselných hodnot odpovídají koncentracím, při kterých nebyl zaznamenán bakteriální nárůst.

Pro zhodnocení vzájemného působení VAN a DAP v kombinaci byl použit FIC index.

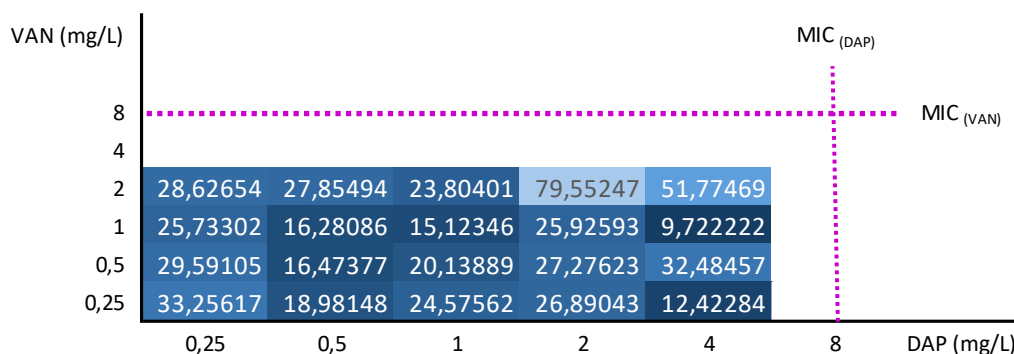
**Tab. 7** Hodnocení kombinovaného účinku daptomycinu a linezolidu vůči kmenu *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 pomocí výpočtu indexu frakční inhibiční koncentrace.

Účinek byl hodnocen po 24hodinové inkubaci.

MIC (VAN : DAP) mg/L	$\Sigma$ FIC = FIC (A) + FIC (B)	Hodnocení
4 : 0,25	0,53125	aditivita
4 : 0,5	0,5625	aditivita
4 : 1	0,625	aditivita
2 : 2	0,5	aditivita
2 : 4	0,75	aditivita
1 : 8	1,125	indiference
0,5 : 8	1,0625	indiference
0,25 : 8	1,03125	indiference

Legenda: **MIC** – minimální inhibiční koncentrace, **VAN** – vankomycin, **DAP** – daptomycin, **FIC** – frakční inhibiční koncentrace, **MIC (VAN : DAP) mg/L** – poměr minimální inhibiční koncentrace vankomycinu a daptomycinu vyjádřena v jednotkách mg/L.

Jak je patrné z Graf. 5 po 24hodinové inkubaci bylo zaznamenáno aditivní působení u kombinace VAN a DAP hned v několika poměrech cílových koncentrací, 4 : 0,25 (mg/L); 4 : 0,5 (mg/L); 4 : 1 (mg/L); 2 : 2 (mg/L) a 2 : 4 (mg/L). Po celkových 48 hodinách byla (viz Graf. 6) v poměrech u koncentrací 4 : 0,25 (mg/L); 4 : 0,5 (mg/L); 4 : 1 (mg/l); 4 : 2 (mg/L) a 4 : 4 (mg/L) zaznamenána inhibice růstu bakterií. U zbylých koncentračních poměrů byl po 48hodinové zaznamenán nárůst bakterií.



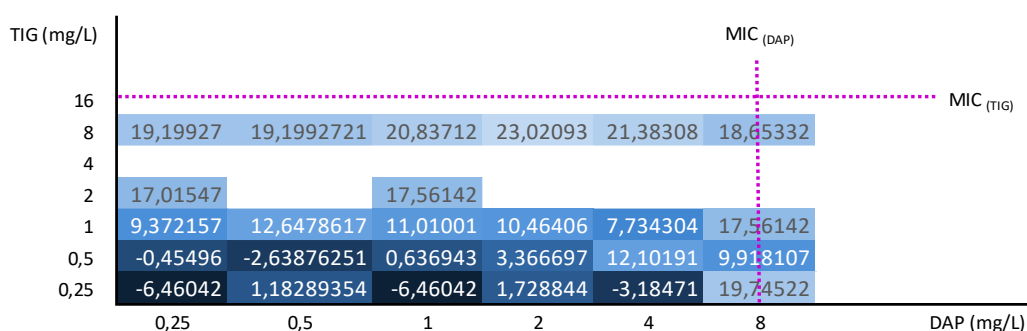
**Graf. 6** „Heat“ mapa. Grafické znázornění antibakteriální aktivity daptomycinu (DAP) a vankomycinu (VAN) v kombinaci vůči bakterii *Enterococcus faecalis* ATCC 29212.

Expozice bakteriálního kmene probíhala při teplotě 37 °C po dobu 48 hodin. Číselné hodnoty znázorňují procento inhibice růstu ve srovnání s pozitivní kontrolou. Nejtmaší modrá barva představuje nejmenší procento inhibice růstu daného bakteriálního kmene až po nejsvětější modrou barvu, která znázorňuje největší procentuální inhibici bakteriálního růstu. Přerušovaná čára znázorňuje hodnotu minimální inhibiční koncentrace (MIC) pro samotná antibiotika  $MIC_{DAP} = 8$  mg/L a  $MIC_{VAN} = 8$  mg/L. Pole bez číselných hodnot odpovídají koncentracím, při kterých nebyl zaznamenán bakteriální nárůst.

VAN podobně jako DAP vykazuje na enterokoky baktericidní účinek. [82] Účinek VAN byl potencován DAP i po 48 hodinách, tj. byla udržena inhibice bakteriálního růstu, s výjimkou poměrů VAN : DAP, 2 : 2 a 2 : 4 (mg/L).

#### 4.4.2.4 Studium antibakteriální aktivity daptomycinu a tigecyklinu v kombinaci vůči klinickému izolátu *Enterococcus faecium*

DAP a TIG byl pipetován dle schématu (viz. Obr. 17). Inkubace probíhala po dobu 24 hodin. Následně byly odečteny hodnoty MIC, kdy hodnota MIC<sub>DAP</sub> odpovídala  $\geq 8$  mg/L a MIC<sub>TIG</sub>  $\geq 16$  mg/L (viz. Graf. 7). MIC<sub>DAP</sub> stanovená v rámci toho experimentu neodpovídala MIC<sub>DAP</sub> stanovené v rámci kapitoly 4.2, tj. 4 mg/L. Podobně tomu bylo i u samotného TIG, pro které byla v rámci předchozího experimentu zaznamenána MIC<sub>TIG</sub> = 8 mg/L.



**Graf. 7** „Heat“ mapa. Grafické znázornění antibakteriální aktivity daptomycinu (DAP) a tigecyklinu (TIG) v kombinaci vůči klinickému izolátu bakterie *Enterococcus faecium*.

Expozice bakteriálního kmene probíhala při teplotě 37 °C po dobu 24 hodin. Číselné hodnoty znázorňují procento inhibice růstu ve srovnání s pozitivní kontrolou. Nejtmavší modrá barva představuje nejmenší procento inhibice růstu daného bakteriálního kmene až po nejsvětlejší modrou barvu, která znázorňuje největší procentuální inhibici bakteriálního růstu. Přerušovaná čára znázorňuje hodnotu minimální inhibiční koncentrace (MIC) pro samotná antibiotika MIC<sub>DAP</sub> > 8 mg/L a MIC<sub>TIG</sub> > 16 mg/L. Pole bez číselných hodnot odpovídají koncentracím, při kterých nebyl zaznamenán bakteriální nárůst.

FIC index nebyl hodnocen. Inhibice růstu při vizuálním hodnocení a také při spektrofotometrickém hodnocení byla zaznamenána v jamkách, kde cílová koncentrace TIG v kombinacích odpovídala 4 mg/L a v některých jamkách, kde cílová koncentrace TIG odpovídala 2 mg/L. Pomocí metabolického indikátoru Alamar Blue byla vyšší míra inhibice metabolické aktivity vůči pozitivní kontrole zaznamenána pouze pro kombinace TIG : DAP v koncentracích odpovídajících poměru 4 : 8 (mg/L), 4 : 2 (mg/L), 4 : 1 (mg/L), 4 : 0,5 (mg/L) a 4 : 0,25 (mg/L) (viz. Obr. 20). Pro potvrzení těchto výsledků je více než žádoucí daný experiment opakovat. Hodnocení výsledků po 48 hodinách inkubace klinického izolátu exponovaného vybranými antibiotiky v kombinacích nebylo provedeno. Růst bakterií nebyl tak jednoznačný jako u referenčního kmene *E. faecalis* ATCC 29212, ačkoli se pracovalo s kulturou přibližně 16 až 20 hodin starou. Odečet vizuální a spektrofotometrický bylo nutné po 24hodinové inkubaci potvrdit i dalším přístupem, proto byla volena metoda určení metabolické aktivity indikátorem AB.

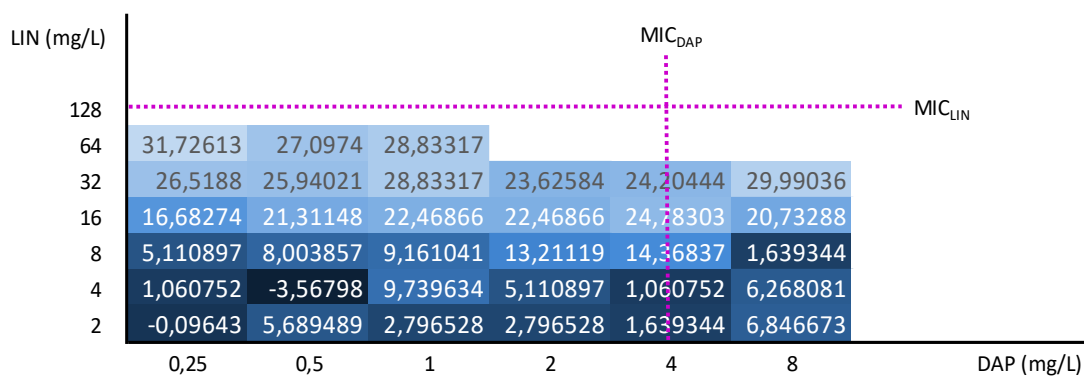
mg/L	tigecyklin/daptomycin					
	8	4	2	1	0,5	0,25
8	8,732394	27,46881	21,77062	21,96378	18,77666	16,84507
4	80,49095	65,85915	88,31388	88,16901	85,51308	88,41046
2	-12,3219	25,77867	17,76258	6,607646	15,05835	-15,5091
1	-9,13481	8,249497	-1,6499	-1,21529	5,8833	5,158954
0,5	-0,15292	13,94769	15,44467	16,55533	15,87928	11,67807
0,25	-4,49899	19,5493	20,32193	23,41247	10,76056	17,95573

**Obr. 20** Hodnocení kombinace tigecyklinu a daptomycinu pomocí barviva Alamar Blue.

Expozice bakteriálního kmene probíhala při teplotě 37 °C po dobu 24 hodin. Číselné hodnoty vyjadřují procentuální zastoupení inhibice bakteriálního růstu v jednotlivých jamkách. Barevně vyznačená čísla označují jamky a představují procentuální vyjádření inhibice metabolické aktivity vůči pozitivní kontrole, ve kterých nebyl bakteriální růst vlivem kombinace daptomycinu a tigecyklinu evidován. Tigecyklin a daptomycin v koncentračním rozmezí 8–0,25 mg/L.

#### 4.4.2.5 Studium antibakteriální aktivity daptomycinu a linezolidu v kombinaci vůči klinickému izolátu *Enterococcus faecium*

LIN a DAP byl pipetován dle schématu (viz. Obr. 18). Inkubace probíhala po dobu 24 hodin. Následně byly odečteny hodnoty MIC pro samotná antibiotika, kdy hodnota MIC<sub>DAP</sub> odpovídala 4 mg/L a MIC<sub>LIN</sub> = 128 mg/L (viz. Graf. 8).



**Graf. 8** „Heat“ mapa. Grafické znázornění antibakteriální aktivity daptomycinu (DAP) a linezolidu (LIN) v kombinaci vůči klinickému izolátu bakterie *Enterococcus faecium*.

Expozice bakteriálního kmene probíhala při teplotě 37 °C po dobu 24 hodin. Číselné hodnoty znázorňují procento inhibice růstu ve srovnání s pozitivní kontrolou. Nejtmaší modrá barva představuje nejmenší procento inhibice růstu daného bakteriálního kmene až po nejsvětější modrou barvu, která znázorňuje největší procentuální inhibici bakteriálního růstu. Přerušovaná čára znázorňuje hodnotu minimální inhibiční koncentrace (MIC) pro samotná antibiotika MIC<sub>DAP</sub> = 4 mg/L a MIC<sub>LIN</sub> = 128 mg/L. Pole bez číselných hodnot odpovídají koncentracím, při kterých nebyl zaznamenán bakteriální nárůst.

Inhibice růstu byla zaznamenána u kombinace LIN v cílové koncentraci 64 mg/L s DAP o cílových koncentracích 8, 4 a 2 mg/L. Ovšem pomocí indikátoru AB byla potvrzena vyšší míra inhibice metabolické aktivity pro všechny kombinace DAP a LIN, kde cílová koncentrace LIN činila 64 mg/L (viz. Obr. 21).

mg/L	linezolid/daptomycin					
	8	4	2	1	0,5	0,25
64	81,51659	85,48578	84,6564	85,95972	84,59716	85,54502
32	21,4455	51,36256	49,34834	50,35545	53,67299	61,0782
16	-13,3294	7,819905	-1,24408	-8,17536	-18,8981	-2,90284
8	-28,9692	-7,99763	-13,9218	-10,6043	-11,1967	1,658768
4	4,324645	3,554502	-20,7346	-17,0616	-36,9076	-15,8768
2	18,8981	13,9218	3,850711	0,473934	-15,2251	-9,24171

**Obr. 21** Hodnocení kombinace linezolidu a daptomycinu pomocí barviva Alamar Blue.

Expozice bakteriálního kmene probíhala při teplotě 37 °C po dobu 24 hodin. Číselné hodnoty vyjadřují procentuální inhibici bakteriálního růstu v jednotlivých jamkách. Barevně vyznačená čísla označují jamky a představují procentuální vyjádření inhibice metabolické aktivity vůči pozitivní kontrole, ve kterých nebyl zaznamenán bakteriální růst vlivem kombinace linezolidu a daptomycinu potvrzen pomocí barviva Alamar Blue. Linezolid byl v koncentračním rozmezí 64–2 mg/L, daptomycin 8–0,25 mg/L.

V tomto případě je stanovení FIC na místě. Pro kombinaci LIN : DAP v koncentračním poměru 64 : 2 (mg/L) byl prokázán aditivní účinek. U zbylých koncentračních poměrů zůstalo indiferentní působení (viz. Tab. 8).

**Tab. 8** Hodnocení kombinovaného účinku daptomycinu a linezolidu vůči klinickému izolátu bakterie *Enterococcus faecium* pomocí výpočtu indexu frakční inhibiční koncentrace.

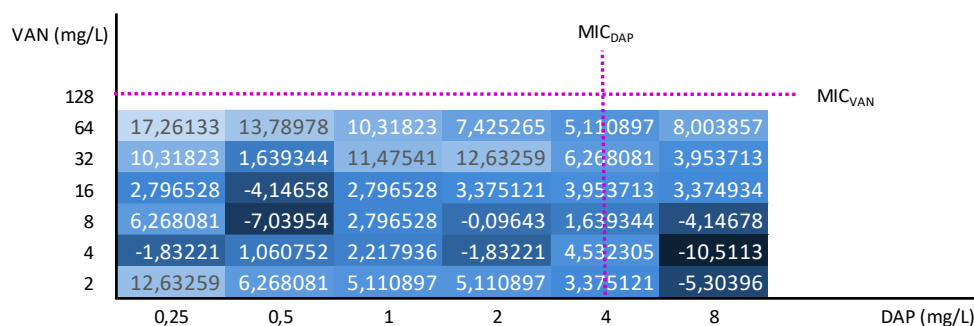
Účinek byl hodnocen po 24hodinové inkubaci.

MIC (LIN : DAP) mg/L	$\Sigma$ FIC = FIC (A) + FIC (B)	Hodnocení
64 : 8	2,5	indiference
64 : 4	1,5	indiference
64 : 2	1	aditivita

Legenda: MIC – minimální inhibiční koncentrace, LIN – linezolid, DAP – daptomycin, FIC – frakční inhibiční koncentrace, MIC (LIN : DAP) mg/L – poměr minimální inhibiční koncentrace linezolidu a daptomycinu vyjádřena v jednotkách mg/L.

#### 4.4.2.6 Studium antibakteriální aktivity daptomycinu a vankomycinu v kombinaci vůči klinickému izolátu *Enterococcus faecium*

VAN a DAP byl pipetován dle schématu Obr. 17. Inkubace probíhala po dobu 24 hodin. Následně byly odečteny hodnoty MIC pro samotná antibiotika volená do kombinací, kdy hodnota MIC<sub>DAP</sub> odpovídala 4 mg/L a MIC<sub>VAN</sub> ≥ 128 mg/L (viz. Graf. 9). Míra antibakteriální aktivity je vyjádřena jako procento inhibice růstu ve srovnání s pozitivní kontrolou. V rámci všech volených kombinací nebyla při žádném koncentračním poměru zaznamenána inhibice bakteriálního růstu ani při odečtu pouhým okem, spektrofotometrickým měřením, ani při určení metabolické aktivity pomocí indikátoru AB.



**Graf. 9** „Heat“ mapa. Grafické znázornění antibakteriální aktivity daptomycinu (DAP) a vankomycinu (VAN) v kombinaci vůči klinickému izolátu bakterie *Enterococcus faecium*.

Expozice bakteriálního kmene probíhala při teplotě 37 °C po dobu 24 hodin. Číselné hodnoty znázorňují procento inhibice bakteriálního růstu ve srovnání s pozitivní kontrolou. Nejtmavší modrá barva představuje nejmenší procento inhibice růstu daného bakteriálního kmene až po nejsvětlejší modrou barvu, která znázorňuje největší procentuální inhibici bakteriálního růstu. Přerušovaná čára znázorňuje hodnotu minimální inhibiční koncentrace (MIC) pro samotná antibiotika MIC<sub>DAP</sub> = 4 mg/L a MIC<sub>VAN</sub> ≥ 128 mg/L.



## 5 Diskuse

Antibiotická rezistence představuje v dnešní době závažný celosvětový problém, jemuž je stále nutné věnovat větší pozornost. Problém se týká především rychlého nárůstu počtu rezistentních bakteriálních kmenů, zejména u ESKAPE patogenů, které WHO spolu s Centrem pro kontrolu a prevenci nemocí označila jako velkou hrozbu pro lidské zdraví. [83] Typičtí zástupci rodu *Enterococcus* způsobují celou řadu infekčních, obtížně léčitelných onemocnění, a to především kvůli jejich přibývajícím multirezistenci a virulenci. Virulentní faktory, kterými disponují enterokoky, výrazně napomáhají ke vzniku infekcí.

V rámci hledání nových terapeutických možností v léčbě infekcí vyvolaných rezistentními organismy existuje mnoho způsobů. Nový vývoj antibiotických látek představuje zdoluhavý a náročný proces. Léčiva musí projít preklinickým a klinickým hodnocením, což zpravidla trvá několik let. [84] Často proto je volen přístup potenciace antimikrobní účinnosti již existujících léčiv nebo se zkoumají léčiva, která byla přednostně vyvinuta pro naprosto odlišnou indikaci. U již dostupných léčiv jsou známy jejich farmakokinetické a farmakodynamické vlastnosti, což představuje výhodu, kvůli čemuž by mohly být rychleji využity pro případné nové léčebné možnosti. [85, 86] Jednu z alternativ představuje využití kombinační terapie. Často se jedná o kombinace více antibiotik se stejným nebo odlišným mechanismem účinku nebo o kombinace antibiotik s látkami jinými, které nemusí mít vlastní antibakteriální aktivitu nebo mohou mít jinou indikaci, a i přesto dokážou potencovat účinnost antibiotika.

Kromě výzkumu a zavádění nových potenciálních přístupů v léčbě a boji s rezistentními kmeny je zapotřebí omezení nevhodného užívání antibiotik v rámci zdravotní péče. Národní antibiotická politika určuje pravidla pro zodpovědné zacházení s antibiotiky, ale samotná realizace patří do rukou zdravotníků, kteří se podílejí na tom, jaká antibiotika budou předepsána. [87] Nadměrná preskripce a u některých jedinců i neschopnost řádně dodržovat pokyny k léčbě je mimo jiné také příčinou vzniku rezistence. Pacienti by se následně měli řídit pokyny zdravotníků a užívat antibiotika v předepsaných intervalech po stanovenou dobu. [88]

Výskyt a šíření enterokoků rezistentních na antibiotika první volby (ampicilin, aminoglykosidy a VAN), ztěžuje léčbu enterokokových infekcí a je více než žádoucí hledat nové alternativy. U relativně nových léčiv ze skupiny oxazolidinonů s prokázanou účinností na VRE nebo DAP se svým specifickým mechanismem účinku, jež se zdál velmi slibným, již také byla v rámci monoterapie zaznamenána u enterokoků rezistence. [89]

Hlavní myšlenkou této práce bylo zjistit antienterokokový účinek vybraných antibiotik v kombinaci v experimentálním režimu *in vitro*. Slibné kombinace by pak měly posloužit k navazujícím studiím, zaměřeným především na boj s enterokoky přítomnými v biofilmových společenstvích. V rámci experimentů byl studován vliv vzájemné interakce čtyř vybraných antibiotických léčiv v kombinaci vůči dvěma vybraným kmenům enterokoků, jmenovitě vůči sbírkovému kmenu *E. faecalis* ATCC 29212 a klinickému izolátu *E. faecium*. Enterokoky jsou řazeny k bakteriálním patogenům skupiny ESKAPE, u kterých je nezbytné se zaměřit na výzkum a vývoj nových léčiv. [90] Rozdíl mezi *E. faecalis* a *E. faecium* není jen ve virulenci, ale i v rezistenci, přičemž více rezistentní je klinický izolát *E. faecium*. [91]

Mezi vybraná antibiotika byl zařazen kvůli svému ojedinělému účinku DAP, který byl dán do kombinace s TIG, LIN a VAN. DAP má schopnost se navázat na cytoplazmatickou membránu grampozitivních bakterií bez toho, aniž by pronikl do jejich cytoplazmy. [54] Působí na bakterie v jakékoliv fázi jejího růstového cyklu, což může být využito u enterokokových infekcí spojených s biofilmem.

Pro vyhodnocení vzájemného působení vybraných antibakteriálních látek byly nejdříve pro jednotlivá antibiotika stanoveny hodnoty MIC. Určování hodnot MIC bylo provedeno pomocí mikrodiluční bujónové techniky, v souladu s doporučením k metodice organizace EUCAST. Byla vždy kombinována dvě antibiotika s různými cílovými koncentracemi. Poté byl hodnocen růst pouhým okem a pomocí spektrofotometrického měření byla dále vypočítána z naměřených dat míra inhibice růstu v pozorování s kontrolou (bakterie neexponované ATB). Pro zhodnocení kombinovaného účinku byly následně vypočítány FIC indexy. Šetření byly podrobeny následující kombinace: DAP + TIG, DAP + VAN, DAP + LIN, a to vůči oběma vybraným kmenům enterokoků.

Ani u jedné zvolené kombinace v případě obou kmenů nebyl prokázán synergní účinek. U *E. faecalis* ATCC 29212 bylo aditivní antibakteriální působení po 24hodinové inkubaci zaznamenáno pro DAP + TIG u dvou koncentračních poměrů DAP : TIG, 0,25 : 4 (mg/L) a 0,25 : 0,25 (mg/l). Po 48hodinové inkubaci byl tento inhibiční potenciál udržen pouze v koncentračním poměru 0,25 : 4 (mg/L). Dále byl zaznamenán aditivní účinek vůči referenčnímu kmenu u kombinace DAP + LIN odpovídající poměru DAP : LIN, 1 : 4 (mg/L). Inhibiční potenciál odpovídající nedetekovatelnému nárůstu enterokoků však poklesl po dalších 24 hodinách inkubace na pouhých 67 %. V ostatních koncentračních poměrech pro DAP a LIN, 2 : 0,25 (mg/L); 2 : 0,5 (mg/L) a 2 : 1 (mg/L), došlo po 48hodinové inkubaci k nárůstu bakterií. Nejslibnější kombinace vyšla pro DAP + VAN, kdy byl aditivní účinek vůči referenčnímu kmenu potvrzen v pěti různých koncentračních poměrech DAP : VAN, 0,25 : 4 (mg/l); 0,5 : 4 (mg/L); 1 : 4 (mg/L); 2 : 2 (mg/L) a 4 : 2 (mg/L), z čehož byla u koncentračních poměrů 0,25 : 4 (mg/L); 0,5 : 4 (mg/L); 1 : 4 (mg/L);

2 : 4 (mg/L) a 4 : 4 (mg/L) udržena aktivita vedoucí k nedetekovatelnému růstu i po 48 hodinové inkubaci.

Jelikož růst bakterií u klinického izolátu *E. faecium* nebyl tak výrazný a jednoznačný jako tomu bylo u referenčního kmene *E. faecalis* ATCC 29212, byla jako další způsob zhodnocení vzájemného antibakteriálního účinku dvou vybraných antibiotik v kombinaci volena metoda s využitím indikátoru Alamar Blue, která detekuje metabolicky aktivní bakterie. Metoda byla volena pro potvrzení vizuálního a spektrofotometrického hodnocení. Tento způsob vyhodnocování se ale ukázal oproti výsledkům ze spektrofotometrického měření nejednoznačný. U obou kombinací, kde bylo barvivo využito (DAP : TIG a DAP : LIN) se výsledky ani v jednom případě plně neshodovaly. V obou případech byly prokázány metabolicky aktivní bakterie v jamkách, kde detekci růstu pouhým okem a spektrofotometrickým měřením již zaznamenán růst nebyl. V tom případě se pro takovýto kmen nabízí vhodnější strategie pro šetření inhibičního potenciálu antibiotik v kombinacích, a tím je dynamická kultivace, např. přístrojem Bioscreen C. Nicméně, pokud by se nepřihlédlo k výsledkům z hodnocení metabolické aktivity, bylo by možné vyhodnotit aditivní účinek pro kombinaci DAP : LIN u klinického izolátu v koncentračním poměru 2 : 64 (mg/L). U kombinace DAP + VAN nebyla zaznamenána v žádném hodnoceném poměru ani aditivita či dokonce synergie.

Dle dostupných odborných informačních zdrojů jsou studie účinku kombinace DAP + LIN vůči *E. faecium* poměrně ojedinělé. [92] U studie z roku 2014 v rámci hodnocení dvojkombinace DAP + LIN byla popsána synergie *in vitro* (hodnoty FIC < 0,5) proti všem testovaným kmenům *E. faecalis* a proti některým testovaným kmenům *E. faecium*. MIC byly v této studii stanoveny podle doporučených postupů CLSI v mozkosrdcovém bujónu s menšími obměnami. Byl zde použit kmen *E. faecalis* ATCC 29212 jako kmen pro kontrolu kvality. Stanovení bylo provedeno pomocí „checkerboard“ metody a „time-kill“ testu. Přesný mechanismus synergie této kombinace není znám. [90] V jiné studii, zejména u *E. faecium*, byla popsána *in vivo* studie úspěšné terapie touto kombinací u meningitidy. [93] Mimo enterokoků byla u kombinace DAP a LIN prokázána v *in vitro* modelu biofilmu synergní a baktericidní aktivita vůči kmenu MRSA. [90, 92]

U kombinace DAP + TIG byla popsána *in vitro* synergie vůči dvěma klinickým izolátům *E. faecalis* a *E. faecium*. Zároveň je zde zmíněno i antagonistické působení vůči jiným izolátům těchto bakterií. Baktericidní aktivita byla hodnocena pomocí „time-kill“ testování. Hodnoty MIC<sub>DAP</sub> byly stanoveny pomocí E-testu na MHA suplementovaném 50 mg/l chloridem vápenatým. [93] Mimo jiné existují i případy, kde byla potvrzena účinnost této kombinace při léčbě endokarditidy u infekcí vyvolaných MDR *E. faecium*. [94–96]

U poslední testované kombinace DAP + VAN podle informačních zdrojů byl potvrzen synergní efekt *in vitro*. Do testování bylo zahrnuto třicet kmenů VRE, z čehož dvacet osm kmenů bylo identifikovaných jako VRE<sub>fm</sub> a zbylé dva jako VRE *E. faecalis*. Hodnoty MIC byly stanoveny mikrodiluční bujónovou technikou popsanou organizací CLSI. Jednotlivé účinky byly vyhodnoceny metodou „checkerboard“ a „time-kill“ testem. Synergní a baktericidní účinek vůči kmenu *E. faecium* nastal u kombinace VAN + DAP v koncentračním poměru 512 : 4 (μg/mL). V některých případech byla potvrzena synergní, nikoli baktericidní aktivita, pro kombinaci VAN + DAP při  $\frac{1}{2}$  MIC<sub>DAP</sub> a  $\frac{1}{2}$  MIC<sub>VAN</sub>. [97]

V této diplomové práci byl nejslibnější účinek prokázán u kombinace DAP + VAN vůči kmenu *E. faecalis* ATCC 29212. Nicméně je žádoucí tento výsledek potvrdit dalšími experimenty.

K dnešní době je rovněž dostupná přehledová studie z roku 2022, ve které je představen souhrn informací synergního působení DAP s jinými antibiotika vůči stafylokokům a enterokokům. V této studii je jako nejefektivnější kombinace působící vůči enterokokům uvedena kombinace DAP s ceftobiprolem, fosfomycinem a rifampicinem. [98] Tedy, racionální bude pro navazující experimenty zařadit i tyto kombinace.

## 6 Závěr

- Pro studium vlivu vzájemného působení vybraných antibiotik v kombinaci byla vybrána čtyři antimikrobiální léčiva, DAP, TIG, VAN a LIN, a dva kmeny bakterií *E. faecium* a *E. faecalis* rodu *Enterococcus*.
- Byla vždy kombinována dvě antibiotika s různými cílovými koncentracemi. Do kombinací byl dán vždy DAP s dalším antibiotickým léčivem, a to s LIN, VAN či TIG. Aktivita léčiv v kombinaci byla testována vůči dvěma kmenům, klinickému izolátu *E. faecium* a sbírkovému bakteriálnímu kmenu *E. faecalis* ATCC 29212.
- Nejprve byly stanoveny hodnoty MIC vybraných antibakteriálních léčiv pomocí mikrodiluční bujónové techniky dle doporučení organizace EUCAST.
- Dále byla studována antienterokoková aktivita v kombinaci. U žádné kombinace antimikrobiálních látek nebyl prokázán synergní účinek vůči žádnému z volených kmenů.
- Aditivní účinek byl prokázán po 24hodinové inkubaci u kombinace DAP + VAN vůči *E. faecalis* (ATCC 29212) v koncentračním poměru 0,25 : 4 (mg/L); 0,5 : 4 (mg/L); 1 : 4 (mg/L); 2 : 2 (mg/L) a 4 : 2 (mg/L). Po 48hodinové inkubaci byla aktivita vedoucí k inhibici růstu v takovém rozsahu, že ji nebylo možné detekovat, udržena u koncentračního poměru 0,25 : 4 (mg/L); 0,5 : 4 (mg/L); 1 : 4 (mg/L) a 4 : 4 (mg/L).
- Aditivní působení bylo zaznamenáno také u kombinace DAP + TIG vůči *E. faecalis* ATCC 29212, a to ve dvou koncentračních poměrech, 0,25 : 4 (mg/L) a 0,25 : 0,25 (mg/L). Po 48hodinové inkubaci byla aktivita ve stejném rozsahu udržena pro koncentrační poměr 0,25 : 4 (mg/L).
- U kombinace DAP + LIN působící na *E. faecalis* ATCC 29212 v koncentračním poměru 1 : 4 (mg/L) byla zaznamenána aktivita odpovídající aditivnímu působení, které nebyla po 48hodinové inkubaci udržena.
- U klinického izolátu *E. faecium* bylo zaznamenáno aditivní působení u kombinace DAP + LIN v koncentračním poměru 2 : 64 (mg/L).
- U klinického izolátu *E. faecium* nebyla u kombinace DAP + VAN zaznamenána v žádném koncentračním poměru ani aditivita.

- U kombinace antibiotik DAP + TIG vůči *E. faecium* je vhodné experiment opakovat.
- Byly voleny tři způsoby odečtu výsledků, a to spektrofotometrická detekce, odečet nárůstu bakterií pouhým okem a v případě *E. faecium* bylo využito metabolického indikátoru Alamar Blue.
- Využití barviva Alamar Blue pro ověření antibakteriálního účinku pro dvojkombinace vybraných antibiotik vůči klinickému izolátu *E. faecium* se ukázalo jako nejednoznačné. Ve srovnání s hodnocením pomocí spektrofotometrické detekce nedošlo ke shodě výsledků.
- Jako nejspolehlivější metoda se ukázala spektrofotometrická detekce, která korelovala s odečtem růstu bakterie pouhým okem, kde se hodnotil zákal.

## 7 Seznam použitých zkratk

<b>AB</b>	<u>A</u> lamar <u>B</u> lue
<b>AMR</b>	<u>A</u> ntimicrobial <u>R</u> esistance, antimikrobiální rezistence
<b>AST</b>	<u>A</u> ntimicrobial <u>S</u> usceptibility <u>T</u> esting, testování antimikrobiální citlivost
<b>ATCC</b>	<u>A</u> merican <u>T</u> ype <u>C</u> ulture <u>C</u> ollection (nezisková organizace, která shromažďuje a uchovává sbírkové mikroorganismy)
<b>CFU</b>	<u>C</u> olony- <u>F</u> orming <u>U</u> nit, kolonie tvořící jednotka
<b>CLSI</b>	The <u>C</u> linical and <u>L</u> aboratory <u>S</u> tandards <u>I</u> nstitute, Institut pro klinické a laboratorní standardy
<b>CRE</b>	<u>C</u> arbapenem- <u>R</u> esistant <u>E</u> nterobacterales, bakterie taxonu <i>Enterobacterales</i> rezistentní vůči karbapenemu
<b>DAP</b>	<u>D</u> aptomycin
<b>DMSO</b>	<u>D</u> imethylsulfoxid
<b>EARS-Net</b>	The <u>E</u> uropean <u>A</u> ntimicrobial <u>R</u> esistance <u>S</u> urveillance <u>N</u> etwork, Evropská síť pro sledování antimikrobiální rezistence
<b>ECDC</b>	<u>E</u> uropean <u>C</u> entre for <u>D</u> isease Prevention and <u>C</u> ontrol, Evropské středisko pro prevenci a kontrolu nemocí
<b>ECOOFF</b>	<u>E</u> pidemiological- <u>C</u> ut <u>O</u> ff, epidemiologická cut-off hodnota
<b>ESAC-Net</b>	The <u>E</u> uropean <u>S</u> urveillance of <u>A</u> ntimicrobial <u>C</u> onsumption <u>N</u> etwork, Evropská síť pro sledování spotřeby antimikrobiálních látek
<b>ESBL</b>	<u>E</u> xtended <u>S</u> pectrum $\beta$ - <u>L</u> actamases, širokospektré $\beta$ -laktamázy
<b>ESKAPE</b>	<i>E</i> nterococcus faecium, <i>S</i> taphylococcus aureus, <i>K</i> lebsiella pneumoniae, <i>A</i> cinetobacter baumannii, <i>P</i> seudomonas aeruginosa a <i>E</i> nterobacter species
<b>EU</b>	<u>E</u> uropean <u>U</u> nion, Evropská unie
<b>EUCAST</b>	<u>E</u> uropean <u>C</u> ommittee on <u>A</u> ntimicrobial <u>S</u> usceptibility <u>T</u> esting, Evropská komise pro testování antimikrobiální citlivosti

<b>FDA</b>	<u>F</u> ood and <u>D</u> rug <u>A</u> dministration, Úřad pro kontrolu potravin a léčiv
<b>FIC</b>	<u>F</u> ractional <u>I</u> nhibitory <u>C</u> oncentration, frakční inhibiční koncentrace
<b>GAP-AMR</b>	<u>G</u> lobal <u>A</u> ction <u>P</u> lan on <u>A</u> ntimicrobial <u>R</u> esistance, Globální akční plán proti antimikrobiální rezistenci
<b>GLASS</b>	<u>G</u> lass <u>A</u> ntimicrobial <u>R</u> esistance <u>S</u> urveillan <u>S</u> ystem, Globální systém pro sledování antimikrobiální rezistence
<b>GRAM</b>	<u>G</u> lobal <u>R</u> esearch on <u>A</u> ntimicrobial <u>R</u> esistance, Globální výzkum na antimikrobiální rezistenci
<b>HAI-Net</b>	<u>H</u> ealthcare- <u>A</u> ssociated <u>I</u> nfections <u>S</u> urveillan <u>S</u> ystem <u>N</u> etwork, Systém sledování infekcí spojených se zdravotní péčí
<b>IDSA</b>	The <u>I</u> nfectious <u>D</u> iseases <u>S</u> ociety of <u>A</u> merica, Americká společnost pro infekční nemoci
<b>JIP</b>	<u>J</u> ednotka <u>i</u> ntenzivní <u>p</u> éče
<b>LIN</b>	<u>L</u> inezolid
<b>MALDI-TOF MS</b>	<u>M</u> atrix <u>A</u> ssisted <u>L</u> aser <u>D</u> esorption/ <u>I</u> onization- <u>t</u> ime <u>o</u> f <u>F</u> light <u>M</u> ass <u>S</u> pectrometry, hmotnostní spektrometrie s laserovou desorpčí a ionizací za účasti matrice s analyzátoru doby letu
<b>MBC</b>	<u>M</u> inimal <u>B</u> actericidal <u>C</u> oncentration, minimální baktericidní koncentrace
<b>MBIC</b>	<u>M</u> inimal <u>B</u> iofilm <u>I</u> nhibitory <u>C</u> oncentration, minimální biofilm inhibující koncentrace
<b>MDR</b>	<u>M</u> ultidrug-resistant (pojem označující bakterie s rezistencí alespoň k jednomu antibiotiku vůči více než třem třídám antibiotik)
<b>MHA</b>	<u>M</u> ueller- <u>H</u> inton agar
<b>MHB</b>	<u>M</u> ueller- <u>H</u> inton bujón
<b>MIC</b>	<u>M</u> inimal <u>I</u> nhibitory <u>C</u> oncentration, minimální inhibiční koncentrace
<b>MRSA</b>	<u>M</u> ethicillin- <u>R</u> esistant <u>S</u> taphylococcus <u>a</u> ureus, meticilin-rezistentní <i>Staphylococcus aureus</i>



<b>NHSN</b>	<u>N</u> ational <u>H</u> ealthcare <u>S</u> afety <u>N</u> etwork, Národní síť pro bezpečnost ve zdravotnictví
<b>NIH</b>	<u>N</u> ational <u>I</u> nstitutes of <u>H</u> ealth, Národní institut zdraví
<b>OD</b>	<u>O</u> ptická <u>d</u> enzita
<b>PBP</b>	<u>P</u> enicillin- <u>B</u> inding <u>P</u> roteins, penicilin-vázající proteiny
<b>PCR</b>	<u>P</u> olymerase <u>C</u> hain <u>R</u> eaction, polymerázová řetězová reakce
<b>TIG</b>	<u>T</u> igecyklin
<b>USA</b>	<u>U</u> nited <u>S</u> tates of <u>A</u> merica, Spojené státy americké
<b>UTI</b>	<u>U</u> rinary <u>T</u> ract <u>I</u> nfection, infekce močových cest
<b>VAN</b>	<u>V</u> ankomycin
<b>VRE</b>	<u>V</u> ancomycin- <u>R</u> esistant <u>E</u> nterococcus, vankomycin-rezistentní <i>Enterococcus</i>
<b>VREfm</b>	<u>V</u> ancomycin- <u>R</u> esistant <u>E</u> nterococcus <i>faecium</i> , vankomycin-rezistentní <i>Enterococcus faecium</i>
<b>VRSA</b>	<u>V</u> ancomycin- <u>R</u> esistant <u>S</u> taphylococcus <i>aureus</i> , vankomycin-rezistentní <i>Staphylococcus aureus</i>
<b>WHO</b>	<u>W</u> orld <u>H</u> ealth <u>O</u> rganisation, Světová zdravotnická organizace
<b>β-NAD</b>	<u>β</u> - <u>n</u> ikotin <u>a</u> midadenin <u>d</u> inukleotid

## 8 Seznam obrázků

<b>Obr. 1</b> Představitelé bakteriálních agens ze skupiny ESKAPE.....	14
<b>Obr. 2</b> Horizontální přenos genetické informace u bakterií.....	16
<b>Obr. 3</b> Nejčastější mechanismy rezistence u ESKAPE patogenů. ....	18
<b>Obr. 4</b> Životní cyklus biofilmového společenství. ....	19
<b>Obr. 5</b> Chemická struktura vankomycinu.....	25
<b>Obr. 6</b> Chemická struktura linezolidu. ....	26
<b>Obr. 7</b> Chemická struktura tigecyklinu.....	27
<b>Obr. 8</b> Mechanismus účinku daptomycinu. ....	28
<b>Obr. 9</b> Chemická struktura daptomycinu.....	29
<b>Obr. 10</b> Schéma diskové difúzní metody. ....	33
<b>Obr. 11</b> Schématické zobrazení E-testu. ....	34
<b>Obr. 12</b> Schéma mikrotitrační destičky pro stanovení minimální inhibiční koncentrace mikrodiluční bujónovou technikou. ....	36
<b>Obr. 13</b> Vzorec pro výpočet hodnoty indexu frakční inhibiční koncentrace.....	37
<b>Obr. 14</b> Schéma ředění vybraných antibiotik daptomycinu a tigecyklinu v DMSO.....	40
<b>Obr. 15</b> Schéma mikrotitrační destičky s kombinací antibiotik, daptomycinu, tigecyklinu a vankomycinu pro testování antibakteriální aktivity vůči kmenu <i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212. ....	42
<b>Obr. 16</b> Schéma mikrotitrační destičky s kombinací antibiotik, daptomycinu a linezolidu pro testování antibakteriální aktivity vůči kmenu <i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212.....	42
<b>Obr. 17</b> Schéma mikrotitrační destičky s kombinací antibiotik, daptomycinu, tigecyklinu a vankomycinu pro testování antibakteriální aktivity vůči klinickému izolátu bakterie <i>Enterococcus faecium</i> . ....	43
<b>Obr. 18</b> Schéma mikrotitrační destičky s kombinací antibiotik, daptomycinu a linezolidu pro testování antibakteriální aktivity vůči klinickému izolátu bakterie <i>Enterococcus faecium</i> .....	43
<b>Obr. 19</b> Přeměna resazurinu na resorufin pomocí metabolicky aktivních buněk.....	44
<b>Obr. 20</b> Hodnocení kombinace tigecyklinu a daptomycinu pomocí barviva Alamar Blue.....	54
<b>Obr. 21</b> Hodnocení kombinace linezolidu a daptomycinu pomocí barviva Alamar Blue.....	55

## 9 Seznam grafů

<b>Graf. 1</b> „Heat“ mapa. Grafické znázornění antibakteriální aktivity daptomycinu (DAP) a tigecyklinu (TIG) v kombinaci vůči bakterii <i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212.....	47
<b>Graf. 2</b> „Heat“ mapa. Grafické znázornění antibakteriální aktivity daptomycinu (DAP) a tigecyklinu (TIG) v kombinaci vůči bakterii <i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212.....	48
<b>Graf. 3</b> „Heat“ mapa. Grafické znázornění antibakteriální aktivity daptomycinu (DAP) a linezolidu (LIN) v kombinaci vůči bakterii <i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212.....	49
<b>Graf. 4</b> „Heat“ mapa. Grafické znázornění antibakteriální aktivity daptomycinu (DAP) a linezolidu (LIN) v kombinaci vůči bakterii <i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212.....	50
<b>Graf. 5</b> „Heat“ mapa. Grafické znázornění antibakteriální aktivity daptomycinu (DAP) a vankomycinu (VAN) v kombinaci vůči bakterii <i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212.....	51
<b>Graf. 6</b> „Heat“ mapa. Grafické znázornění antibakteriální aktivity daptomycinu (DAP) a vankomycinu (VAN) v kombinaci vůči bakterii <i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212.....	52
<b>Graf. 7</b> „Heat“ mapa. Grafické znázornění antibakteriální aktivity daptomycinu (DAP) a tigecyklinu (TIG) v kombinaci vůči klinickému izolátu bakterie <i>Enterococcus faecium</i> .....	53
<b>Graf. 8</b> „Heat“ mapa. Grafické znázornění antibakteriální aktivity daptomycinu (DAP) a linezolidu (LIN) v kombinaci vůči klinickému izolátu bakterie <i>Enterococcus faecium</i> .....	54
<b>Graf. 9</b> „Heat“ mapa. Grafické znázornění antibakteriální aktivity daptomycinu (DAP) a vankomycinu (VAN) v kombinaci vůči klinickému izolátu bakterie <i>Enterococcus faecium</i> .....	56

## 10 Seznam tabulek

<b>Tab. 1</b> Hodnotící kritéria pro vzájemné působení látek na základě indexu frakční inhibiční koncentrace. ....	38
<b>Tab. 2</b> Seznam bakteriálních kmenů.....	39
<b>Tab. 3</b> Určení hodnoty minimální inhibiční koncentrace pro vybraná antibiotika vůči dvěma vybraným kmenům bakterie rodu <i>Enterococcus</i> . ....	45
<b>Tab. 4</b> Hodnoty minimální inhibiční koncentrace stanovené mikrodiluční bujónovou technikou, uvedené v podkladech European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) pro referenční kmen <i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212. ....	46
<b>Tab. 5</b> Hodnocení kombinovaného účinku látek daptomycinu a tigecyklinu vůči kmenu <i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212 pomocí výpočtu indexu frakční inhibiční koncentrace.....	47
<b>Tab. 6</b> Hodnocení kombinovaného účinku daptomycinu a linezolidu vůči kmenu <i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212 pomocí výpočtu indexu frakční inhibiční koncentrace. ....	50
<b>Tab. 7</b> Hodnocení kombinovaného účinku daptomycinu a linezolidu vůči kmenu <i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212 pomocí výpočtu indexu frakční inhibiční koncentrace. ....	52
<b>Tab. 8</b> Hodnocení kombinovaného účinku daptomycinu a linezolidu vůči klinickému izolátu bakterie <i>Enterococcus faecium</i> pomocí výpočtu indexu frakční inhibiční koncentrace. ....	55

## 11 Použitá literatura

- [1] This is how many people antibiotic resistance could kill every year by 2050 if nothing is done. *World Economic Forum* [online]. 2016 [cit. 2024-04-21].  
Dostupné z: <https://www.weforum.org/agenda/2016/09/this-is-how-many-people-will-die-from-antimicrobial-resistance-every-year-by-2050-if-nothing-is-done/>
- [2] **David M. P. DE OLIVEIRA, Brian M. FORDE, Timothy J. KIDD, Patrick N. A. HARRIS, Mark A. SCHEMBRI, Scott A. BEATSON, David L. PATERSON, Mark J. WALKER.** Antimicrobial Resistance in ESKAPE Pathogens. *Clinical Microbiology Reviews* [online]. 2020, 33(3), e00181-19. ISSN 0893-8512, 1098-6618.  
Dostupné z: [doi:10.1128/CMR.00181-19](https://doi.org/10.1128/CMR.00181-19)
- [3] **Sirijan SANTAJIT, Nitaya INDRAWATTANA.** Mechanisms of Antimicrobial Resistance in ESKAPE Pathogens. *BioMed Research International* [online]. 2016, 1–8. ISSN 2314-6133, 2314-6141. Dostupné z: [doi:10.1155/2016/2475067](https://doi.org/10.1155/2016/2475067)
- [4] **Giuseppe MANCUSO, Angelina MIDIRI, Elisabetta GERACE, Carmelo BIONDO.** Bacterial Antibiotic Resistance: The Most Critical Pathogens. *Pathogens* [online]. 2021, 10(10), 1310. ISSN 2076-0817.  
Dostupné z: [doi:10.3390/pathogens10101310](https://doi.org/10.3390/pathogens10101310)
- [5] **Vilma MAREŠOVÁ.** *Tigecyklin | Remedia* [online]. 2009 [cit. 2024-04-14].  
Dostupné z: <https://www.remédia.cz/rubriky/aktuality/tigecyklin-1078/>
- [6] *Antimicrobial resistance* [online]. 2023 [cit. 2024-04-14].  
Dostupné z: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance>
- [7] CDC. CDC Partners Estimate Healthcare Cost of AR Infections. *Centers for Disease Control and Prevention* [online]. 2022 [cit. 2024-04-14].  
Dostupné z: <https://www.cdc.gov/drugresistance/solutions-initiative/stories/partnership-estimates-healthcare-cost.html>

- [8] **Rene S. HENDRIKSEN, Patrick MUNK, Patrick NJAGE, Bram VAN BUNNIK, Luke MCNALLY, Oksana LUKJANCENKO, Timo RÖDER, David NIEUWENHUIJSE, Susanne Karlsmose PEDERSEN, Jette KJELDGAARD, Rolf S. KAAS, Philip Thomas Lanken Conradsen CLAUSEN, Josef Korbinian VOGT, et al.** Global monitoring of antimicrobial resistance based on metagenomics analyses of urban sewage. *Nature Communications* [online]. 2019, 10(1), 1124. ISSN 2041-1723.  
Dostupné z: [doi:10.1038/s41467-019-08853-3](https://doi.org/10.1038/s41467-019-08853-3)
- [9] **Ka Wah Kelly TANG, Beverley C. MILLAR, John E. MOORE.** Antimicrobial Resistance (AMR). *British Journal of Biomedical Science* [online]. 2023, 80, 11387. ISSN 2474-0896.  
Dostupné z: [doi:10.3389/bjbs.2023.11387](https://doi.org/10.3389/bjbs.2023.11387)
- [10] *European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net)* [online]. 2017 [cit. 2024-04-14].  
Dostupné z: <https://www.ecdc.europa.eu/en/about-us/networks/disease-networks-and-laboratory-networks/ears-net-data>
- [11] *About ECDC* [online]. 2017 [cit. 2024-04-14].  
Dostupné z: <https://www.ecdc.europa.eu/en/about-ecdc>
- [12] **Mónica GARCÍA-SOLACHE, Louis B. RICE.** The Enterococcus: a Model of Adaptability to Its Environment. *Clinical Microbiology Reviews* [online]. 2019, 32(2), e00058-18. ISSN 0893-8512, 1098-6618.  
Dostupné z: [doi:10.1128/CMR.00058-18](https://doi.org/10.1128/CMR.00058-18)
- [13] Antibiotická rezistence – Ústav technologie vody a prostředí. *tvp.vscht.cz* [online]. [cit. 2024-04-14].  
Dostupné z: <https://tvp.vscht.cz/veda-a-vyzkum/projekty/ARGTech/antibioticka-rezistence>
- [14] **Acharya TANKESHWAR.** Gene Transfer Mechanism in Bacteria and It's types. *Microbe Online. Microbe Online* [online]. 2013 [vid. 2024-04-14].  
Dostupné z: <https://microbeonline.com/key-information-regarding-gene-transfer-mechanism-bacteria/>

- [15] **Kevin S. GIPSON, Kourtney P. NICKERSON, Eliana DRENKARD, Alejandro LLANOS-CHEA, Snaha Krishna DOGIPARTHI, Bernard B. LANTER, Rhianna M. HIBBLER, Lael M. YONKER, Bryan P. HURLEY, Christina S. FAHERTY.** The Great ESKAPE: Exploring the Crossroads of Bile and Antibiotic Resistance in Bacterial Pathogens. *Infection and Immunity* [online]. 2020, 88(10), e00865-19. ISSN 0019-9567, 1098-5522.  
Dostupné z: [doi:10.1128/IAI.00865-19](https://doi.org/10.1128/IAI.00865-19)
- [16] **Ragi JADIMURTHY, Shilpa Borehalli MAYEGOWDA, S.Chandra NAYAK, Chakrabhavi Dhananjaya MOHAN, Kanchugarakoppal S. RANGAPPA.** Escaping mechanisms of ESKAPE pathogens from antibiotics and their targeting by natural compounds. *Biotechnology Reports* [online]. 2022, 34, e00728. ISSN 2215017X.  
Dostupné z: [doi:10.1016/j.btre.2022.e00728](https://doi.org/10.1016/j.btre.2022.e00728)
- [17] **Christopher MUTUKU, Zoltan GAZDAG, Szilvia MELEGH.** Occurrence of antibiotics and bacterial resistance genes in wastewater: resistance mechanisms and antimicrobial resistance control approaches. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* [online]. 2022, 38(9), 152. ISSN 0959-3993, 1573-0972.  
Dostupné z: [doi:10.1007/s11274-022-03334-0](https://doi.org/10.1007/s11274-022-03334-0)
- [18] **Nira RABIN, Yue ZHENG, Clement OPOKU-TEMENG, Yixuan DU, Eric BONSU, Herman O SINTIM.** Biofilm formation mechanisms and targets for developing antibiofilm agents. *Future Medicinal Chemistry* [online]. 2015, 7(4), 493–512. ISSN 1756-8919, 1756-8927.  
Dostupné z: [doi:10.4155/fmc.15.6](https://doi.org/10.4155/fmc.15.6)
- [19] **Ranita ROY, Monalisa TIWARI, Gianfranco DONELLI, Vishvanath TIWARI.** Strategies for combating bacterial biofilms: A focus on anti-biofilm agents and their mechanisms of action. *Virulence* [online]. 2018, 9(1), 522–554. ISSN 2150-5594, 2150-5608.  
Dostupné z: [doi:10.1080/21505594.2017.1313372](https://doi.org/10.1080/21505594.2017.1313372)
- [20] **Muzamil Ahmad RATHER, Kuldeep GUPTA, Manabendra MANDAL.** Microbial biofilm: formation, architecture, antibiotic resistance, and control strategies. *Brazilian Journal of Microbiology* [online]. 2021, 52(4), 1701–1718. ISSN 1517-8382, 1678-4405.  
Dostupné z: [doi:10.1007/s42770-021-00624-x](https://doi.org/10.1007/s42770-021-00624-x)

- [21] **Ruixiang MA, Xianli HU, Xianzuo ZHANG, Wenzhi WANG, Jiaxuan SUN, Zheng SU, Chen ZHU.** Strategies to prevent, curb and eliminate biofilm formation based on the characteristics of various periods in one biofilm life cycle. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* [online]. 2022, 12, 1003033. ISSN 2235-2988.  
Dostupné z: [doi:10.3389/fcimb.2022.1003033](https://doi.org/10.3389/fcimb.2022.1003033)
- [22] **Lindsey M. WEINER, Amy K. WEBB, Brandi LIMBAGO, Margaret A. DUDECK, Jean PATEL, Alexander J. KALLEN, Jonathan R. EDWARDS, Dawn M. SIEVERT.** Antimicrobial-Resistant Pathogens Associated With Healthcare-Associated Infections: Summary of Data Reported to the National Healthcare Safety Network at the Centers for Disease Control and Prevention, 2011–2014. *Infection Control & Hospital Epidemiology* [online]. 2016, 37(11), 1288–1301. ISSN 0899-823X, 1559-6834.  
Dostupné z: [doi:10.1017/ice.2016.174](https://doi.org/10.1017/ice.2016.174)
- [23] **Elizabeth FIORE, Daria VAN TYNE, Michael S. GILMORE.** Pathogenicity of Enterococci. *Microbiology Spectrum* [online]. 2019, 7(4), 7.4.9. ISSN 2165-0497.  
Dostupné z: [doi:10.1128/microbiolspec.GPP3-0053-2018](https://doi.org/10.1128/microbiolspec.GPP3-0053-2018)
- [24] **Pm Giridhara UPADHYAYA, KI RAVIKUMAR, BI UMAPATHY.** Review of virulence factors of *Enterococcus*: An emerging nosocomial pathogen. *Indian Journal of Medical Microbiology* [online]. 2009, 27(4), 301–305. ISSN 02550857.  
Dostupné z: [doi:10.4103/0255-0857.55437](https://doi.org/10.4103/0255-0857.55437)
- [25] **John VU, John CARVALHO.** *Enterococcus*: review of its physiology, pathogenesis, diseases and the challenges it poses for clinical microbiology. *Frontiers in Biology* [online]. 2011, 6(5), 357–366. ISSN 1674-7984, 1674-7992.  
Dostupné z: [doi:10.1007/s11515-011-1167-x](https://doi.org/10.1007/s11515-011-1167-x)
- [26] **Helen LEAVIS, Janetta TOP, Nathan SHANKAR, Katrine BORGEN, Marc BONTEN, Jan VAN EMBDEN, Rob J. L. WILLEMS.** A Novel Putative Enterococcal Pathogenicity Island Linked to the *esp* Virulence Gene of *Enterococcus faecium* and Associated with Epidemicity. *Journal of Bacteriology* [online]. 2004, 186(3), 672–682. ISSN 0021-9193, 1098-5530.  
Dostupné z: [doi:10.1128/JB.186.3.672-682.2004](https://doi.org/10.1128/JB.186.3.672-682.2004)



- [27] **Rob JI WILLEMS, Wieger HOMAN, Janetta TOP, Marga VAN SANTEN-VERHEUVEL, David TRIBE, Xenia MANZIOROS, Carlo GAILLARD, Christina Mje VANDENBROUCKE-GRAULS, Ellen M MASCINI, Eric VAN KREGTEN, Jan Da VAN EMBDEN, Marc Jm BONTEN.** Variant *esp* gene as a marker of a distinct genetic lineage of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* spreading in hospitals. *The Lancet* [online]. 2001, 357(9259), 853–855. ISSN 01406736.  
Dostupné z: [doi:10.1016/S0140-6736\(00\)04205-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(00)04205-7)
- [28] **Wei GAO, Benjamin P HOWDEN, Timothy P STINEAR.** Evolution of virulence in *Enterococcus faecium*, a hospital-adapted opportunistic pathogen. *Current Opinion in Microbiology* [online]. 2018, 41, 76–82. ISSN 13695274.  
Dostupné z: [doi:10.1016/j.mib.2017.11.030](https://doi.org/10.1016/j.mib.2017.11.030)
- [29] **Güven KAYAOGLU, Dag ØRSTAVIK.** Virulence factors of *Enterococcus faecalis*: relationship to endodontic disease. *Critical Reviews in Oral Biology and Medicine: An Official Publication of the American Association of Oral Biologists* [online]. 2004, 15(5), 308–320. ISSN 1544-1113.  
Dostupné z: [doi:10.1177/154411130401500506](https://doi.org/10.1177/154411130401500506)
- [30] **Heather C. MAISEY, Mary HENSLER, Victor NIZET, Kelly S. DORAN.** Group B Streptococcal Pilus Proteins Contribute to Adherence to and Invasion of Brain Microvascular Endothelial Cells. *Journal of Bacteriology* [online]. 2007, 189(4), 1464–1467. ISSN 0021-9193, 1098-5530.  
Dostupné z: [doi:10.1128/JB.01153-06](https://doi.org/10.1128/JB.01153-06)
- [31] **M. PINHOLT, C. ØSTERGAARD, M. ARPI, N. E. BRUUN, H. C. SCHØNHEYDER, K. O. GRADEL, M. SØGAARD, J. D. KNUDSEN.** Incidence, clinical characteristics and 30-day mortality of enterococcal bacteraemia in Denmark 2006–2009: a population-based cohort study. *Clinical Microbiology and Infection* [online]. 2014, 20(2), 145–151. ISSN 1198743X.  
Dostupné z: [doi:10.1111/1469-0691.12236](https://doi.org/10.1111/1469-0691.12236)
- [32] **Deborah PIERCE, Bethany C. CALKINS, Kristen THORNTON.** Infectious endocarditis: diagnosis and treatment. *American Family Physician*. 2012, 85(10), 981–986. ISSN 1532-0650.  
Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22612050/>
- [33] **Sahra KIRMUSAOĞLU, Sonia Bhonchal BHARDWAJ.** *Pathogenic Bacteria*. B.M.: BoD – Books on Demand, 2020. ISBN 978-1-78985-987-4.

- [34] **Cristina D. CRUZ, Shreya SHAH, Päivi TAMMELA.** Defining conditions for biofilm inhibition and eradication assays for Gram-positive clinical reference strains. *BMC Microbiology* [online]. 2018, 18(1), 173. ISSN 1471-2180.  
Dostupné z: [doi:10.1186/s12866-018-1321-6](https://doi.org/10.1186/s12866-018-1321-6)
- [35] **Jac-Hoon SONG.** Introduction: the goals of antimicrobial therapy. *International Journal of Infectious Diseases* [online]. 2003, 7, S1–S4. ISSN 12019712.  
Dostupné z: [doi:10.1016/S1201-9712\(03\)90064-6](https://doi.org/10.1016/S1201-9712(03)90064-6)
- [36] **Milan KOLÁŘ.** Bacterial Infections, Antimicrobial Resistance and Antibiotic Therapy. *Life* [online]. 2022, 12(4), 468. ISSN 2075-1729.  
Dostupné z: [doi:10.3390/life12040468](https://doi.org/10.3390/life12040468)
- [37] **Jindra LOCHMANNOVÁ, Milan KOLÁŘ, Dagmar KOUKALOVÁ, Karel URBÁNEK.** Antibiotická léčba bakteriálních infekcí z pohledu klinika, mikrobiologa a farmakologa. *Medicína pro praxi*. 2005, 2(1), 15–18. ISSN 12148687, 18035310.  
Dostupné z: [https://www.medicinapropraxi.cz/artkey/med-200401-0004\\_Antibioticka\\_lecba\\_bakterialnich\\_infekci\\_z\\_pohledu\\_klinika\\_mikrobiologa\\_a\\_farmakologa.php?l=en](https://www.medicinapropraxi.cz/artkey/med-200401-0004_Antibioticka_lecba_bakterialnich_infekci_z_pohledu_klinika_mikrobiologa_a_farmakologa.php?l=en)
- [38] **Pavla PATEROVÁ, Pavlína KRÁLÍČKOVÁ, Petra VÁVROVÁ, Helena ŽEMLIČKOVÁ.** Principy racionální léčby antibiotiky (část I.). *Intervenční a akutní kardiologie* [online]. 2016, 15(2), 85–89. ISSN 1213807X, 18035302.  
Dostupné z: [doi:10.36290/kar.2016.018](https://doi.org/10.36290/kar.2016.018)
- [39] *Antibiotický stewardship. Díl I. Zkušenosti z USA | MT* [online]. 2019 [cit. 2024-04-18].  
Dostupné z: <https://www.tribune.cz/medicina/antibioticky-stewardship-dil-i-zkusenosti-z-usa/>
- [40] **Nelson I. AGUDELO HIGUITA, Mark M. HUYCKE.** Enterococcal Disease, Epidemiology, and Implications for Treatment. In: Michael S. GILMORE, Don B. CLEWELL, Yasuyoshi IKE, Nathan SHANKAR, ed. *Enterococci: From Commensals to Leading Causes of Drug Resistant Infection* [online]. Boston: Massachusetts Eye and Ear Infirmary, 2014 [cit. 2024-04-18].  
Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK190429/>

- [41] **Elena ROSSELLI DEL TURCO, Michele BARTOLETTI, Anders DAHL, Carlos CERVERA, Juan M. PERICÀS.** How do I manage a patient with enterococcal bacteraemia? *Clinical Microbiology and Infection* [online]. 2021, 27(3), 364–371. ISSN 1198743X.  
Dostupné z: [doi:10.1016/j.cmi.2020.10.029](https://doi.org/10.1016/j.cmi.2020.10.029)
- [42] **C. A. ARIAS, G. A. CONTRERAS, B. E. MURRAY.** Management of multidrug-resistant enterococcal infections. *Clinical Microbiology and Infection* [online]. 2010, 16(6), 555–562. ISSN 1198743X.  
Dostupné z: [doi:10.1111/j.1469-0691.2010.03214.x](https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2010.03214.x)
- [43] **F. R. BRUNIERA, F. M. FERREIRA, L. R. M. SAVIOLLI, M. R. BACCI, D. FEDER, M. DA LUZ GONÇALVES PEDREIRA, M. A. SORGINI PETERLINI, L. A. AZZALIS, V. B. CAMPOS JUNQUEIRA, F. L. A. FONSECA.** The use of vancomycin with its therapeutic and adverse effects: a review. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*. 2015, 19(4), 694–700. ISSN 2284-0729.  
Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25753888/>
- [44] **Iva VÁGNEROVÁ, Milan KOLÁŘ.** Možnosti terapie infekcí způsobených vankomycin-rezistentními enterokoky. *Klinická farmakologie a farmacie*. 2005, 17(3), 170–173. ISSN 12127973, 18035353.  
Dostupné z: [https://www.klinickafarmakologie.cz/artkey/far-200303-0009\\_Moznosti\\_terapie\\_infekci\\_zpusobenych\\_vankomycin-rezistentnimi\\_enterokoky.php](https://www.klinickafarmakologie.cz/artkey/far-200303-0009_Moznosti_terapie_infekci_zpusobenych_vankomycin-rezistentnimi_enterokoky.php)
- [45] **Anne H. C. UTTLEY, C. H. COLLINS, Jay NAIDOO, R. C. GEORGE.** Vancomycin-resistant enterococci. *The Lancet* [online]. 1988, 331(8575–8576), 57–58. ISSN 01406736.  
Dostupné z: [doi:10.1016/S0140-6736\(88\)91037-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(88)91037-9)
- [46] **Marco CASSONE, Lona MODY.** Colonization with Multidrug-Resistant Organisms in Nursing Homes: Scope, Importance, and Management. *Current Geriatrics Reports* [online]. 2015, 4(1), 87–95. ISSN 2196-7865.  
Dostupné z: [doi:10.1007/s13670-015-0120-2](https://doi.org/10.1007/s13670-015-0120-2)
- [47] **P. DLOUHÝ, I. HEROLD, M. KOLÁŘ, J. BENEŠ, P. CETKOVSKÝ, T. DOLEŽAL, D. JAHODA, M. KOUBA, I. NOVÁK, O. NYČ, J. PILNÁČEK, Z. RÁČIL, T. SECHSER, P. ŠEVČÍK, P. ŠVIHOVEC.** Postavení linezolidu v léčbě rezistentních gram pozitivních infekcí. *Anesteziologie a intenzivní medicína*. 2005, 16(6), 305–312. ISSN 12142158, 18054412.  
Dostupné z: <https://www.aimjournal.cz/pdfs/aim/2005/06/04.pdf>

- [48] **Seyed MohammadReza HASHEMIAN, Tayebeh FARHADI, Mojdeh GANJPARVAR.** Linezolid: a review of its properties, function, and use in critical care. *Drug Design, Development and Therapy* [online]. 2018, Volume 12, 1759–1767. ISSN 1177-8881.  
Dostupné z: [doi:10.2147/DDDT.S164515](https://doi.org/10.2147/DDDT.S164515)
- [49] **Christopher J. KRISTICH, Louis B. RICE, Cesar A. ARIAS.** Enterococcal Infection – Treatment and Antibiotic Resistance. In: **Michael S. GILMORE, Don B. CLEWELL, Yasuyoshi IKE, Nathan SHANKAR.** *Enterococci: From Commensals to Leading Causes of Drug Resistant Infection* [online]. Boston: Massachusetts Eye and Ear Infirmary, 2014 [cit. 2024-04-18].  
Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK190420/>
- [50] **James E. FRAMPTON, Monique P. CURRAN.** Tigecycline. *Drugs* [online]. 2005, 65(18), 2623–2635. ISSN 1179-1950.  
Dostupné z: [doi:10.2165/00003495-200565180-00008](https://doi.org/10.2165/00003495-200565180-00008)
- [51] **Vilma MAREŠOVÁ, Pavla URBÁŠKOVÁ.** Daptomycin – nové antibiotikum pro léčbu závažných infekcí způsobených některými grampozitivními bakteriemi. *Klinická farmakologie a farmacie*. 2010, 24(4), 187–189. ISSN 12127973, 18035353.  
Dostupné z: <https://www.klinickafarmakologie.cz/pdfs/far/2010/04/06.pdf>
- [52] **Pavla URBÁŠKOVÁ, Vilma MAREŠOVÁ.** Daptomycin | *Remedia* [online]. 2011 [vid. 2024-04-19]. Dostupné z: <https://www.remedia.cz/rubriky/lekove-profilu/daptomycin-3950/>
- [53] **N. GÓMEZ CASANOVA, M. SILLER RUIZ, J. L. MUÑOZ BELLIDO.** Mechanisms of resistance to daptomycin in *Staphylococcus aureus*. *Revista Espanola De Quimioterapia: Publicacion Oficial De La Sociedad Espanola De Quimioterapia*. 2017, 30(6), 391–396. ISSN 1988-9518.  
Dostupné z: <https://seq.es/wp-content/uploads/2017/12/gomez25oct2017.pdf>
- [54] **Mohsen HEIDARY, Azar Dohkt KHOSRAVI, Saeed KHOSHNOOD, Mohammad Javad NASIRI, Saleh SOLEIMANI, Mehdi GOUDARZI.** Daptomycin. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* [online]. 2018, 73(1), 1–11. ISSN 0305-7453, 1460-2091.  
Dostupné z: [doi:10.1093/jac/dkx349](https://doi.org/10.1093/jac/dkx349)
- [55] **Gloria VAZQUEZ-GRANDE, Anand KUMAR.** Optimizing Antimicrobial Therapy of Sepsis and Septic Shock: Focus on Antibiotic Combination Therapy. *Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine* [online]. 2015, 36(01), 154–166. ISSN 1069-3424, 1098-9048.  
Dostupné z: [doi:10.1055/s-0034-1398742](https://doi.org/10.1055/s-0034-1398742)

- [56] **Mical PAUL, George L DAIKOS, Emanuele DURANTE-MANGONI, Dafna YAHAV, Yehuda CARMELI, Yael Dishon BENATTAR, Anna SKIADA, Roberto ANDINI, Noa ELIAKIM-RAZ, Amir NUTMAN, Oren ZUSMAN, Anastasia ANTONIADOU, Pia Clara PAFUNDI, Amos ADLER, Yaakov DICKSTEIN, et al.** Colistin alone versus colistin plus meropenem for treatment of severe infections caused by carbapenem-resistant Gram-negative bacteria: an open-label, randomised controlled trial. *The Lancet Infectious Diseases* [online]. 2018, 18(4), 391–400. ISSN 14733099.  
Dostupné z: [doi:10.1016/S1473-3099\(18\)30099-9](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(18)30099-9)
- [57] **Chinyere ALOKE, Ikechukwu ACHILONU.** Coping with the ESKAPE pathogens: Evolving strategies, challenges and future prospects. *Microbial Pathogenesis* [online]. 2023, 175, 105963. ISSN 0882-4010.  
Dostupné z: [doi:10.1016/j.micpath.2022.105963](https://doi.org/10.1016/j.micpath.2022.105963)
- [58] **Nouha Bakaraki TURAN, Güleda Önköl ENGIN.** Quorum Quenching. In: *Comprehensive Analytical Chemistry* [online]. B.m.: Elsevier, 2018 [cit. 2024-04-18], s. 117–149. ISBN 978-0-444-64064-2.  
Dostupné z: [doi:10.1016/bs.coac.2018.02.003](https://doi.org/10.1016/bs.coac.2018.02.003)
- [59] **P. BALAMURUGAN, M. HEMA, Gurmeet KAUR, V. SRIDHARAN, P. C. PRABU, M. N. SUMANA, S. Adline PRINCY.** Development of a biofilm inhibitor molecule against multidrug resistant *Staphylococcus aureus* associated with gestational urinary tract infections. *Frontiers in Microbiology* [online]. 2015, [cit. 2024-04-19]. ISSN 1664-302X.  
Dostupné z: [doi:10.3389/fmicb.2015.00832](https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00832)
- [60] **Simona NOVOTNÁ.** Pokročilé testování antibakteriální aktivity kandidátních nově syntetizovaných sloučenin [online]. 2021 [cit. 2024-04-23].  
Dostupné z: <https://dspace.cuni.cz/handle/20.500.11956/124912>
- [61] **George SAKOULAS, Poochit NONEJUIE, Victor NIZET, Joseph POGLIANO, Nancy CRUM-CIANFLONE, Fadi HADDAD.** Treatment of High-Level Gentamicin-Resistant *Enterococcus faecalis* Endocarditis with Daptomycin plus Ceftaroline. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* [online]. 2013, 57(8), 4042–4045. ISSN 0066-4804, 1098-6596.  
Dostupné z: [doi:10.1128/AAC.02481-12](https://doi.org/10.1128/AAC.02481-12)

- [62] **Jordan R. SMITH, Katie E. BARBER, Animesh RAUT, Mostafa ABOUTALEB, George SAKOULAS, Michael J. RYBAK.**  $\beta$ -Lactam combinations with daptomycin provide synergy against vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* [online]. 2015, 70(6), 1738–1743. ISSN 1460-2091, 0305-7453. Dostupné z: [doi:10.1093/jac/dkv007](https://doi.org/10.1093/jac/dkv007)
- [63] **Fumiaki TABUCHI, Yasuhiko MATSUMOTO, Masaki ISHII, Keita TATSUNO, Mitsuhiro OKAZAKI, Tomoaki SATO, Kyoji MORIYA, Kazuhisa SEKIMIZU.** Synergistic effects of vancomycin and  $\beta$ -lactams against vancomycin highly resistant *Staphylococcus aureus*. *The Journal of Antibiotics* [online]. 2017, 70(6), 771–774. ISSN 0021-8820, 1881-1469. Dostupné z: [doi:10.1038/ja.2017.7](https://doi.org/10.1038/ja.2017.7)
- [64] **Andrew WILSEY, Donna R. BURGESS, David S. BURGESS.** Focusing the Lens on the CAMERA Concepts: Early Combination  $\beta$ -Lactam and Vancomycin Therapy in Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Bacteremia. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* [online]. 2020, 64(7), e00360-20. ISSN 0066-4804, 1098-6596. Dostupné z: [doi:10.1128/AAC.00360-20](https://doi.org/10.1128/AAC.00360-20)
- [65] **John P. MANZELLA.** Quinupristin-Dalfopristin: A New Antibiotic for Severe Gram-Positive Infections. *American Family Physician*. 2001, 64(11), 1863–1867. Dostupné z: <https://www.aafp.org/pubs/afp/issues/2001/1201/p1863.html>
- [66] **Juan F. MOSLEY, Lillian L. SMITH, Crystal K. PARKE, Jamal A. BROWN, Alton L. WILSON, Lydia V. GIBBS.** Ceftazidime-Avibactam (Avycaz): For the Treatment of Complicated Intra-Abdominal and Urinary Tract Infections. *P & T: A Peer-Reviewed Journal for Formulary Management*. 2016, 41(8), 479–483. ISSN 1052-1372. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27504064/>
- [67] **Zeeshan A. KHAN, Mohd F. SIDDIQUI, Seungkyung PARK.** Current and Emerging Methods of Antibiotic Susceptibility Testing. *Diagnostics* [online]. 2019, 9(2), 49. ISSN 2075-4418. Dostupné z: [doi:10.3390/diagnostics9020049](https://doi.org/10.3390/diagnostics9020049)
- [68] **Ina GAJIC, Jovana KABIC, Dusan KEKIC, Milos JOVICEVIC, Marina MILENKOVIC, Dragana MITIC CULAFIC, Anika TRUDIC, Lazar RANIN, Natasa OPAVSKI.** Antimicrobial Susceptibility Testing: A Comprehensive Review of Currently Used Methods. *Antibiotics* [online]. 2022, 11(4), 427. ISSN 2079-6382. Dostupné z: [doi:10.3390/antibiotics11040427](https://doi.org/10.3390/antibiotics11040427)

- [69] **John TURNIDGE, David L. PATERSON.** Setting and Revising Antibacterial Susceptibility Breakpoints. *Clinical Microbiology Reviews* [online]. 2007, 20(3), 391–408. ISSN 0893-8512, 1098-6618.  
Dostupné z: [doi:10.1128/CMR.00047-06](https://doi.org/10.1128/CMR.00047-06)
- [70] **Johan W. MOUTON.** Breakpoints: current practice and future perspectives. *International Journal of Antimicrobial Agents* [online]. 2002, 19(4), 323–331. ISSN 09248579.  
Dostupné z: [doi:10.1016/S0924-8579\(02\)00028-6](https://doi.org/10.1016/S0924-8579(02)00028-6)
- [71] **Lindsey E. NIELSEN, Jeanne B. FORRESTER, Jennifer Ellis GIROTTO, Aimee M. DASSNER, Romney HUMPHRIES.** One Size Fits All? Application of Susceptible-Dose-Dependent Breakpoints to Pediatric Patients and Laboratory Reporting. *Journal of Clinical Microbiology* [online]. 2019, 58(1), e01446-19. ISSN 0095-1137, 1098-660X.  
Dostupné z: [doi:10.1128/JCM.01446-19](https://doi.org/10.1128/JCM.01446-19)
- [72] **James H. JORGENSEN, Mary Jane FERRARO.** Antimicrobial Susceptibility Testing: A Review of General Principles and Contemporary Practices. *Clinical Infectious Diseases* [online]. 2009, 49(11), 1749–1755. ISSN 1058-4838, 1537-6591.  
Dostupné z: [doi:10.1086/647952](https://doi.org/10.1086/647952)
- [73] *Eucast: MIC determination* [online]. [vid. 2024-04-19].  
Dostupné z: [https://www.eucast.org/ast\\_of\\_bacteria/mic\\_determination](https://www.eucast.org/ast_of_bacteria/mic_determination)
- [74] **Maciej JAŚKIEWICZ, Adriana JANCZURA, Joanna NOWICKA, Wojciech KAMYSZ.** Methods Used for the Eradication of Staphylococcal Biofilms. *Antibiotics* [online]. 2019, 8(4), 174. ISSN 2079-6382.  
Dostupné z: [doi:10.3390/antibiotics8040174](https://doi.org/10.3390/antibiotics8040174)
- [75] **R. L. WHITE, D. S. BURGESS, M. MANDURU, J. A. BOSSO.** Comparison of three different in vitro methods of detecting synergy: time-kill, checkerboard, and E test. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* [online]. 1996, 40(8), 1914–1918. ISSN 0066-4804, 1098-6596.  
Dostupné z: [doi:10.1128/AAC.40.8.1914](https://doi.org/10.1128/AAC.40.8.1914)

- [76] **Ying ZHOU, Zheng HOU, Chao FANG, Xiaoyan XUE, Fei DA, Yukun WANG, Hui BAI, Xiaoxing LUO.** Comparison of microplate and macrodilution methods in time-kill study of new antimicrobial drugs. *Folia Microbiologica* [online]. 2013, 58(1), 9–16. ISSN 0015-5632, 1874-9356.  
Dostupné z: [doi:10.1007/s12223-012-0168-8](https://doi.org/10.1007/s12223-012-0168-8)
- [77] Antimicrobial Synergy Study – Checkerboard Testing. *Emery Pharma* [online]. [cit. 2024-04-19].  
Dostupné z: <https://emerypharma.com/solutions/cell-microbiology-services/antimicrobial-synergy-study-checkerboard-testing/>
- [78] **D. T. A. TE DORSTHORST, P. E. VERWEIJ, J. MELETIADIS, M. BERGERVOET, N. C. PUNT, J. F. G. M. MEIS, J. W. MOUTON.** *In Vitro* Interaction of Flucytosine Combined with Amphotericin B or Fluconazole against Thirty-Five Yeast Isolates Determined by both the Fractional Inhibitory Concentration Index and the Response Surface Approach. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* [online]. 2002, 46(9), 2982–2989. ISSN 0066-4804, 1098-6596.  
Dostupné z: [doi:10.1128/AAC.46.9.2982-2989.2002](https://doi.org/10.1128/AAC.46.9.2982-2989.2002)
- [79] *AlamarBlue Assays for Cell Viability – CZ* [online]. [cit. 2024-05-09].  
Dostupné z: <https://www.thermofisher.com/uk/en/home/life-science/cell-analysis/fluorescence-microplate-assays/microplate-assays-cell-viability/alamarblue-assay-cell-viability.html>
- [80] **Tereza PCHÁLKOVÁ.** *In vitro* screening potenciálních antimykobakteriálně účinných sloučenin na rychle rostoucích kmenech rodu *Mycobacterium* II [online]. 2020 [cit. 2024-05-09].  
Dostupné z: <https://dspace.cuni.cz/handle/20.500.11956/118262>
- [81] *Eucast: Quality Control* [online]. [cit. 2024-04-21].  
Dostupné z: [https://www.eucast.org/ast\\_of\\_bacteria/quality\\_control](https://www.eucast.org/ast_of_bacteria/quality_control)
- [82] **Kelly A. CAIRNS, Kelly A., Andrew A. UDY, Trisha N. PEEL, Iain J. ABBOTT, Michael J. DOOLEY, Anton Y. PELEG.** Therapeutics for Vancomycin-Resistant Enterococcal Bloodstream Infections. *Clinical Microbiology Reviews* [online]. nedatováno, 36(2), e00059-22. ISSN 0893-8512.  
Dostupné z: [doi:10.1128/cmr.00059-22](https://doi.org/10.1128/cmr.00059-22)



- [83] CDC. The biggest antibiotic-resistant threats in the U.S. *Centers for Disease Control and Prevention* [online]. 2022 [cit. 2024-04-22].  
Dostupné z: <https://www.cdc.gov/drugresistance/biggest-threats.html>
- [84] **Lenka SOUČKOVÁ, Hana KOSTKOVÁ, Regina DEMLOVÁ.** Jak se vyvíjí nový lék. Farmakologický ústav LF MU Brno, Masarykův onkologický ústav Brno. 2015.  
Dostupné z: [https://www.internimedicina.cz/artkey/lek-201504-0007\\_Jak\\_se\\_vyviji\\_novy\\_lek.php](https://www.internimedicina.cz/artkey/lek-201504-0007_Jak_se_vyviji_novy_lek.php)
- [85] **Catherine H. SCHEIN.** Repurposing approved drugs on the pathway to novel therapies. *Medicinal Research Reviews* [online]. 2020, 40(2), 586–605. ISSN 1098-1128.  
Dostupné z: [doi:10.1002/med.21627](https://doi.org/10.1002/med.21627)
- [86] **Steven M. OPAL.** Non-antibiotic treatments for bacterial diseases in an era of progressive antibiotic resistance. *Critical Care* [online]. 2016, 20(1), 397. ISSN 1364-8535.  
Dostupné z: [doi:10.1186/s13054-016-1549-1](https://doi.org/10.1186/s13054-016-1549-1)
- [87] Význam bakteriologického screeningu kolonizačních kmenů u hematoonkologických nemocných. *Zdraví.euro.cz* [online]. [cit. 2024-04-22].  
Dostupné z: <https://zdravi.euro.cz/clanky/vyznam-bakteriologickeho-screeningu-kolonizacnich-kmenu-u-hematoonkologickyh-nemocnych/>
- [88] *Antibiotický týden varuje: I antibiotika v podobě kapek nebo mastí je třeba užívat zodpovědně, aby zůstala účinná pro budoucí generace – Hygienická stanice hlavního města Prahy* [online]. [cit. 2024-04-22].  
Dostupné z: <https://www.hygp Praha.cz/antibioticky-tyden-varuje-i-antibiotika-v-podobe-kapek-nebo-masti-je-treba-uzivat-zodpovedne-aby-zustala-ucinna-pro-budouci-generace/>
- [89] **Weiliang ZENG, Luozhu FENG, Changrui QIAN, Tao CHEN, Sipei WANG, Ying ZHANG, Xiangkuo ZHENG, Lingbo WANG, Shixing LIU, Tieli ZHOU, Yao SUN.** Acquisition of Daptomycin Resistance by *Enterococcus faecium* Confers Collateral Sensitivity to Glycopeptides. *Frontiers in Microbiology* [online]. 2022, 13, 815600. ISSN 1664-302X.  
Dostupné z: [doi:10.3389/fmicb.2022.815600](https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.815600)

- [90] **José M. ENTENZA, Marlyse GIDDEY, Jacques VOUILLAMOZ, Philippe MOREILLON, Stefano MANCINI.** Assessment of the *in vitro* synergy of daptomycin plus linezolid against multidrug-resistant enterococci. *Journal of Global Antimicrobial Resistance* [online]. 2014, 2(4), 306–308. ISSN 2213-7165.  
Dostupné z: [doi:10.1016/j.jgar.2014.09.004](https://doi.org/10.1016/j.jgar.2014.09.004)
- [91] **Yaeghob SHARIFI, Alka HASANI, Reza GHOTASLOU, Mojtaba VARSHOCHI, Akbar HASANI, Mohammad AGHAZADEH, Morteza MILANI.** Survey of Virulence Determinants among Vancomycin Resistant *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* Isolated from Clinical Specimens of Hospitalized Patients of North west of Iran. *The Open Microbiology Journal* [online]. 2012, 6, 34–39. ISSN 1874-2858.  
Dostupné z: [doi:10.2174/1874285801206010034](https://doi.org/10.2174/1874285801206010034)
- [93] **Janet A. HINDLER, Annie WONG-BERINGER, Carmen L. CHARLTON, Shelley A. MILLER, Theodoros KELESIDIS, Marissa CARVALHO, George SAKOULAS, Poochit NONEJUIE, Joseph POGLIANO, Victor NIZET, Romney HUMPHRIES.** *In Vitro* Activity of Daptomycin in Combination with  $\beta$ -Lactams, Gentamicin, Rifampin, and Tigecycline against Daptomycin-Nonsusceptible Enterococci. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* [online]. 2015, 59(7), 4279–4288. ISSN 0066-4804.  
Dostupné z: [doi:10.1128/AAC.05077-14](https://doi.org/10.1128/AAC.05077-14)
- [94] **Amanda C SCHUTT, Nicole M BOHM.** Multidrug-Resistant *Enterococcus faecium* Endocarditis Treated with Combination Tigecycline and High-Dose Daptomycin. *Annals of Pharmacotherapy* [online]. 2009, 43(12), 2108–2112. ISSN 1060-0280.  
Dostupné z: [doi:10.1345/aph.1M324](https://doi.org/10.1345/aph.1M324)
- [95] **C. SILVESTRI, O. CIRIONI, D. ARZENI, R. GHISELLI, O. SIMONETTI, F. ORLANDO, G. GANZETTI, S. STAFFOLANI, L. BRESCINI, M. PROVINCIALI, A. OFFIDANI, M. GUERRIERI, A. GIACOMETTI.** *In vitro* activity and *in vivo* efficacy of tigecycline alone and in combination with daptomycin and rifampin against Gram-positive cocci isolated from surgical wound infection. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases* [online]. 2012, 31(8), 1759–1764. ISSN 1435-4373.  
Dostupné z: [doi:10.1007/s10096-011-1498-1](https://doi.org/10.1007/s10096-011-1498-1)

- [96] **M. POLIDORI, A. NUCCORINI, C. TASCINI, G. GEMIGNANI, R. IAPOCE, A. LEONILDI, E. TAGLIAFERRI, F. MENICHETTI.** Vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* (VRE) bacteremia in infective endocarditis successfully treated with combination daptomycin and tigecycline. *Journal of Chemotherapy (Florence, Italy)* [online]. 2011, 23(4), 240–241. ISSN 1973-9478.  
Dostupné z: [doi:10.1179/joc.2011.23.4.240](https://doi.org/10.1179/joc.2011.23.4.240)
- [97] **Gulseren AKTAS.** *In Vitro* Synergistic Effect of Vancomycin Combined with Daptomycin Against Vancomycin-Resistant Enterococci. *Microbial Drug Resistance* [online]. 2019, 25(10), 1484–1489. ISSN 1076-6294, 1931-8448.  
Dostupné z: [doi:10.1089/mdr.2019.0033](https://doi.org/10.1089/mdr.2019.0033)
- [98] **Roberta Maria ANTONELLO, Diana CANETTI, Niccolò RICCARDI.** Daptomycin synergistic properties from *in vitro* and *in vivo* studies: a systematic review. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* [online]. 2023, 78(1), 52–77. ISSN 0305-7453.  
Dostupné z: [doi:10.1093/jac/dkac346](https://doi.org/10.1093/jac/dkac346)