

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



DIPLOMOVÁ PRÁCA

HODNOTENIE DEZINFEKČNEJ ÚČINNOSTI NOVÝCH  
LÁTKO

Christián Balko

Vedúci diplomovej práce: PharmDr. Miroslav Kovařík, Ph.D.

Konzultant: PharmDr. Jan Marek, Ph.D.

HRADEC KRÁLOVÉ, 2024

## **Pod'akovanie**

Touto cestou sa chcem pod'akovať pánovi PharmDr. Miroslavu Kovaříkovi, PhD. za pomoc s formátom písania práce, doporučením vhodnej literatúry a ústretovou komunikáciou, ďalej pánovi PharmDr. Janu Marekovi, PhD. a PharmDr. Michaele Hympánové, PhD. z Centra biomedicínskeho výskumu Fakultnej nemocnice v Hradci Králové za pomoc s obsahovou stránkou práce, veľmi ochotnú pomoc pri experimentálnej časti a za poskytnutie vhodných postupov písania diplomovej práce.

„Prehlasujem, že táto práca je mojím pôvodným autorským dielom. Všetka literatúra a ďalšie zdroje, z ktorých som pri spracovaní čerpal, sú uvedené v zozname použitej literatúry a v práci sú riadne citované. Práca nebola použitá k získaniu iného alebo rovnakého titulu.“

V Hradci Králové 22. 6. 2024

Christián Balko

<b>1. Obsah</b>	
2. ABSTRAKT.....	5
3. ABSTRACT.....	7
4. ÚVOD.....	9
4.1. Zadanie – cieľ práce.....	10
5. TEORETICKÁ ČASŤ .....	11
5.1 Dezinfekcia ako preventívny krok v šírení infekčných chorôb.....	11
5.1.1 Hygiena prevádzky zdravotníckych zariadení .....	11
5.1.2 Nozokomiálne infekcie, kmene a ich rozdelenie podľa citlivosti .....	12
5.1.3 Zdroj pôvodcu nákazy.....	12
5.1.4 Prenos a cesta šírenia pôvodcu nákazy .....	14
5.1.5 Testovanie baktericídnej účinnosti dezinfekčných prostriedkov podľa Európskych noriem .....	16
5.2 Rozdiel medzi klinickými a zbierkovými kmeňmi .....	16
5.3 Mikrodilučná bujónová metóda .....	18
5.4 Kvartérne amoniové soli ako dezinfekčné látky .....	19
5.4.1 Štruktúra kvartérnych amónnych solí .....	19
5.4.2 Mechanizmus účinku kvartérnych amónnych solí .....	20
5.4.3 Príklady využitia kvartérnych amónnych solí.....	22
6. EXPERIMENTÁLNA ČASŤ .....	24
6.1 Vybavenie .....	24
6.1.1 Štandardný set testovaných kmeňov .....	24
6.1.2 Použité prístroje .....	25
6.1.3 Použité chemikálie .....	25
6.1.4 Použité laboratórne pomôcky.....	25
6.1.5 Testované látky .....	27
6.2 Metodika .....	29
6.2.1 Princíp stanovenia minimálnej inhibičnej koncentrácie.....	29
6.2.2 Príprava bakteriálnych kmeňov z kryoskúmaviek .....	29
6.2.3 Príprava suspenzií testovaných modelových kmeňov baktérii.....	30
6.2.4 Príprava testovanej látky .....	31
6.2.5 Testovanie .....	34
6.2.6 Vyhodnotenie a odočet minimálnej inhibičnej koncentrácie .....	34
7. VÝSLEDKY .....	36
7.1 Hodnotenie antimikróbnej aktivity na suspenzii baktérii.....	36

7.2 Porovnanie testovaných látok so štandardmi benzalkónia .....	42
8. Diskusia.....	46
9. Záver .....	50
10. Použité skratky .....	52
11. Zoznam obrázkov .....	54
12. Zoznam tabuliek.....	55
13. Zoznam grafov .....	56
14. Použitá literatúra .....	57

## 2. ABSTRAKT

**Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové**

**Katedra biologických a lékařských věd**

**Autor:** Christián Balko

**Školitel':** PharmDr. Miroslav Kovařík, Ph.D.

**Konzultant:** PharmDr. Jan Marek, Ph.D.

**Diplomová práce**

**Názov:** Hodnotenie dezinfekčnej účinnosti nových látok

**Štúdijný odbor:** Farmacie

**Cieľ práce:** Cieľom tejto diplomovej práce bolo zistiť antimikróbnu účinnosť jednej série kvartérnych amónnych solí formou rýchlej screeningovej metódy stanovenia minimálnej inhibičnej koncentrácie.

**Metódy:** Bola zisťovaná citlivosť 8 bakteriálnych kmeňov na nové látky typu kvartérnych amónnych solí pomocou mikrodilučnej bujónovej metódy. Z 10 látok pripravených na Centre biomedicínskeho výskumu bolo možné použitie ôsmich látok, ktoré splnili podmienku rozpustnosti, prípadne sa po vyzrážaní nariedili, čím sa znížila ich koncentrácia o polovicu. Pomocou odčítaných hodnôt minimálnej inhibičnej koncentrácie bolo zrejmé, ktorá látka má najväčší účinok.

**Výsledky:** Z ôsmich testovaných látok mala látka s označením 3A najlepší účinok na baktérie *Staphylococcus aureus*, methicillín-rezistentný *Staphylococcus aureus*, vankomycin-rezistentný *Enterococcus* a *Staphylococcus epidermidis*. Iné látky po testovaní minimálnej inhibičnej koncentrácie preukázali minimálnu účinnosť, prípadne pre ich ďalšie preskúmanie by bolo potrebné navýšiť koncentráciu testovanej látky > 500 µmol/l.

**Záver:** Z látok na bázi kvartérnych amónnych solí, ktoré boli testované, boli účinné prevažne na grampozitívne baktérie, vďaka zloženiu ich bunkovej steny. Účinok na gramnegatívne kmene nebol dosiahnutý ani napriek viacnásobnému testovaniu.

Látka na bázi kvartérnych amonných solí s počtom uhlíkov  $C_{12}$  na kvartérnom dusíku vykazovala najvyšší účinok.

**Kľúčové slová:** kvartérne amónne soli, minimálna inhibičná koncentrácia, dezinficiencia, štruktúra amónnych solí, grampozitívne a gramnegatívne baktérie

### 3. ABSTRACT

**Charles University in Prague, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové**

**Department of Biological and Medical Sciences**

**Student:** Christián Balko

**Thesis Tutor:** PharmDr. Miroslav Kovařík, Ph.D.

**Consultant:** PharmDr. Jan Marek, Ph.D.

**Diploma thesis**

**Background:** Evaluation of the disinfection efficacy of new disinfection agents

**Study program:** Pharmacy

**Purpose of work:** The aim of this diploma thesis was to determine the antimicrobial effectiveness of quaternary ammonium salts in a microbiological laboratory and the evaluation, which took place through the determination of the minimum inhibitory concentration.

**Methods:** The sensitivity of 8 bacterial strains was determined to new substances of the quaternary ammonium salt type using the microdilution broth method. Of the 10 substances supplied by the Center for Biomedical Research, it was possible to use eight substances that did not precipitate, or were diluted after precipitation, which reduced their concentration by half. Using the readings of the minimum inhibitory concentration, it was clear which substance has the greatest effect.

**Results:** Of the eight substances tested, the substance with the designation 3A had the best effect on *Staphylococcus aureus*, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, vancomycin-resistant *Enterococcus* and *Staphylococcus epidermidis* bacteria. Other substances showed minimal effectiveness after minimum inhibitory concentration testing, or for their further examination it would be necessary to increase the concentration of the tested substance  $> 500 \mu\text{mol/l}$ .

**Conclusion:** Of the substances based on quaternary ammonium salts that were tested, they were primarily effective against Gram-positive bacteria. The quaternary



ammonium salts based agents were tested mostly effective on gram-positive bacteria, due to the composition of their cell wall. The effect on other gram-negative strains was not achieved despite multiple testing. The quaternary ammonium salts based substance with C<sub>12</sub> carbon number on quaternary nitrogen showed the highest effect.

**Key words:** quaternary ammonium salts, minimum inhibitory concentration, disinfection, structure of ammonium salts, gram-positive and gram-negative bacteria

## 4. ÚVOD

Bakteriálne infekcie vyvolávajú množstvo ochorení, ktoré sú celosvetovo rozšírené. Medzi niektoré zo závažných ochorení vyvolané baktériami patrí napríklad tetanus, listerióza, tuberkulóza, cholera, brušný tyfus, mor a iné [1]. Sú veľkým rizikom a preto je nutná neustála snaha o nájdenie nových protimikróbnych látok a metód zisťujúcich ich citlivosť. Baktérie ohrozujúce všeobecné zdravie obyvateľstva sa do organizmu dostávajú rôznymi spôsobmi, zahrňujúce všetko od prieniku cez kožu, teda drobné rany, škrábane, prípadne zákroky, ktoré neboli prevedené chirurgicky odborne. Do organizmu vstupujú po prenose vzduchom alebo kvapôčkami cez sliznice nosu, úst. Jedná sa teda o nozokomiálne nákazy, ktorých pôvodcovia vstupujú cez dýchacie cesty. S týmito nákazami sa najčastejšie stretávame v zdravotníckych zariadeniach, kde je zvýšené riziko prítomnosti bakteriálnych kmeňov na rôznych povrchoch a viacero citlivých jedincov. Môžu sa vyskytovať napríklad na povrchu nástrojov a prístrojov používaných pri rutinných činnostiach zdravotníckych pracovníkov [1].

Vo vážnych prípadoch hrozí pri rýchlom množení baktérii utlačovanie tkanív hostiteľa a tým dochádza k narušovaniu ich funkcií. Často však dochádza k ničeniu okolitých buniek a tkanív už po ich pomnožení. Baktérie ničia bunky tiež produkciou toxínov, ktoré môžu vyvolať masívnu imunitnú reakciu a paralyzovať bunky. To má závažný následok pre správnu funkciu organizmu ako celku.

Nadužívanie antibiotík (ATB) prispelo k nárastu počtu génov zodpovedných za rezistenciu u baktérii proti týmto ATB či iným antimikróbnyh látkam, a práve to viedlo k nutnosti vytvorenia ATB s odlišnou štruktúrou. Riziko vzniká takisto pri používaní dezinfekčných látok používaných v zdravotníckych zariadeniach (napr. nemocniciach). To viedlo k vzniku nových zlúčenín, teda kvarterných amoniových solí (KAS). KAS sa označujú ako látky s veľmi dobrými antibakteriálnymi vlastnosťami, ktoré zabíjajú baktérie procesom jednoduchej elektrostatickej absorpcie. Tieto látky následne vstupujú do bunčných membrán, a dokážu narušiť permeabilitu bunkovej membrány. V porovnaní s bakteriostatickými ATB je vznik rezistencie u baktérie značne redukovaný. KAS zabraňujú šíreniu rezistentných

kmeňov a ich selekcii. V súčasnosti sa stali bežnou súčasťou dezinfekcie a antisepsie v nemocničnom prostredí, lekárňach, prípadne iných zdravotníckych zariadeniach [1].

#### 4.1. Zadanie – cieľ práce

Cieľom tejto diplomovej práce bolo screeningovou metódou zistiť antimikróbnu účinnosť 10 testovaných látok za použitia 8 vhodných testovaných kmeňov. Použité látky boli na bázi KAS s rôznou dĺžkou alkylového reťazca. Na základe postupov bolo možné zistiť, či tieto nové látky, na bázi KAS dokážu prejavíť svoje antimikróbne vlastnosti na testované bakteriálne kmene. Na toto stanovenie sa zisťovala tzv. minimálna inhibičná koncentrácia (MIC) pomocou využitia mikrodilučnej bujónovej metódy (BMD). Cieľom bolo rovnako popísať vzťah medzi štruktúrou a biologickým účinkom.

Výsledky sa následne vyhodnocovali po inkubácií a odčítali sa z jamiek mikrotitračnej dosičky. Testovanie látok, ich syntéza a rovnako aj práca v mikrobiologickom laboratóriu prebiehali v Centre biomedicínskeho výskumu, Fakultnej nemocnice v Hradci Králové. V rámci práce boli testované látky na bázi KAS. K dispozícii bolo 8 bakteriálnych kmeňov, teda: *Staphylococcus aureus* (STAU), methicillín-rezistentný *Staphylococcus aureus* (MRSA), *Staphylococcus epidermidis*, vankomycin-rezistentný *Enterococcus* (VRE), *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* neprodujúca širokospektré  $\beta$ -laktamázy, *Klebsiella pneumoniae* produjúca širokospektré  $\beta$ -laktamázy, multirezistentný *Pseudomonas aeruginosa*.

## 5. TEORETICKÁ ČASŤ

### 5.1 Dezinfekcia ako preventívny krok v šírení infekčných chorôb

#### 5.1.1 Hygiena prevádzky zdravotníckych zariadení

Je všeobecne známe, že dezinfekčné látky sa používajú na zníženie počtu mikroorganizmov na rôznych povrchoch na bezpečnú úroveň. Znižuje sa ňou počet mikroorganizmov procesmi, ako je napríklad deštrukcia membrán buniek, denaturáciou proteínov, alebo interakciou s DNA a tým pádom má teda využitie, ako preventívny krok pri šírení chorôb, na ochranu zdravia a bezpečnosti, ale aj ochranu majetku napr. pred plesňami. Nevýhodou týchto látok môže byť toxicita pre človeka, alebo pre životné prostredie [2,3,4].

Prevádzka zdravotníckych zariadení musí spĺňať určité hygienické a epidemiologické požiadavky. Jedným z kritérií, ktoré tieto zariadenia musia spĺňať je „zákon č.258/2000 Sb., o ochrane verejného zdravia a o zmene niektorých súvisiacich zákonov, provozný rad zariadenia [2,5,6]. “ Prevádzka musí byť schválená Krajskou hygienickou stanicou a mali by v nej byť dodržiavané a uvedené zásady osobnej a prevádzkovej hygieny. Pri nedodržiavaní týchto zásad hrozí rozšírenie infekcie a vznik choroby. Práve preto je od zdravotných pracovníkov vyžadované, aby dodržiavali osobnú hygienu, prípadne sa podrobili zdravotným prehliadkam. Je ich povinnosťou používať osobné a ochranné prostriedky vzhľadom na ich pracovnú náplň, pričom je potrebné zohľadniť, či ide o výkon s pacientom a do akej miery je tento výkon rizikový. Tomu musia prislúchať isté opatrenia súvisiace s rizikom prípadného úkonu. Týmto chráni zdravie pacientov, ale aj iných pracovníkov prevádzky. Na základe zákona č.258/2000 je nutné mať k dispozícii dezinfekciu, dezinfekciu a zaistiť proces deratizácie [2,3,4,5,6].

V rámci zdravotných zariadení je dôležité, aby bola do zdravotných zariadení dodávaná čistá voda neobsahujúca nečistoty alebo ťažké kovy ako napríklad olovo. Strava lôžkových a sociálnych služieb by mala byť mikrobiologicky nezávadná, za využívania nezávadných surovín, mala by mať príslušnú biologickú hodnotu, podávaná v stanovených režimoch a musí byť vhodne tepelne upravená. Pri práci

s biologickým materiálom je potrebné dodržiavať hygienu a dezinfekciu prístrojov a materiálov, použitých napríklad pri chirurgickom výkone. Aby sa zabránilo kontaminácií je zdravotnícky pracovník povinný nosiť pracovný odev a dodržiavať zásadu - zákaz jedla, pitia a fajčenia na pracovisku. Vhodnou môže byť aj tzv. „hygienická slučka“ pri pracoviskách s vysokým rizikom nákazy, pri ktorej sa na pracovisko prechádza cez umyvárku, a vchod pre pracovníkov je oddelený [2,3,5,6].

### **5.1.2 Nozokomiálne infekcie, kmene a ich rozdelenie podľa citlivosti**

Podľa článku - Nozokomiální infekce autora Petra Smejkal (2012) pôsobiaceho na 1. lekárskej fakulte Univerzity Karlovy znie definícia nozokomiálnych infekcií nasledovne: „Systémové alebo lokalizované infekcie, ktoré preukazateľne neboli prítomné pri prijatí do nemocnice a už prepukli najskôr za 48 hodín po prijatí, alebo 48 hodín po prepustení. Sú časté je im možné predchádzať, zvyšujú mortalitu a prejavujú sa v cene hospitalizácie [7].“

Všeobecne môže byť zdrojom nákazy iný človek alebo zvierka a okrem baktérii a vírusov dochádza aj k prenosu parazitárnych ochorení, pričom najvýznamnejšími sú cudzopasní červi a členovci. Ďalším etiologickým agens, ktoré vyvolávajú ochorenia, môžu byť metazoa, protozoa a huby. Ochorenie trypanozomiáza, leishmanióza alebo malária sú zdrojom ochorení vyvolávaných protozoami. Častými a neprijemnými ochoreniami, ktoré vyvolávajú huby, sú plesňové ochorenia nechtov, kože alebo ochorenia vlasov. Príkladom môže byť dermatomykóza vyvolávaná oddelením *Fungi imperfecti*. Závažné systémové ochorenia, ktoré etiologické agens dokáže vyvolať je histoplazmóza alebo blastomykóza [2,4].

### **5.1.3 Zdroj pôvodcu nákazy**

Zdrojom nákazy u človeka sú najčastejšie osoby s klinickým priebehom ochorenia, alebo nosiči. Ako nosiča môžeme označiť osobu, ktorá sama nemá žiadne príznaky ochorenia, ale prechováva a vylučuje infekčné agens do okolia. Je to nebezpečné z dôvodu, že títo jednotlivci o svojom ochorení nevedia, a nevie o nich ani ich okolie.

Nosič pri perzistentnej infekcii je zdrojom nákazy len krátkodobo alebo dlhodobo, pričom dochádza k pravidelnému uvoľňovaniu infekčného agens. Iným typom je nosič v inkubačnej dobe, a tento proces prebieha pri asymptomatickom priebehu alebo v rekonvalescencii [2,4,8].

V prípade osôb s klinickým priebehom, pri výskyte ochorenia, sa prejavujú klinické symptómy zmenou telesných funkcií ako sú tachykardia, horúčka, únava, bolesť svalov alebo tachypnoe. V prípade vírusových nákaz je pôvodca vylučovaný ešte pred tým, než sa objavia prvé klinické príznaky ochorenia. Pri bakteriálnych nákazách dochádza k vylučovaniu ich zárodkov hneď na začiatku ochorenia. Postupne sa pravdepodobnosť prenosu nákazy znižuje.

Medzi grampozitívne (G+) baktérie, ktoré sú veľmi častým zdrojom nozokomiálnych nákaz, sú zaradzované baktérie *Streptococcus sp.*, *Enterococcus sp.*, baktéria STAU, prípadne MRSA. Bakteriálny kmeň MRSA je značne nebezpečný, na jeho liečbu je potrebná kombinácia ATB. Tento kmeň je vysoko rezistentný na betalaktámové ATB. V súčasnosti sa na jeho liečbu používa vankomycín, ktorý je podávaný injekčne. Ako z názvu vyplýva, predchádzajúcim liečivom, ktoré sa na tento bakteriálny kmeň používalo, bol methicillín a jedná sa o bakteriálny kmeň STAU. Jedným z liečiv používaných na STAU je v Českej republike oxacilín [2,3,8,9].

Infekcie spôsobené gramnegatívnymi (G-) baktériami predstavujú niektorí zástupcovia ako *Klebsiella*, *Escherichia coli* alebo *Pseudomonas*. Tieto kmene vykazujú rôznu mieru rezistencie na ATB. Sú veľmi častým zdrojom infekcií močových ciest, hlavne G- tyčinka *Pseudomonas aeruginosa* alebo kvasinky rodu *Candida*. Pri chirurgických ranách infekcie vyvolávajú často niektoré anaeroby alebo G- tyčinky [2,4,7,8,10].

Rozdeľujú sa podľa viacerých hľadísk, jednak podľa pôvodu na exogenné a endogenné. Pri exogénnom pôvode sa do organizmu mikrobiologické agens dostáva z vonkajšieho prostredia, napríklad z nemocničného prostredia, pričom zdrojom môžu byť neumyté ruky iného pacienta alebo personálneho pracovníka. Pri endogennom pôvode dochádza u konkrétneho pacienta k premnoženiu bežne nepatogénnej mikroflóry, ktorá sa dostáva z pôvodného miesta mikroflóry do iných orgánov. Nastáva to v prípade invazívnych operačných výkonov. U týchto infekcií už

nehrozí rozsiahly prenos v rámci oddelenia, ako to bolo v prípade exogénnych nákaz. Z tohto dôvodu je nutné na zamedzenie šírenia nákaz dodržiavanie hygieny rúk pri chirurgických zákrokoch [7,8].

Všeobecne známe je rozdelenie infekcií podľa ich spôsobu šírenia na prvú skupinu - aparentné formy, pri ktorých je nákaza menej nebezpečná, pretože je pri nich možná včasná diagnostika po ktorej nasleduje zahájenie liečby. Druhú skupinu tvoria značne nebezpečnejšie atypické alebo ľahké formy ochorenia, pretože práve z dôvodu týchto prejavov nemusia byť diagnostikovateľné [2,4,8].

#### **5.1.4 Prenos a cesta šírenia povôdca nákazy**

Pri prenose infekčného agens hrá dôležitú úlohu spôsob, ako sa bakteriálny kmeň presunie zo zdroja na potencionálne vnímavého jedinca ďalej. Šírenie infekcie závisí na zdroji a jeho lokalizácii v organizme. A to do značnej miery ovplyvní to, akým spôsobom nákaza opustí hostiteľa. Sú známe 3 veľké epiteliárne povrchy so zvýšeným rizikom, teda koža, sliznice respiračného a alimentárneho ústrojenstva. Menšie epiteliárne povrchy, ktoré sú tiež vstupnou bránou inkekcii, sú očná spojivka a urogenitálny trakt. Pri prenikaní nákazy do hostiteľa musia bakteriálne kmene prekonať viacero bariér. Veľmi častou bariérou, ktorou sa pri jej porušení dostávajú infekcie do organizmu je práve koža. V prípade infekcií je nutné poznamenať, že vstupná brána infekcie môže byť zároveň aj bránou výstupnou. Je nutné spomenúť, že bariér je v tele viac. Nie len koža, ale aj hematoencefalitická, mozgomiešny mok, hematotestikulárna bariéra, tvoria účinné bariéry vstupu infekcie. Prienik infekcií je častý aj v prípade injekčného vpichu, hrozí tiež pri transplantáciách. Infekcia, ktorá sa šíri, zanecháva poškodenie nie len na bunky epiteliárne, ale môže dôjsť k tomu, že sa rozšíri do iných orgánov tela [2,3,4,11,12].

Dôležité rozdelenie infekcií v rámci zdravotníckeho zariadenia, podľa epidemiologického hľadiska je členenie na 2 rozsiahle kategórie, a teda na špecifické a nešpecifické. Nešpecifické infekcie odrážajú epidemiologickú situáciu v príslušnom zdravotníckom zariadení a pomocou nich dokážeme zistiť hygienickú úroveň daného zariadenia. Ďalšou skupinou sú špecifické a pre nich platí, že

vznikajú následkom terapeutických a diagnostických výkonov. Výskytu nákaz sa dá zamedziť asepsiou, správnu dezinfekciou a sterilizáciou. Z toho vyplýva dodržiavanie hygienicko-epidemiologického režimu [2,4].

Infekcie môžu zasiahnuť viaceré orgány, prípadne sa rozšíriť z miesta nákazy a napadnúť iné orgány. Medzi orgány, ktoré bývajú často zasiahnuté, patrí epitel pokožky, ďalej gastrointestinálny a urogenitálny trakt, infekcie krvného riečiska, respiračné infekcie. V prípade respiračných infekcií je potrebné rozlišovať poškodenie, resp. infekcie horných alebo dolných dýchacích ciest. Infekcie respiračného traktu môžu vyústiť až v pneumóniu. V tomto prípade väčšinu nákaz vyvolávajú práve nozokomiálne infekcie. Často tvoria až 20 % týchto infekcií a hrozí vysoké riziko úmrtnosti, pričom najviac sú ohrození pacienti na jednotke intenzívnej starostlivosti (JIP). Zdrojom infekcie môžu byť aj infekcie pri chirurgických operáciách, ranné infekcie, alebo infekcie pohlavného ústrojenstva [2,3,4,8,9,13,14].

Nákaza môže mať rôzne formy. Forma manifestná je tá, ktorá je menej nebezpečná, dobre diagnostikovateľná a liečiteľná. A forma tzv. nosičstva, pri ktorom nosiči prechovávajú a vylučujú infekčné agens bez zjavných známk ochorenia. Jedná sa o priamy prenos. Rovnako sa tak jedná aj o prenos po kontakte s nakazenou osobou alebo zamestnancami zdravotníctva. Prenos nepriamou cestou sa od toho priameho líši tak, že pacient bol v kontakte s miestom, kde sa pomnožili mikroorganizmy. Veľmi nebezpečnými sú tzv. katérové sepsie, ktoré vznikajú pri nesprávnom používaní infúznej linky. Pri tomto prípade môže dôjsť k sepse. V nemocniciach sa baktériálne kmene pomnožujú na plochách, ako napríklad kľučky od dverí, panel s tlačidlami vo výťahu, prípadne na kontaminovaných nástrojoch alebo prístrojoch používaných v zdravotných zariadeniach [2,4,10,14,15].



### **5.1.5 Testovanie baktericídnej účinnosti dezinfekčných prostriedkov podľa Európskych noriem**

Pri testovaní baktericídnej účinnosti sa postupuje podľa noriem, ktorých výsledkom je získanie známky kvality podľa Európskeho spoločenstva, teda Comunité Européen (CE). Centrom, ktoré zodpovedá za kvalitu používania dezinfekčných látok je – „European Committee for Standardization (CEN) ktorý je koordinátor Management Centra so sídlom v Bruseli [5,16].“

„CEN spolu s technickou komisiou vytvorili štandardy mandátov, ktoré je nutné dodržiavať a nemandátov, ktoré dodržiavať nemusia, ale môžu byť nápomocné priemyslu aj užívateľom [16].“ V rámci týchto mandátov rozdelili požiadavky na kroky, ktoré je potrebné splniť, aby boli lepšie účinné nie len na baktérie, ale aj na huby, spóry a iné virulentné organizmy. Pri testovaní dezinfekcií sa uplatňujú aj organizácie ako Európska komisia pre testovanie antimikróbnej citlivosti (EUCAST), ktorá je voľne prístupná a Inštitút klinických a laboratórnych noriem (CLSI), ktorý je prístupný za poplatok [5,6,16,17].

## **5.2 Rozdiel medzi klinickými a zbierkovými kmeňmi**

Klinické a zbierkové kmene používajúce sa v laboratóriách pri výskume alebo v lekárskej praxi, sú dva rôzne typy baktérii z hľadiska ich použitia. Pri klinických kmeňoch ide o baktérie, ktoré sú priamo spojené s ľudským zdravím a môžu spôsobovať infekcie a pri zbierkových kmeňoch platí, že nie sú aktuálne spojené s konkrétnym pacientom alebo ľudským ochorením. Vďaka tomu je možné povedať, že klinické kmene sú získavané z klinických vzorkov ako napríklad krv, hnis, moč, ster z krku, stolice. Zbierkové kmene sú na druhú stranu archivované v laboratóriách a sú používané na výskumné účely, pri štúdiu evolúcie, taxonómie. V rôznych zbierkach je možné nájsť rôzne sérovary baktérii napríklad: *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, alebo G- bakteriálna čeľaď *Enterobacteriaceae*. Vedeckým pracoviskom skúmajúcim rôzne kmene, ktoré sú uložené v zbierkach práve v Českej republike je „Česká sbírka mikroorganizmů“ (CCM) v Brne [9,18,19,20].

Autorka Vávrová (2008) komentuje rozdiel medzi klinickými a zbierkovými kmeňmi slovami: „Rozdiel medzi jednotlivými kmeňmi je v rozdielne antigénnych štruktúr, v prípade antigénnych štruktúr, ktoré sú menšie, ide o tzv. sérovary. Líšiť sa môžu v biochemických vlastnostiach, rastlinnej virulencii, okrem toho aj podľa citlivosti k fágom [9].“

Zbierkové kultúry druhu musia byť kultivovateľné a uložené aspoň v dvoch zbierkach. Príkladom môže byť kmeň *Pseudomonas aeruginosa*, *Lactobacillus rhamnosus*. Podľa vydania zbierky „Bergey's Manual“ sa bakteriálne kmene ukladajú v rôznych verejných výskumných centrách celosvetovo [21]. Predovšetkým pre zbierkové kmene je typické, že majú úložisko v rôznych zbierkach po celom svete. Slúžia pri štúdiu evolúcie a diverzity. Sú oveľa častejšie využívané pri výuke a vo výskume a rôznych organizáciách zahrňujúcich napríklad veterinu. Pomáhajú tiež určiť, aké baktérie sú si navzájom príbuzné z hľadiska taxonómie a klasifikácie. Samozrejmosťou týchto kmeňov je, že sa používajú pri vývoji nových liečiv, pri výskume v laboratóriách, ale tiež pri výuke napríklad na stredných alebo vysokých školách v rámci experimentálnej práce študentov. Vďaka tomu je možné testovanie nových ATB, dezinfekcií a zisťovanie prípadnej rezistencie bakteriálnych kmeňov. Netreba zabudnúť na ich využitie pri výskume infekčných ochorení, pričom sa študuje ich patogenita a mechanizmy infekcie. Vďaka tomu majú zamestnanci zdravotníctva a vedci značnú výhodu v tom, že im to pomáha porozumieť príslušným ochoreniam a interakciám baktérii s ľudským zdravím [9,18,19,20].

Tieto kmene je nutné skladovať tzv. lyofilizáciou – pri teplote 4 stupne Celzia, a kryoprezerváciou – až pri nízkych teplotách v tekutom dusíku dosahujúcich -196 stupňov Celzia [22]. Pre každý používaný bakteriálny druh je medzinárodnou komisiou stanovený typový (resp. referenčný kmeň). Príkladom môžu byť baktérie rodu *Vischeria*, *Eustigmatos*, *bifidobaktérie*, *Bacterium longum*, *Bacterium infantis*, *Bacterium animalis*, *Bacterium adolescentis*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* [23]. Nevyhnutnosťou je každoročná kontrola, kde sa kontrolujú všetky vlastnosti vrátane ich faktoru nakažlivosti. Bakteriálne kmene je možné dokázať analýzou polymerázovej reťazcovej reakcie (PCR) produktu, restriktívou analýzou, metódami „Automated Nucleic acid Detection and Raman Analysis (ANDRA), Restriction Digestion Ribotyping Analysis (RDRA) [22,23,24].“

Citlivosť kmeňov sa líši vzhľadom k ich odolnosti voči teplote, chlade, odolnosti voči detergentom, liečivám, rôznym chemickým látkam napríklad zlúčeninám soli. Veľmi rizikové v súčasnej dobe sú kmene rezistentné voči ATB, ktoré boli pred pár dekadami účinné, pričom liečivá, na ktoré sú rezistentné je možné počuť už v samotnom názve. Príkladom môže byť VRE alebo MRSA [9,20].

Na záver je nutné zhrnúť, že klinické kmene nachádzajú uplatnenie pri lekárskej praxi, zatiaľ čo zbierkové kmene sú skôr pre výskumné účely, teda certifikované testovanie.

### **5.3 Mikrodilučná bujónová metóda**

V súčasnosti sa používajú dve rôzne dilučné metódy – makrodilučná a mikrodilučná. Makrodilučná bujónová metóda je menej využívanou metódou, často sa pri nej používajú väčšie objemy (minimálne nad 1 ml). Vyžaduje dlhšiu dobu inkubácie než BMD. Používajú sa pri nej štandardné skúmavky. Na rozdiel od BMD, makrodilučná metóda sa vykonáva výhradne manuálne [25,26,27].

Pri BMD sa často pracuje s malým objemom 0,1 ml. Je to rýchlejšia metóda, než makrodilučná. Jej výhodou je tiež, že je ju možné použiť na rôzne typy baktérii. Vďaka tomu je možné otestovanie viacerých látok, napríklad ATB na jeden bakteriálny kmeň, prípadne viacero bakteriálnych kmeňov naraz. Pri tejto metóde sa zisťuje, aká koncentrácia látky je potrebná k inhibícií rastu baktérii, pričom sa využíva dvojková riediaci rada. Pri tejto metóde sa bakteriálny kmeň zmieša s testovanou látkou v mikrotitračnej dosičke v tekutom Müller-Hinton bujóne (MHB), ktorý sa kultivuje v termostate pri  $35\pm 1^\circ\text{C}$ . Po kultivácii je na mikrotitračnej dosičke prítomný zákal v prípade, pokiaľ došlo k rastu baktérie. Pokiaľ však bola látka účinná, dôjde k inhibícii rastu baktérie, teda prejaví sa to čírymi jamkami bez zákalu. Práve tá jamka, kde dôjde k zástave rastu baktérie je označovaná pojmom MIC [3,8,25-29].

BMD je kvantitatívna metóda, ktorá slúži k zisteniu MIC, pomocou nej je možné znížiť množstvo baktérii resp. zastaviť rast mikroba. Obecné ide o citlivú metódu.

Často sa pri nej pracuje s malou koncentráciou ATB. Zisťuje sa citlivosť bakteriálnych kmeňov. V súčasnosti je to dôležitá metóda testovania citlivosti bakteriálnych kmeňov doporučená CLSI a EUCAST. Táto metóda je niekedy označovaná ako referenčná, predovšetkým pre bakteriálny kmeň *Bacteroides fragilis*. V prípade testovania ATB je táto metóda namáhavá a hrozia závažné chyby. Napriek tomu je to výhodná referenčná metóda vďaka jej spoľahlivosti, malej spotrebe materiálu, reprodukovateľnosti, rovnako aj možnosti automatizácie [3,8,25,26,27].

## 5.4 Kvartérne amoniové soli ako dezinfekčné látky

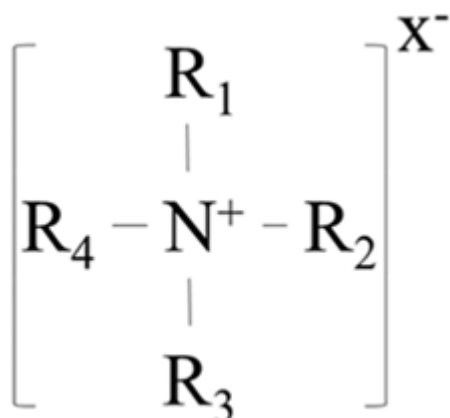
KAS sú široko používané vo výskume a pri výuke, ako aj v priemysle ako surfaktanty, v kozmetickom priemysle, ako emulzifikanty, analgetiká, dezinficiencia a sú najúčinnnejšie proti G+ baktériam, účinkujú aj na G- baktérie, ale v nižšej miere. KAS majú široké využitie a pôsobia významne proti kvasinke *Candida albicans*, prípadne aj na spóry rodu *Bacillus*, *Trychophyton*, noroviry a enteroviry. Okrem nich však ich využitie je nachádzané aj u améb a niektorých zapúzdrených vírusov, teda vďaka prieniku cez ich lipidové obaly. Aj KAS sú ohrozené rezistenciou podobne ako ATB, pretože z dlhodobého hľadiska dochádza k postupnému rozvoju rezistencie baktérii na KAS. Je to z dôvodu ich rozsiahleho používania v súčasnosti od domácnosti až po zdravotnícke zariadenia [5-10,13-17,30,31-39].

### 5.4.1 Štruktúra kvartérnych amónnych solí

Fyzikálne vlastnosti – Autori Jennings (2015), Minbiole (2017) a Wuest (2023) popísali štruktúru KAS následovne: „KAS vo všeobecnosti tvorí kladne nabitý dusík, čo sa označuje aj slovom hlava, z ktorého vychádzajú štyri väzby a na nich je prítomný nepolárny aryl alebo alkylový reťazec. KAS sú často označované aj ako kationaktívne tenzidy [32,33,34].“

Dĺžka alkylu naviazaného na kladne nabitý dusík je často v rozmedzí C<sub>8</sub> až C<sub>18</sub>. Záporne nabitým je v tomto prípade najčastejšie protijón Br<sup>-</sup> alebo Cl<sup>-</sup> (**obrázok 1**).

Vďaka tejto kombinácii sú lepšie rozpustné vo vode. Avšak niektoré jednoduché KAS sú nerozpustné vo vode. Z iných atómov halogénov sa naskytla otázka použitia iodidovej soli, tá však z dôvodu zníženej rozpustnosti má len obmedzené využitie. Je všeobecne známe, že z celkového hľadiska majú KAS amfifilnú povahu a preto umožňujú tvorbu micel, čo im tým pádom umožňuje ich testovanie pri kritickej micelárnej koncentrácii (CMC) [13-15,32-39].



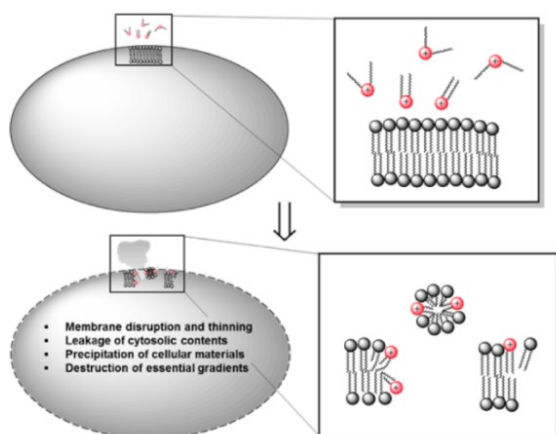
Obrázok 1 – Obecná štruktúra KAS [40]

#### 5.4.2 Mechanizmus účinku kvartérnych amónnych solí

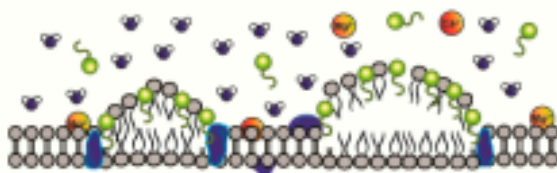
Vďaka ich amfifilnej povahe je ich základný mechanizmus účinku založený na zásahu do štruktúry baktérii, teda cytoplazmatickej membrány a dvojvrstvy lipidov, pričom dochádza k deštrukcii membrán a bielkovín mikroorganizmov. Jedná sa o baktericídny efekt, pri ktorom dochádza k permeabilite kationaktívnych tenzidov do bunecnej membrány, pričom preniknuté tenzidy spôsobia proces, ktorý vedie k lýze baktérii a bunecnej smrti. Sú preto veľmi účinné proti závažným ochoreniam baktérii, ktoré majú významnú patogenicitu, teda ESKAPE. Medzi ne patria *Enterococcus faecium*, *STAU*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* a baktérie rodu *Enterobacter* [32 - 38,41,42,43,44].

Základom mechanizmu je prvý krok - elektrostatická interakcia pripevnenia KAS na membránu (obrázok 2), teda medzi kladne nabitou hlavou KAS - kvartérnym

dusíkom a záporne nabitou bakteriálnou bunečnou membránou. Pri ďalšom kroku dochádza k prestupu KAS bočných hydrofóbnych reťazcov do intramembránového regiónu, a to vedie k úniku materiálu, minerálov predovšetkým Mg, Ca, K z cytoplazmy a lýze bunky. Na základe tohto procesu dôjde k odbúraniu cytoplazmatickej membrány, čo je znázornené na **obrázku 3**. Všeobecne platí vyššie spomínané, že KAS sú účinnejšie na G<sup>+</sup> baktérie, pričom ich štruktúru tvorí hrubšia bunková stena tvorená peptidoglykánom, teichoové kyseliny a lipoteichoové kyseliny. V prípade G<sup>-</sup> baktérii, ktoré sú zapúzdrené do dvoch membrán – vonkajšej fosfolipidovej a vnútornej cytoplazmatickej membrány, sú tieto membrány silne odolné voči chemikáliám. Medzi týmito membránami sa nachádza periplazmatický priestor. Ďalej tu u nich je možné nájsť jednu tenkú vrstvu peptidoglykánu. Práve vďaka prítomnosti druhej membrány majú KAS tendenciu vykazovať zníženú aktivitu proti G<sup>-</sup> baktériám [12,32,33,36,38,41,45,46].



**Obrázok 2 – Mechanizmus účinku KAS proti baktériám [32,33]**

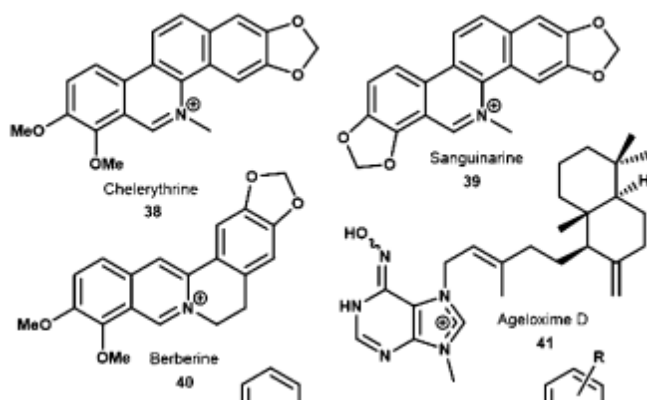


**Obrázok 3 – Odburávanie cytoplazmatickej membrány [39,47]**

V rámci mnohých štúdií nadviazali autori Minbiole, Wuest a spolupracovníci na predchádzajúce výskumy a štúdie týkajúce sa mechanizmu, efektivity a biologickej aktivity a preskúmali ďalší účinok KAS. Otestovali rôzne možnosti úpravy a modifikácií alkylov a arylov KAS. Výsledkom tejto ich práce bola lepšia antibakteriálna aktivita proti G<sup>+</sup> baktérii STAU, G<sup>-</sup> baktérii *Escherichia coli* a kvasinke *Candida albicans*. Výhodou bolo aj začlenenie aromatického systému vedúceho k širšiemu antimikrobiálnemu spektru. Prispelo to však aj k zníženiu toxicity a zjednodušeniu výroby [12,32,33,34].

#### 5.4.3 Príklady využitia kvartérnych amónnych solí

Okrem syntetických KAS, ktoré sa prevažne na trhu vyskytujú a sú najviac komerčne využívané, existujú aj tzv. prírodné KAS, medzi ktoré patrí napríklad chelerytrín, sanguinarín, berberín a ageloxím (vzorce látok sú znázornené na **obrázku 4**). Rozšírenie týchto látok o fenyl prispelo k získaniu významnej antimikrobiálnej aktivity [32,33].



Obrázok 4 – Vzorce chelerytrínu, sanguinarínu, berberínu a ageloxínu [32,33]

KAS sú častou súčasťou dezinfekčných a antiseptických prostriedkov a využívajú sa na dezinfekciu nástrojov alebo povrchov. Ako kationické surfaktanty nachádzajú uplatnenie pre svoj protektívny účinok a využívajú aj pri výrobe mýdiel, farieb na vlasy, sú súčasťou šampónov a kondicionérov a sú aj súčasťou masť. Tvoria súčasť

farbív nachádzajúcich sa v kryštálovej violeti, čo sa používa pri Gramovom farbení stien baktérii, tiež malachitovej zeleni. Ďalšou látkou, ktorá sa využíva je propidium iodid pri konfokálnom mikroskopickom zobrazovaní [7,32,33,39,47-49].

Významnými látkami, ktoré obsahujú KAS a používajú sa v praxi a zároveň nachádzajú uplatnenie ako veľmi často používané zlúčeniny v priemysle sú napr. látky benzalkonia, ktoré sa nachádzajú v rôznych prípravkoch ako napríklad Ajatin, čo je kožný roztok, nachádza sa tiež v očných kvapkách Systane, BioDrop, ďalej benzethonium v čistiacom prostriedku Dial alebo Desident. Benzoxonium nachádza uplatnenie pri bolesti hrdla, zápaloch hrdla a nachádza sa v prípravkoch Oralgic, Orofar, Lidocam - ústna voda, alkylpyridinium – Neoseptolete, Septabene. V zdravotníckych zariadeniach sa KAS používajú ako dezinfekcia povrchov, čím zároveň bránia šíreniu nozokomiálnych nákaz [6,10,47]. Výrazné uplatnenie našli ako dezinficiens látky - benzethonium chlorid, stearalkonium chlorid, didecyldimethylammonium chlorid nachádzajúci sa v prípravku Lysol [10,49-56].



## 6. EXPERIMENTÁLNA ČASŤ

V rámci experimentálnej časti bola zisťovaná antimikróbna účinnosť jednej série nových látok na bázi KAS. Na posúdenie účinnosti KAS bola použitá BMD. Stanovenie prebiehalo po 48 hodinovej inkubácii v termostate pri  $35\pm 1^\circ\text{C}$ . Odpočet výsledkov bolo možné zhodnotiť z mikrotitračných dosičiek pomocou spektrofotometra pri vlnovej dĺžke 600 nm.

### 6.1 Vybavenie

#### 6.1.1 Štandardný set testovaných kmeňov

Gram pozitívne baktérie G+

**STAU** *Staphylococcus aureus* C1947

**MRSA** methicillín-rezistentný *Staphylococcus aureus* C1926

**STEP** *Staphylococcus epidermidis* C1936

**VRE** vankomycin-rezistentný *Enterococcus* S2484

Gram negatívne baktérie G-

**ESCO** *Escherichia coli* A1235

**KLPN ES-** *Klebsiella pneumoniae* neprodukujúca širokospektré  $\beta$ -laktamázy C1950

**KLPN ES+** *Klebsiella pneumoniae* produkujúca širokospektré  $\beta$ -laktamázy C1934

**PSAE MR** multirezistentný *Pseudomonas aeruginosa* A1245

### **6.1.2 Použité prístroje**

1. Vortex mixér Stuart (Bibby-scientific/Cole partner, Staffordshire, UK)
2. Spektrofotometer s vlnovou dĺžkou 600 nm The Synergy™ HT (Bio-Tek Instruments, Vermont, USA)
3. Ultrazvuková lázeň SONOREX DIGITEC (BANDELIN electronic GmbH & Co. KG, Berlín, Nemecko)
4. Termostat na pomnoženie kultivácií baktérii (CO<sub>2</sub> inkubátor, ESCO, Singapur)
5. Laminárny box Heal Force (Shanghai Lisben scientific equipment, Šanghaj, Čína)
6. Denzitometer DEN1B (Biosan 1 Ltd., Riga, Lotyšsko)

### **6.1.3 Použité chemikálie**

1. Voda pre injekcie 0,1% (B.Braun, Melsungen, Nemecko)
2. Dimethylsulfoxide (DMSO) pre molekulárnu biológiu  $\geq 99,9\%$  (Sigma – Aldrich, St.Louis, Missouri, USA)
3. MHB, kultivačné médium (HiMedia, Bombaj, India)
4. Kultivačná pôda v Petriho miskách s Müller-Hinton agarom (MHA) (HiMedia, Bombaj, India)

### **6.1.4 Použité laboratórne pomôcky**

1. bakteriologické jednorázové očkovacie kľučky
2. stojan na skúmavky
3. mikrotitračná dosička
4. multikanálová pipeta a jednokanálová pipeta Research Plus (Eppendorf, Hamburg, Nemecko)

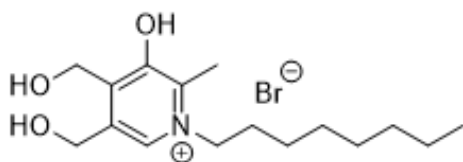
5. sterilné skúmavky s uzáverom

6. Petriho misky

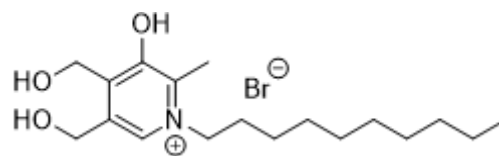
7. sterilné špičky

### 6.1.5 Testované látky

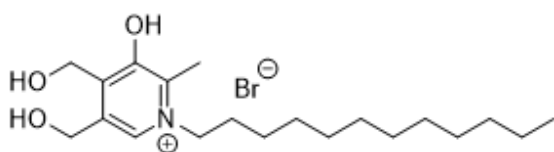
Látky na bázi KAS boli syntetizované v Centre biomedicínskeho výskumu Fakultnej nemocnice v Hradci Králové. Testovanie prebiehalo v triplikáte pre každú jednotlivú látku z dôvodu overenia pravdivosti, taktiež z dôvodu vysokej odolnosti testovaných mikroorganizmov a možných chýb pri testovaní. Vzorce jednotlivých látok **1A - 6A** (**obrázok 5**) sa líšia počtom uhlíkov v alkyle naviazanom na atóm dusíku. Počet uhlíkov naviazaných na  $N^+$  u uvedených látok vzrastal v poradí -  $C_{8,10,12,14,16,18}$ .



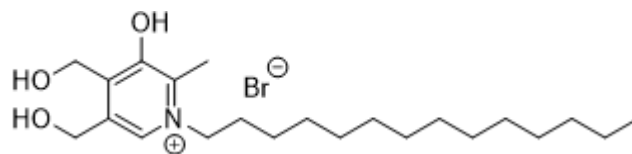
Vzorec látky - 1A



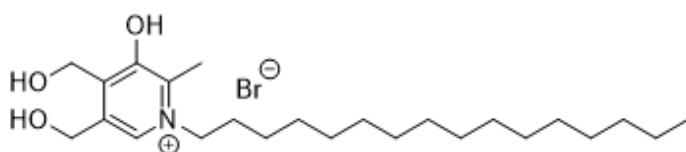
Vzorec látky - 2A



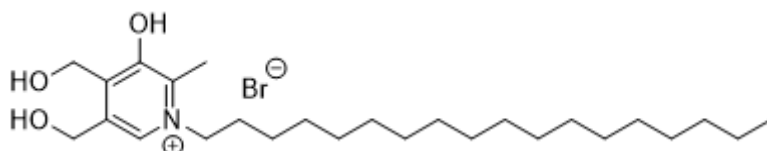
Vzorec látky - 3A



Vzorec látky - 4A



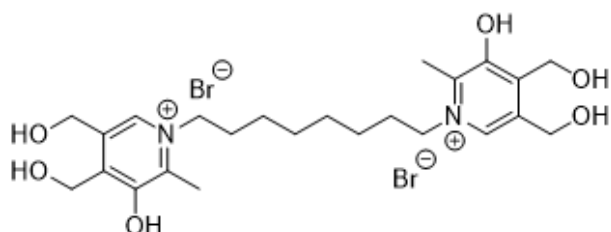
Vzorec látky - 5A



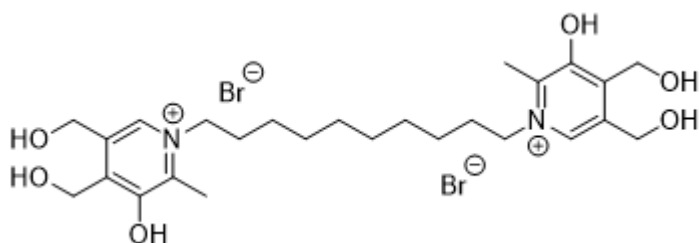
Vzorec látky - 6A

**Obrázok 5 – Vzorce látok 1A – 6A**

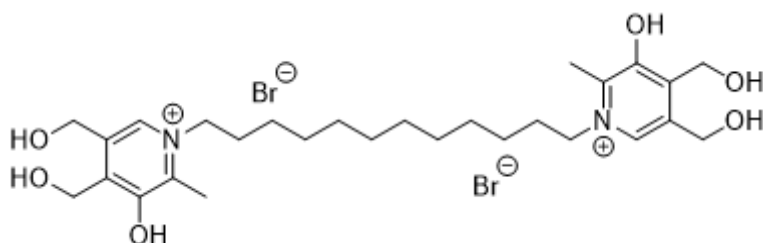
Vzorce druhej série látok označené „**1B - 4B**“ sú uvedené na **obrázku 6**. Po otestovaní prvej série látok boli testované látky, ktoré mali navyše pyridínový kruh s tromi naviazanými hydroxy skupinami a zároveň sa navzájom líšili počtom uhlíkov v alkyle medzi nimi. Tieto látky sú zároveň nositeľmi dvoch kladných a dvoch záporných nábojov.



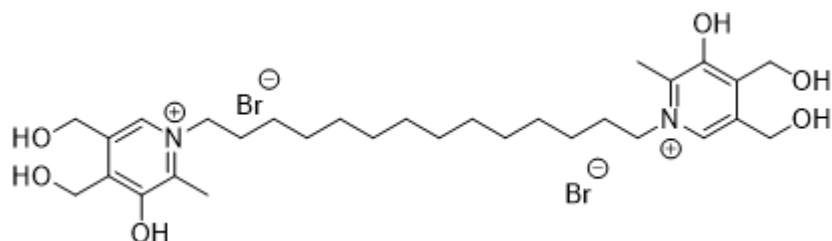
Vzorec látky - 1B



Vzorec látky - 2B



Vzorec látky - 3B



Vzorec látky - 4B

**Obrázok 6 – Vzorce látok 1B – 4B**

## 6.2 Metodika

### 6.2.1 Princíp stanovenia minimálnej inhibičnej koncentrácie

Pri stanovení MIC vyhodnotenie výsledkov vychádzalo z vizuálneho hodnotenia a kontroly pomocou spektrofotometra pri vlnovej dĺžke 600 nm. Pri vizuálnom hodnotení bolo možné na základe zákalu alebo čírosti indikovať či šlo o MIC, v opačnom prípade, pokiaľ bol viditeľný zákal, bolo zrejmé, že látka bola neúčinná. Tento proces nasledoval po kultivácii baktérii v inkubátore s nastavenou teplotou  $35\pm 1^\circ\text{C}$ . Počas inkubácie dochádzalo k rastu baktérii a ich reakcií na prítomnosť KAS. Po inkubácii sa odčítala MIC z jamky s najnižšou koncentráciou skúšanej látky, kde bola viditeľná inhibícia rastu, zároveň tam, kde nebol zákal. Na základe týchto výsledkov bolo možné zhodnotiť, že pokiaľ bola MIC nízka, baktérie boli citlivé na testovanú látku. Ak bola naopak MIC vysoká, došlo k rezistencii baktérie. Už na základe toho, či mikrotitračné jamky boli číre alebo nie bolo možné zistiť, či bol účinok látky dostatočný.

### 6.2.2 Príprava bakteriálnych kmeňov z kryoskúmaviek

Médium, ktoré sa využívalo bol MHB. Jedná sa o bujón o vhodnom pH  $7,4\pm 0,2$ , ktorý podporuje rast baktérii. Z hľadiska zloženia obsahuje – 17,5 g peptonu z kaseinu, 2 g hovädzieho výťažku a 1,5 g škrobu. Je vhodné ho skladovať v chladničke. Používa sa najčastejšie na pomnoženie kolónií ako sú *Neisseria* alebo *Moraxela* [13,26,27].

Príprava spočívala v tom, že sa vyžíhanou pinzetou, prípadne sterilnou kľučkou sterilne vybrala jedna guľička z kryoskúmavky a dala na pevnú pôdu, teda MHA. Na túto guľičku sa následne kvapol MHB. Po týchto dvoch krokoch sa pôda kultivovala 16-24 hodín pri  $35\pm 1^\circ\text{C}$ . Po napipetovaní tekutého média na pôdu s guľičkou obsahujúcou baktériu bolo potrebné uskutočniť rozter. Následujúci deň bola k dispozícii narastená primárna kultúra. Z tejto kultúry sa odobrala kolónia a rozotrela krížovým rozterom na úplne nový MHA v Petriho miskách (**obrázok 7**). Po uskutočnení tohoto kroku nasledovala opätovná kultivácia 16-24 hodín pri  $35\pm 1^\circ\text{C}$ .

Ďalší deň pripravená sekundárna kultúra narástla a tým bola vhodná pre antimikróbne testovanie. Jej použiteľnosť pri skladovaní v chladničke je 14 dní [26,27,28,29].



**Obrázok 7 – Krížová kultivácia baktérii MRSA – Zdroj: Vlastná tvorba**

### **6.2.3 Príprava suspenzií testovaných modelových kmeňov baktérii**

Suspenzie modelových kmeňov baktérii sa pripravila tak, že sa do laminárneho boxu pripravili sterilné skúmavky (modré viečko, 15 cm). V skúmavkách bolo približne 3 ml vody pre injekcie. Pri BMD sa najskôr do skúmavky pripravila suspenzia z mikrobiálnej kultúry. K dispozícii bolo 8 testovaných bakteriálnych kmeňov, ktoré sa získali z pripravených Petriho misiek. Vyžíhanou bakteriologickou kľučkou sa nabralo trochu kultúry, najprv sa rozotrela po stene skúmavky, ktoré boli dopredu popísané a potom vytvorila homogénna suspenzia s MHB, s požadovanou denzitou 0,5 podľa McFarlanda. V prípade, že hodnota bola značne nad hodnotou 0,5 stupňa McFarlandovej stupnici bolo potrebné suspenziu nariediť doplnením vody pre injekcie. V prípade, že bola hodnota nižšia bolo potrebné pridať ešte malé množstvo

baktérii. Celý postup bol vykonávaný v laminárnom boxe so zapnutou ventiláciou, teda prúdiacim vzduchom, aby sa zamedzilo šíreniu kmeňov do okolia. Po ukončení práce bolo nutné laminárny box dezinfikovať, rovnako aj použité nástroje.

#### 6.2.4 Príprava testovanej látky

Testovaná látka bola pripravená tak, že ju bolo nutné najskôr navážiť. Aby navážky sedeli bolo potrebné dodržiavanie rovnakej navážky, teda pri každej látke o hmotnosti približne 5 mg. V **tabuľke 1** sú tiež popísané molekulové hmotnosti látok. Tieto látky boli následne suspendované v roztoku DMSO (látka bola premiešaná pomocou prístroja vortex, pričom bolo nutné, aby bol roztok číry) a pomocou tohto postupu bolo zaistené, aby bola výsledná testovacia koncentrácia 250 µmol/l. Túto koncentráciu bolo potrebné neskôr dosadiť na výpočet do rovnice s použitím látok, aby bol vypočítaný objem DMSO ( $V_{DMSO}$ ).

Rovnica na výpočet objemu DMSO:

$$V_{DMSO} = \frac{m}{M \times c \times 100} = x \text{ l DMSO} \times 10^6 = x \text{ ul DMSO}$$

m - navážka (g)

c - koncentrácia v prvých jamkách riediacej rady (250 µmol/l)

M - molárna hmotnosť

Pokiaľ sa látka rozpustila alebo vytvorila homogénna suspenzia v médiu, pristúpilo sa k ďalšej fáze testovania. V niektorých prípadoch došlo k vzniku zákalu aj po dôkladnom premiešaní na prístroji vortex, preto bolo potrebné, na dosiahnutie čírosti, aby sa tento roztok znovu nariedil. Pokiaľ došlo k tomu, že sa testovaná látka vyzrážala alebo nerozpustila, tak sa tento pôvodný roztok látky v DMSO zriedil konkrétne znovu v DMSO na polovičnú koncentráciu a najvyššia testovaná



koncentrácia na dosičke teraz zodpovedala koncentrácii menšej než pripravená koncentrácia 250  $\mu\text{mol/l}$ . V prípade prvého riedenia by to bolo 125  $\mu\text{mol/l}$ , druhého riedenia – 62,5  $\mu\text{mol/l}$ , atď. [28,29].

Po týchto krokoch sa uskutočnil odpočet až po 48 hodinách, po inkubácií v termostate, mikrotitračná dosička bola porovnávaná oproti tmavému podkladu a ten umožnil zviditeľniť pomnožené baktérie v jamkách dosičky.

**Tabuľka 1 - Popis navážok a molekulových hmotností jednotlivých látok**

<b>Látka</b>	<b>Molekulová hmotnosť (g/mol)</b>	<b>Navážka (mg)</b>
<b>1A</b>	362,308	5,73
<b>2A</b>	390,362	5,40
<b>3A</b>	418,416	5,35
<b>4A</b>	446,470	5,87
<b>5A</b>	474,524	5,08
<b>6A</b>	502,578	5,31
<b>1B</b>	610,384	4,83
<b>2B</b>	638,438	5,10
<b>3B</b>	666,492	5,20
<b>4B</b>	694,546	5,20

Tabuľka popisuje jednotlivé látky, usporiadané podľa ich názvu, pričom molekulová hmotnosť, vyjadrená v jednotkách g/mol, sa zvyšuje vďaka ich rastúcemu alkylovému reťazci. Tabuľka je zároveň doplnená o navážky látok v mg. Sú rozdelené do dvoch skupín podľa spoločného charakteru, vlastností molekuly, teda látky prvej skupiny označenej „**1A - 6A**“ obsahujú vo svojej molekule jednu soľ,

teda jeden kation a jeden anion a látky druhej skupiny označenej „**1B - 4B**“ obsahujú dva kationy a dva anióny. Kation je kladne nabitý  $N^+$  a aniónom je halogén, v tomto prípade  $Br^-$ . Látky boli syntetizované v laboratóriu, v Centre biomedicínskeho výskumu Fakultnej nemocnice v Hradci Králové. Na základe molekulovej hmotnosti a navážky látok bolo nevyhnutné zistiť koncentráciu potrebnú na prípravu zásobného roztoku  $V_{DMSO}$ . Všetky látky, použité v rámci experimentálnej časti bolo nutné otestovať v triplikáte, aby boli zistené prípadné chyby pri práci.

Výpočty objemov jednotlivých látok:

$$1A. V_{DMSO} = \frac{0,00573}{362,308 \times 0,025 \times 100} = x \text{ l DMSO} \times 10^6 = 632,61 \text{ ul DMSO}$$

$$2A. V_{DMSO} = \frac{0,0054}{390,362 \times 0,025 \times 100} = x \text{ l DMSO} \times 10^6 = 553,33 \text{ ul DMSO}$$

$$3A. V_{DMSO} = \frac{0,00535}{418,416 \times 0,025 \times 100} = x \text{ l DMSO} \times 10^6 = 511,45 \text{ ul DMSO}$$

$$4A. V_{DMSO} = \frac{0,00587}{446,470 \times 0,025 \times 100} = x \text{ l DMSO} \times 10^6 = 525,90 \text{ ul DMSO}$$

$$5A. V_{DMSO} = \frac{0,00508}{474,524 \times 0,025 \times 100} = x \text{ l DMSO} \times 10^6 = 428,22 \text{ ul DMSO}$$

$$6A. V_{DMSO} = \frac{0,00531}{502,578 \times 0,025 \times 100} = x \text{ l DMSO} \times 10^6 = 422,69 \text{ ul DMSO}$$

$$1B. V_{DMSO} = \frac{0,00483}{610,384 \times 0,025 \times 100} = x \text{ l DMSO} \times 10^6 = 316,522 \text{ ul DMSO}$$

$$2B. V_{DMSO} = \frac{0,0051}{638,438 \times 0,025 \times 100} = x \text{ l DMSO} \times 10^6 = 319,5298 \text{ ul DMSO}$$

$$3B. V_{DMSO} = \frac{0,0052}{666,492 \times 0,025 \times 100} = x \text{ l DMSO} \times 10^6 = 312,0818 \text{ ul DMSO}$$

$$4B. V_{DMSO} = \frac{0,0052}{694,546 \times 0,025 \times 100} = x \text{ l DMSO} \times 10^6 = 299,476 \text{ ul DMSO}$$

### 6.2.5 Testovanie

Vo chvíli, keď bolo v sterilnej skúmavke 3,96 ml rastového média a 40  $\mu$ l rozpustenej testovanej látky, tak sa 200  $\mu$ l tohto roztoku asepticky prenieslo do všetkých jamiek prvého stĺpca mikrotitračnej dosičky a do všetkých jamiek 2. a 3. stĺpca sa prenieslo 100  $\mu$ l tohto roztoku. Následne sa do sterilného rezervoáru pripravilo médium s 1% DMSO (teda 1 ml DMSO do 99 ml média). 100  $\mu$ l tohto média sa asepticky napipetovalo multikanálovou pipetou do všetkých jamiek stĺpcov 2-11 mikrotitračnej dosičky. Do jamiek posledného dvanástého stĺpca sa napipetovalo 200  $\mu$ l tohto média. Tento 12. stĺpec slúžil ako kontrolný. Kontroloval sa ním nárast baktérii. Následne sa premiešali jamky 2. stĺpca multikanálovou pipetou a potom premiešali jamky 3. stĺpca a prenieslo sa 100  $\mu$ l z 3. jamky do 4. jamky a týmto spôsobom až do jamky 11. stĺpca. Z 11. stĺpca sa po premiešaní odstránilo 100  $\mu$ l do odpadu. Následne sa doplnili všetky jamky stĺpcov 3-11 a práve 100  $\mu$ l média s 1% DMSO. Po tomto kroku nasledovalo napipetovanie 10  $\mu$ l pripravenej suspenzie do každej jamky jedného riadku. Na každý riadok pripadal jeden bakteriálny kmeň. Po prevedení týchto krokov sa mikrotitračná dosička prikryla viečkom a nechala sa inkubovať v termostate pri  $35\pm 1^\circ\text{C}$ . Týmto postupom bolo dosiahnuté, že v prvej jamke bola koncentrácia riediacej rady 250  $\mu\text{mol/l}$ , v druhej jamke 125  $\mu\text{mol/l}$ , v tretej jamke 62,5  $\mu\text{mol/l}$ , atď. V 12. jamke, ktorá slúžila ako kontrola rastu bolo 200  $\mu$ l média s 1% DMSO a zároveň 10  $\mu$ l bakteriálnej suspenzie.

### 6.2.6 Vyhodnotenie a odočet minimálnej inhibičnej koncentrácie

Hodnota MIC sa odčítala po kultivácii v inkubátore po 48 hodinách v jamke s najnižšou koncentráciou testovanej látky, kde už nebol zaznamenaný rast baktérie. K odčítaniu výsledkov MIC bol využitý spektrofotometer pri vlnovej dĺžke 600 nm.

Na základe získaných výsledkov každého z troch rôznych meraní látok bolo možné získať koncentrácie v jednotkách  $\mu\text{mol/l}$  pomocou spektrofotometra a po tomto kroku nasledovalo ich znázornenie do stĺpcov grafov (resp. tabuliek). Pri inhibícii

rastu boli hodnoty preukazateľné v prípade, pokiaľ číselná hodnota v tabuľke získanej spektrofotometrom (**tabuľka 2**) bola pod 0,1 optickej hustoty (OD) – zhodnotenie na základe doporučeného postupu. Vzhľadom na to, že pri meraniach látok vyšla koncentrácia rovnako v troch prípadoch meraní, teda aj v prípade, že nedošlo k inhibícii rastu pri maximálnej použitej koncentrácii bola aj v tomto prípade znázornená prostredníctvom jedného zhrnujúceho grafu alebo tabuľky. (**graf 1-4**)

## 7. VÝSLEDKY

### 7.1 Hodnotenie antimikróbnej aktivity na suspenzii baktérii

Cieľom tejto diplomovej práce bolo zistiť v mikrobiologickom laboratóriu antimikróbnu účinnosť KAS, teda vyhodnotenie ich účinnosti, ktoré prebiehalo prostredníctvom zistenia MIC. V rámci hodnotenia antimikróbnej aktivity 8 látok na G<sup>+</sup> a G<sup>-</sup> baktérie bolo potrebné sumarizovať zistené výsledky graficky, zahrňujúce použité koncentrácie. Zameraním sa na MIC rôznych látok bolo možné dôjsť k záverom, teda k zisteniu, ktorá látka vykazuje účinok a prípadne ktoré látky je možné použiť pri ďalšom testovaní.

V **grafoch 1 až 4** sú porovnávané účinky látok na rôzne bakteriálne kmene, G<sup>+</sup>, G<sup>-</sup>. Každý stĺpec v grafe (výsledky vyjadrené v  $\mu\text{mol/l}$ ) zastupuje rovnaké výsledky predchádzajúcich troch meraní (grafov, resp. stĺpcov). Vo väčšine prípadov nedošlo k inhibícii rastu baktérie pri danej koncentrácii. V prípade, kde bolo nutné „nariadenie“ na koncentráciu 125  $\mu\text{mol/l}$  alebo 62,5  $\mu\text{mol/l}$  je táto hodnota považovaná za najvyššiu testovanú koncentráciu príslušnej baktérie.

K výsledkom je potrebné spomenúť látky, označené **2A a 6A**, ktoré neboli rozpustné ani po dôkladnom premiešaní na prístroji vortex, teda nebolo možné ich testovať ani po nariadení skúmaného roztoku.

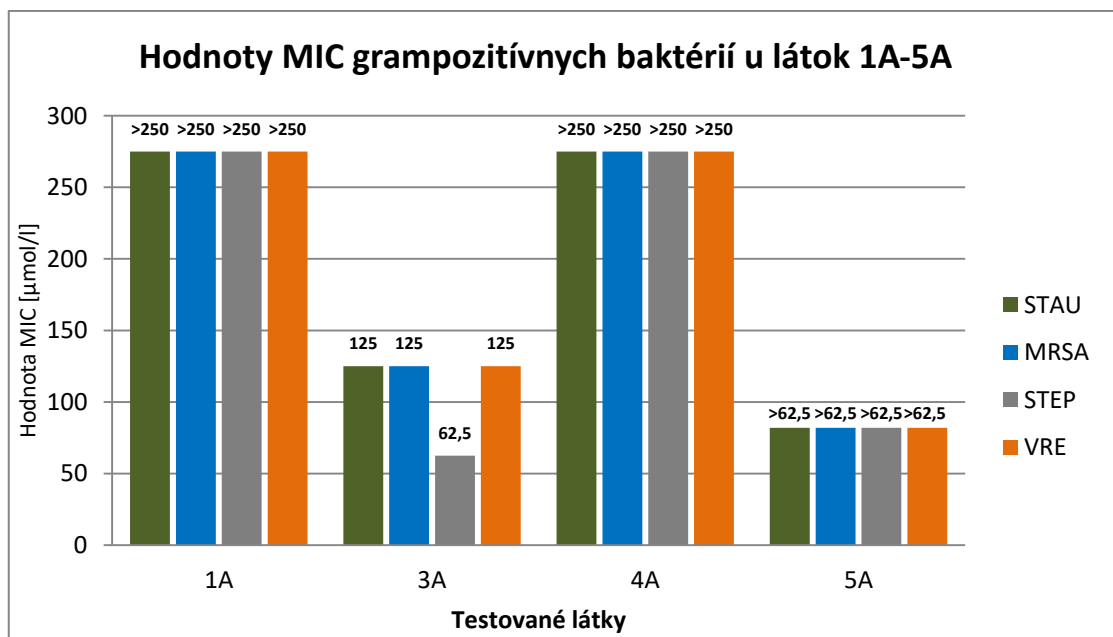
Na základe výsledkov a ich následnom grafickom znázornení v **grafe 1** bolo možné zhrnúť, že kmene STAU, MRSA, VRE boli najviac citlivé na testovanú látku, označenú „**3A**“ o príslušnej koncentrácii 125  $\mu\text{mol/l}$ . Látka **3A** bola najviac účinná, čo aj vzhľadom k predpokladanej dĺžke alkylového reťazca bolo očakávané. Najviac bola účinná na bakteriálny kmeň STEP, pričom koncentrácia potrebná na inhibíciu bola už 62,5  $\mu\text{l/mol}$ .

V **grafe 1** je popísaný účinok látok **1A**, **3A**, **4A** a **5A** na G<sup>+</sup> baktérie z prvej skupiny látok líšiacich sa počtom uhlíkov naviazaných na N<sup>+</sup>. Grafické znázornenie poukazuje na porovnanie citlivosti 4 testovaných baktérii G<sup>+</sup>, ktoré preukazovali najväčšiu citlivosť na testovanú látku označenú „**3A**“. V prípade bakteriálnych kmeňov STAU, MRSA a VRE, ktoré patria do skupiny G<sup>+</sup> baktérii bolo zistené, že látka **3A** na tieto baktérie pôsobí inhibíciou rastu už pri 125 µmol/l. V prípade bakteriálneho kmeňa STEP, ktorý patrí medzi G<sup>+</sup> baktérie, z výsledkov vyplynulo, že kmeň bol citlivý na koncentráciu 62,5 µmol/l.

Látky **1A** a **4A** boli pri testovaní preukázané ako menej účinné, vzhľadom na to, že spektrofotometer nezaznamenal požadovanú hodnotu OD menej ako 0,1 na dokázanie inhibície rastu. Z tohto dôvodu sú v **grafe 1** tieto výsledky znázornené koncentráciou > 250 µmol/l.

Látka **5A** v **grafe 1** a **grafe 3**, pri ktorej je znázornená koncentrácia > 62,5 µmol/l bola nerozpustná pri pôvodnej koncentrácii, a preto ju bolo potrebné zriediť vo väčšom množstve DMSO až dvojnásobne. Na účinok látky **5A** je teda potrebná vyššia koncentrácia. Látka **5A** zároveň vykazovala najhorší účinok spomedzi látok prvej série vzhľadom na to, že nebola účinná ani na G<sup>+</sup> ani na G<sup>-</sup> bakteriálne kmene a bol problém s jej rozpúšťaním v zásobnom roztoku DMSO.

Graf 1 – Testované látky 1A-5A a ich účinok na G+ baktérie

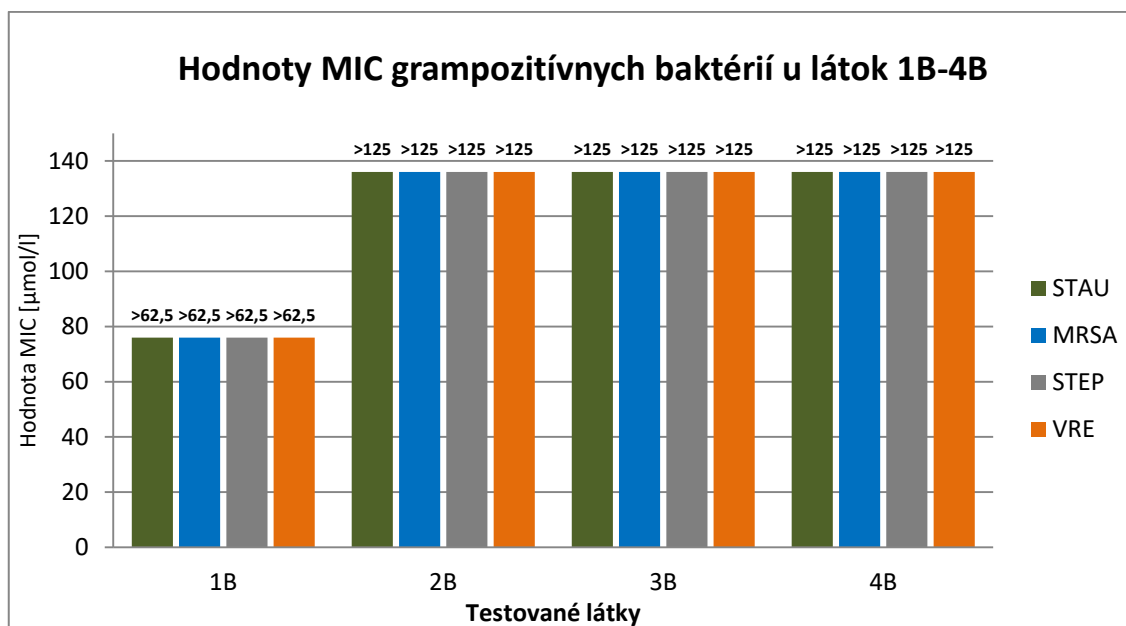


MIC – minimálna inhibičná koncentrácia v  $\mu\text{mol/l}$ , STAU - *Staphylococcus aureus*, MRSA - methicillín-rezistentný *Staphylococcus aureus*, STEP - *Staphylococcus epidermidis*, VRE - vankomycin-rezistentný *Enterococcus*

Hodnoty so znamienkom „>“ vyjadrujú, že došlo k rezistencii baktérie na najvyššiu testovanú koncentráciu. V prípade hodnoty  $> 250 \mu\text{mol/l}$ , došlo k rezistencii baktérie pri MIC =  $250 \mu\text{mol/l}$ . Podobne to je aj v prípade koncentrácie  $> 62,5 \mu\text{mol/l}$ .

Látky **1B**, **2B**, **3B** a **4B** z druhej testovanej skupiny látok pôsobiace na G+ sú znázornené v **grafe 2**. Tieto látky sú obohatené o pyridín a zároveň novú soľ, tvorenú kationom – kladne nabitý N<sup>+</sup> a aniónom – záporne nabitý Br<sup>-</sup> a bol sledovaný ich účinok na G+ baktérie. Viditeľné v grafoch sú predovšetkým 3 koncentrácie, ktoré boli pri zisťovaní hodnôt MIC v experimentálnej časti najviac používané. Jednalo sa o hodnoty  $250 \mu\text{mol/l}$  a po nariadení sa následne pracovalo s hodnotami  $125 \mu\text{mol/l}$  a  $62,5 \mu\text{mol/l}$  (v prípade látky **1B**). Roztok sa nariedoval v prípade, pokiaľ nebol dostatočne rozpustný na prístroji vortex. Tento krok bol nutný v prípade látok **1B**, **2B**, **3B** a **4B** (vrátane látky **5A**). V mnohých prípadoch pri vyššie uvedených koncentráciách ani po nariadení nedošlo k inhibícii rastu.

**Graf 2 – Testované látky 1B-4B a ich účinok na G+ baktérie**



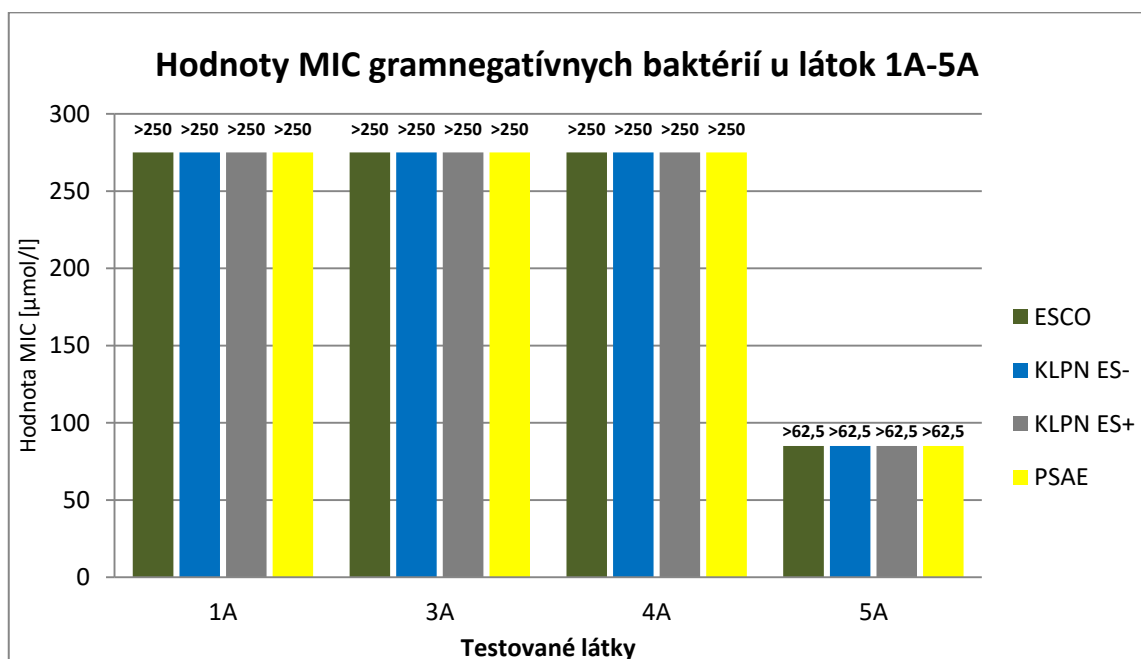
MIC – minimálna inhibičná koncentrácia v µmol/l, STAU - *Staphylococcus aureus*, MRSA - methicillín-rezistentný *Staphylococcus aureus*, STEP - *Staphylococcus epidermidis*, VRE - vankomycin-rezistentný *Enterococcus*

Hodnoty so znamienkom „>“ vyjadrujú, že došlo k rezistencii baktérie na najvyššiu testovanú koncentráciu. V prípade hodnoty > 125 µmol/l, došlo k rezistencii baktérie pri MIC = 125 µmol/l. Podobne to je aj v prípade koncentrácie > 62,5 µmol/l.

V grafe 3 je popísaný účinok látok 1A, 3A, 4A a 5A na G- baktérie z prvej skupiny látok líšiacich sa počtom uhlíkov naviazaných na N+. Z výsledkov vyplýva, že G- baktérie boli voči týmto látkam rezistentné.



**Graf 3 – Testované látky 1A-5A a ich účinok na G- baktérie**

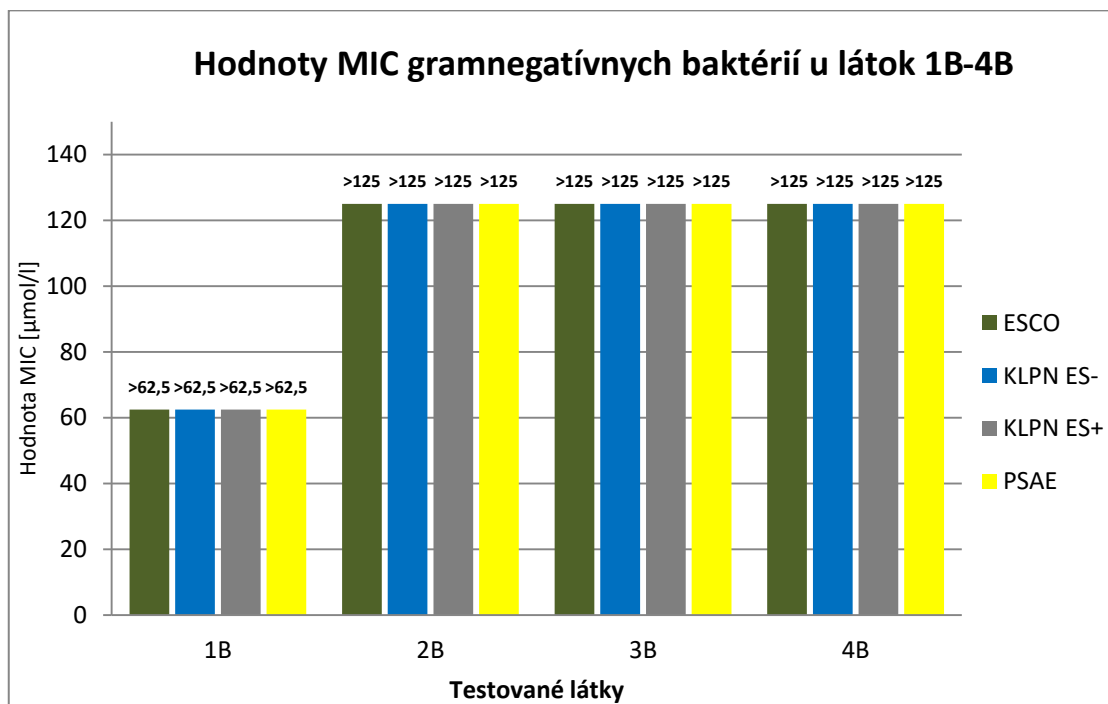


MIC – minimálna inhibičná koncentrácia v  $\mu\text{mol/l}$ , ESCO - *Escherichia coli*, KLPN ES- *Klebsiella pneumoniae* neprodukováca širokospektré  $\beta$ -laktamázy, KLPN ES+ *Klebsiella pneumoniae* produkujúca širokospektré  $\beta$ -laktamázy, PSAE - multirezistentný *Pseudomonas aeruginosa*

Hodnoty so znamienkom „>“ vyjadrujú, že došlo k rezistencii baktérie na najvyššiu testovanú koncentráciu. V prípade hodnoty  $> 250 \mu\text{mol/l}$ , došlo k rezistencii baktérie pri MIC =  $250 \mu\text{mol/l}$ . Podobne to je aj v prípade koncentrácie  $> 62,5 \mu\text{mol/l}$ .

Látky **1B**, **2B**, **3B** a **4B** z druhej testovanej skupiny látok, ktorých súčasťou je pyridín, pôsobiace na G-, sú znázornené v **grafe 4**. Látky **2B**, **3B** a **4B** nevykazovali významnú MIC ani po nariedení na  $125 \mu\text{mol/l}$  resp. na  $62,5 \mu\text{mol/l}$  u látky **1B**. Predpokladom účinku testovaných látok na G- baktérie bol zvyšujúci sa reťazec uhlíkov, pričom pri počte uhlíkov  $C_{14}$  -  $C_{16}$  malo dôjsť k inhibícii rastu. V tomto prípade pri testovaní ani v jednom prípade nedošlo k zníženiu rezistencie baktérii. V prípade látky **1B** je zamýšľaný účinok vyšší pri koncentrácií  $> 62,5 \mu\text{mol/l}$  a u látok **2B**, **3B**, **4B** je požadovaný účinok vyšší pri koncentrácií  $> 125 \mu\text{mol/l}$ . Možný predpokladaný zvýšený účinok dvojitej soli KAS nebol rovnako potvrdený.

Graf 4 – Testované látky 1B-4B a ich účinok na G- baktérie



MIC – minimálna inhibičná koncentrácia v  $\mu\text{mol/l}$ , ESCO - *Escherichia coli*, KLPN ES- *Klebsiella pneumoniae* neprodukujúca širokospektré  $\beta$ -laktamázy, KLPN ES+ *Klebsiella pneumoniae* produkujúca širokospektré  $\beta$ -laktamázy, PSAE - multirezistentný *Pseudomonas aeruginosa*

Hodnoty so znamienkom „>“ vyjadrujú, že došlo k rezistencii baktérie na najvyššiu testovanú koncentráciu. V prípade hodnoty  $> 250 \mu\text{mol/l}$ , došlo k rezistencii baktérie pri MIC =  $250 \mu\text{mol/l}$ . Podobne to je aj v prípade koncentrácie  $> 62,5 \mu\text{mol/l}$ .

## 7.2 Porovnanie testovaných látok so štandardmi benzalkónia

8 testovaných látok bolo po vyhodnotení výsledkov porovnaných so štandardmi benzalkónium bromidu 12, 14, 16 (BAC-Br 12, 14, 16). Tieto látky sa pri testovaní KAS javia ako účinné zlúčeniny s vysokou účinnosťou zahrňujúcou výslednú MIC na priaznivých hodnotách.

Pri porovnaní 8 látok na bázi KAS s látkami zahrňujúcimi v odbornom článku bola zisťovaná podobnosť výsledkov, ktoré boli výsledkom tejto experimentálnej časti práce s výsledkami, ktoré boli uskutočnené odborne za účasti niekoľkých autorov [12,39].

Pri porovnaní so štandardmi benzalkónia 12, 14, 16 bolo zrejmé, že látky z prvej skupiny označenej „**1 až 5A**“ (tabuľka 2), vykazovali výrazne horšie inhibičné vlastnosti, v porovnaní so štandardmi. Látka, ktorá bola v rámci experimentálnej časti najúčinnější, teda **3A**, pri porovnávaní so štandardmi nevykazovala inhibičnú hodnotu porovnateľnú tej za použitia štandardov. Rozdiel koncentrácií v rámci použitého dvojkového riedenia týchto látok bol radovo rozdielny vo väčšine prípadov a u väčšiny bakteriálnych kmeňov. Rozdiel v 1 rade sa vyskytol u látky **5A** so štandardom **BAC-Br 12**, pôsobiacich na bakteriálny kmeň KLPN ES+ a KLPN ES-. Avšak koncentrácie potrebné na dosiahnutie „zhody“ neboli preukázané u žiadnej z látok. Z tejto skupiny neboli podobné ani pri testovaní baktérii STAU, MRSA, STEP, VRE, ESCO, KLPN ES+. V prípade bakteriálneho kmeňa G-, baktérie KLPN ES- u látky **5A**, sa naskytuje možná podobnosť so štandardom **BAC-Br 12**, avšak bolo by potrebné uskutočniť ďalšie merania. Bakteriálny kmeň PSAE v rámci celého hodnotenia, ukazuje na podobnosť výsledkov pri testovaní s výsledkami z odborného článku. Koncentrácie v tomto prípade sú v prípade látok **1A, 3A a 4A** podobné, ako so štandardmi. Aj pri tzv. nedosiahnutej inhibícii rastu pri 250 µmol/l porovnanie koncentrácie značí podobný výsledok [11,12, 39].

**Tabuľka 2 – Hodnoty MIC po 48 hodinovej inkubácii pre látky skupiny označené „1 - 5A“ a štandardy benzalkónia-Br 12, 14, 16**

Kmeň	Minimálna inhibičná koncentrácia (μmol/l) po 48hod. inkubácií						
	1A	3A	4A	5A	BAC-Br 12	BAC-Br 14	BAC-Br 16
<b>STAU</b>	>250	125	>250	>62,5	3,26	1,14	1,3
<b>MRSA</b>	>250	125	>250	>62,5	5,37	0,98	1,47
<b>STEP</b>	>250	62,5	>250	>62,5	15,63	0,49	0,49
<b>VRE</b>	>250	125	>250	>62,5	13,68	2,93	2,44
<b>ESCO</b>	>250	>250	>250	>62,5	15,63	3,91	3,91
<b>KLPN ES+</b>	>250	>250	>250	>62,5	31,25	7,81	3,91
<b>KLPN ES-</b>	>250	>250	>250	>62,5	78,13	15,63	11,72
<b>PSAE</b>	>250	>250	>250	>62,5	>500	250	375

BAC-Br 12, BAC-Br 14 a BAC-Br 16 – štandardy benzalkónium bromidu slúžiace ako porovnávacie látky, líšiac sa počtom uhlíkov v alkylovom reťazci, s počtom uhlíkov C<sub>12</sub>-C<sub>14</sub>-C<sub>16</sub>.

MIC – minimálna inhibičná koncentrácia v μmol/l, STAU - *Staphylococcus aureus*, MRSA - methicillín-rezistentný *Staphylococcus aureus*, STEP - *Staphylococcus epidermidis*, VRE - vankomycin-rezistentný *Enterococcus*

ESCO - *Escherichia coli*, KLPN ES– *Klebsiella pneumoniae* neprodukuje širokospektré β-laktamázy, KLPN ES+ *Klebsiella pneumoniae* produkuje širokospektré β-laktamázy, PSAE - multirezistentný *Pseudomonas aeruginosa*

Hodnoty so znamienkom „>“ vyjadrujú, že došlo k rezistencii baktérie na najvyššiu testovanú koncentráciu. V prípade hodnoty > 250 μmol/l, došlo k rezistencii baktérie pri MIC = 250 μmol/l. Podobne to je aj v prípade koncentrácie > 62,5 μmol/l.

V **tabuľke 3** sú uvedené látky druhej skupiny, s označením **1B, 2B, 3B, 4B** a ich hodnota MIC. Zároveň sú tieto látky porovnávané so štandardmi benzalkónia (benzalkónium bromid C<sub>12, 14</sub> a 16) s uvedením ich MIC, ako v predchádzajúcom prípade. V prípade, že je pri koncentrácii znamienko „>“, znamená to, že pri danej koncentrácii nebola dosiahnutá požadovaná inhibícia rastu bakteriálneho kmeňa.

Pri porovnávaní so štandardmi benzalkónia 12, 14, 16, z výsledkov vyplýva, že látky z druhej skupiny označenej „**1 až 4B**“, testované rovnakým spôsobom, vykazovali prevažne horšie inhibičné vlastnosti v porovnaní so štandardmi. Výsledné dosiahnuté koncentrácie látok, ktoré boli získané po ich zhodnotení prístrojom boli nemenné v rámci ich účinku na rôzne bakteriálne kmene a v prípade každej látky bolo zistené, že na to, aby bola látka účinnejšia, musí byť použitá jej vyššia koncentrácia.

Podobne, ako v prípade látok prvej skupiny, koncentrácia sa líšila minimálne o jeden rad, v prípade porovnania účinku látky **1B** s **BAC-Br 12**, na G- bakteriálny kmeň ESCO. Rovnako to bolo v prípade porovnania tej istej látky, teda **1B** s **BAC-Br 12** na KLPN ES+.

Bakteriálny kmeň PSAE bol znovu podobný výsledkom v rámci predchádzajúceho hodnotenia. Vzhľadom na to, že v prípade koncentrácií, ktoré ukazujú neúčinnosť na PSAE je na účinok potrebné dosiahnutie vyššej koncentrácie. Výsledky sa v tomto prípade teda znovu zhodujú iba v tom, že pri koncentráciách 62,5 a 125 µmol/l, nebola dosiahnutá potrebná inhibícia rastu [12,39].

**Tabuľka 3 – Hodnoty MIC po 48 hodinovej inkubácii pre látky skupiny označené „1 – 4 B“ a štandardy benzalkónia-Br 12, 14, 16**

Kmeň	Minimálna inhibičná koncentrácia (μmol/l) po 48hod. inkubácií						
	1B	2B	3B	4B	BAC-Br 12	BAC-Br 14	BAC-Br 16
<b>STAU</b>	>62,5	>125	>125	>125	3,26	1,14	1,3
<b>MRSA</b>	>62,5	>125	>125	>125	5,37	0,98	1,47
<b>STEP</b>	>62,5	>125	>125	>125	15,63	0,49	0,49
<b>VRE</b>	>62,5	>125	>125	>125	13,68	2,93	2,44
<b>ESCO</b>	>62,5	>125	>125	>125	15,63	3,91	3,91
<b>KLPN ES+</b>	>62,5	>125	>125	>125	31,25	7,81	3,91
<b>KLPN ES-</b>	>62,5	>125	>125	>125	78,13	15,63	11,72
<b>PSAE</b>	>62,5	>125	>125	>125	>500	250	375

BAC-Br 12, BAC-Br 14 a BAC-Br 16 – štandardy benzalkónium bromidu slúžiace ako porovnávacie látky, líšiace sa počtom uhlíkov v alkylovom reťazci, s počtom uhlíkov C<sub>12</sub>-C<sub>14</sub>-C<sub>16</sub>.

MIC – minimálna inhibičná koncentrácia v μmol/l, STAU - *Staphylococcus aureus*, MRSA - methicillín-rezistentný *Staphylococcus aureus*, STEP - *Staphylococcus epidermidis*, VRE - vankomycin-rezistentný *Enterococcus*

ESCO - *Escherichia coli*, KLPN ES– *Klebsiella pneumoniae* neprodukujúca širokospektré β-laktamázy, KLPN ES+ *Klebsiella pneumoniae* produkujúca širokospektré β-laktamázy, PSAE - multirezistentný *Pseudomonas aeruginosa*

Hodnoty so znamienkom „>“ vyjadrujú, že došlo k rezistencii baktérie na najvyššiu testovanú koncentráciu. V prípade hodnoty > 125 μmol/l, došlo k rezistencii baktérie pri MIC = 125 μmol/l. Podobne to je aj v prípade koncentrácie > 62,5 μmol/l.

## 8. Diskusia

V diplomovej práci boli testované nové série látok KAS, rôzne dĺžky ich homológov, ich protimikróbny účinok na bakteriálne kmene pomocou BMD. Vzhľadom na to, že táto metóda je vysoko citlivá a účinná, vyhovuje testovaniu viacerých bakteriálnych kmeňov naraz. Testovacia séria látok obsahovala 10 nových látok rozdelených do dvoch skupín. Z dôvodu nevyhovujúcich fyzikálno-chemických vlastností (predovšetkým rozpustnosti) neboli testované 2. Po navážení látok nasledovala príprava vhodného roztoku a takisto aj suspenzií bakteriálnych kmeňov.

V týchto sériách (skupinách) prebiehalo testovanie pomocou BMD, na základe ktorej sa zisťovala inhibícia rastu baktérii. Výsledky sa zhodnotili jednak vizuálne tak, že v mieste inhibície rastu nebol prítomný zákal, ale predovšetkým spektrofotometrom pri vlnovej dĺžke 600 nm. Testovali sa bakteriálne kmene G<sup>+</sup> a G<sup>-</sup> baktérii. K dispozícii boli na porovnanie účinku KAS 4 druhy G<sup>+</sup> aj G<sup>-</sup> baktérii, aby bolo možné overenie ich inhibície navzájom po otestovaní.

Medzi G<sup>+</sup> baktérie, ktoré boli použité patrili STAU, STEP, MRSA a VRE. Medzi G<sup>-</sup> baktérie patrili ESCO, KLPN ES<sup>-</sup>, KLPN ES<sup>+</sup>, PSAE.

### Závislosť účinku na štruktúre

Najúčinnejšia spomedzi testovaných látok na bázi KAS bola látka s dĺžkou reťazca C<sub>12</sub>, teda látka označená **3A**. Táto látka mala teda v porovnaní so zvyškom iných látok z prvej skupiny o niečo kratšiu dĺžku alkylového reťazca naviazanú na N<sup>+</sup>. Vďaka tejto vlastnosti, práve látka označená **3A** účinkovala predovšetkým na G<sup>+</sup> bakteriálne kmene STAU, MRSA, VRE. Zároveň v rámci testovania iných látok, v rámci hodnotenia výsledkov bolo potvrdené, že predovšetkým kmene STAU, MRSA, VRE je možné označiť za najviac citlivé s najnižšou mierou rezistencie. V tomto prípade, za použitia testovanej látky **3A** bol u týchto baktérii účinok dosiahnutý pri koncentrácii 125 μmol/l. Látka vykazovala účinok rovnako aj pri nižšej koncentrácii, teda 62,5 μmol/l u jedného z bakteriálnych kmeňov. Za použitia koncentrácie 125 μmol/l bola látka **3A** účinná na bakteriálne kmene STAU,

MRSA, VRE. Ako jediná z látok, ktoré boli pri experimentálnej časti použité bol dokázaný účinok na G<sup>+</sup> bakteriálny kmeň STEP, a to pri koncentrácií 2x nižšej, a teda 62,5 µmol/l. U týchto baktérii sa javila látka ako najúčinnjšia. Účinok na G<sup>+</sup> bakteriálne kmene je aj v tomto prípade v súvislosti s dĺžkou reťazca alkyly C<sub>12</sub>-C<sub>14</sub> očakávaný [56].

V tomto prípade ide o G<sup>+</sup> baktérie s jednou vrstvou bunkovej steny, preto penetrácia látky na bázi KAS bola práve u týchto kmeňov najviac účinná. Prvá látka neúčinkovala na bakteriálne kmene G<sup>-</sup>, aj napriek tomu, že sa jednalo o reťazec so skoro vhodnou dĺžkou alkylov. Iné bakteriálne kmene, teda G<sup>-</sup> baktérie ako ESCO, KLPN ES<sup>+</sup>, KLNP ES<sup>-</sup> a PSAE nevykazovali významnú inhibíciu rastu. Avšak najväčší účinok látky z tejto skupiny štyroch baktérii bol práve na bakteriálny kmeň PSAE.

Látky **2A** a **6A** neboli testované vzhľadom k tomu, že neboli dostatočne rozpustné ani po niekoľkonásobnom nariadení. Na základe toho bolo zrejmé, že hodnotenie týchto látok s dĺžkou reťazca C<sub>10</sub> u látky **2A** a C<sub>18</sub> u látky **6A** nebolo možné preukázať. U týchto látok teda aj po premiešaní na prístroji vortex nedošlo k rozpusteniu častíc látky. V tomto prípade sa mohlo jednať o to, že zlúčeniny vzhľadom na ich štruktúru neboli v DMSO rozpustné.

Látka **1A** nemôže byť uvedená do praxe, vzhľadom k tomu, že nespĺňa podmienku inhibície rastu, pričom mala mať pri tomto testovaní hodnotu 0,1 OD. Testovanie tejto látky vyšlo v jednom prípade z troch meraní hranične, v iných prípadoch hodnotenia MIC bolo zrejmé, že látka je neúčinná. Jednalo sa o látku s najkratším alkylovým reťazcom, teda C<sub>8</sub>.

Testovaná látka **1B** nevykazovala významný účinok ani na jeden bakteriálny kmeň. V prípade tejto látky prítomnosť pyridínu a zároveň prítomnosť ďalšej soli nemalo pozitívny vplyv na účinok, ktorý bol naopak výrazne znížený.

Zhrnutím predchádzajúceho a porovnaním s odbornou literatúrou je nutné poznamenať, že látka **1A**, mala dĺžku uhlíkového reťazca až príliš krátku [12,38]. Pri látke **1A** s počtom uhlíkov C<sub>8</sub> bolo predpokladané, že bude mať iba slabý účinok na G<sup>+</sup> baktérie. Pri testovaní látky bolo zrejmé, že táto látka dosiahla malú inhibíciu u



bakteriálneho kmeňa G+ STEP. G+ bakteriálny kmeň STEP bol pri jednom z troch testov citlivý na látku **1A**, pri ďalšom testovaní sa výsledok nezopakoval. Výsledok bol podobný aj pri treťom testovaní. Na základe toho mala byť vylúčená možnosť chyby a tento výsledok sa potvrdil. Porovnaním s odbornou literatúrou bolo možné zistiť, že dĺžka uhlíkového reťazca je zásadná, pričom vyššie testované látky mali tento reťazec príliš krátky [1,32,33,54].

Testovanú látku **5A** bolo potrebné nariediť vzhľadom k tomu, že vykazovala zákal pri koncentrácií 250  $\mu\text{mol/l}$ . Ani pri koncentrácií 125  $\mu\text{mol/l}$  nedošlo k požadovanej čírosti, preto konečná koncentrácia, ktorá bola pri testovaní tejto látky použitá, bola 62,5  $\mu\text{mol/l}$ . Avšak za použitia tejto koncentrácie nedošlo k inhibícii rastu žiadného z bakteriálnych kmeňov.

Látka **5A** obsahovala dlhší alkylový reťazec, o dĺžke  $C_{16}$ . Vzhľadom k tomu, že látka s dĺžkou reťazca  $C_{18}$  je podľa literatúry na baktérie neúčinná, tento výsledok mohol byť predpokladom príliš dlhého uhlíkového reťazca a problémovému presupu cez membrány [43].

Látka **6A** nebola testovaná z dôvodu zlej rozpustnosti, čo mohlo byť zapríčinené počtom uhlíkov  $C_{18}$ . Látka sa nerozpustila ani pri otestovaní nižších koncentráciách. Pri možnej obmene štruktúry, napríklad pri naviazaní ďalšej hydroxy skupiny bola predpokladom lepšia rozpustnosť. Pri tejto látke bolo následne očakávané, že aj práve z rovnakého dôvodu (dĺžky alkylového reťazca) nebude prestupovať cez membrány. Tento výsledok by bol vzhľadom k počtu uhlíkov očakávaný ako nevýrazný.

Látky **1B**, **2B**, **3B**, **4B**, ktoré boli súčasťou druhej skupiny látok, nezaznamenali výrazný účinok a to mohlo nastať z dôvodu prítomnosti naviazaného pyridínu na alkylový reťazec. Hlavným rozdielom medzi týmito látkami bola dĺžka alkylového reťazca, ktorá v tomto prípade však nemala značný rozdiel na konečné výsledky. Aj po dôkladnom zvortexovaní týchto látok nedošlo k ich rozpusteniu. Často krát bol u týchto látok viditeľný zákal. Predpokladom bolo, že iba malá časť roztoku látok pri tomto zvortexovaní a umiestnení do ultrazvukovej lázne, došla do bodu, keď sa uhlíkový reťazec naviazaný na pyridín tzv. „otvoril“ a účinkoval. U týchto látok nebola dosiahnutá MIC ani v prípade jednej látky.

V nadväznosti na predchádzajúce v prípade látok **2B**, **3B**, **4B** je nutné zhrnúť, že tieto látky obsahujúce pyridínový kruh a ďalší komplex kation-anión, nepreukázali významný účinok ani po nariadení na koncentráciu 125  $\mu\text{mol/l}$  ani látka **1B** o koncentrácii 62,5  $\mu\text{mol/l}$ . Nastal rovnaký problém, ako v predchádzajúcich prípadoch, znova z dôvodu ich horšej rozpustnosti, resp. nedostatočnej čírosti roztoku.

V prípade G<sup>+</sup> baktérii bol maximálny účinok dosiahnutý u látky s dĺžkou alkylového reťazca C<sub>12</sub>. Na základe tohto počtu uhlíkov KAS, podľa dostupných zdrojov z článkov, bolo možné predpokladať značnú inhibíciu rastu baktérii [12,39]. V prípade G<sup>+</sup> baktérii je vhodná dĺžka alkylového reťazca C<sub>12</sub>-C<sub>14</sub>, v prípade G<sup>-</sup> baktérii je nutné navýšenie počtu uhlíkov v alkylovom reťazci s vhodnou dĺžkou C<sub>14</sub>-C<sub>16</sub>. Testovaním a zverejnením informácií v mnohých publikáciách sa naskytlo zistenie, že zlúčeniny obsahujúce menej než 4 uhlíky alebo viac než 18 uhlíkov sú neaktívne, pretože narastá problém prestupu KAS cez membránu [33].

### **Porovnanie nových látok na bázi KAS a príkladov látok z odbornej literatúry**

V prípade G<sup>-</sup> baktérii boli v rámci článku testované prevažne iné bakteriálne kmene [32]. Podobnosťou sa výsledky zhodujú v prípade G<sup>-</sup> baktérie *Pseudomonas aeruginosa*, ktorý aj v prípade odborného testovania množstva nových látok bol rezistentný na všetky použité kmene baktérii. Podobne rezistentný kmeň bol aj v prípade látok, ktoré boli testované v rámci experimentálnej časti práce. Baktérie  $\beta$ -laktamáza negatív a zároveň G<sup>-</sup> baktérie, KLPN ES<sup>+</sup> a KLPN ES<sup>-</sup>, ktoré boli porovnávané s látkou 3-methoxy-1-tetradecylpyridinium bromid, vykazovali v článku citlivosť pri koncentrácií MIC = 250  $\mu\text{mol/l}$  (odhadom z grafu znázorneného v článku). V tomto prípade však k inhibícii nedošlo [39].

Pre porovnanie môže byť vhodným príkladom VRE, G<sup>+</sup> baktéria, ktorá v tomto prípade bola citlivá prevažne na látku **3A** pri koncentrácií 125  $\mu\text{mol/l}$ . V prípade látky z odborného článku 1-dodecyl-3-(2-hydroxyethyl)pyridinium bromid, bola dosiahnutá MIC pri koncentrácií 250  $\mu\text{mol/l}$ . Tento výsledok je podobný testovanej látke **3A** tiež pri koncentrácií 250  $\mu\text{mol/l}$  a zároveň aj látkam **1A** a **4A**. Zlúčenina 1-(2-hydroxyethyl)pyrrolidinium bromid je príkladom substancie s dosiahnutou koncentráciou MIC = 250  $\mu\text{mol/l}$ , pôsobiacou na VRE s podobným účinkom [39].

## 9. Záver

Diplomová práca bola zameraná na stanovenie účinnosti nových dezinfekčných látok na bázi KAS. Teoretická časť bola zameraná na všeobecnosť použitia dezinfekčných látok, ktoré sú nevyhnutnou súčasťou pri neustále narastajúcej rezistencii mnohých odolných kmeňov baktérii. Ďalej bolo nutnosťou spomenúť nozokomiálne infekcie, ktoré sú jedny s najviac rozšírených nákaz. Dôležité bolo popísať BMD, ktorá bola práve súčasťou tejto experimentálnej práce a v rámci nej bol zisťovaný antimikróbný účinok novo vytvorených látok, ktoré doposiaľ neboli testované. Teoretická časť bola ukončená základnými informáciami o KAS, ktoré sú už dnes komerčne používané vzhľadom na ich potvrdenú efektivitu. Sú to látky, ktoré nenachádzajú len použitie ako dezinficiencia, ale tiež ako antiseptiká.

V rámci experimentálnej časti bolo popísané konkrétne testovanie látok, ktoré poskytlo Centrum biomedicínskeho výskumu vo Fakultnej nemocnici, Hradec Králové. K dispozícii bolo 10 testovaných látok a 8 bakteriálnych kmeňov. Na vyhodnotenie MIC po 48 hodinách bol použitý spektrofotometer s nastavenou vlnovou dĺžkou 600 nm.

Látky, ktoré boli testované, sa líšili v prvej sérii látok počtom alkylov naviazaných na kvartérny dusík, týchto látok bolo 6. V druhej sérii boli k dispozícii 4 látky, ktoré boli navyše syntetizované tak, že na nich bol naviazaný ďalší pyridín naviazaný na posledný uhlíkový reťazec. Medzi dvoma arylmi boli ako v prvej sérii látok rozdiely v počte alkylov.

V rámci výsledkov bolo zistené, že najúčinnějšía bola látka pomenovaná **3A**. Táto látka vykazovala účinok predovšetkým na bakteriálne kmene STAU, MRSA, STEP, VRE. Účinok látky **3A** pri koncentracii 125  $\mu\text{mol/l}$  bol potvrdený aj na bakteriálne kmene STAU, MRSA, VRE. Zároveň táto látka vykazovala účinok pri koncentrácii 62,5  $\mu\text{mol/l}$  na bakteriálny kmeň STEP. Látky **2A** a **6A** neboli testované, z dôvodu nedostatočnej rozpustnosti. Účinnosť týchto látok preto nebolo možné preukázať. Látka **1A** pôsobila významnejšie (po odočte MIC) iba v jednom z troch meraní na G<sup>+</sup> baktériu STEP. Avšak výsledok MIC bol hraničný, z tohto dôvodu nebola zaradená do výsledkov. U testovanej látky **4A** a **1B** z dôvodu vyššieho počtu uhlíkov

sa nevyskytol významný účinok ani na jeden bakteriálny kmeň. Pri testovaní týchto látok vyplýva, že vzhľadom na ich stúpajúci počet uhlíkov v alkylovom reťazci, ich účinok je výrazne znížený. Testovanú látku označenú „**5A**“ bolo potrebné znovu nariediť z dôvodu prítomnosti zákalu na 62,5  $\mu\text{mol/l}$ . Podobne to bolo aj v prípade látok **2B**, **3B**, **4B**. Tieto látky ani po nariadení na koncentráciu 125  $\mu\text{mol/l}$ , nepreukázali významný účinok. V prípade látky **1B**, ktorá bola použitá po nariadení na koncentráciu 62,5  $\mu\text{mol/l}$ , bol výsledok tiež nevýznamný.

Na základe výsledkov bolo zrejmé, že G- baktérie boli odolnejšie vďaka prítomnosti dvojitej bakteriálnej steny, preto na G+ baktérie bol preukázaný najvyšší protibakteriálny účinok. So zmenami počtov alkylov pri látkach **1 - 5A** naviazaných na  $\text{N}^+$  bolo zistené, že zároveň sa mení ich účinok vzhľadom na to, ako blízko boli tzv. ideálnej hodnote  $\text{C}_{12}\text{-C}_{14}\text{-C}_{16}$ . V tomto prípade na overenie boli k dispozícii hodnoty len jednej látky, a teda látky **3A**.

## 10. Použité skratky

ANDRA Automated Nucleic acid Detection and Raman Analysis

ATB antibiotikum

BAC-Br 12, 14, 16 – benzalkónium bromid 12,14,16.

BMD Mikrodilučná bujónová metóda

Br<sup>-</sup> Anión brómu (bromid)

CCM Česká sbírka mikroorganizmů

CE Communauté Européen, teda Európske spoločenstvo

CEN European Committee for Standardization

CLSI The Clinical and Laboratory Standards Institute

DMSO Dimethylsulfoxid

ESCO *Escherichia coli*

EUCAST European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing

G+ Gram pozitívne baktérie

G- Gram negatívne baktérie

JIP Jednotka intenzívnej péče (starostlivosti)

KAS Kvartérne amóniové soli

KLPN ES– *Klebsiella pneumoniae* neprodukujúca širokospektré  $\beta$ -laktamázy

KLPN ES+ *Klebsiella pneumoniae* produkujúca širokospektré  $\beta$ -laktamázy

MIC Minimálna inhibičná koncentrácia

MHA Müller-Hinton agar

MHB Müller-Hinton bujón

MRSA methicillín-rezistentný *Staphylococcus aureus*

N<sup>+</sup> Kvartérny dusík

OD Optická hustota (optical density)

PCR polymerázová reťazcová reakcia (metóda)

PSAE MR multirezistentný *Pseudomonas aeruginosa*

RDRA Restriction Digestion Ribotyping Analysis

STAU *Staphylococcus aureus*

STEP *Staphylococcus epidermidis*

VRE vankomycin-rezistentný *Enterococcus*

## 11. Zoznam obrázkov

Obrázok 1 – Obecná štruktúra KAS [40].....	20
Obrázok 2 – Mechanizmus účinku KAS proti baktériam [32,33] .....	21
Obrázok 3 – Odburávanie cytoplazmatickej membrány [39,47] .....	21
Obrázok 4 – Vzorce chelerytrínu, sanguinarínu, berberínu a ageloxínu [32,33].....	22
Obrázok 5 – Vzorce látok 1A – 6A .....	27
Obrázok 6 – Vzorce látok 1B – 4B.....	28
Obrázok 7 – Krížová kultivácia baktérii MRSA – Zdroj: Vlastná tvorba .....	30

## 12. Zoznam tabuliek

Tabuľka 1 - Popis navážok a molekulových hmotností jednotlivých látok.....	32
Tabuľka 2 – Hodnoty MIC po 48 hodinovej inkubácií pre látky skupiny označené „1 - 5A“ a štandardy benzalkónia-Br 12, 14, 16 .....	43
Tabuľka 3 – Hodnoty MIC po 48 hodinovej inkubácií pre látky skupiny označené „1 – 4 B“ a štandardy benzalkónia-Br 12, 14, 16 .....	45



### **13. Zoznam grafov**

Graf 1 – Testované látky 1A-5A a ich účinok na G+ baktérie.....	38
Graf 2 – Testované látky 1B-4B a ich účinok na G+ baktérie .....	39
Graf 3 – Testované látky 1A-5A a ich účinok na G- baktérie.....	40
Graf 4 – Testované látky 1B-4B a ich účinok na G- baktérie .....	41

## 14. Použitá literatura

1. Národní zdravotnický informační portál. *Bakteriální infekce* [online]. Praha: Ministerstvo zdravotnictví ČR a Ústav zdravotnických informací a statistiky ČR, 2024 [cit. 03.11.2023]. Dostupné z: <https://www.nzip.cz>, <https://www.nzip.cz/rejstrikovy-pojem/3977>. ISSN 2695-0340
2. Hamplová, L. *Mikrobiologie, imunologie, epidemiologie, hygiena pro bakalářské studium a všechny typy zdravotnických škol*. V Praze: Stanislav Juhaňák - Triton, 2015. ISBN 978-80-7387-934-1. Str.70-85
3. NursingHero, *Microbial Mechanisms of Pathogenicity, Introduction to Microbial Mechanisms of Pathogenicity* [online]. Vystavené 2023 [cit. 12.10.2023]. Dostupné z: <https://www.nursinghero.com/study-guides/microbiology/introduction-to-microbial-mechanisms-of-pathogenicity>  
NursingHero, *Microbial Mechanisms of Pathogenicity, Characteristics of Infectious Disease* [online]. Vystavené 2023 [cit. 12.10.2023]. Dostupné z: <https://www.nursinghero.com/study-guides/microbiology/characteristics-of-infectious-disease>
4. McDonnell, G., Russell, A.D. *Antiseptics and disinfectants: Activity, action, and resistance*. *Clinical Microbiology Reviews*.1999, 12(1). Str. 147-179
5. Kassim, A., Omuse, G., Premji, Z., Revathi, G. *Comparison of Clinical Laboratory Standards Institute and European Committee on Antimicrobial Susceptibility, Testing guidelines for the interpretation of antibiotic susceptibility at a University teaching hospital in Nairobi, Kenya: a cross-sectional study*. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*. 2016 Apr 11,15:21. doi: 10.1186/s12941-016-0135-3. PMID: 27068515, PMCID: PMC4827198.
6. *Zákony pro lidi. Zákon č. 258/2000 Sb., Zákon o ochraně veřejného zdraví a o změně některých souvisejících zákonů* [online]. Vystavené 15.4.2024 [cit. 7.2.2024]. Dostupné z: <https://www.zakonyprolidi.cz/cs/2000-258>
7. Smejkal, P. *Nozokomiální infekce* [online]. Publikované 7.11.2012 [cit. 25.10.2023]. Dostupné z: <https://infekce.lf1.cuni.cz/nozkomPS1.htm>

8. Zahradníček, O. *Nozokomiální nákazy* [online]. Vystavené 2019 [cit. 24.4.2024]. Dostupné z: [https://is.muni.cz/el/med/jaro2019/BSKM021c/um/kapitoly\\_skript/Skripta\\_kapitola\\_10.pdf](https://is.muni.cz/el/med/jaro2019/BSKM021c/um/kapitoly_skript/Skripta_kapitola_10.pdf)
9. Vávrová, A. *Jaká je definice bakteriálního druhu ?* [online]. Vystavené 29.9.2008 [cit. 11.12.2023]. Dostupné z: [https://is.muni.cz/el/sci/podzim2008/Bi5710c/um/Bakterialni\\_druh.pdf](https://is.muni.cz/el/sci/podzim2008/Bi5710c/um/Bakterialni_druh.pdf)
10. Mount Sinai Selikoff Centers for Occupational Health. *Quaternary Ammonium Compounds in Cleaning Products: Health & Safety Information for Cleaners and Supervisors* [online]. Vystavené 2015 [cit. 3.2.2024]. Dostupné z: [https://www.mountsinai.org/files/MSHealth/Assets/HS/Patient-Care/Service-Areas/Occupational-Medicine/QACsInfoforWorkers\\_18.pdf](https://www.mountsinai.org/files/MSHealth/Assets/HS/Patient-Care/Service-Areas/Occupational-Medicine/QACsInfoforWorkers_18.pdf)
11. Busetti, A., Crawford, D.E., Earle, M.J., Gilea, M.A., Gilmore, B.F., Gorman, S.P., Lavery, G., Lowry, A.F., McLaughlin, M., Seddon, K.R. *Antimicrobial and antibiofilm activities of 1-alkylquinolinium bromide ionic liquids*. *Green Chem.*, 2010, 12(3), 420-425.
12. Benkova, M., Soukup, O., Prchla, L., Sleha, R., Elersek, T., Novak, M., Sepcic, K., Gunde-Cimerman, N., Dolezal, R., Bostik, V., Bostik, P., Marek, J. *Synthesis, Antimicrobial Effect and Lipophilicity-Activity Dependence of Three Series of Dichainech N-Alkylammonium Salts*. *Chemistry Select*, 2019, 4(41), 12076-12084
13. P-LAB. *Agar Mueller-Hinton*[online]. Vystavené 2023 [cit. 9.12.2023]. Dostupné z: <https://www.p-lab.cz/agar-mueller-hinton>
14. Pracovní skupina Aesculap Akademie, Bezpečnost personálu. *Nozokomiální nákaza* [online]. Vystavené 2012 [cit. 13.2.2024]. Dostupné z: <https://bezpecnostpersonalu.cz/nezarazene/nozokomialni-nakaza/>
15. Monteiro, A., Cardoso, J., Guerra, N., Ribeiro, E., Viegas, C., Cabo Verde, S., Sousa-Uva, A. *Exposure and Health Effects of Bacteria in Healthcare Units: An Overview*. *Appl. Sci.* 2022, 12, 1958. <https://doi.org/10.3390/app12041958>

16. Fraise, A. P. *European norms for disinfection testing*. J Hosp Infect. 2008 Oct;70 Suppl 1:8-10. doi: 10.1016/S0195-6701(08)60004-3. PMID: 18994675.
17. Rezková, B. *Dezinfekce* [online]. Ústav ochrany a podpory zdraví LF MU, Brno, 2018 [cit. 13.12.2023]. Dostupné z: <https://is.muni.cz/el/med/jaro2018/BLHL061p/um/Dezinfekce.pdf>
18. Ústav experimentální biologie MUNI sci. *Česká sbírka mikroorganismů*. [online]. 2023 [cit. 12.12.2023]. Dostupné z: <https://ueb.sci.muni.cz/onas/struktura-ustavu/ceska-sbirka-mikroorganismu>
19. Balkwill, D.L., Reeves, R.H., Drake, G.R., Reeves, J.Y., Crocker, F.H. Melody Baldwin King, David R. Boone, *Phylogenetic characterization of bacteria in the subsurface microbial culture collection*, FEMS Microbiology Reviews, Volume 20, Issue 3-4, July 1997, Pages 201–216, <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.1997.tb00309.x>
20. Jandová, B., Kotoučková, L. *Praktikum z mikrobiologie*. 1. vyd. Brno: Vydavatelství MU, 1996, 67 s. ISBN 80-210-1374-5. Str. 25-40
21. Whitman, W. B., Parte, A. C. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. 2. vyd., Springer, New York, NY, 2011. 976 s. ISBN 0-387-95042-6. Str. 240-270
22. Národní program konzervace a využívání genetických zdrojů mikroorganismů a drobných živočichů hospodářského významu, *Sbírka fytopatogenních a zemědělsky prospěšných bakterií* (VURV–B), (VÚRV, v. v. i., Praha) [online]. 2023 [cit.8.12.2023]. Dostupné z: <https://www.microbes.cz/bakterie.html>
23. Doušková, D. *Molekulární diagnostika baktérii mléčného kvašení rodu bifidobacterium* [online]. Brno, 2007 [cit.11.12.2023]. Dostupné z: [https://is.muni.cz/th/j8413/DIPLOMOVA\\_PRACE.pdf](https://is.muni.cz/th/j8413/DIPLOMOVA_PRACE.pdf)
24. Pospíšek, M., Gabriel, J. *Bulletin Československé Společnosti Mikrobiologické*. Vydala Československá společnost mikrobiologická, Praha 2007, jako přílohu Bulletinu Československé společnosti mikrobiologické 48, 2007. 300 s. ISSN 0009-0646. Str. 221-228

25. Baquer, F., Ali Sawan, A., Auzou, M., Grillon, A., Jaulhac, B., Join-Lambert, O., Boyer, P.H. *Broth Microdilution and Gradient Diffusion Strips vs. Reference Agar Dilution Method: First Evaluation for Clostridiales Species Antimicrobial Susceptibility Testing*. *Antibiotics* (Basel). 2021 Aug 12,10(8):975. doi: 10.3390/antibiotics10080975. PMID: 34439025, PMCID: PMC8388896.
26. Ústav Lékařské Mikrobiologie 3. Lékařské fakulty Univerzity Karlovy. *Diluční metoda* [online]. [cit.16.11.2023]. Dostupné z: <http://mikrobiologie.lf3.cuni.cz/bak/uceb/obsah/mic/mic.htm>
27. eStránky. *Stanovení citlivosti bakterií k ATB*. [online]. Publikované 26. 6. 2019 [cit.25.4.2024]. Dostupné z: <https://drobnohledem.estranky.cz/clanky/obecna-mikrobiologie/diagnosticke-metody/stanoveni-citlivosti-bakterii-k-atb.html>
28. Tankeshwar, A. *Mueller Hinton Agar (MHA): Composition, Preparation, Uses* [online]. Publikované 27.12.2023 [cit.25.4.2024]. Dostupné z: <https://microbeonline.com/mueller-hinton-agar/>
29. Amlerová, J., Fajfrlík, K. *Kvantitativní testy citlivosti* [online]. Vystavené 30.7.2018 [cit.1.12.2023]. Dostupné z: <https://www.vovcr.cz/odz/zdrav/183/page28.html>
30. Kwaśniewska, D., Chen, Y.L., Wieczorek, D. *Biological Activity of Quaternary Ammonium Salts and Their Derivatives*. *Pathogens*. 2020 Jun,9(6) E459. doi:10.3390/pathogens9060459. PMID: 32531904, PMCID: PMC7350379.
31. Gotter, A. *A Guide to Antiseptics* [online]. Vystavené 8.3.2019 [cit.25.4.2024]. Dostupné z: <https://www.healthline.com/health/what-is-antiseptic>
32. Zubris, D.L., Minbiole, K.P., Wuest, W.M. *Polymeric Quaternary Ammonium Compounds: Versatile Antimicrobial Materials*. *Curr Top Med Chem*. 2017,17(3):305-318. doi: 10.2174/1568026616666160829155805. PMID: 27572084.
33. Minbiole, K.P.C., Wuest, W.M., Jennings, M.C. *Quaternary Ammonium Compounds: An Antimicrobial Mainstay and Platform for Innovation to*

- Address Bacterial Resistance*, ACS Infectious Diseases 2015 1 (7), 288-303, DOI: 10.1021/acsinfecdis.5b00047
34. Toles, Z.E.A., Wu, A., Sanchez, Ch.A., Michaud, M.E., Thierer, L.M., Wuest, W.M., Minbiole, K.P.C. *Double BAC and Triple BAC: A Systematic Analysis of the Disinfectant Properties of Multicationic Derivatives of Benzalkonium Chloride (BAC)*. ChemMedChem. 2023 May 16;18(10):e202300018. doi: 10.1002/cmdc.202300018. Epub 2023 Mar 13. PMID: 36823400; PMCID: PMC10192024.
35. Xue, Y., Xiao, H., Zhang, Y. *Antimicrobial polymeric materials with quaternary ammonium and phosphonium salts*. Int J Mol Sci. 2015 Feb 6;16(2):3626-55. doi: 10.3390/ijms16023626. PMID: 25667977, PMCID: PMC4346917.
36. Liang, Y., Li, H., Ji, J., Wang, J., Ji, Y. *Self-Aggregation, Antimicrobial Activity and Cytotoxicity of Ester-Bonded Gemini Quaternary Ammonium Salts: The Role of the Spacer*. Molecules. 2023 Jul 17;28(14):5469. doi: 10.3390/molecules28145469. PMID: 37513340, PMCID: PMC10386392.
37. Makvandi, P., Jamaledin, R., Jabbari, M., Nikfarjam, N., Borzacchiello, A. *Antibacterial quaternary ammonium compounds in dental materials: A systematic review*. Dent Mater. 2018 Jun, 34(6):851-867. doi: 10.1016/j.dental.2018.03.014. Epub 2018 Apr 17. PMID: 29678327.
38. Brycki, B., Koziróg, A., Kowalczyk, I., Pospieszny, T., Materna, P., Marciniak, J. *Synthesis, Structure, Surface and Antimicrobial Properties of New Oligomeric Quaternary Ammonium Salts with Aromatic Spacers*. Molecules. 2017 Oct 25, 22(11):1810. doi: 10.3390/molecules22111810. PMID: 29068383, PMCID: PMC6150277.
39. Soukup, O., Benkova, M., Dolezal, R., Sleha, R., Malinak, D., Salajkova, S., Markova, A., Hympanova, M., Prchal, L., Ryskova, L., Hobzova, L., Sepčić, K., Gunde-Cimerman, N., Korabecny, J., Jun, D., Bostikova, V., Bostik, P., Marek, J. *The wide-spectrum antimicrobial effect of novel N-alkyl monoquaternary ammonium salts and their mixtures, the QSAR study against bacteria*. Eur J Med Chem. 2020 Nov 15, 206:112584. doi: 10.1016/j.ejmech.2020.112584. Epub 2020 Jul 19. PMID: 32853858.

40. Nadagouda, M. N., Vijayasathy, P., Sin, A. et al. *Antimicrobial activity of quaternary ammonium salts: structure-activity relationship*. *Med Chem Res* 31, 1663–1678 (2022).
41. Obłąk, E., Futoma-Kołodziej, B., Wiecznyńska, A. *Biological activity of quaternary ammonium salts and resistance of microorganisms to these compounds*. *World J Microbiol Biotechnol*. 2021 Jan 11, 37(2):22. doi: 10.1007/s11274-020-02978-0. PMID: 33428020.
42. Marek, J., Joskova, V., Dolezal, R., Soukup, O., Benkova, M., Fucikova, A., et al. *Synthesis, Antimicrobial Effect and Surface Properties of Hydroxymethylsubstituted Pyridinium Salts*. *Letters in Drug Design & Discovery*. 2017, 14:1-15.
43. Marek, J., Josková, V., Doležal, R., Soukup, O., Benkova, M., Fucikova, A., Malinák, D., Bostikova, V., Kuca, K. (2018). *Synthesis, Antimicrobial Effect and Surface Properties of Hydroxymethylsubstituted Pyridinium Salts*. *Letters in Drug Design & Discovery*. 15. 828-842.
44. Santajit, S., Indrawattana, N. *Mechanisms of Antimicrobial Resistance in ESKAPE Pathogens*. *Biomed Res Int*. 2016, 2016:2475067. doi: 10.1155/2016/2475067. Epub 2016 May 5. PMID: 27274985, PMCID: PMC4871955
45. Massi, L., Guittard, F., Levy, R., Gèribaldi, S. *Enhanced activity of fluorinated quaternary ammonium surfactants against Pseudomonas aeruginosa*. *Eur J Med Chem*. 2009 Apr, 44(4):1615-22. doi: 10.1016/j.ejmech.2008.07.032. Epub 2008 Aug 5. PMID: 18771821.
46. Padrtová, T., Marvanová, P., Odehnalová, K., Kubínová, R., Parravicini, O., Garro, A., Enriz, R.D., Humpa, O., Oravec, M., Mokry, P. *Synthesis, Analysis, Cholinesterase-Inhibiting Activity and Molecular Modelling Studies of 3-(Dialkylamino)-2-hydroxypropyl 4-[(Alkoxy-carbonyl)amino]benzoates and Their Quaternary Ammonium Salts*. *Molecules*. 2017 Nov 23, 22(12):2048. doi: 10.3390/molecules22122048. PMID: 29168793, PMCID: PMC6149889.
47. Salajkova, S., Benkova, M., Marek, J., Sleha, R., Prchal, L., Malinák, D., Dolezal, R., Sepčić, K., Gunde-Cimerman, N., Kuca, K., et al. Wide-

- Antimicrobial Spectrum of Picolinium Salts*. *Molecules* 2020, 25, 2254. <https://doi.org/10.3390/molecules25092254>
48. Markova, A., Hympanova, M., Matula, M., Prchal, L., Sleha, R., Benkova, M., Pulkrabkova, L., Soukup, O., Krocova, Z., Jun, D., et al. *Synthesis and Decontamination Effect on Chemical and Biological Agents of Benzoxonium-Like Salts*. *Toxics* 2021, 9, 222
49. Kula, N., Lamch, Ł., Futoma-Kołodziej, B., Wilk, K.A., Obłak, E. *The effectiveness of newly synthesized quaternary ammonium salts differing in chain length and type of counterion against priority human pathogens*. *Sci Rep.* 2022 Dec 16, 12(1):21799. doi: 10.1038/s41598-022-24760-y. PMID: 36526659, PMCID: PMC9757636.
50. CLSI [Clinical and Laboratory Standards Institute]. *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically*, Approved Standard - Tenth Edition. CLSI document M07-A10., Wayne, PA.2015.
51. Buffet-Bataillon, S., Tattevin, P., Bonnaure-Mallet, M., Jolivet-Gougeon, A. *Emergence of resistance to antibacterial agents: the role of quaternary ammonium compounds-a critical review*. *International Journal of Antimicrobial Agents*.2012, 39(5):381-9.
52. Dolezal, R., Soukup, O., Malinak, D., Savedra, R.M.L., Marek, J., Dolezalova, M, Pasdiorova, Salajkova, S., Korabecny, J., Honegr, J., Ramalho, T.C., Kuca, K. *Towards understanding the mechanism of action of antibacterial N-alkyl-3-hydroxypyridinium salts: Biological activities, molecular modeling and QSAR studies*. *Eur.J. Med. Chem.*, 2016, 121, 699-711.
53. Zhou, Z., Zhou, S., Zhang, X., Zeng, S., Xu, Y., Nie, W., Zhou, Y., Xu, T., Chen P. *Quaternary Ammonium Salts: Insights into Synthesis and New Directions in Antibacterial Applications*. *Bioconjug Chem.* 2023 Feb 15, 34(2):302-325. doi: 10.1021/acs.bioconjchem.2c00598. Epub 2023 Feb 7. PMID: 36748912.
54. Davis, H.J. Mihai, M.T., Phipps R.J. *Ion Pair-Directed Regiocontrol in Transition-Metal Catalysis: A Meta-Selective C–H Borylation of Aromatic*



*Quaternary Ammonium Salts*, Department of Chemistry, University of Cambridge, Lensfield Road, Cambridge CB2 1EW, United Kingdom

55. Morandini, A., Leonetti, B., Riello, P., Sole, R., Gatto, V., Caligiuri, I., Rizzolio, F., Beghetto, V. *Synthesis and Antimicrobial Evaluation of Bis-morpholine Triazine Quaternary Ammonium Salts*. ChemMedChem. 2021 Oct 15, 16(20):3172-3176. doi: 10.1002/cmdc.202100409. Epub 2021 Jul 29. PMID: 34288499, PMCID: PMC8596621.
56. Grabińska-Sota, E. *Genotoxicity and biodegradation of quaternary ammonium salts in aquatic environments*. J Hazard Mater. 2011 Nov 15, 195:182-7. doi: 10.1016/j.jhazmat.2011.08.026. Epub 2011 Aug 16. PMID: 21880416.