

UNIVERZITA KARLOVA  
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ  
Katedra biologických a lékařských věd



***In vitro* screening nových, potenciálně  
antibakteriálně účinných sloučenin**

**Diplomová práce**

Autor práce: Bc. Lucie Davidová

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

UNIVERZITA KARLOVA

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra biologických a lékařských věd

Akademický rok: 2017/2018

## ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

Jméno a příjmení: **Lucie Davidová**

Studijní program: **Zdravotnická bioanalytika**

Studijní obor: **Odborný pracovník v laboratorních metodách**

Děkan fakulty Vám podle zákona č. 111/1998 Sb. určuje tuto diplomovou práci:

Název práce: ***In vitro* screening nových, potenciálně antibakteriálně účinných sloučenin**

Anglický název práce: ***In vitro* screening of novel potentially active antibacterial compounds**

Zásady pro vypracování:

1. Rešerše odborné literatury 2. Vypracování pracovních postupů a zásady práce v mikrobiologické laboratoři 3. Praktické provedení daných úkolů - testování antibakteriální účinnosti 4. Zhodnocení a komentář výsledků 5. Diskuse

Seznam odborné literatury:

Votava M. et al: Lékařská mikrobiologie speciální, Neptun, Brno 2003. Votava M. et al: Lékařská mikrobiologie II., Přehled vyšetřovacích metod v lékařské mikrobiologii, Masarykova univerzita, Brno 2000 Scharfen J. (2013) Diferenciální diagnostika v klinické mikrobiologii. Nucleus HK, Praha, 236 s. ISBN 978-80-87009-32-1 Greenwood D., Slack R. C. B., Peutherer J. F. a kol. (1999) Lékařská mikrobiologie. Grada, Praha, 686 s. ISBN 80-7169-365-0 Mahon R. C., Manuselis G. (2000) Textbook of Diagnostic Microbiology. W. B. Saunders Company, Philadelphia, 2. vydání, 1230 s. ISBN 0-7216-7917-X

internetové zdroje: (<http://www.isiknowledge.com>) American society for microbiology (ASM) National Center for Biotechnology Information (NCBI) HealthFinder Medscape MediClub World Health Organization (WHO) Free Medical Journals Free Books for Doctors MedPilot PubMed PubMed Central Velký lékařský slovník MedlinePlus: Medical Encyclopedia (A.D.A.M.) MedlinePlus: Medical Dictionary

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

Oponenti:

Konzultanti:

Datum zadání diplomové práce: 11.12.2016

Termín odevzdání diplomové práce: dle harmonogramu příslušného akademického roku

.....  
Vedoucí katedry

V Hr. Králové 30.4.2018

.....  
Děkan

## **Prohlášení**

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

V Hradci Králové dne 2. května 2018

.....

## **Poděkování**

Děkuji svému vedoucímu panu PharmDr. Ondřeji Jand'ourkovi, Ph.D. za odborný dohled, ochotu vést moji práci, konzultaci a pomoc při zpracování diplomové práce. Dále děkuji paní laborantce Idě Dufkové za pomoc, vstřícnost a ochotu věnovat se mi při praktické části v laboratoři.

# Abstrakt

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra biologických a lékařských věd

Studijní obor: Odborný pracovník v laboratorních metodách

Kandidát: Bc. Lucie Davidová

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

Název diplomové práce: *In vitro* screening nových, potenciálně antibakteriálně účinných sloučenin

Diplomová práce se zabývá antibiotickou politikou s důrazem na rezistenci a mechanismus účinku antibiotik. Pozornost je také věnována testování nových látek ve smyslu jejich účinku na vybrané bakterie.

Teoretická část diplomové práce popisuje systém antibiotické politiky včetně její struktury a organizace v České republice. Také stručně shrnuje tuto problematiku ve světě a jednotlivé organizace, které se na organizaci antibiotické politiky podílí. Dále se zabývá historií, rozdělením, účinky a významem antibiotik. Zvláštní pozornost je věnována kapitole, která popisuje makromolekulární mechanismus účinku 2 vybraných skupin látek (antibiotik) na bakterie včetně fyziologických funkcí některých bakteriálních struktur. V neposlední řadě teoretická část shrnuje principy bakteriální rezistence včetně jejího vzniku a vývoje. Práce také obsahuje popis jednotlivých metod stanovení citlivosti bakterií na antibiotika od základních až po ty nejmodernější, které jsou plně automatizované.

Praktická část detailně zachycuje mikrodiluční bujónovou metodu, která byla použita k testování účinnosti nových látek, včetně celého pracovního postupu. Zároveň tato část obsahuje seznam zkoumaných látek včetně jejich vzorců a dalších údajů. Nechybí také přehled použitých bakterií, jejich základní vlastnosti, patogenita a možnost léčby onemocnění, které způsobují. V praktické části jsou veškeré získané výsledky zhodnoceny a zpracovány. Je zde také určeno, zda jsou na bakterie účinné či nikoli.

**Klíčová slova:** bakterie, antibiotika, rezistence, mikrodiluční bujónová metoda, minimální inhibiční koncentrace

## **Abstract**

Charles University

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Biological and Medical Sciences

Study program: Specialist in Laboratory Methods

Candidate: Bc. Lucie Davidová

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

Title of diploma thesis: *In vitro* screening of novel potentially active antibacterial compounds.

The diploma thesis deals with the antibiotics policy and is focused on resistance and mechanism of action of the antibiotics. A great attention is also paid to novel substances testing in terms of their impact on the selected bacteria.

Theoretical part of thesis describes the system of antibiotic policy including its structure and organization in the Czech Republic. It also briefly summarizes this issue globally as well as individual organizations involved in the organization of the antibiotic policy. The theoretical part is also concerned with the history, classification, effects and significance of the antibiotics. A particular attention is paid to the chapter describing the macromolecular mechanism of action of 2 selected groups of substances (antibiotics) on bacteria, including physiological functions of some bacterial structures. And, last but not least, the theoretical part summarizes principles of bacterial resistance including its origin and development. The diploma thesis also contains description of individual methods for determination of bacterial sensitivity to the antibiotics, from the basic methods up to the most progressive ones, which are fully automated.

The practical part specifies in detail the broth microdilution method that was used to test effectiveness of the novel substances, including the whole working procedure. At the same time, this section contains a list of examined substances including their formulas and other data. An overview of used bacteria, their basic properties and features, pathogenicity and possibility of treatment of the diseases caused by them, is also presented. In the practical part, all obtained results have been assessed and processed. It is also determined here, whether or not the substances are active against the tested bacteria.

**Key words:** bacteria, antibiotics, resistance, microdilution broth method, minimal inhibition concentration

## Seznam zkratek a symbolů

ADM	Agarová diluční metoda
AML	Antimikrobiální látky
AMR	Antimikrobiální rezistence
ATB	Antibiotikum
BP	Breakpoint (bod zlomu)
CKS	Centrální koordinační skupina
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute Ústav klinických a laboratorních standardů
DDT	Diskový difuzní test
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
EAAD	European Antibiotic Awareness Day Evropský antibiotický den
EC	<i>Escherichia coli</i>
ECDC	European Center on Disease Prevention and Control Evropské středisko pro prevenci a kontrolu nemocí
ECV	Epidemiologic Cutoff Values Epidemiologická cutoff (mezí) hodnota
EF	<i>Enterococcus faecalis</i>
EHEC	Enterohemoragická <i>Escherichia coli</i>
EPEC	Enteropatogenní <i>Escherichia coli</i>
ESCMID	European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases Evropská společnost pro klinickou mikrobiologii a infekční nemoci
ETEC	Enterotoxigenní <i>Escherichia coli</i>
EU	Evropská unie
EUCAST	European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing Evropský výbor pro testování antimikrobiální citlivosti
GIT	Gastrointestinální trakt
HUS	Hemolyticko-uremický syndrom
IZ	Inhibiční zóna
KP	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
KP	Karboxypeptidasa



LPS	Lipopolysacharidy
MBC	Minimální baktericidní koncentrace
MHA	Mueller-Hinton agar
MIC	Minimální inhibiční koncentrace
MRSA	Methicilin-rezistentní <i>Staphylococcus aureus</i>
NAG	<i>N</i> -acetylglukosamin
NAM	kyselina <i>N</i> -acetylmuramová
NAP	Národní antibiotický program
NRL	Národní referenční laboratoř
NÚ	Nežádoucí účinek
PA	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
PAE	Postantibiotický efekt
PBP	Penicillin Binding Protein (penicilin-vázající protein)
PNC	Penicilin
RKS	Regionální koordinační skupiny
RNA	Ribonukleová kyselina
SA	<i>Staphylococcus aureus</i>
SAR	Structure-Activity relationships
SE	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
SEMA	<i>Serratia marcescens</i>
SKAP	Subkomise pro antibiotickou politiku
SZÚ	Státní zdravotní ústav
VRE	Vankomycin-rezistentní enterokoky
WHO	World Health Organization Světová zdravotnická organizace

# Obsah

1	Úvod .....	12
2	Současný stav .....	13
2.1	Antibiotická politika.....	13
2.1.1	Struktura antibiotické politiky v České republice.....	13
2.1.2	Antibiotická politika ve světě .....	15
2.2	Antibiotika.....	17
2.2.1	Historie.....	18
2.2.2	Rozdělení .....	19
2.2.3	Účinky.....	24
2.2.4	Farmakodynamika a farmakokinetika .....	28
2.2.5	Význam antibiotik.....	30
2.2.6	ATB oproti jiným lékům.....	31
2.2.7	Chyby v užívání .....	32
2.3	Mechanismy účinku antibiotik.....	32
2.4	Makromolekulární mechanismus účinku u vybraných látek .....	35
2.4.1	$\beta$ -laktamová antibiotika .....	35
2.4.2	Makrolidy.....	38
2.5	Rezistence .....	42
2.5.1	Vznik a vývoj rezistence .....	43
2.5.2	Mechanismy rezistence .....	45
2.5.3	Příčiny vzniku rezistence .....	48
2.6	Metody stanovení citlivosti bakterií na antibiotika.....	48
2.6.1	Diskový difuzní test.....	49
2.6.2	Diluční metody .....	50
2.6.3	E-test .....	51
2.6.4	Standardizace metod .....	52
2.6.5	Automatizace metod .....	52
3	Cíl práce.....	55
4	Metodika práce .....	56
4.1	Mikrodiluční bujónová metoda .....	56
4.2	Definice souboru .....	56
4.2.1	Přehled použitých bakterií .....	57
4.2.2	Přehled testovaných látek .....	63
4.2.3	Standardy antibiotik.....	69
4.3	Pracovní postupy .....	70

4.3.1	Příprava suspenzí kmenů bakterií .....	71
4.3.2	Příprava ředící řady testované látky.....	71
4.3.3	Pipetování do mikrotitrační destičky .....	72
4.3.4	Hodnocení .....	73
5	Výsledky.....	75
6	Diskuze .....	80
7	Závěr.....	85
8	Seznam použitých zdrojů .....	86
9	Seznam obrázků.....	95
10	Seznam tabulek .....	96
11	Seznam příloh .....	97
12	Přílohy.....	98

# 1 Úvod

Dříve (například před druhou světovou válkou), než se antibiotika začala používat, byla infekce jedna z nejčastějších příčin úmrtí. Na to se dnes již zapomnělo, protože lidstvo bere antibiotika jako naprosto přirozenou součást života. V současnosti jsou tedy antibiotika chápána jako léky, bez kterých se neobejdeme a které spolu s jinými prostředky zachraňují lidské životy. Antibiotika však nejsou pouze výhodná. Mají i své slabé stránky. Právě kvůli jejich kolikrát až zbytečnému předepisování či chybnému používání se stávají neúčinnými. Neúčinnost je způsobena tím, že si na ně bakteriální kmeny vytvořily rezistenci a jsou tak vůči nim odolné. Ke vzniku rezistence také přispívá nesprávné používání antibiotik z hlediska pacienta, a to ať už se jedná o svévolně upravené dávkování daného léku či nedodržení léčebného procesu. Typickým příkladem je nedoužívání předepsaného množství a ukončení užívání antibiotika dříve, než je dobráno. Lidé mají pocit, že už jim je tzv. dobře. Jenže tímto způsobem užívání jsou bakterie pouze oslabeny a z důvodu nízké koncentrace antibiotika v organismu si vůči němu vytvoří rezistenci.

K zabránění vzniku rezistence přispívá také laboratorní stanovení bakteriální citlivosti na daná antibiotika. Jedná se o způsob, který je v laboratořích klinické mikrobiologie rutinně používán. Jeho výsledkem jsou pak konkrétní antibiotika a určení, zda jsou vůči vykultivovaným bakteriálním kmenům účinná či rezistentní. Lékař má tak k dispozici vodítko, které mu pomůže při výběru vhodného antibiotika pro konkrétního pacienta. Jednou z možností hodnocení bakteriální citlivosti je také stanovení minimální inhibiční koncentrace. Jedná se o kvantitativní stanovení. Díky této metodě lze určit přesnou minimální koncentraci dané antibakteriální látky, která zastaví růst bakterií. Existují její různé modifikace a používá se mimo jiné také pro experimentální a vědecké pokusy.

V současnosti jsou již některé metody stanovení citlivosti bakterií na antibiotika plně či částečně automatizovány. Tyto moderní technologie urychlují celý proces stanovení. Výsledek s možností terapie se tak dostane rychleji k lékaři, který může včas nasadit vhodnou a cílenou léčbu.

## **2 Současný stav**

### **2.1 Antibiotická politika**

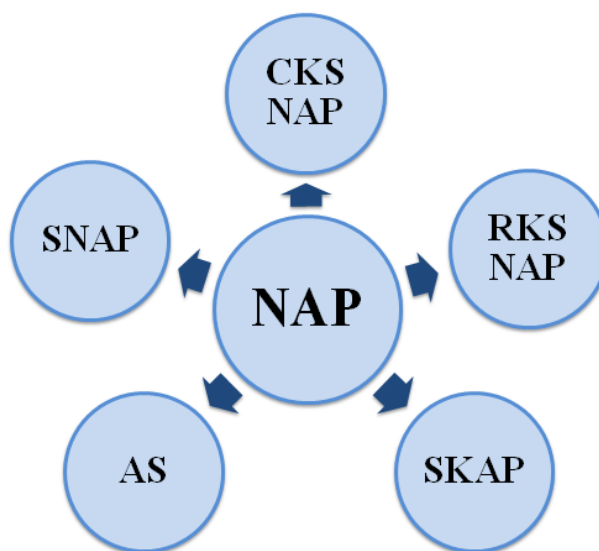
Antibiotická politika je dle WHO definována jako soubor opatření, jejichž cílem je vysoká kvalita používání antimikrobiálních přípravků (antibiotik) ve smyslu účinné, bezpečné a nákladově efektivní léčby a profylaxe infekcí. Současně by daná léčba měla omezovat riziko vzestupu antibiotické rezistence a snažit se o zachování dlouhodobé účinnosti antibiotik. Mezi důležitý cíl antibiotické politiky patří snaha o omezení nadužívání a chybného používání antimikrobiálních látek. Toho lze dosáhnout omezováním nesprávné indikace antibiotické léčby, chybné volby antibiotik či špatného dávkování včetně délky podávání (Jindrák, 2014; Votava, 2010, s. 116).

#### **2.1.1 Struktura antibiotické politiky v České republice**

Česká vláda v roce 2009 (na podnět Ministerstva zdravotnictví České republiky) rozhodla o vzniku Národního antibiotického programu (NAP). Zároveň byly vymezeny jeho cíle, činnosti, funkce, organizační uspořádání a struktura. Ta vychází z Doporučení Rady EU o obezřetném používání antimikrobiálních látek v lékařství, které popisuje základní mechanismy účinné prevence a kontroly rezistence vůči antibiotikům. Základním principem NAP je tzv. mezisektorový koordinační mechanismus, který zajišťuje efektivní koordinaci výkonů mezi veterinárním a humánním zdravotnictvím a dalšími subjekty mezi které patří například Ministerstvo zdravotnictví, Ministerstvo zemědělství, Státní zdravotní ústav (SZÚ) či Státní ústav pro kontrolu léčiv (SÚKL). Další skupinu subjektů, které spolupracují s NAP, tvoří mimo jiné vědecké a vzdělávací instituce, zdravotnická zařízení či profesní organizace - Česká lékařská společnost Jana Evangelisty Purkyně (ČLS JEP). Mezi hlavní funkce a zájmy NAP patří tvorba a průběžná aktualizace zásad národní antibiotické politiky, sledování a analýza antibiotické rezistence, monitorování spotřeby a používání antibiotik, realizace opatření pro prevenci infekcí. NAP také podporuje vědu a výzkum v oblasti antibiotické rezistence a provádí vzdělávání odborné i laické veřejnosti (Šturma, 2011; <http://zdravi.euro.cz>; [www.tribune.cz](http://www.tribune.cz)).

Organizační strukturu NAP tvoří 3 složky, které mají své určité funkce – řídicí, koordinační, výkonnou. Dlouhodobou strategii NAP a akční plány zajišťuje Centrální koordinační skupina (CKS NAP). Ta také zprostředkovává vzdělávání laické i odborné

veřejnosti. Společně se Subkomisí pro antibiotickou politiku (SKAP) tvoří a formuluje zásady národní antibiotické politiky. Regionální koordinační skupiny (RKS NAP) koordinují aktivity Národního antibiotického programu na úrovni krajů. Výkonnou složku NAP na lokální úrovni tvoří Antibiotická střediska (AS), která prosazují antibiotickou politiku či poskytují odborné konzultace. Dále vytváří a aktualizují postupy pro používání antibiotik a kontrolují dodržování zásad správné antibiotické praxe. Sekretariát NAP (SNAP) zajišťuje administrativní a organizační činnost NAP a spadá do řídicí kompetence SZÚ. Všechny úkony NAP musí odpovídat etickým principům a musí být nezávislé na farmaceutickém průmyslu (Šturma, 2011; <http://www.cls.cz>; Věstník MZ ČR).



**Obrázek 1 – Organizační struktura NAP**

K dodržování antibiotické politiky přispívají také nemocnice a další zdravotnická zařízení, ve kterých již do určité míry existuje omezení antibiotické preskripce. Jedná se o administrativní opatření, které rozděljuje antibiotika na tzv. volná a vázaná. Tyto dvě skupiny se liší v možnosti jejich předepisování. Skupinu volných antibiotik, kam patří především perorální preparáty namířené proti běžným infekcím, smí předepisovat všichni lékaři bez větších omezení. Zatímco u vázaných antibiotik je důležitá správně vyplněná žádanka příslušným lékařem a samotné vydání antibiotického přípravku musí být schváleno antibiotickým střediskem. Seznam těchto antibiotik určuje ředitel příslušného zdravotnického zařízení po konzultaci a schválení

lékovou komisí i antibiotickým střediskem ([www.kntb.cz](http://www.kntb.cz); Votava 2010; Julák a Pavlík, 2010).

## 2.1.2 Antibiotická politika ve světě

Celosvětově se do boje s patogenními mikroorganismy zapojují desítky až stovky zemí a snaží se vyřešit situaci se vzrůstající rezistencí těchto patogenů vůči používaným antibiotikům. K řešení antibiotické politiky ve světě přispívá řada zdravotnických, odborných a politických organizací či institucí. S velkou částí z nich spolupracuje i Česká republika. Jednou z nejznámějších organizací je Světová zdravotnická organizace (WHO). Ta se zabývá problematikou antibiotické rezistence a vydává jednotlivé doporučené postupy či strategické dokumenty. Cílem těchto programů je eliminovat rizika vzniku rezistentních mikroorganismů a snížit přenos původců infekčních nemocí, které jsou spojeny s poskytováním zdravotní péče. WHO organizuje různé kampaně, které mají zlepšit spolupráci pacienta se zdravotnickým zařízením (jedná se o tzv. compliance, kterou je možno definovat takto: „*Compliance je termín, který znamená míru, s jakou subjekty účastníci se farmakoterapie (lékaři a pacienti) dodržují doporučení, ustanovení a příslušná pravidla, která se k farmakoterapii vztahují*“ (Práznovcová, 2013)) a zároveň vzdělávat zdravotnické pracovníky. Jednou z těchto kampaní WHO je například osvěta o hygieně rukou a správných postupech při jejich umývání. Postupně přibývá zemí, které s WHO začínají spolupracovat. Česká republika se Světovou zdravotnickou organizací spolupracuje od roku 2011. Výsledkem činnosti WHO v boji s antimikrobiální rezistencí (AMR) je Globální akční plán o antimikrobiální rezistenci, který byl schválen v květnu roku 2015 na Světovém zdravotním shromáždění. S WHO spolupracuje Evropská unie (EU), která vybízí jednotlivé členské státy, aby vypracovaly a zavedly národní akční plány, týkající se AMR. Ty by měly být v souladu s cíli globálního akčního plánu ([www.euro.who.int](http://www.euro.who.int); Jindrák; 2014).

Další organizací je Evropské středisko pro prevenci a kontrolu nemocí (ECDC), které bylo zřízeno v roce 2005. Jedná se o organizaci, která se zabývá zlepšením evropské situace ve spojení s výskytem infekčních chorob a hodnocením rizik spojených s infekčními nemocemi ohrožující zdravotní stav evropské populace. ECDC má sídlo ve švédském Stockholmu. Jeho klíčové úkoly jsou rozmanité: monitoring přenosných infekcí, příprava odborných a metodických doporučení, organizace

informačních kampaní a mnoho dalších. Jednou z kampaní ECDC je Evropský antibiotický den (EAAD). Probíhá každoročně 18. listopadu a jeho cílem je přiblížit veřejnosti problém vzniku rezistence vůči antibakteriálním látkám a poučit ji o správnosti užívání antibiotik včetně chyb spojených s jejich užíváním ([www.ecdc.europa.eu/en](http://www.ecdc.europa.eu/en); <http://antibiotic.ecdc.europa.eu>).

Do projektu v rámci Evropské unie lze řadit také program Antibiotic Strategy International. Celkem je do něho zapojeno 9 zemí – Česká republika (vstoupila v roce 2007), Rakousko, Itálie, Slovinsko, Slovensko, Polsko, Německo, Belgie a Maďarsko. Hlavní řídicí stát je Rakousko. Snahou projektu je vytvořit model doporučených metod a standardizovaných postupů, který bude platný ve všech státech EU. Cílem tohoto modelu by mělo být snížení spotřeby ATB, zlepšení manipulace s nimi či cílené a odůvodněné předepisování daného antibiotika. Všechny tyto postupy by měly vést ke snížení vzniku AMR (Kuklík, 2007).

Ve Spojených státech amerických funguje organizace CDC – Centrum pro prevenci a kontrolu nemocí. Obecně se zaměřuje na ochranu zdraví a bezpečnosti v USA. Zabývá se závažnými infekcemi, které jsou způsobovány rezistentními bakteriemi. CDC pro prevenci vzniku AMR používá následující mechanismy: sledování předepisování antibiotik na národní a regionální úrovni, poskytování pokynů a doporučení zdravotnickým zařízením, popřípadě zajištění laboratorního testování. Specializovaná národní referenční laboratoř CDC testuje vzorky bakterií z celé země, aby odhalila nové mechanismy rezistence, které ovlivňují zdraví pacienta. Zároveň slouží také jako NRL k identifikaci mikroorganismů. Pod organizaci CDC spadá mnoho dalších národních programů ([www.cdc.gov](http://www.cdc.gov)).

Jednotlivé organizace (ať už světové nebo národní) spolu vzájemně spolupracují. Aby jejich činnost byla prospěšná a plně funkční, je důležité, aby dané organizace nebyly závislé na farmaceutickém průmyslu a byly podporovány státem včetně finančních příspěvků. Například antibiotická střediska, která v České republice fungují od roku 2003, nejsou v evropských zemích rozšířená a jejich principy nejsou příliš známé. Výjimku tvoří Švédsko a Rakousko. V těchto zemích je na ATB politiku kladen značný důraz. Je snaha tuto síť rozšířit a dbát na ATB politiku i v ostatních zemích. Každý stát by měl vytvořit svůj národní program s cílem kontrolovat a dodržovat preventivní opatření proti vzniku rezistence vůči antibiotikům. Program by měl být celistvý a komplexní včetně mezisektorového působení. To znamená, že by měl



zasahovat nejen do humánní medicíny, ale také do veterinární včetně živočišné výroby a produktů zemědělství. Je totiž patrné, že velká část ATB je také využívána právě v zemědělství (Kuklík, 2007).

## 2.2 Antibiotika

Jako antibiotikum se dříve označovala látka, která byla produkována živými mikroorganismy (například plísněmi či bakteriemi). Jednalo se tedy o přírodní produkt metabolismu těchto organismů, který bylo možné později dále chemicky modifikovat. Cílem úprav bylo zlepšení farmakologických a antibakteriálních vlastností. Takto modifikovaná antibiotika se označovala jako polosyntetické antimikrobiální látky. Naopak zcela synteticky vyrobené antimikrobiální látky byly označovány jako chemoterapeutika. Ta jsou také (stejně jako všechny antimikrobiální látky) určena k blokování biochemických cest nebo k interferenci s buněčnými strukturami bakterií. Chemoterapeutika byla svou strukturou velmi podobná chemické struktuře biomolekul, které jsou nezbytné pro životaschopnost bakteriální buňky. Lze je tak často definovat jako strukturní analogy esenciálních sloučenin nezbytných pro přežití buňky (Němec, 2015).

V současné době je však termín antibiotikum často používán pro všechny AML a nezáleží na tom, zda byly vyrobeny uměle či produkovány mikroorganismy. Z důvodu ustálení terminologie byla navržena nová definice: „*Antibiotikum je substance biologického, semisyntetického nebo syntetického původu, která vykazuje selektivní toxicitu proti bakteriím, a je tudíž potencionálně použitelná k léčbě infekcí. Dezinfekční a antiseptické látky nejsou do této definice zahrnuty.*“ Tuto oficiální definici vytvořil a schválil EUCAST (Evropský výbor pro testování antimikrobiální citlivosti), který je součástí Evropské společnosti pro klinickou mikrobiologii a infekční nemoci - ESCMID (Mahon, 2015; Goering, 2016; Votava 2005; Němec, 2015; [www.clinicalmicrobiologyandinfection.com](http://www.clinicalmicrobiologyandinfection.com)).

Antibiotika mají především antibakteriální účinky (působí proti bakteriím) a řadí se do nadskupiny antimikrobiálních látek. Antimikrobiální látky (AML) jsou léčiva, která se používají k profylaxi nebo terapii infekčních onemocnění. Do této skupiny lze zahrnout také látky proti mikroskopickým houbám (antimykotika), virům (antivirotika) či parazitům (antiparazitika). Do jisté míry patří mezi AML také skupiny látek, které

mají antimikrobiální účinek – cytostatika, imunosupresiva, oxidační činidla a další (Mahon, 2015; Němec, 2015; Votava 2005).

### 2.2.1 Historie

S historií antibiotik je neodmyslitelně spojeno jméno Alexander Fleming. Sir Fleming celý svůj život zasvětil pozorování různých látek a jejich účinku na živočišné tkáně. Během své vojenské kariéry se zajímal o vlastnosti dalších látek a zkoušel jejich interakci s bakteriemi. Objevil substanci, která způsobuje lýzu bakterií, a nazval ji lysozym. V září roku 1928 si všiml (na tehdejší dobu) neobyčejného jevu. Jedna z Petriho misek s kulturou bakterie rodu *Staphylococcus* byla náhodně kontaminována plísní. Fleming bližším pozorováním zjistil, že okolo kolonií plísně bakterie nerostou a vytváří se tzv. inhibiční zóna. Při svém dalším výzkumu potvrdil, že plíseň zřejmě uvolňuje určitou látku, která brání množení a růstu bakterií. Tato skutečnost byla prvním krokem k objevu penicilinu. Od jeho objevu až po popsání samotného penicilinu uplynulo ještě několik let. Zjistilo se, že plíseň (označena jako *Penicillium notatum*) lze kultivovat na syntetických živných půdách, ale stále se nedařilo syntetizovat a izolovat penicilin v čisté formě a v dostatečně velkém množství. Penicilin (PNC) má totiž tu nevýhodu, že je velice nestabilní, rozkládá se a je tedy problém chemicky vyřešit jeho přípravu ve velkém množství. Až v roce 1939 Ernst Chain a Howard Florey (oba z Oxfordské univerzity) vyvinuli metodu pro izolaci a purifikaci penicilinu. Umožnili tak zavedení PNC mezi běžné postupy léčby bakteriálních infekcí během druhé světové války. Dříve byly tyto infekce ve většině případů smrtelné. V roce 1945 za tyto objevy obdrželi Fleming, Florey a Chain Nobelovu cenu (Todar, 2012; Hyde Park Civilizace; [www.nobelprize.org](http://www.nobelprize.org)).

Po druhé světové válce došlo k velkému rozmachu antibiotik. Nová léčiva se dostala do klinického použití a způsobila pozitivní dopad na veřejné zdraví. Koncem 40. let a na počátku 50. let 20. století byly vyvinuty další antimikrobiální látky – například chloramfenikol, tetracyklin, streptomycin (objeven Waksmanem v roce 1944). Čtyřicátá léta až konec 60. let 20. století jsou označovány jako zlatý věk antibiotik (Todar, 2012).

Zatímco Fleming pracoval na vývoji penicilinu, německý lékař Gerhard Domagk oznámil objev syntetické molekuly s antibakteriálními vlastnostmi, kterou nazval Prontosil. Ve 30. letech 20. století byl používán k boji proti infekcím močových cest

či pneumoniím. Francouzští vědci zjistili, že teprve v lidském těle vzniká z Prontosilu vlastní účinná látka. Ta je dnes řazena mezi sulfonamidy. Domagk v roce 1939 získal za svůj objev Nobelovu cenu (Votava, 2005; Todar, 2012).

## 2.2.2 Rozdělení

Dělení antibiotik není jednoduché a neexistuje jejich striktní a pevně dané rozdělení. Jednotlivé skupiny se prolínají. Antibiotika je možné klasifikovat dle různých hledisek. Existuje například rozdělení na základě jejich mechanismu účinku či vlastností. Obecně je jako nejpřehlednější bráno dělení dle chemické struktury antibiotik, které shrnuje základní vlastnosti jednotlivých skupin, jejich farmakodynamické či farmakokinetické účinky. Nevýhodou této klasifikace je nedostatečná představa o účinku konkrétních antibiotik. Proto je pro některé aplikace vhodnější rozdělení dle mechanismu účinku. Celkově lze říct, že metody klasifikace antibiotik jsou různé. Každá má své výhody i nevýhody (Lincová, 2002).

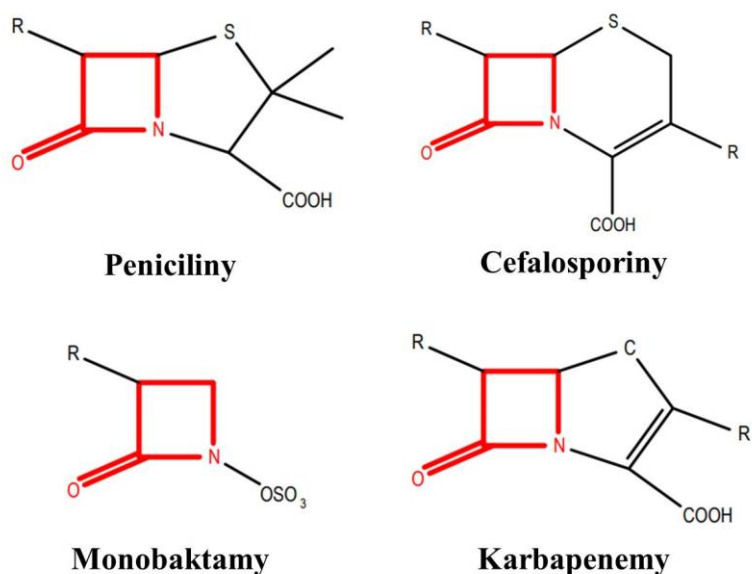
### 2.2.2.1 Skupiny antibiotik

V současné době je známo přibližně 23 unikátních tříd a 18 podtříd klinicky významných antibiotik. S objevy nových tříd, jejich počet neustále narůstá a klasifikační schéma je čím dál tím obtížnější. Mezi základní skupiny antibiotik se řadí:  $\beta$ -laktamová antibiotika, tetracykliny, aminoglykosidy, chloramfenikoly, makrolidy, linkosamidy, polypeptidy, glykopeptidová antibiotika a chinolony. Přehled zástupců jednotlivých skupin popisuje Tabulka 1 (Mahon, 2015).

#### **$\beta$ -laktamová antibiotika**

Základem  $\beta$ -laktamů (mezi které patří: peniciliny, cefalosporiny, monobaktamy, karbapenemy) je beta-laktamový kruh (Obrázek 2). Ten se skládá ze tří atomů uhlíku, jednoho atomu dusíku a dalších substituentů, které jsou typické pro jednotlivé podtřídy. Jednotlivé podskupiny (penamy, cefemy, karbapenemy, monobaktamy i inhibitory  $\beta$ -laktamas) se liší heterocyklem, který tvoří spolu s betalaktamovým kruhem kondenzovaný heterocyklus.  $\beta$ -laktamy ovlivňují stavbu bakteriální stěny, zastavují její syntézu a způsobí smrt bakterie. Účinek všech  $\beta$ -laktamů je především baktericidní. V některých případech se v kombinaci s  $\beta$ -laktamy používají inhibitory  $\beta$ -laktamas (především kyselina klavulanová), které také obsahují beta-laktamový kruh a inhibují

laktamasy některých bakterií.  $\beta$ -laktamasy mají k těmto inhibitorům větší afinitu. Častým jevem při podávání  $\beta$ -laktamů je vznik rezistence bakterií na tuto skupinu látek. Jedním z nejčastějších příčin rezistence je schopnost bakterií tvořit enzym beta-laktamasu, která štěpí beta-laktamový kruh a příslušné ATB se tak stává neúčinným. Jiné bakterie tuto základní strukturu inaktivují. Komplikací při užívání  $\beta$ -laktamových antibiotik je často rozvoj nežádoucích účinků – především alergií. Ty se projevují různými formami kopřivek, ale může dojít až k anafylaktickému šoku. Všechny  $\beta$ -laktamy jsou z organismu vylučovány močí (Votava, 2010; Goering, 2016; Lincová, 2002).



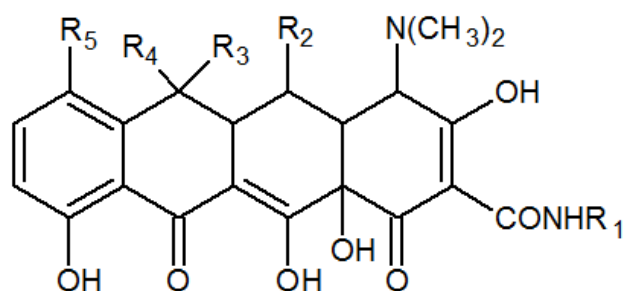
**Obrázek 2 – Struktura  $\beta$ -laktamových antibiotik**

*Struktura beta-laktamového kruhu v molekule jednotlivých skupin antibiotik je zvýrazněna červeně.*

(Zdroj: Votava, 2010) - upraveno

## **Tetracykliny**

Molekula tetracyklinů se skládá ze čtyř šestičlenných kondenzovaných cyklů (Obrázek 3). Jedná se o velmi širokospektrá antibiotika s bakteriostatickým účinkem. Tetracykliny se vážou na malou podjednotku ribozomů a tím dochází k inhibici proteosyntézy. Také nepříznivě ovlivňují syntézu kostí a tvorbu zubní skloviny (vážou se na hydroxyapatit v kostech a zubech). Ukládání tetracyklinů způsobuje žluté zbarvení zubů. U těžších forem jsou výsledkem ukládání modro-šedé skvrny na zubech. Proto je jasná jejich kontraindikace u dětí a těhotných žen. Jsou schopny pronikat přes placentu i do mateřského mléka. Vylučují se močí a žlučí (Martínková, 2007; Goering, 2016; Julák a Pavlík, 2010).



**Obrázek 3 – Struktura tetracyklinů**

*Tetracykliny obsahují 4 cykly s možností vazby substituentů na pěti různých místech ( $R_1$ - $R_5$ ).*

(Zdroj: Goering, 2016) - upraveno

### **Aminoglykosidová antibiotika**

Strukturu těchto ATB tvoří trisacharidy obsahující neobvyklé aminocukry. Obecně aminoglykosidy brání vzniku iniciačních komplexů, důležitých pro zahájení proteosyntézy. Mají velmi rychlý baktericidní účinek s dlouhým postantibiotickým efektem. Z toho důvodu, že se nevstřebávají v GIT a musí být podávána parenterálně (intravenózně nebo infuzí), bývají označována jako nemocniční antibiotika. Nežádoucí účinky aminoglykosidů jsou časté. Jedná se především o účinek nefrotoxický, ototoxický (může vést až k hluchotě) a neurotoxický. Obecně je toxicita těchto antibiotik závislá na plazmatické koncentraci a na celkové době léčby. Z těla se vylučují výhradně močí. Hladiny aminoglykosidů se důkladně monitorují, zvláště u pacientů s poruchami ledvin. Díky jejich dlouhému postantibiotickému efektu je možné tato ATB podávat v delším časovém intervalu, čímž dochází ke snížení jejich toxicity (Martínková, 2007; Votava, 2005; Julák a Pavlík, 2010).

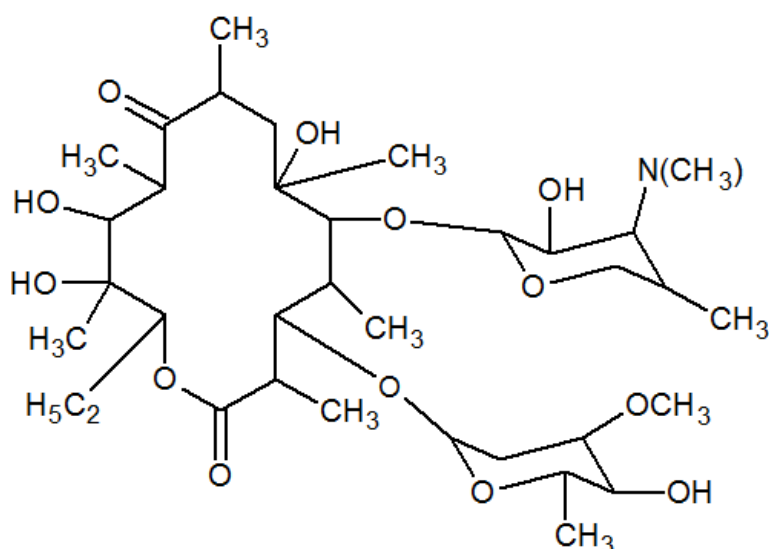
### **Amfenikoly**

Z této skupiny se v humánní medicíně používá chloramfenikol (původně izolovaný ze streptomycet), který má široké spektrum účinnosti a je bakteriostatický. Ostatní amfenikoly jsou používány ve veterinární praxi. Mechanismus účinku chloramfenikolu spočívá v inhibici syntézy proteinů. Používání chloramfenikolu je značně omezeno a většinou se systémově používá jen u závažných stavů nebo jako lék druhé volby. To je dáno především jeho silnou toxicitou, která se projevuje poškozením jater, ledvin a přechodnými až trvalými poruchami kostní

dřeně – aplastická anémie. K lokální aplikaci je chloramfenikol používán častěji (Martínková, 2007; Votava, 2010; Julák a Pavlík, 2010).

## Makrolidy

Pro makrolidová antibiotika je charakteristický makrocyclický laktonový kruh, na který se jsou glykosidovou vazbou vázány dva aminocukry (Obrázek 4). Dle počtu uhlíků v laktonovém kruhu (14-16) se makrolidy dělí do různých skupin. Makrolidová antibiotika inhibují syntézu bílkovin. Jejich výsledný účinek je bakteriostatický. Spektrum účinku nejznámějšího makrolidu (erytromycinu) je stejné jako u penicilinů. Z toho vyplývá, že makrolidová ATB jsou lékem volby u pacientů, kteří jsou alergičtí na  $\beta$ -laktamová antibiotika (Lincová, 2002; Todar, 2012; Votava, 2005).



Obrázek 4 – Struktura erytromycinu

(Zdroj: Votava; 2005, s. 255) - upraveno

## Linkosamidy

Základní strukturou linkosamidů je aminokyselina prolin a aminocukr thiolinkosamin. Jedná o skupinu bakteriostatických antibiotik, jejichž mechanismus účinku je založen na inhibici proteosyntézy. Jsou málo toxické a dobře pronikají do tkání a buněk. Avšak mohou způsobit nežádoucí účinky, mezi které patří například pseudomembranózní kolitida (Julák a Pavlík, 2010; Jindrák, 2014).

## Polypeptidová antibiotika

Polypeptidová antibiotika jsou rozvětvené cyklické polypeptidy. Pro klinické použití jsou využívány polymyxiny (složené z 10 aminokyselin), které obsahují volné

aminoskupiny. Ty rozrušují fosfolipidovou vrstvu membrány bakterií a působí tak baktericidně. Složité a velké molekuly těchto antibiotik obtížně pronikají do tkání. Některá polypeptidová ATB jsou silně toxická, proto se smí používat jen lokálně (Votava, 2005; Julák a Pavlík, 2010; Martínková, 2007).

### **Glykopeptidová antibiotika**

Glykopeptidová antibiotika jsou po chemické stránce peptidy, které obsahují navázanou cukernou složku. Jejich mechanismem účinku je inhibice syntézy buněčné stěny bakterií. Konkrétně brání vlastnímu zesíťování vznikajícího peptidoglykanu. Jedná se tedy o baktericidní antibiotika. Obecně je u této skupiny antibiotik nebezpečný jejich toxický účinek – nefrotoxicita a neurotoxicita (Votava, 2005; Jindrák, 2014; Julák a Pavlík, 2010).

### **Chinolony**

Chinolony představují velkou skupinu syntetických antibiotik. Mezi původní zástupce této skupiny patřila kyselina nalidixová a oxolinová. Ty dnes mají velmi omezenou použitelnost. V současnosti se především využívají fluorované deriváty chinolonů označované jako flourochinolony. Díky atomu fluoru, který obsahují ve své molekule, mají široké spektrum účinku a také dobře pronikají do tkání. Jedná se o ATB, která nemají žádné nebo mají běžné nežádoucí účinky. Jsou kontraindikovány u dětí a těhotných žen. Jejich mechanismus účinku je založen na poškození struktury bakteriální DNA. Konkrétně ovlivňují funkci enzymů, které jsou zodpovědné za tvorbu nukleových kyselin bakterií (Jindrák, 2014; Julák a Pavlík, 2010; Votava, 2005).

### **Sulfonamidy**

Sulfonamidy patří do skupiny látek vyráběných čistě chemickou syntézou. Nejedná se tedy o přírodní produkty. Zjednodušeně jejich mechanismus účinku spočívá v blokaci tvorby kyseliny listové, která patří mezi faktory nutné k syntéze nukleových kyselin bakterií. Účinek sulfonamidů je bakteriostatický. Sulfonamidy jsou však účinné pouze na bakterie, které jsou schopny syntézy vlastní kyseliny listové. Jejich podávání s cílem systémového účinku je celkově omezeno. Často jsou sulfonamidy předepisovány v kombinaci s jinými antibiotiky nebo jsou používány lokálně (Lincová, 2002; Goering, 2016; Lüllmann, 2007).

**Tabulka 1 – Skupiny antibiotik a zástupci**

<b>Skupina</b>	<b>Podskupina</b>	<b>Zástupci</b>		
<b>β-laktamová ATB</b>	Peniciliny	Amino-PNC	amoxicilin, ampicilin	
		Karboxy-PNC	karbenicilin, tikarcilin	
		Ureido-PNC	piperacilin, azlocilin	
		Amidino-PNC	mecilinam	
	Cefalosporiny	I. generace	cefalotin, cefazolin, cefadroxil	
		II. generace	cefuroxim, cefprozil, cefaklor	
		III. generace	ceftriaxon, cefotaxim, cefoperazon	
		IV. generace	cefepim, cefpirom	
		V. generace	ceftarolin	
	Monobaktamy	aztreonam		
Karbapenemy	imipenem, meropenem			
<b>Tetracykliny</b>	-	doxycyklin, minocyklin		
<b>Aminoglykosidy</b>	-	amikacin, gentamicin, neomycin, streptomycin, kanamycin		
<b>Amfenikoly</b>	-	chloramfenikol		
<b>Makrolidy</b>	-	erytromycin, klaritromycin, azitromycin, spiramycin		
<b>Linkosamidy</b>	-	klindamycin, linkomycin		
<b>Polypeptidová ATB</b>	-	bacitracin, kolistin, polymyxin B		
<b>Glykopeptidová ATB</b>	-	vankomycin, teikoplanin		
<b>Chinolony</b>	-	I. generace	kyselina oxolinová, kyselina nalidixová	
		II. generace	ciprofloxacin, ofloxacin, norfloxacin	
		III. generace	grepafloxacin, sparfloxacin	
		IV. generace	moxifloxacin, gatifloxacin	
<b>Sulfonamidy</b>	-	sulfamethoxazol (kotrimoxazol), sulfadoxin		

### 2.2.3 Účinky

Mezi základní vlastnost antibiotik patří jejich schopnost zasahovat do bakteriálních struktur a narušovat jejich funkci. Výsledkem těchto pochodů může být poškození samotné buňky. Výsledkem působení antibiotik je na jedné straně smrt bakterie, tehdy mluvíme o tom, že daná antibakteriální látka má baktericidní účinek. Pokud dojde na straně druhé pouze k zástavě růstu a potlačení množení bakterií,



mluvíme o účinku bakteriostatickém, který může být reverzibilní (vratný). Obecně mají tyto sloučeniny delší nástup účinku. Naopak baktericidní látky působí rychleji a jejich výsledek je nevratný. Tímto způsobem je možné dělit antibakteriální látky dle typu jejich účinku (Tabulka 2). Nelze však tyto dvě skupiny od sebe striktně oddělovat. Existují totiž látky, které na určitý druh bakterií působí bakteriostaticky, ale na jiný druh mají baktericidní účinek. Stupeň účinku daného antibiotika závisí na více faktorech. Například na samotných vlastnostech a povaze ATB, citlivosti konkrétního mikroba a také na koncentraci a době působení dané antimikrobiální látky. V souvislosti s koncentrací a dobou působení jsou uváděny a stanovovány minimální inhibiční koncentrace (MIC) či minimální baktericidní koncentrace (MBC) – viz níže. U některých antibiotik (aminoglykosidy) je pozorován tzv. postantibiotický efekt (PAE). Jedná se o určitou dobu po vysazení (přerušení užívání) ATB, kdy ještě v lidském organismu přetrvává účinek daného antibiotika. Při PAE je tedy na určitou dobu zastaveno množení bakterií. Délka trvání PAE závisí na druhu a koncentraci ATB a také na příslušném bakteriálním druhu (Votava, 2010; Bursová, 2014; Julák, 2015; Martínková, 2007).

**Tabulka 2 – Dělení antibiotik dle typu jejich účinku na bakterie**

<b>Baktericidní účinek</b>	<b>Bakteriostatický účinek</b>
<b>Skupina</b>	<b>Skupina</b>
Beta-laktamová ATB	Tetracykliny
Aminoglykosidy	Makrolidy
Glykopeptidy	Sulfonamidy
Fluorochinolony	Amfenikoly
Nitroimidazoly	Linkosamidy

(Zdroj: Lüllmann, 2004; Votava, 2005) – upraveno

Důležitým parametrem u antibakteriálních látek je také jejich vlastní bezpečnost a účinnost. Cílem je, aby byl ovlivněn (ve smyslu zmírněn nebo zcela vyléčen) patologický stav v lidském organismu, který probíhá na základě přítomnosti primárně nebo podmíněně patogenních mikroorganismů v těle člověka. Zároveň nesmí být daná látka pro organismus toxická či nebezpečná a musí mít takové nežádoucí účinky, které nezatěžují nemocného a jsou méně rizikové než samotná infekce (Jindrák, 2014).

Nežádoucí účinek (NÚ) je definován jako nepříznivá nezamýšlená odpověď organismu na podání jakéhokoli léčivého přípravku. Jednotlivé nežádoucí účinky se dělí podle toho, jakým mechanismem byly vyvolány. Například mechanismus stejný jako očekávaný účinek, genetický mechanismus či NÚ vyvolaný dlouhodobým podáváním léčivého přípravku. Při léčbě infekcí pomocí antimikrobiálních látek je známo velké množství nežádoucích účinků (reakcí) – Tabulka 3. Některé se objevují výjimečně, jiné jsou časté a závažné. Většina z nich jsou nezávažné projevy, které odezní po ukončení terapie. Je však důležité veškeré projevy, které souvisí s podáváním antibakteriální léčby, sledovat a monitorovat, zda nedochází k jejich progresi a zhoršování. Nežádoucí reakce lze pomyslně rozdělit podle toho, jaký účinek na lidský organismus mají – toxický, alergický a biologický. Toxický účinek má rozmanité příznaky, které se odvíjí od toho, jaký orgán je poškozen. Například do neurotoxických příznaků lze zahrnout ototoxicitu. Jiné antibakteriální látky mohou být nefrotoxické (postihují ledviny) nebo například hepatotoxické (poškozují játra). Částečně lze do toxických účinků zahrnout také průjemy a zvracení. Poškození GIT je způsobeno redukcí přirozené bakteriální flóry ve střevech vlivem AML. Z těchto problémů může vzniknout až nejzávažnější NÚ na trávicí trakt – tzv. pseudomembranózní kolitida, kdy je potlačena běžná bakteriální flóra a ve střevě se pomnoží bakterie *Clostridium difficile*. Její toxiny následně poškozují střevní sliznici. Tento závažný stav nastává častěji po širokospektrých antibiotikách a je možné ho již řadit mezi biologické NÚ. Alergické reakce, pro které je často hlavním příznakem vyrážka, jsou typické například při podání penicilinu. U takových případů hrozí nebezpečí vzniku anafylaktického šoku, které je třeba neprodleně řešit (Jindrák, 2014; Martínková, 2007; Urbánek, 2003; Votava, 2005).

### Tabulka 3 – Nežádoucí účinky antibakteriálních látek

V tabulce jsou uvedeny některé nežádoucí účinky, jejich projevy a nejčastější skupiny antibiotik, které je způsobují. Tabulka účinky rozděluje do tří skupin. Jedná se pouze o stručný přehled. Celkových NÚ, včetně jejich projevů, je velké množství. Stejně tak i jednotlivých antibakteriálních látek.

Typ účinku	Zasažený orgán/systém	Projevy	Zástupce
<b>Toxický</b>	játra	poškození jater až selhání	tetracykliny, erytromycin
	srdce	hypertenze, ischemická choroba srdeční	makrolidy
	ledviny	selhání ledvin, hematurie, akutní tubulární nekróza	aminoglykosidy, kolistin
	nervový systém	poškození sluchu až jeho ztráta, poškození periferních nervů	aminoglykosidy
	krev	anemie	chloramfenikol, sulfonamidy
		trombocytopenie	chloramfenikol, linezolid
		leukopenie	peniciliny, cefalosporiny
	růstové chrupavky	ztráta růstu kostí, deformace zubů a kostí	tetracykliny, fluorochinolony
GIT	nauzea, zvracení, průjmy	tetracykliny, erytromycin	
<b>Alergický</b>	celý organismus, kůže	kopřivka, svědění, anafylaktický šok, fotodermatitida	peniciliny, cefalosporiny, sulfonamidy
<b>Biologický</b>	GIT	pseudomembranózní kolitida, průjmy, křeče břicha, horečka	klindamycin
	střeva	hypovitaminóza K, zvracení, průjmy	tetracykliny

(Zdroj: Votava, 2010; Jindrák, 2014; Martínková, 2007) – upraveno

Další vlastnost, která se u jednotlivých skupin antibakteriálních látek liší a souvisí s jejich účinkem, je spektrum účinnosti. To definuje, na jak velké množství mikrobiálních druhů daná látka působí. Dle tohoto parametru rozlišujeme antibiotika se širokým, středním a úzkým spektrem účinku. Širokospektrá ATB působí proti většímu počtu bakteriálních druhů – například tetracykliny. Látky se širokým spektrem účinku mají tu nevýhodu, že ovlivňují a redukují běžnou bakteriální flóru. Tím dochází k mnoha komplikacím z důvodu osídlení sliznic patogenními kmeny. Naopak jejich výhodou je možnost použití k léčbě těžkých sepsí, u kterých neznáme původce, a delší

časová prodleva by mohla ohrozit život pacienta. V těchto případech však hrozí riziko vzniku rezistence (viz níže). Typickým zástupcem antibiotik se středním spektrem účinnosti je penicilin, který působí téměř na všechny grampozitivní bakteriální kmeny. Také je účinný na gramnegativní koky, avšak nepůsobí proti většině gramnegativních tyčků. ATB s úzkým spektrem účinnosti působí jen na velmi omezené množství bakteriálních druhů (Votava, 2005; Lüllmann, 2004; Lüllmann, 2007).

Výsledný účinek antibiotik výrazně ovlivňují jejich fyzikálně-chemické vlastnosti. Především se jedná rozpustnost ve vodě a molekulovou hmotnost. Mezi hydrofilní antibiotika patří beta-laktamy, glykopeptidy a aminoglykosidy. Většinou mají nízkou nebo velmi omezenou vazbu na plazmatické bílkoviny, nejčastěji jsou eliminována ledvinami v chemicky nezměněné podobě. Také nejsou schopna pasivního přechodu přes plazmatické membrány eukaryotických buněk. Makrolidy, tetracykliny, chloramfenikol či fluorochinolony se řadí mezi lipofilní antibiotika. Prostupují plazmatickou membránou volně. Z toho vyplývá, že jsou účinná v boji proti intracelulárním patogenům a jsou schopna přejít i přes hematoencefalickou bariéru. Nejčastěji jsou biotransformovány játry. Co se týká molekulové hmotnosti, obecně je u většiny ATB 300-500 Da. Jedním z nejmenších antibiotik je metronidazol, který dosahuje hmotnosti 171 Da, naopak některé látky mají molekulovou hmotnost okolo 600 Da – kolistin, vankomycin, teikoplanin. Molekulová hmotnost má význam v souvislosti se schopností ATB prostupovat biologickou membránou. Obecně platí, že čím větší je molekulová hmotnost ATB, tím se snižuje jeho propustnost přes dialyzační membránu (Jindrák, 2014).

## **2.2.4 Farmakodynamika a farmakokinetika**

Pro pochopení celkových účinků antibakteriálních látek na lidský organismus jsou důležité farmakodynamika a farmakokinetika, které definují jednotlivé pojmy a parametry spojené s užíváním AML. Důležitý je také vztah mezi podanou dávkou antibiotika a jeho vlastním účinkem, který je ovlivněn řadou faktorů – vlastnostmi daného léčiva (fyzikálně-chemickými, schopností vázat se na bílkoviny, prostupností léčiva), vlastnostmi konkrétní bakterie, stavem pacienta a také výskytem infekce a její lokalizací. Tento vztah je pro klinickou praxi klíčový, protože určuje, jaká dávka antibiotika je bezpečná a účinná (Jindrák, 2014).

Farmakokinetika antibiotik se zabývá osudem léčiva v organismu. Má několik fází – absorpce, distribuce, biotransformace, exkrece. Jako absorpce se označuje přechod ATB z místa podání (sval, GIT) do krevního řečiště. Distribucí se léčivo dostává do místa působení. Biotransformace je metabolická přeměna léčiva na neaktivní látku, která je více hydrofilní a snáze eliminovatelná. V některých případech může biotransformací dojít k aktivaci neaktivní látky (tzv. proléčiva) na aktivní léčivo. Posledním farmakokinetickým dějem je eliminace (vyloučení) látky nebo jejího metabolitu z těla. Jednotlivé skupiny antibiotik se vzájemně liší, proto je při volbě daného ATB potřeba posoudit veškeré parametry a zvolit správné ATB, které neohrožuje pacienta. Mezi základní farmakokinetické parametry antibiotik patří například: biologická dostupnost, jejich vazba na bílkoviny krevní plazmy, distribuční objem, clearance a biologický poločas. Biologická dostupnost určuje podíl z extravaskulárně podaného ATB, který se vstřebá a dosáhne systémového krevního oběhu. Farmakologicky je účinná jen volná (na bílkoviny nenavázaná) frakce antibiotika. Distribuční objem je charakterizovaný jako vztah mezi podanou dávkou ATB a jeho koncentrací v krvi. Má význam především při stanovení úvodní dávky daného antibiotika. Schopnost organismu eliminovat dané antibiotikum kvantitativně vyjadřuje clearance. Jedná se o vztah mezi rychlostí eliminace ATB a jeho koncentrací v krvi. Stanovení clearance se používá pro určení velikosti udržovací dávky a vytvoření intervalu podávání ATB. Doba, za kterou poklesne koncentrace antibiotika v krvi na polovinu podané dávky, se nazývá biologický poločas (Jindrák, 2014; Lincová, 2002; Lüllmann, 2004).

Farmakodynamika antibiotik se zabývá účinkem daného antibiotika na lidský organismus a jeho mechanismem účinku. Také popisuje rychlost nástupu účinku a jeho velikost. Účinek může být dvojitý – závislý na čase, závislý na koncentraci. Antibiotika, u kterých je jejich účinek závislý na dosažené plazmatické koncentraci, jsou účinná tehdy, pokud sérová koncentrace volného ATB výrazně převyšuje stanovenou hodnotu MIC daného bakteriálního kmene. Mezi tuto skupinu antibiotik patří: aminoglykosidy, fluorochinolony, imidazoly. U antibiotik, jejichž účinnost je závislá na čase, je dosaženo maximální účinnosti při dlouhodobém udržení koncentrace nad hodnotu MIC. Tento účinek je typický pro: betalaktamy, makrolidy či linkosamidy (Adámková, 2012).

## 2.2.5 Význam antibiotik

Antibiotika jsou jedním z možných způsobů, jak zastavit nebo alespoň omezit působení a růst mikroorganismů (především patogenních) a přitom nepoškodit lidský organismus. V tomto případě se uplatňuje tzv. selektivní toxicita, což je důležitý princip v antimikrobiální terapii. Jedná se vlastně o selektivní inhibici růstu mikroorganismů bez poškození hostitele. Selektivní toxicita využívá rozdílů mezi metabolismem či strukturou mikroorganismů a konkrétními vlastnostmi nebo znaky lidských buněk. Lze tedy říci, že většina antibiotik působí na určitou strukturu bakterií, ale nikoli na lidské buňky. Kromě antibiotik se do antimikrobiálního působení řadí také antiseptické, desinfekční či sterilizační postupy. Tyto procesy (včetně podávání antibiotických přípravků) jsou neodmyslitelnou součástí zdravotnictví i současné medicíny (Mahon, 2015; Levinson, 2014).

Antibiotickou léčbu je možné dle vztahu k laboratorní diagnostice a indikaci dělit na úvodní, empirickou, a cílenou. Úvodní terapie je volena tak, aby u závažných onemocnění pokryla všechny pravděpodobné původce. Musí být zahájena co nejdříve, ale před podáním daného antibiotika jsou klinicky relevantní vzorky biologického materiálu podrobeny mikrobiologickému vyšetření. Oproti tomu empirická terapie vychází z velmi obecných kritérií pro volbu ATB. Je do jisté míry založena na zkušenosti lékaře odhadnout pro které onemocnění je typická konkrétní bakterie. Před podáním léčby se neprovádí žádné mikrobiologické vyšetření, ani testování citlivosti bakterií na antibakteriální látky. Empirická léčba je založena na podávání antibiotik se širokým spektrem účinku. Cílená léčba je v mnohých případech pokračováním úvodní terapie. Funguje na principu identifikace mikroba před podáním ATB a je selektivně zaměřena na prokázaného původce infekčního onemocnění. Vychází ze znalosti infekčního agens včetně jeho známé a vyšetřené citlivosti k antibiotikům. V těchto případech je nejvhodnější používat antibiotika s úzkým spektrem účinku (Adámková, 2015; Jindrák, 2014; Martínková, 2007).

Antibiotika lze také využít k tzv. antibiotické profylaxi. Jedná se o krátkodobé (většinou jednorázové) podání antibiotika (například před operačním výkonem) s cílem snížit riziko vzniku infekce. Při profylaxi je důležité dodržovat přesná pravidla – ATB určená k profylaxi by neměla být používána k běžné terapii infekcí, nevyužívat profylaxi rutinně, při indikaci profylaxe se řídit vydanými a schválenými postupy, případně konzultovat neobvyklé případy s antibiotickým střediskem.

Antibiotická profylaxe může být primární či sekundární. Primární profylaxe se týká prevence počáteční infekce, zatímco sekundární profylaxe se zabývá prevencí recidivy dané infekce či reaktivací již existující infekce (Brodák, 2010; [ww.ashp.org](http://www.ashp.org); Ryska, 2014).

## 2.2.6 ATB oproti jiným lékům

Jak již bylo zmíněno, jednou ze základních vlastností antibiotik je selektivita jejich účinku. ATB jsou roznášena krví do jednotlivých orgánů a tkání lidského organismu, na které však nepůsobí (kromě nežádoucích účinků) nebo působí jen minimálně. Naopak jsou účinná v boji proti bakteriím. Lze tedy říct, že ATB inhibují růst bakterií nebo je zabíjí, ale nemají vliv na buňky lidského těla. Z toho vyplývá, že zatímco u ostatních léků je hodnocen vztah a vlastnosti dvou činitelů (lidský organismus a léčivo), v případě antibiotických přípravků je nutné brát v potaz interakci 3 subjektů – lidský organismus, léčivo a bakterie. Další vlastností, kterou se ATB liší od ostatních léčivých přípravků, je aplikace přístupu léčby. Při podání antibakteriálního přípravku je nutný individuální přístup ke každému pacientovi. Ze zkušeností vyplývá, že stejné projevy bakteriálního onemocnění mohou způsobovat odlišní původci. Z tohoto důvodu nelze u ATB aplikovat postup hromadného podání jednoho konkrétního antibiotika každému pacientovi. Dalším příkladem je také fakt, že vlastnosti lidské populace jsou poměrně stálé a účinnost běžných léků je tak pro všechny lidi přibližně stejná. Naopak bakterie jsou velmi proměnlivé, rychle se množí, jsou schopny si předávat vlastnosti a geny navozující rezistenci. Z toho jednoznačně vyplývá, že účinnost léčby antibiotiky se u každého jedince může výrazně lišit. Jedním z mnoha rozdílů je také doba užívání a reakce na cílové buňky. Většina léků (kromě antibiotik) se užívá dlouhou dobu, někdy i celoživotně. U antibiotik je však užívání zpravidla krátkodobé. To je dáno účinkem na cílové buňky. Běžné léky modifikují či funkčně mění lidské buňky, zatímco antibiotika své cílové objekty (bakterie) ničí nebo zastavují jejich růst. Další jev, který nebyl pozorován u jiných léků, ale u antibiotik ano, je ovlivnění neléčených osob. Běžným mezilidským kontaktem se bakterie dostávají z jednoho organismu do druhého a mohou mutovat, či si vytvořit odolnost vůči různým podmínkám. Takto změněné bakterie mohou do jisté míry ovlivňovat další osoby a způsobit jim komplikace. Ostatní léky ovlivňují jen osobu, která je užívá (Beneš, 2014).

## 2.2.7 Chyby v užívání

Antibiotika patří mezi skupinu léčiv, která je spojena s výskytem velkého množství chyb. Jedná se o chyby nejen v nesprávném užívání, ale také ve špatné indikaci jednotlivých antibiotik. Neuvážené používání ATB včetně nevhodně doporučené antibiotické terapie má za následek vznik bakteriální rezistence, která je závažnou komplikací antibiotické léčby. Jednou z možností, jak omezit a zpomalit vznik rezistence, je dodržovat tzv. zásady racionální antibakteriální terapie neboli zásady správné antibiotické praxe. Jedná se o soubor doporučených opatření, který by měl být dodržován na různých úrovních (Dostál, 2011; Jindrák, 2014).

Jednou z oblastí je samotná indikace ATB. Lékař nebo odborník by měl ve většině případů před předepsáním antibiotika nejdříve zhodnotit klinický stav pacienta, posoudit jeho závažnost, stanovit diagnózu a následně se rozhodovat o léku volby. Při volbě správného antibiotika a jeho dávkování je třeba zohlednit také vlastní farmakokinetiku a farmakodynamiku léčiva. Dávka antibiotik by měla být spolehlivě účinná a zároveň co nejméně toxická pro lidský organismus. Při racionální terapii je také kladen důraz na mikrobiologický průkaz původce infekčního onemocnění a zjištění jeho vlastností (test citlivosti bakterií na ATB). Cílená terapie výrazně minimalizuje vznik rezistence. Nezbytné je také dodržování délky podávání antibiotik. Ta se výrazně liší dle podávaného ATB, závažnosti klinického stavu a typu diagnózy. Pokud nedojde ke zlepšení stavu pacienta nejpozději do 4 dnů od zahájení léčby, je nutné provést kontrolu diagnózy, případně změnit antibiotikum. Další bod úspěšné a správné léčby je dodržování dávkovacích intervalů. Nesprávně zvolené nebo nedodržované intervaly vedou ke snížení sérových koncentrací antibiotik a mohou mít za následek vznik rezistence (Paterová, 2016; Jindrák, 2014; Lochmannová, 2004; Dostál, 2011).

## 2.3 Mechanismy účinku antibiotik

Existuje několik základních způsobů, kterými antimikrobiální látky zasahují různá místa bakteriálních buněk a interferují s jejich strukturami či metabolickými procesy (Tabulka 4, Obrázek 5). Antibiotika lze podle místa jejich primárního zásahu a následného účinku na bakterie rozdělit do 5 skupin:



### **Inhibitory syntézy buněčné stěny**

Do skupiny látek, které inhibují syntézu buněčné stěny, patří především  $\beta$ -laktamová antibiotika. Jednotliví zástupci skupiny inhibují určitý krok syntézy peptidoglykanu, který je hlavní stavební složkou buněčné stěny (viz kapitola Makromolekulární mechanismus účinku u vybraných skupin látek). Velkou výhodou této skupiny je ta skutečnost, že se buněčná stěna nevyskytuje v lidských buňkách. Tím pádem antibiotikum, které inhibuje syntézu buněčné stěny, je selektivní a zasahuje pouze bakterie, nikoli struktury lidského organismu (Julák, 2015; Mahon, 2015; Navrátil, 2015).

### **Inhibitory syntézy a funkce nukleových kyselin**

Syntéza nukleových kyselin může být narušena v jakémkoli stádiu. ATB, která patří do této skupiny, interferují s polymerasami a inhibují je. Jsou také schopna se vázat na nukleové kyseliny a blokovat tak růst a množení bakterií. Některá antibiotika jsou schopna rozrušit a destruovat vlákna bakteriální DNA. Většina těchto antibakteriálních látek však není selektivní a nepříznivě ovlivňuje buňky lidského organismu (Todar, 2012; Julák, 2015)

### **Inhibitory funkce cytoplazmatické membrány**

Cytoplazmatická membrána je tvořena lipidovou dvojvrstvou s vmezeřenými proteiny. Pro bakterie je životně důležitá. Slouží k aktivnímu transportu iontů i dalších látek a významnou roli hraje při dělení bakterií. Tato skupina antibiotik dezorganizuje strukturu cytoplazmatické membrány bakterií nebo inhibuje její funkci. Velmi rychle dochází k rozrušení membrány, nastává porucha permeability, únik kationtů a následná smrt bakterie. Vzhledem k podobnosti fosfolipidů v bakteriálních a eukaryotických membránách není tento účinek dostatečně specifický. Na lidský organismus tato antibiotika působí toxicky a často se nedoporučuje jejich systémové používání (Němec, 2015; Todar, 2012; Julák, 2015).

### **Inhibitory proteosyntézy**

Velká skupina klinicky používaných antibiotik inhibuje určitý krok v procesu syntézy proteinů. Některé skupiny ATB narušují proces translace, jiné se vážou na podjednotky ribozomů nebo brání elongaci peptidového řetězce. V proteosyntéze, která probíhá jak u bakteriálních, tak eukaryotických buněk, lze najít patrné odlišnosti.

Těch se využívá pro dosažení selektivní toxicity daných ATB na bakterie. Jedná se především o rozdíly ve velikosti ribozomálních jednotek. Bakterie obsahují ribozomy 70S, zatímco v lidských buňkách se nachází ribozomy 80S (Goering, 2016; Todar, 2012; Němec, 2015; Horáček, 2000).

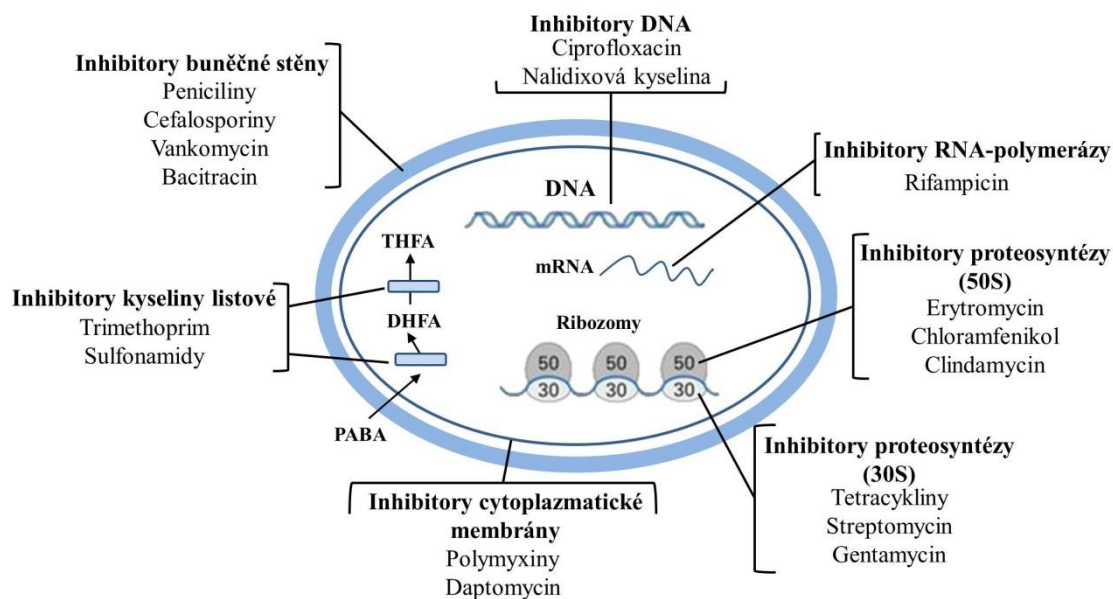
### **Inhibitory syntézy kyseliny listové**

Kyselina listová je důležitý koenzym při syntéze purinů a thymidinu. Tyto látky jsou základní stavení jednotky DNA i RNA potřebné při růstu či dělení buněk. Bakterie jsou schopny si samy syntetizovat kyselinu dihydrolistovou, která je následně redukována na tetrahydrolistovou kyselinu. K správné syntéze kyseliny listové je nutná *p*-aminobenzoová kyselina, která slouží jako růstový faktor a bakterie ji zabudovávají do dihydrolistové kyseliny. AML, které inhibují syntézu kyseliny listové, bývají označovány jako antimetabolity. Jejich struktura je velmi podobná kyselině *p*-aminobenzoové. Z toho vyplývá, že obsazují její cílová místa a syntéza dihydrolistové kyseliny je inhibována. Výsledkem je nedostatek kyseliny tetrahydrolistové a dochází ke snížení hladiny purinů. Což má za následek bakteriostatický efekt. Jiný způsob zásahu do metabolismu kyseliny listové je vazba antibiotik na enzymy nutné k syntéze tetrahydrolistové kyseliny (Lüllmann, 2004; Julák, 2015; Navrátil, 2015).

### **Tabulka 4 – Mechanismus účinku ATB včetně zástupců**

*Tabulka popisuje jednotlivé skupiny antibiotik rozdělené dle jejich mechanismu účinku.*

<b>Mechanismus účinku</b>	<b>ATB</b>
Inhibice syntézy buněčné stěny	β-laktamy, bacitracin, vankomycin
Inhibice syntézy a funkce nukleových kyselin	chinolony - inhibice DNA rifampicin - inhibice RNA
Inhibice funkce cytoplazmatické membrány	polymyxiny
Inhibice proteosyntézy Inhibice ribozomů	aminoglykosidy, tetracyklíny, makrolidy, chloramfenikol, klindamycin
Inhibice syntézy kyseliny listové	sulfonamidy, trimethoprim



**Obrázek 5 – Schéma mechanismu účinku antibiotik na buňku**

Na obrázku jsou znázorněny jednotlivé struktury bakteriální buňky a skupiny antibiotik (včetně vybraných zástupců), které na danou cílovou strukturu působí.

*PABA* – kyselina *p*-aminobenzoová, *DHFA* – dihydrolistová kyselina,

*THFA* – tetrahydrolistová kyselina.

(Zdroj: Němec, 2015) – upraveno

## 2.4 Makromolekulární mechanismus účinku u vybraných látek

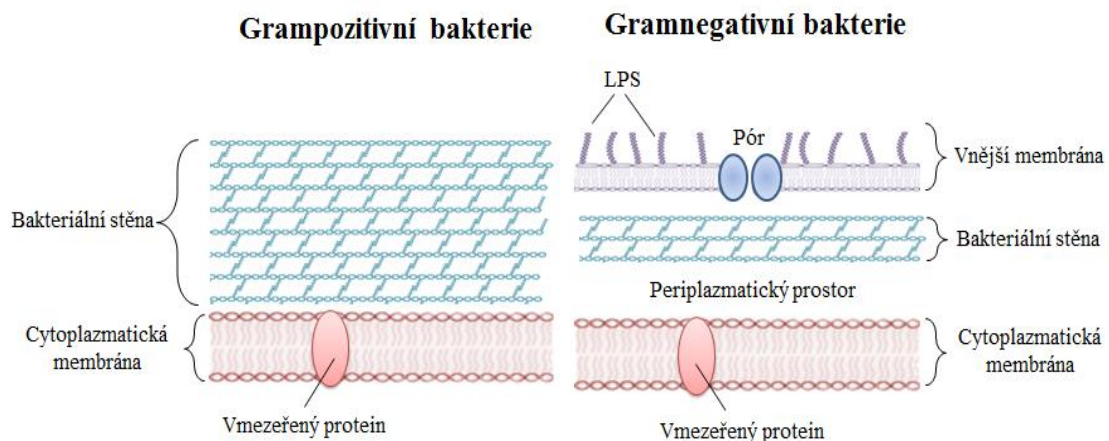
Pro pochopení vlastních mechanismů účinku daných látek a k jejich podrobnému vysvětlení je nutná znalost základních bakteriálních struktur, které jsou cílovým místem vybraných látek. V tomto případě především bakteriální stěny, ribozomů a dějů, které s nimi souvisí.

### 2.4.1 $\beta$ -laktamová antibiotika

Jedná se o skupinu, která působí na buněčnou stěnu bakterií, konkrétně na její syntézu. Základem bakteriální stěny je peptidoglykan (murein), který je tvořen pravidelně se střídajícími molekulami *N*-acetylglukosaminu (NAG) a kyseliny *N*-acetylmuramové (NAM), které jsou spojeny  $\beta$ -1,4-glykosidovou vazbou. Od těchto polysacharidů vedou oligopeptidové řetězce, které jsou tvořeny čtyřmi aminokyselinami – L-alaninem, D-alaninem, D-glutamovou kyselinou. Čtvrtá

aminokyselina je pro každý bakteriální druh specifická. Může to být například: L-lyzin, L-ornitin, L-glycin a další. Tetrapeptidy jsou navzájem propojeny a vytváří typickou síťovitou strukturu, která je velmi pevná a mimo jiné plní funkci opěrné kostry bakterie. Složení bakteriální stěny se u grampozitivních a gramnegativních bakterií značně liší (Němec, 2015; Finch, 2012; Julák, 2010).

U grampozitivních bakterií stěnu tvoří několik vrstev peptidoglykanu a je tak poměrně silná (20 nm). Jednotlivé vrstvy jsou na cytoplazmatickou membránu vázány teichoovými kyselinami, které prostupují na vnější povrch bakterie. Buněčná stěna grampozitivních bakterií neobsahuje žádné lipidy. Naopak stěna gramnegativních bakterií je tenká (10 nm), protože obsahuje zpravidla jen jednu vrstvu peptidoglykanu. Na ni je vázána tzv. vnější membrána, která je tvořena klasickou lipoproteinovou dvojvrstvou s lipopolysacharidy (LPS), které jsou typickými antigeny. Na peptidoglykan jsou pevně vázány také některé bílkoviny. Jejich uspořádání tvoří tzv. hydrofilní pór. Mezi vnější membránou a bakteriální stěnou je periplazmatický prostor (Julák, 2010; Němec, 2015).



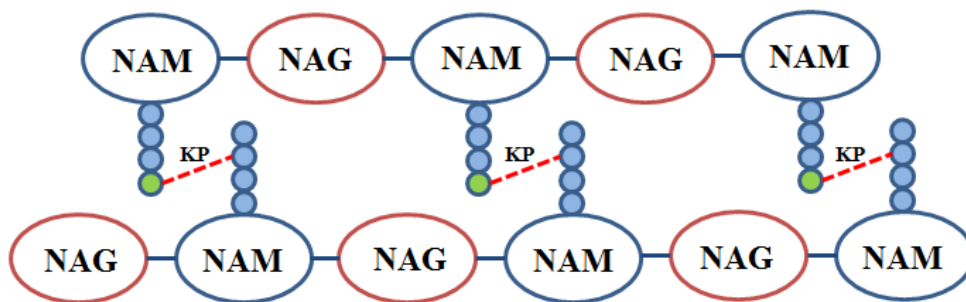
**Obrázek 6 – Srovnání buněčné stěny u grampozitivních a gramnegativních bakterií**

*Obrázek znázorňuje hlavní rozdíly ve stavbě bakteriální stěny mezi grampozitivními a gramnegativními bakteriemi. Kromě stěny jsou patrné i rozdíly v dalších vrstvách.*

*U gramnegativních je značný periplazmatický prostor a vnější membrána s lipopolysacharidy (LPS).*

Syntéza peptidoglykanu probíhá v několika fázích. Právě jednotlivé fáze jsou cílovým místem zásahu antibiotik.  $\beta$ -laktamová antibiotika ovlivňují poslední fázi syntézy, která bývá označována jako extracelulární fáze. Ta zahrnuje polymeraci

a konečné zesílení peptidoglykanu do trojrozměrné struktury pomocí enzymů. Polymerace nastává přenosem nového (v cytoplazmě vytvořeného) peptidoglykanového řetězce na neredukující *N*-acetylglukosamin, který je součástí původního peptidoglykanu. Nový peptidoglykanový řetězec je k již existujícímu peptidoglykanu připojen pomocí komplexu enzymů transpeptidasy a karboxypeptidasy. Transpeptidasa odstraní jednu aminokyselinu z každého peptidového řetězce. Výsledkem je zkrácení oligopeptidového řetězce na 4 aminokyseliny. Na tento krok naváže D-alanin-karboxypeptidasa (zkráceně karboxypeptidasa), která vytvoří vazbu mezi peptidovými řetězci jednotlivých polysacharidů (původních i nových), které dohromady tvoří peptidoglykan (Obrázek 7). Konkrétně se jedná o vytvoření peptidové vazby mezi třetí a čtvrtou aminokyselinou, kterou bývá D-alanin (Příborský, 2004; Anderson, 2012; Neu, 1996).



**Obrázek 7 – Schématické znázornění struktury peptidoglykanu**

*Na obrázku je znázorněna struktura peptidoglykanu tvořená molekulami NAG (*N*-acetylglukosaminu) a NAM (*kyseliny N*-acetylmuramové). Na NAM jsou navázány oligopeptidové řetězce. Ty jsou složeny z aminokyselin. Důležitá je aminokyselina D-alanin (zelená barva). Mezi ní a třetí aminokyselinou druhého řetězce vzniká za účasti karboxypeptidasy (KP) peptidová vazba (červená přerušovaná čára).*

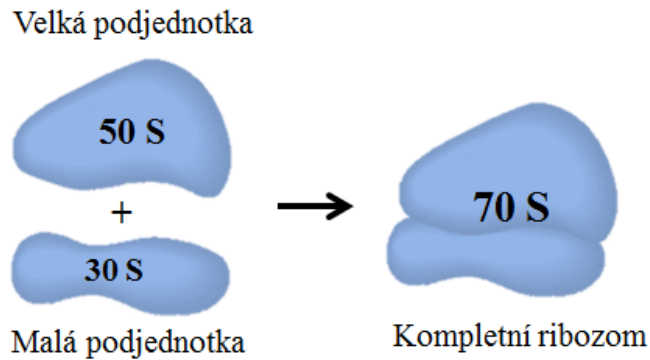
Mechanismus účinku  $\beta$ -laktamových antibiotik spočívá v inhibici enzymového komplexu transpeptidasy a karboxypeptidasy (známého jako PBP – penicilin-binding protein). Struktura této skupiny ATB je velmi podobná struktuře dipeptidu tvořeného dvěma D-alaniny, který je na konci peptidového řetězce a na který reaguje právě karboxypeptidasa, aby mohla utvořit peptidovou vazbu. Čtyřčlenný  $\beta$ -laktamový kruh se pro PBP stává falešným substrátem. Jedná se tedy o kompetitivní inhibici enzymu, kdy antibiotikum a D-alanin soutěží o vazebné místo na enzymu. Pokud je tento komplex enzymů již inhibován antibiotikem, peptidová vazba nevzniká, zesílení

a zpevnění peptidoglykanu je narušeno. Murein již nemá stabilní strukturu a celá bakteriální kostra se hroustí. Výsledkem působení  $\beta$ -laktamů na grampozitivní bakterie je vysoký osmotický tlak uvnitř bakteriální buňky a následná lýza. Obecně lze říct, že např. PNC je účinnější na grampozitivní bakterie, protože je snadněji transportován k vrstvě peptidoglykanu. U gramnegativních bakterií je průchod k mureinu ztížen díky vnější membráně, která je tvořena lipoproteinovou dvojvrstvou, skrze kterou penicilin neproniká. Může se transportovat do bakterie jen pomocí přítomných pórů (Palmer, 2012; Anderson, 2012; Neu, 1996; Příborský, 2004; Dale-Skinner, 2008).

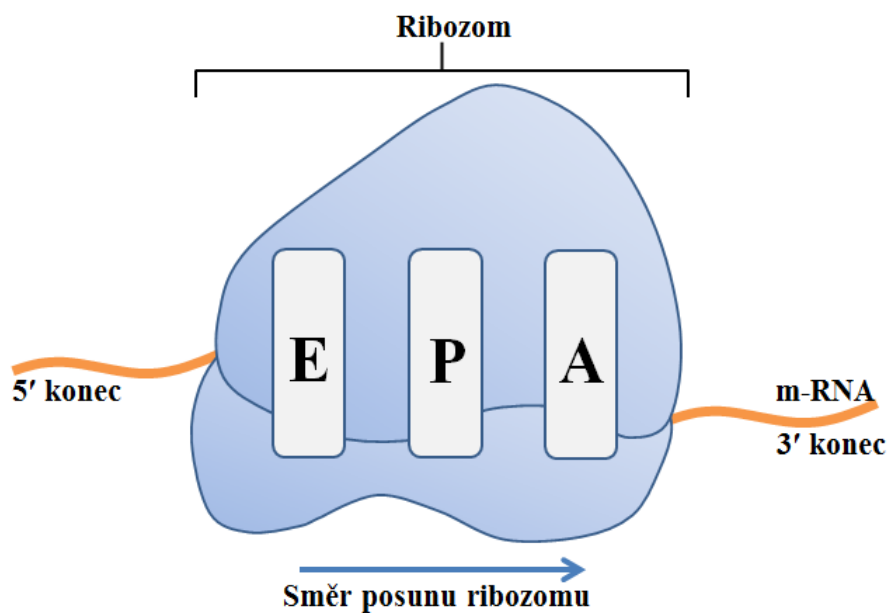
### 2.4.2 Makrolidy

Makrolidy patří mezi antibiotika, která inhibují proteosyntézu. Jedná se o klíčový proces výroby proteinů potřebných pro existenci bakterie, který je energeticky velmi náročný. Na syntézu bílkovin je třeba 90 % veškeré energie bakterie. Proteiny tvoří asi polovinu váhy sušiny v bakteriální buňce. Pro proteosyntézu jsou klíčové následující makromolekuly: ribozomy, m-RNA a t-RNA.

Bakteriální ribozom (70S) se skládá ze dvou podjednotek (Obrázek 8) - velké (50 S) a malé (30 S). Dohromady ho tvoří 20 proteinů – 6 v malé podjednotce a 14 ve velké. Další součástí ribozomu jsou specifické domény (otvor pro vznikající protein) a r-RNA (ribosomální RNA), která se podílí na jeho struktuře a stavbě. Ribozomy slouží k tvorbě proteinů. Ta je zahájena spojením obou podjednotek na molekule m-RNA. Malá podjednotka zodpovídá za navázání t-RNA s danou aminokyselinou na příslušný kodón. Velká podjednotka hraje roli při tvorbě peptidové vazby a uvolňování AMK z t-RNA. Ve struktuře ribozomů jsou rozeznávána 3 typická místa – A, P, E. A-místo je charakterizováno jako vstupní a slouží jako vazebné místo pro t-RNA. Z něho je t-RNA s AMK přenesena na P-místo, kde dochází k připojení aminokyseliny k peptidovému řetězci. Samotná t-RNA pak ribozom opouští E-místem (Obrázek 9) (Lüllmann, 2004; Melnikov, 2012; Orelle, 2015).



**Obrázek 8 – Podjednotky ribozomu**

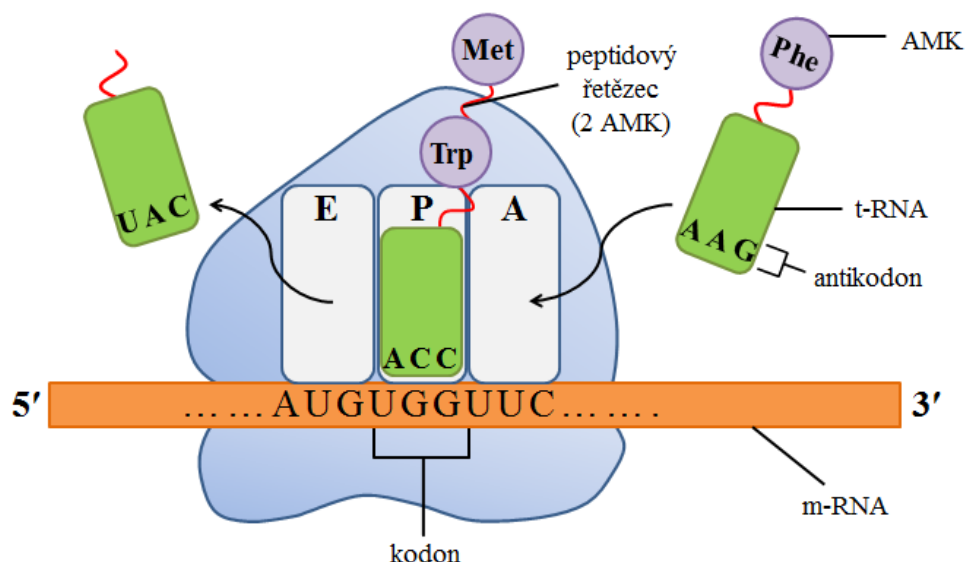


**Obrázek 9 – Struktura ribozomu**

*Během syntézy proteinů se ribozom pohybuje po vlákně mRNA směrem: 5' konec až 3' konec. t-RNA s navázanou aminokyselinou vstupuje do ribozomu A místem. tRNA, která již předala AMK do peptidového řetězce, opouští P místo a posouvá se na místo E. Přes něj pak opouští ribozom. t-RNA, na kterou je vázaná nová aminokyselina vstupuje do místa A, v ribozomu se na P místě vytvoří peptidová vazba mezi danou AMK a již existujícím peptidovým řetězcem. Peptidový řetězec tak roste (Anderson, 2012).*

K zahájení proteosyntézy je nutné rozpojení dvoušroubovice DNA v místě genetického kódu dané bílkoviny, která má být vytvořena. Rozpletení DNA zajišťuje enzym helikasa. Poté na jedno vlákno nasedá enzym RNA-polymerasa, který přepíše genetickou informaci z DNA (deoxyribonukleové kyseliny) do RNA (ribonukleové

kyseliny). Tento proces se nazývá transkripce. Výsledkem je tedy m-RNA (messengerová RNA), která je téměř přesnou kopií vybraného DNA segmentu. Na kompletní m-RNA vlákno se váže nejprve malá podjednotka ribozomu a později i velká. Nutný je také proces translace, který spočívá v přeložení genetického kódu m-RNA do pořadí aminokyselin. Po nasednutí obou podjednotek ribozomu na m-RNA a nalezení iniciačního tripletu (kodonu) AUG začíná proteosyntéza. Kodon je typický vždy pro jednu konkrétní aminokyselinu (AMK). Ty jsou k ribozomu přiváděny pomocí dalšího typu RNA – tzv. t-RNA (transferová). Jednotlivé t-RNA přináší vždy jednu aminokyselinu díky tomu, že obsahují antikodon. Jedná se o sekvenci tří nukleotidů, která je komplementární ke kodonu na m-RNA. t-RNA vstupují do ribozomu A-místem (Obrázek 10). Řazení jednotlivých t-RNA s navázanými AMK vedle sebe vede k vytvoření peptidové vazby mezi aminokyselinami pomocí enzymu peptidyltransferasy. V tomto kroku se nachází t-RNA v ribozomu na P-místě. Ribozom se posune o jeden kodon a celý proces se opakuje. Samotná t-RNA (bez navázané AMK) je z ribozomu transportována ven přes E-místo. Vznikající peptidový řetězec se stále prodlužuje. V případě vzniku konečné bílkoviny je proteosyntéza zastavena tzv. stopkodonem. Je to sekvence nukleotidů na m-RNA v podobě UAA, UAG, UGA. Po dokončení proteosyntézy se od sebe obě podjednotky oddělí a ribozom se rozpadne (Finch, 2012; Příborský, 2001; Anderson, 2012).



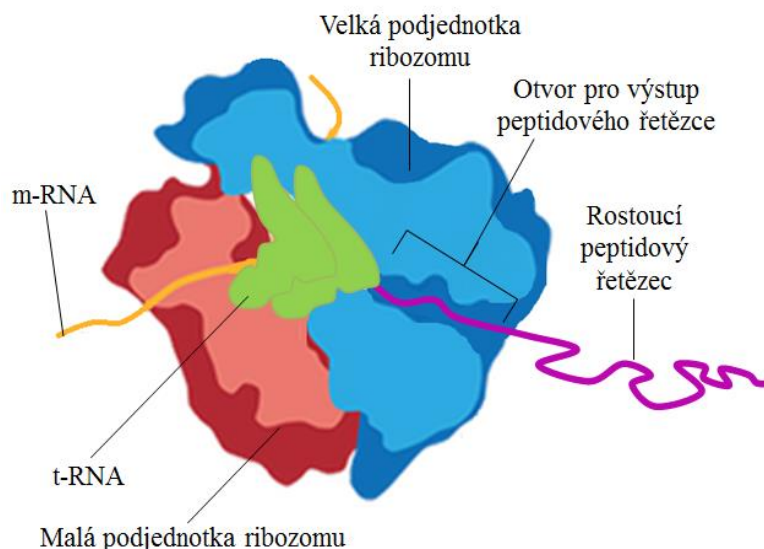
**Obrázek 10 – Schématické znázornění proteosyntézy**

Jeden ze dvou možných mechanismů účinku makrolidů vychází ze skutečnosti, že vazebné místo pro makrolidy je umístěno na velké ribozomální podjednotce uvnitř



tzv. otvoru (tunelu) pro výstup vznikajícího peptidového řetězce (Obrázek 11). Tento výstupní otvor je relativně široký, obsahuje však zúžení, které je tvořeno proteiny L4 a L22, které jsou umístěny blízko centra peptidyltransferasy. A právě makrolidy se váží v blízkosti tohoto zúžení a představují určitou překážku a zábranu pro rostoucí polypeptidový řetězec. Prvních několik aminokyselin je ke vznikajícímu peptidovému řetězci připojeno bez problémů. Teprve po vytvoření delšího peptidového řetězce se projeví účinek navázaného makrolidu. Dochází k přerušení růstu polypeptidu a k inhibici proteosyntézy. Zjednodušeně lze říct, že makrolidová antibiotika blokují vývoj vznikajícího polypeptidového řetězce (Kannan, 2011; Wilson, 2009; Gaynor, 2003; Kannan, 2014).

Vedle bránění výstupu vznikajících proteinů je uváděn ještě jeden mechanismus účinku makrolidů. Ten spočívá v blokaci procesu translokace. Jedná se o znemožnění posunu ribozomu na m-RNA o další triplet. Tím pádem nedochází k přesunu t-RNA z P-místa v ribozomu na E-místo. To znamená, že není uvolněno A-místo pro další t-RNA s novou AMK. Vznik a vývoj peptidového řetězce je tak zastaven stejně jako celá proteosyntéza. Jedná se však o reverzibilní proces, který bude obnoven v případě poklesu koncentrace makrolidových antibiotik. Jeho následkem je uvolnění makrolidů z 50S podjednotky a obnovení proteosyntézy (Příborský, 2001; Gaynor, 2003).



**Obrázek 11 – Schématické znázornění výstupu peptidového řetězce z ribozomu**  
*Ribozom je na obrázku barevně rozdělen na své 2 podjednotky – velká (modrá barva) a malá (červeně) podjednotka. Fialově je znázorněn peptidový řetězec vznikající proteosyntézou.*

(Zdroj: Cabrita, 2009; Waudby, 2013) - upraveno

## 2.5 Rezistence

Antimikrobiální rezistence je schopnost mikroorganismů (bakterií, virů) odolávat účinkům antimikrobiálních látek. Je možné používat také termín antibiotická rezistence. V tom případě se jedná o schopnost bakterií odolávat účinku daných antibiotik, což se projeví snížením antibiotického účinku až jejich inaktivací. Z toho plyne, že pokud je bakterie na určité antibiotikum rezistentní, nepůsobí na ni baktericidní ani bakteriostatický účinek antibiotika. Obecně jsou rozlišovány 2 typy rezistence – primární a sekundární (Bursová, 2014; Jindrák, 2014; [www.cdc.gov](http://www.cdc.gov)).

Primární rezistence bývá často označována jako přirozená. Není ovlivněna předchozím kontaktem bakterie s antibiotickou látkou. Jedná se o geneticky podmíněnou vlastnost, která má trvalý charakter a přenáší se z generace na generaci. Daná bakterie obsahuje geny o necitlivosti na jedno či více antibiotik. Z jiného pohledu je možné chápat primární rezistenci jako přirozený jev některých bakterií, u kterých je jejich necitlivost zapříčiněna absencí (chyběním) cílového místa či struktury pro dané ATB. Typickým příkladem jsou mykoplazmata, která nemají buněčnou stěnu. Jsou tak rezistentní vůči antibiotikům působícím na syntézu buněčné stěny – peniciliny (Navrátil, 2015; Julák, 2015; Martínková, 2007).

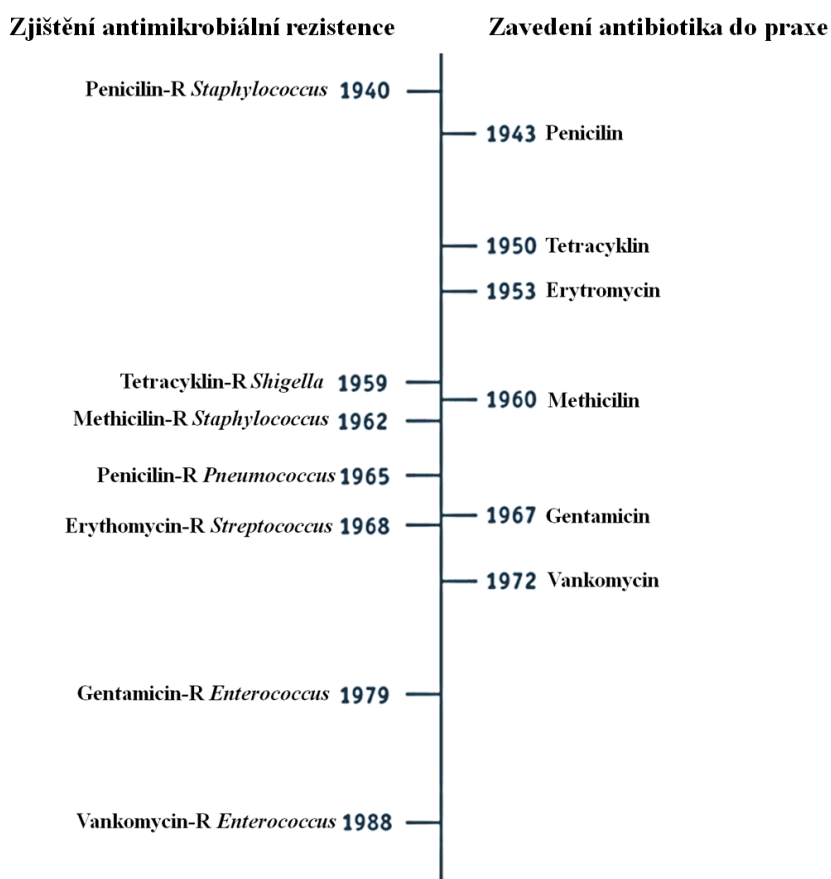
Sekundární neboli získaná rezistence představuje v současnosti značný problém. Její podstatou je změna v genomu bakterie, která může být způsobena bodovou mutací nebo tzv. horizontálním genetickým přenosem (přijetím DNA od jiných bakterií). Z toho plyne, že z bakterií původně citlivých na určité antibiotikum se touto změnou mohou stát bakterie rezistentní (Jindrák, 2014; Julák, 2015; Navrátil, 2015).

Značnou komplikací je vznik zkřížené rezistence. Jedná se o specifický typ rezistence bakterií na antibiotika sobě blízká, nejčastěji ze stejné skupiny, která se vyznačují stejným mechanismem účinku a podobnou chemickou strukturou. Rezistence bakterií na zcela chemicky odlišná antibiotika je označována jako sdružená rezistence. Dalším vážným problémem je tzv. multirezistence (mnohočetná rezistence), kdy je daná bakterie rezistentní k více různým antibiotikům (Todar, 2012; Jindrák, 2014; Bursová, 2010; Schindler, 2008).

Selekční tlak, který je vytvořen neuvážlivým používáním antibiotik, silně potlačuje citlivé bakterie a podporuje množení bakterií rezistentních. Ty jsou odolné vůči stále většímu množství antibiotik. Tento tlak při používání antibiotik vede také ke schopnosti bakterií předávat si geny kódující rezistenci (Schindler, 2008).

## 2.5.1 Vznik a vývoj rezistence

Antibiotická rezistence byla pozorována brzy po objevení antibiotik (Obrázek 12). Sám Fleming brzy po svém objevu upozornil na možnost vzniku odolnosti bakterií vůči antibiotiku. Ukázalo se, že bakterie jsou schopny si poměrně rychle vytvořit rezistenci na každou nově objevenou látku (Kolář, 2007; Žemličková, 2012).



**Obrázek 12 – Vývoj bakteriální rezistence**

Časová osa zobrazuje vývoj rezistence jednotlivých bakteriálních druhů vůči objeveným antibiotikům. PNC byl používán již před válkou, proto již v roce 1940 byly některé rody (*Staphylococcus*) vůči němu rezistentní. V klinické praxi se oficiálně používal až od roku 1943.

R – rezistentní.

(Zdroj: [www.cdc.gov](http://www.cdc.gov)) – upraveno

Rezistence může vzniknout i tzv. přenosem genu pro rezistenci. V tomto případě se rozlišuje rezistence vyvolaná plazmidy či transpozony. Plazmidy zprostředkovaná rezistence je nejvýznamnější hned z několika důvodů. Vyskytuje se u více bakteriálních

druhů, především u gramnegativních bakterií. Plazmidy jsou extrachromozomální, kruhové, dvouvláknové elementy DNA, které určují různé vlastnosti bakterií, jako je například rezistence vůči jednomu či více ATB. Pokud nesou informaci o rezistenci, označují se jako R-plazmidy. Mezi bakteriemi jsou přenášeny vysokou rychlostí, především konjugací. Transpozomy jsou úseky DNA, které se mohou přemísťovat z jednoho místa DNA na jiné v rámci jedné molekuly či mezi různými molekulami DNA. Pro tuto vlastnost bývají nazývány „skákající geny“. Z hlediska medicíny jsou velmi významné. Mohou kódovat významné bakteriální vlastnosti včetně rezistence (Horáček, 2000; Spížek, 1999; Julák, 2010).

Kromě možnosti, že je rezistence zakotvena v genetické výbavě určitého bakteriálního kmene, mohou bakterie rezistenci získat jinými způsoby – mutací a vertikálním či horizontálním přenosem. Co se týká mutací vznikajících v bakteriální DNA, jedná se především o mutace bodové – delece, substituce či adice jednoho popřípadě několika párů bazí, které zapříčiní změnu aminokyselin ve struktuře peptidů. Následně je syntetizován bílkovinný produkt zabraňující působení daného antibiotika. Vertikální přenos znamená, že geny rezistence jsou během replikace DNA přeneseny přímo do všech dceřiných bakterií. Do jisté míry lze přiřadit mutace k vertikálnímu přenosu. Dalším mechanismem, který je odpovědný za získání rezistence vůči antibiotikům, je horizontální přenos, který probíhá mezi dvěma bakteriemi a patří mezi nejčastější způsoby přenosu rezistence. Mezi mechanismy horizontálního přenosu patří konjugace, transdukce a transformace. Konjugací se rozumí přenos genové informace ve formě krátkých úseků DNA mezi dvěma bakteriemi (v rámci jednoho druhu i mezidruhově) pomocí tzv. sex-pilů. Transdukce je proces, při kterém specifické viry (bakteriofágy) vnáší do bakterie spolu se svojí genetickou informací i část DNA, kterou získaly při napadení příbuzné bakterie. Jednoduše lze transdukcii popsat jako přenos úseku genetické informace do bakterie pomocí bakteriofága. Transformace je charakteristická přenosem uvolněné DNA. Tato DNA je přítomna ve vnějším prostředí z důvodu smrti a lýzy jiné bakterie. Jedná se o mezibuněčný přenos genetické informace a výsledkem je získání nových vlastností včetně rezistence (Bursová, 2014; Todar, 2012; Spížek, 1999).

Vývoj rezistence je nevyhnutelný proces. Je ovšem možno ovlivnit, jak rychle a v jaké míře se bakteriální rezistence vyvine. Moderní používání antibiotik způsobilo obrovský nárůst počtu rezistentních bakterií. V průběhu 8-12 let nadměrného a nesprávného užívání jsou rozšířeny bakteriální kmeny odolné vůči více ATB. Některé

kmeny dosáhly takové míry rezistence, že nejsou pro léčbu k dispozici prakticky žádná antibiotika (Žemličková, 2012; Kolář, 2007).

V minulosti byla bakteriální rezistence spojována především s nozokomiálními nákazami. Jedná se o onemocnění, která vznikají v souvislosti s pobytem ve zdravotnickém zařízení a výrazně komplikují další péči. Často mezi původce nozokomiálních nákaz patří právě multirezistentní kmeny bakterií, které mimo jiné výrazně znesnadňují léčbu, prodlužují dobu hospitalizace, zvyšují náklady spojené s léčbou a mortalitu. V dnešní době je výskyt rezistentních bakteriálních kmenů pozorován kromě zdravotnických zařízení také v komunitách. Je tedy nutné myslet na to, že původci infekcí, šířících se v komunitě, mohou být na běžnou antibiotickou léčbu značně odolní. Typickým příkladem je působení selekčního tlaku makrolidových antibiotik, které zapříčinilo výskyt erytromycin-rezistentních kmenů v České republice (Kolář, 2007; Beneš, 2014).

Problém vzniku bakteriální rezistence se netýká pouze humánní medicíny, ale zasahuje také do veterinární medicíny. Zde je příčinou vzniku rezistence nejčastěji chybná indikace či nevhodné podání daných antibiotik. Ta jsou používána nejen k prevenci a terapii, ale také slouží jako stimulatory růstu. V tomto případě hrozí u bakterií nebezpečí vzniku zkřížené rezistence (Kolář, 2007).

Rezistence se vyvíjela a rozšiřovala také v České republice. Na počátku devadesátých let 20. století došlo k prudkému nárůstu spotřeby antibiotik. V té době se ATB používala pro léčbu většiny infekcí. Zvýšení spotřeby nových makrolidových antibiotik, cefalosporinů či chinolonů (dříve byla tato antibiotika nedostupná) vedlo ke vzniku rezistence hlavních původců infekčních onemocnění právě na tato antibiotika. Výrazně se zvýšila rezistence u některých druhů bakterií z rodu *Streptococcus* vůči makrolidům. Byl také sledován vzestup rezistence u bakterie *Escherichia coli* vůči chinolonům. Dalších podobných případů vyvíjející se rezistence bylo zaznamenáno ještě několik, a proto byla zavedena opatření, která mají vznik rezistence zpomalit či pokud možno úplně zastavit. Mezi základní opatření patří uvážlivá a cílená indikace jednotlivých antibiotik a jejich správné užívání (Žemličková, 2012).

## **2.5.2 Mechanismy rezistence**

Pro vlastní rozvoj rezistence mohou bakterie vytvořit různé mechanismy, kterými se přizpůsobí nepříznivým účinkům antibiotik, a mohou se tak bránit.

Jednotlivé mechanismy jsou bakterie schopny vzájemně kombinovat, čím se stávají ještě odolnější. Další fakt, který výrazně zvyšuje odolnost bakterií, je jejich krátká generační doba – část bakterií je schopna se dělit každých 20-30 minut. Pokud se u bakterie vyskytne mutace, která zvyšuje odolnost, dochází velice brzy k rychlému rozmnožení zvýhodněného klonu (Beneš, 2014; Mahon, 2015).

Mezi základní mechanismy rezistence bakterií patří enzymatická inaktivace ATB, změna cílového místa v bakterii, aktivní vypuzování léčiva a omezení průchodnosti antibakteriální látky do vnitřního prostředí bakterie (Levinson, 2014; Votava, 2005).

### **Enzymatická inaktivace antibiotika**

Specifické bakteriální enzymy štěpí (degradují) či modifikují chemickou strukturu antibiotika a tím ho inaktivují. Samotný proces inaktivace může probíhat již před vstupem do bakterie nebo uvnitř. Výsledkem je ztráta antibakteriální aktivity ATB, jeho převedení na neúčinnou látku a vyloučení z bakterie i se samotnými enzymy. Typickým příkladem tohoto mechanismu jsou  $\beta$ -laktamasy, které produkují nejčastěji stafylokoky. Grampozitivní bakterie vylučují tyto enzymy do okolí, jedná se volné  $\beta$ -laktamasy. U jiných bakterií jsou přítomny ve vnitřním prostoru a chrání tak ostatní orgány před účinkem antibiotik. Aby mohly příslušné bakteriální enzymy plnit svoji funkci, je u daného ATB nutná přítomnost  $\beta$ -laktamového kruhu. Proto jsou nejčastějším cílem tohoto obranného mechanismu  $\beta$ -laktamová antibiotika – peniciliny, cefalosporiny. Na skupinu aminoglykosidů také působí bakteriální enzymy, které tato antibiotika inaktivují chemickou modifikací jejich struktur (Bursová, 2014; Julák, 2015; Mahon, 2015; Schindler, 2008).

### **Změna cílového místa pro antibiotikum**

Bakterie jsou schopny vyvolat chemickou změnu (modifikaci) svých struktur, aby zabránily navázání antibiotika v daném místě a znemožnily tak jeho účinek. Typickým příkladem je methylace adeninu v RNA za přítomnosti enzymu methylasy. Vzniká tak chemicky odlišná struktura, na kterou se ATB (v tomto případě erytromycin) není schopno vázat. Modifikace proteinu v 30S ribozomální podjednotce způsobí vznik rezistence vůči streptomycinu. Změna cílového místa se může týkat také tzv. penicilin-vázajících proteinů (PBP-Penicillin Binding Proteins), což jsou enzymy, které se podílejí na biosyntéze peptidoglykanů a hrají tak zásadní roli ve výstavbě

bakteriální buněčné stěny. Ale mohou na sebe vázat i  $\beta$ -laktamová antibiotika, která jsou strukturálně velmi podobná složkám peptidoglykanu. A právě pokud dochází ze strany bakterií ke změnám ve struktuře PBP, nemůže již dojít k vazbě  $\beta$ -laktamových antibiotik na jejich stěnu a vzniká tak bakteriální rezistence (Schindler, 2008; Julák, 2010; Goodsell, 2002; Levinson, 2014).

### **Aktivní vypuzování antibiotika z bakterií**

Jedná se o velmi energeticky náročné vylučování antibakteriálních látek do okolí bakterie z jejího vlastního vnitřního prostředí pomocí tzv. efluxních pump. Celý efluxní systém je založen na transmembránovém přenosu nakumulovaného ATB ven z bakterie. Cílem tohoto mechanismu je snížit intracelulární koncentraci antibiotika – například tetracyklinu, který je tímto způsobem vylučován a vzniká vůči němu rezistence (Bursová, 2014; Julák, 2010; Mahon, 2015).

### **Ovlivnění průchodnosti antibiotika do bakterie**

Změna permeability patří (podobně jako aktivní vypuzování) do mechanismů, kterými bakterie snižují koncentraci antibiotika ve svém vnitřním prostředí. Konkrétně dochází k zabránění vzniku zvýšené hladiny dané antibakteriální látky uvnitř bakterie. Tento proces je závislý na složení bakteriální stěny, plazmatické membrány, ale také na vlastnostech samotného antibiotika. Například nepolární (hydrofobní) antibiotika, která do bakterie prochází vnější membránou (složenou z lipoproteinové dvojvrstvy), jsou schopna snadnějšího přestupu, než polární (hydrofilní) ATB. Ta do bakterií mohou pronikat pouze přes membránové kanálky či pomocí některých přenašečů. Ovšem v obou případech, ať už se jedná o antibiotikum hydrofobní či hydrofilní, jsou bakterie schopny svými mechanismy zabránit jeho prostupu. V případě hydrofobních ATB se tak děje zvýšením hustoty polárních polysacharidových řetězců lipopolysacharidů. U hydrofilních antibiotik jsou bakterie schopny snížit počet membránových kanálků a omezit funkce svých přenašečů. Výsledkem je značná odolnost bakterií, protože se antibiotikum, cílené na vnitřní struktury, nedostane do intracelulárního prostoru bakterie. Jedná se o komplikaci léčby například při použití tetracyklinů a aminoglykosidů (Julák, 2010; Mahon, 2015).

### **2.5.3 Příčiny vzniku rezistence**

Existuje poměrně velké množství procesů, které přispívají ke vzniku rezistence. Jednotlivé kroky se netýkají pouze zdravotnictví, ale jedná se také o chyby na úrovni zemědělství, veterinární praxe, potravních procesů a dalších (Todar, 2012).

Antibiotika vydaná na lékařský předpis nejsou jediným zdrojem ATB vyskytujícím se v prostředí. Tato léčiva se mohou v nezměněné či modifikované formě dostat do podzemních vod a kanalizací. Je tedy pravděpodobné, že se vyskytují v různých potravinách či živočiších. Například používání antibiotik mimo terapeutické účely v živočišné výrobě (doplňková součást krmiva pro zlepšení růstu zvířat) tvoří ve Spojených státech amerických minimálně 60 % celkové antimikrobiální produkce. Toto nezodpovědné používání ATB u hospodářských zvířat může vést k rozvoji rezistence bakterií a je pravděpodobný také přenos rezistentních bakterií ze zvířat na člověka, což výrazně snižuje účinnost antibiotik v boji s lidskými infekcemi. Z tohoto důvodu je v Evropské unii rutinní podávání antibiotik zvířatům zakázáno (Todar, 2012).

Dalším neuvážlivým způsobem je používání genů rezistence jako markerů v geneticky modifikovaných plodinách. Tyto geny jsou vkládány do rostliny již v časně fázi vývoje, aby se zjistila přítomnost genů vylepšujících vlastnosti dané rostliny (například herbicid-rezistentní či insekticidní geny). Jinou roli geny rezistence nemají, ale z rostlin už nejsou nikdy odstraněny. Může tak dojít k získání těchto genů rezistence mikroby vyskytujících se v životním prostředí a ke zvýšení rezistence bakterií (Todar, 2012).

## **2.6 Metody stanovení citlivosti bakterií na antibiotika**

Stanovení a zjištění citlivosti bakteriálních kmenů na antibiotika patří mezi základní a nejvýznamnější činnost mikrobiologické laboratoře. Hlavním cílem testování je zjistit reakci daného mikroorganismu na určitou skupinu antibiotik, vyhodnotit, která ATB jsou účinná, a na základě výsledků zahájit cílenou léčbu infekce pacienta způsobenou určitým druhem bakterie. Stanovení citlivosti na antimikrobiální látky by mělo být provedeno na bakteriálních koloniích izolovaných z daného klinického vzorku. Testování citlivosti může také poskytnout informace o snížené náchylnosti bakterií k některé AML. K tomuto účelu byla vyvinuta samostatná sada kritických hodnot MIC, které se používají k posouzení citlivosti bakterií na antibakteriální látky.

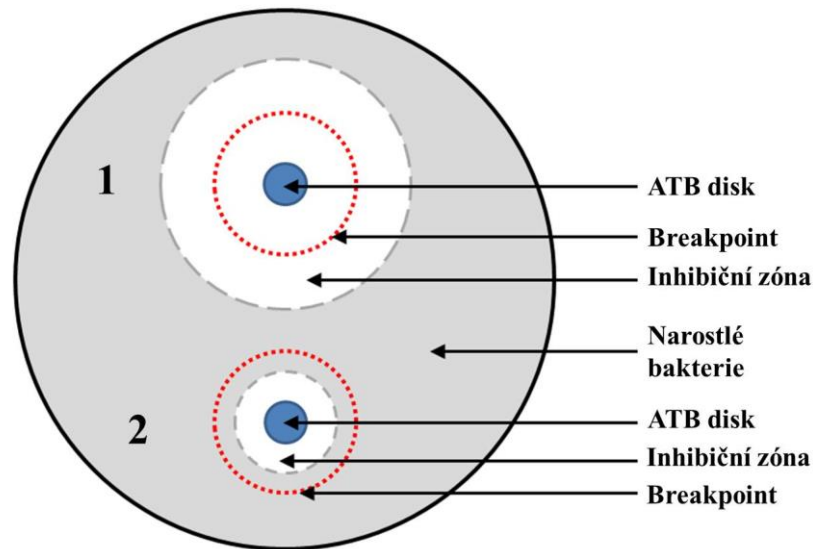


Tyto hodnoty se označují jako epidemiologické mezní (cutoff) hodnoty (ECV). Jestliže je u bakterie zjištěna hodnota MIC, která je větší než ECV, pravděpodobně je bakterie na danou látku rezistentní. Hodnota ECV je často na jednotlivé klinické případy (z hlediska antibiotické terapie) obtížně aplikovatelná. Výsledky hodnocení pomocí mezní hodnoty mohou být využity ke zpomalení či zabránění vzniku rezistence bakterií (Mahon, 2015; Votava, 2010; Melter, 2014; Edelstein, 2017).

Metody pro stanovení citlivosti bakterií na antibiotika je možné dělit do několika skupin. Rozlišují se testy kvalitativní a kvantitativní. Kvalitativní testy určují, zda je bakteriální druh k danému antibiotiku citlivý či rezistentní. Výsledkem kvantitativních testů je konkrétní hodnota možné citlivosti.

### **2.6.1 Diskový difuzní test**

Jedním z neznámějších kvalitativních testů je diskový difuzní test (DDT), který umožňuje testovat na jedné Petriho misce s živným agarem (naočkovaným testovanou bakterií) více antibakteriálních látek zároveň. Vhodnou kultivační půdou pro zjišťování citlivosti bakterií na ATB je Mueller-Hintonův agar, na který se nanáší suspenze konkrétní bakterie (intenzita zákalu je 0,5 McFarlandovy stupnice). Na inokulovaný povrch se umístí papírové disky napuštěné určitou koncentrací antibiotika. Ihned po kontaktu s agarem dochází k nasátí vody diskem, molekuly antibiotika difundují do okolí a tím je tvořen dynamicky měnící se gradient koncentrace antibakteriální látky v agaru. Po osmnáctihodinové inkubaci při 37 °C se odečítá průměr (v milimetrech) tzv. inhibiční zóny, která se tvoří kolem papírového disku. Jednotlivé velikosti inhibičních zón (IZ) se porovnávají s referenčními hodnotami neboli breakpointy – BP. Princip odečítání a interpretaci inhibičních zón znázorňuje Obrázek 13 (Bursová, 2014; Cupáková, 2008; Mahon, 2015; Jílek, 2002).



**Obrázek 13 – Porovnání velikosti inhibičních zón s breakpointy**

*Pokud je inhibiční zóna (IZ) větší, než hodnota oficiálně určeného BP (červený tečkovaný kruh), je bakterie na dané ATB citlivá – situace číslo 1. Naopak pokud je IZ menší než zóna breakpointu, nebo se nevytvoří vůbec, bakterie je vůči antibiotiku rezistentní – situace 2.*

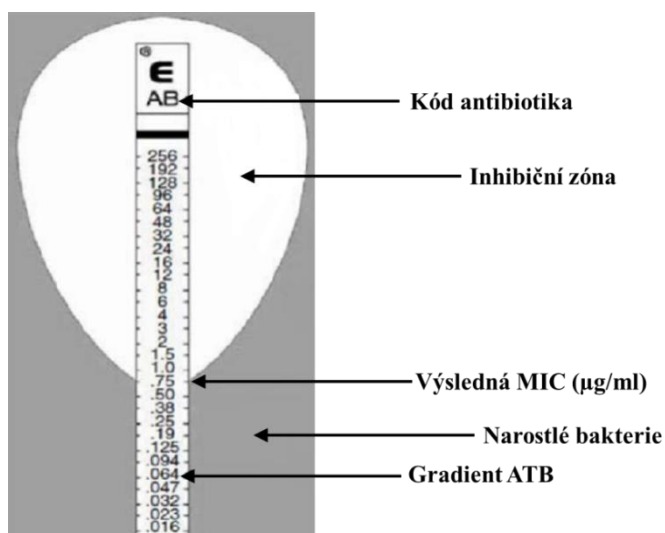
## 2.6.2 Diluční metody

Mezi kvantitativní metody patří tzv. diluční metody, které se používají pro stanovení MIC (minimální inhibiční koncentrace). MIC je definována jako nejnižší možná koncentrace dané antibakteriální látky, která viditelně inhibuje růst bakterie. Mezi standardní diluční testy patří agarová diluční metoda (ADM), od které jsou odvozeny další stanovení bakteriální citlivosti či rezistence. Lze tedy říct, že se jedná také o referenční metodu. Základem ADM je Mueller-Hintonův agar obohacený o konkrétní antibiotikum, které je ředěno dvojnásobně geometrickou řadou. Směs agaru s ATB je rozlévána do Petriho misek. Vznikne tak řada s postupně klesající koncentrací antibakteriální látky. Poté je na povrch agaru aplikováno několik kmenů bakterií. Po inkubaci je odečítána hodnota MIC – jedná se o plotnu s nejnižší koncentrací antibiotika, na které již není patrný růst bakteriálních kolonií. Modifikací ADM jsou diluční bujónové testy, mezi které patří, v dnešní době hojně používaná, mikrodiluční bujónová metoda (viz praktická část). U baktericidních antibiotik se stanovuje MBC (minimální baktericidní koncentrace). Jedná se o nejnižší koncentraci ATB, která je schopna usmrtit 99,9 % bakteriálních buněk. Při stanovení MBC se vychází z MIC,

kdy je obsah jednotlivých důlků mikrotitrační destičky přeočkován speciálním hřebenem na pevnou půdu či do bujónu. Po inkubaci (přibližně 18 hodin) je případný růst bakterií (či zákal v bujónu) odečítán a interpretován. Hodnotí se nejnižší koncentrace antibiotika, při kterém bakterie již na kultivační půdě neroste. Stanovení MBC se v současnosti používá výjimečně (Votava, 2010; Bursová, 2014; Jílek, 2002).

### 2.6.3 E-test

Pro kvantitativní vyšetření citlivosti bakterií vůči antibiotikům lze použít také E-test (Obrázek 14). Stanovení se provádí na agaru, který je masivně inokulován (přelivem, tamponem, kličkou) bakteriální suspenzí (podobně jako u DDT). Na takto připravenou plochu agaru je položen proužek napuštěný antibakteriální látkou o klesajícím gradientu koncentrací antibakteriální látky. Na proužku je také uvedena stupnice sloužící k odečítání výsledku. Po položení proužku dané antibiotikum difunduje do okolí a vytváří se koncentrační gradient – horizontálně i svisle. Po inkubaci má inhibiční zóna kolem proužku slzovitý tvar a na stupnici se (v místě, kde její okraj protíná proužek) odečítá hodnota MIC. Gradient zůstává stabilní 18-20 hodin a dané antibiotikum, které je na proužek naneseo v suché formě, brání přerůstání bakteriálních kolonií. Hlavní výhodou E-testu je jednoduché a rychlé provedení. Rutinnímu používání však brání vysoká cena jednotlivých proužků (Cupáková, 2008; Jílek, 2002; Votava, 2010; Nasir, 2015).



**Obrázek 14 – Výsledek E-testu**

*Na obrázku je již provedený E-test včetně popisu a výsledku. MIC je v tomto případě 0,75 µg/ml.*

(Zdroj: Nasir, 2015) – upraveno

## 2.6.4 Standardizace metod

Veškeré metody vyšetření citlivosti bakterií na antibiotika musí být standardizovány. Cílem procesu standardizace je získat věrohodný, validní, přesný a reprodukovatelný výsledek ve všech laboratořích bez ohledu na to, jaká metoda byla použita. Na prvních krocích procesu standardizace se podílela WHO, která porovnávala jednotlivé výsledky stanovení citlivosti u různých metod v několika zemích světa. Zjistilo se, že jsou mezi výsledky velké rozdíly a výrazný počet chyb. Organizace CLSI (Ústav klinických a laboratorních standardů) je nezisková členská organizace, která fungovala pod jiným názvem již od roku 1975. Její náplní je mimo jiné každoroční vydávání příruček pro standardní vyšetření citlivosti u jednotlivých metod, ale také pro metody, které jsou specifické jen pro určitý druh bakterií. CLSI se nezabývá pouze mikrobiologií, ale řídí proces standardizace metod i v dalších oborech – hematologie, toxikologie, imunologie či veterinární medicína. Organizuje také edukační programy. ([www.clsi.org](http://www.clsi.org); Jindrák, 2014)

V zemích Evropy se v minulých letech také používaly standardy přejaté od CLSI, ale v roce 1997 byla zavedena organizace EUCAST – Evropský výbor pro testování citlivosti na antimikrobiální látky. Jedná se o stálý výbor organizovaný společně s ECDC (Evropské středisko pro prevenci a kontrolu nemocí) a ESCMID (Evropská společnost pro klinickou mikrobiologii a infekční nemoci), jejichž cílem je zlepšit diagnostiku, léčbu a prevenci nemocí souvisejících s infekcí. Směrnice EUCAST se zabývají mimo jiné určením breakpointů. Breakpoint (bod zlomu) je stanovená koncentrace antibiotika, která definuje, zda je daný druh bakterie citlivý nebo rezistentní na antibiotikum. Jednotlivé breakpointy zveřejňuje EUCAST na svých internetových stránkách ve formě tabulek. Dále Evropský výbor pro testování citlivosti na antimikrobiální látky řeší kontrolu kvality metod. Nedílnou součástí programu EUCAST je také aktualizace a standardizace metod pro stanovení citlivosti bakterií na antibiotika. Poskytuje také návody a klinicky významná data, která se týkají vzájemného vztahu antibiotik a bakterií a je volně dostupný (Jindrák, 2014; [www.eucast.org](http://www.eucast.org); [www.clsi.org](http://www.clsi.org); [www.escmid.org](http://www.escmid.org)).

## 2.6.5 Automatizace metod

Některé metody vyšetření citlivosti bakterií na antibiotika jsou již plně či částečně automatizovány. Tyto automatizované systémy je možné využívat také

při identifikaci bakterií. Jejich výhodou oproti ručně prováděným metodám je rychlejší vyhodnocení výsledku. A to díky citlivým optickým detekčním systémům, které jsou schopny detekovat již drobný (pouhým okem neviditelný) nárůst bakterií. Tato skutečnost je velmi žádoucí zvláště v klinických případech, kdy je třeba rychle zasáhnout a změnit antibakteriální terapii (Jorgensen, 2009).

Pokusy o návrh a validaci automatizovaných systémů pro identifikaci a testování citlivosti klinicky významných bakterií probíhaly již před několika desítkami let. Prvním automatizovaným systémem byl systém TAAS (Technicon Automated Antimicrobial Susceptibility) vyvinutý na počátku 70. let 20. století. Základem systému byla eluce antimikrobiálních látek z disků a porovnání růstu testovaných a kontrolních kultur. Tento systém nebyl nikdy uveden na trh. V průběhu dalších let byla snaha principy zdokonalit. Proces vývoje těchto systémů postupoval rychle. Koncem 70. let minulého století byl vyvinut plně automatizovaný systém, který pro identifikaci organismů a testování citlivosti bakterií používal dehydratované antimikrobiální látky uzavřené v plastových panelech. V tomto roce tak došlo k zavedení standardizovaných panelů obsahující AML. Postupně byla vyvinuta řada systémů na různých principech. Ale v současnosti jsou rozšířeny jen některé z nich (Felmingham, 2001; Jorgensen, 2009).

Dnes jsou v laboratořích využívány 4 od sebe navzájem odlišné systémy – MicroScan WalkAway, Sensititre ARIS, BD Phoenix a Vitek. Detekce se u jednotlivých systémů liší, ale obecně je založena na principu fotometrie, fluorometrie či turbidimetrie. Systém MicroScan WalkAway byl vyvinut koncem osmdesátých let. Poskytuje standardní přesnost při identifikaci mikroorganismů a testování citlivosti vůči AML. Současně umožňuje testování velkého množství bakteriálních kmenů. MicroScan využívá mikrodiluční panely a program inkubačních testů, které jsou krátkodobé či dlouhodobé. Růst bakterií je detekován fotometricky (po inkubaci přes noc) nebo fluorimetricky (po krátké inkubaci). Příprava panelů před inkubací probíhá manuálně. Poté je panel vložen do inkubační části systému. Výsledek je k dispozici za 5 až 18 hodin (dle doby inkubace). Systém MicroScan je také schopen odhalit vznikající rezistenci u odolných patogenů, mezi které patří např. MRSA (Felmingham, 2001; Jorgensen, 2009).

Stejně jako MicroScan WalkAway používá také systém Sensititre ARIS standardní mikrodiluční panely, které jsou po automatizované inokulaci pomocí autoinokulátoru umístěny do systémového inkubátoru. Detekce růstu je také

fluorimetrická. Růst je sledován po hydrolýze fluorogenních substrátů. Systém Sensititre ARIS byl vyvinut s USA a umožňuje testování gram pozitivních i gram negativních bakterií. Výsledek citlivosti bakterie na konkrétní látky je znám za 18-24 hodin. U systému BD Phoenix je nutné provést inokulaci manuálně. Monitoring růstu na všech panelech probíhá turbidimetricky každých 20 minut. Výsledky MIC jsou vyhodnoceny a generovány přibližně za 6-16 hodin. Systém Vitek se od ostatních systémů liší velikostí standardních mikrodilučních panelů. Základem systému je tenká plastová karta, která pro testování citlivosti k antimikrobiálním látkám obsahuje asi 40 jamek. Růst je stanoven turbidimetricky v hodinových intervalech po dobu až 15 hodin (nejčastěji 4-10 hodin). Tento systém umožňuje průběh 30-240 testů současně a zároveň umožňuje identifikaci bakterií (Felmingham, 2001; Jorgensen, 2009).

### 3 Cíl práce

Cílem diplomové práce je *in vitro* testování nových, potenciálně účinných antibakteriálních látek a stanovení jejich MIC pomocí mikrodiluční bujonové metody s využitím referenčních bakteriálních kmenů a klinických izolátů bakteriálních kmenů získaných v rámci spolupráce s Fakultní nemocnicí v Hradci Králové.

Dílčím cílem je zhodnotit reakci vybraných bakteriálních kmenů na nově syntetizované látky a určit tak účinnost či neúčinnost těchto látek. V případě účinných látek bude snaha o vyvození vztahů mezi strukturou a aktivitou dané sloučeniny, která by mohla dále ovlivnit vývoj nových sloučenin.

## 4 Metodika práce

### 4.1 Mikrodiluční bujónová metoda

Mikrodiluční bujónová metoda patří mezi kvantitativní metody. Jedná se o stanovení minimální inhibiční koncentrace (MIC). Ta vyjadřuje nejnižší koncentraci dané antimikrobiální látky, která viditelně inhibuje růst bakterie. Původně byl diluční test prováděn ve zkumavkách a test se označoval jako makrodiluční. V současnosti je preferováno testování v miniaturizované podobě. Provádí se v mikrotitračních destičkách a pracuje se s malými objemy. Proto je metoda označována jako mikrodiluční. Obecný princip metody je založen na ředění testované látky. Jedná se o dvojkovou ředící řadu v tekuté živné půdě (v tomto případě v Mueller-Hintonově bujónu). Mezi hlavní výhody mikrodiluční metody patří poměrně rychlé zpracování, možnost pracovat s různými kultivačními médii a testovat účinnost látek v různých koncentracích. Další výhodou je možnost automatizace odečítání výsledků a jejich hodnocení. Metoda má i určitá omezení, mezi která například patří obtížné odhalení a rozpoznání možné kontaminace. Toto riziko je však snižováno dodržováním zásad aseptické práce, prací v laminárním boxu a používáním sterilních pomůcek.

### 4.2 Definice souboru

Při praktické části jsme postupovali a pracovali dle směrnic EUCAST s drobnými úpravami včetně výběru bakteriálních kmenů. Většina z nich jsou kmeny sbírkové a plně popsané, které byly zakoupeny z České sbírky mikroorganismů v Brně. Mezi sbírkové kmeny patří *Staphylococcus aureus* (CCM 4223, ATCC 29213), methicilin-rezistentní *Staphylococcus aureus* (CCM 4750, ATCC 43300), *Enterococcus faecalis* (CCM 4224, ATCC 29212), *Escherichia coli* (CCM 3954, ATCC 25922) a *Pseudomonas aeruginosa* (CCM 3955, ATCC 27853). Ostatní kmeny (*Staphylococcus epidermidis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Serratia marcescens*) jsou klinické izoláty z Fakultní nemocnice Hradec Králové. Také byly použity standardy ATB dle směrnice EUCAST.



## 4.2.1 Přehled použitých bakterií

K testování účinnosti daných látek jsme použili soubor několika odlišných bakteriálních kmenů z obou základních skupin (4 gram pozitivní a 4 gram negativní kmeny). Každá bakterie má svůj kód a identifikační číslo (viz protokol). Jedná se o kmeny: *Staphylococcus aureus* spp. *aureus* (SA), Methicilin-rezistentní *Staphylococcus aureus* (MRSA), *Staphylococcus epidermidis* (SE), *Enterococcus faecalis* (EF), *Escherichia coli* (EC), *Klebsiella pneumoniae* (KP), *Serratia marcescens* (SEMA) a *Pseudomonas aeruginosa* (PA).

### *Staphylococcus aureus*

*Staphylococcus aureus* (SA) je gram pozitivní kok (kulovitá bakterie). Nelze jej mikroskopicky od ostatních stafylokoků odlišit. V některých případech má tendenci vytvářet shluky. Na běžných kultivačních půdách vytváří neprůhledné, většinou pigmentované kolonie (zlatožluté, krémové, žlutohnědé) se zónami hemolýzy (Obrázek 15). SA je vybaven poměrně velkým množstvím antigenů a řadou enzymů, z nichž nejvýznamnější je plazmakoagulasa. Díky ní lze snadno ověřit, zda se jedná právě o SA. Ostatním významným stafylokokům může tento enzym chybět. U některých jedinců se *Staphylococcus aureus* vyskytuje v nose či krku jako součást fyziologické mikroflóry a nezpůsobuje žádné problémy. Ve většině případů je však řazen mezi jeden z nejčastějších lidských patogenů. Způsobuje řadu komplikací a onemocnění různé závažnosti. Mezi častá onemocnění patří postižení kůže (furunkl, karbunkl, impetigo). Jeho zanesení do orgánů může způsobit endokarditidy, pyelonefritidy, meningitidy či hnisavé abscesy. Často je *Staphylococcus aureus* původcem zánětů kostní dřevě (osteomyelitid), které se projevují jako hnisavá artritida. V některých případech může také komplikovat průběh virových onemocnění. Pro člověka jsou velmi nebezpečné také jeho toxiny, které mohou způsobit tzv. syndrom toxického šoku. Jedná se o velmi závažné život ohrožující onemocnění. Dříve byl účinným antibiotikem penicilin. V dnešní době se uvádí, že většina stafylokoků rodu aureus je vůči PNC rezistentní. Lékem volby je nyní například oxacilin, jako zástupce penicilinas-resistentních antibiotik, či peniciliny kombinované s inhibitory  $\beta$ -laktamas – kyselinou klavulanovou, sulbaktamem (Juhaňák, 2012; Julák, 2010; Scharfen, 2013).



**Obrázek 15 – *Staphylococcus aureus* na krevním agaru**

(Zdroj: spolupráce s Bc. Janou Marinčákovou)

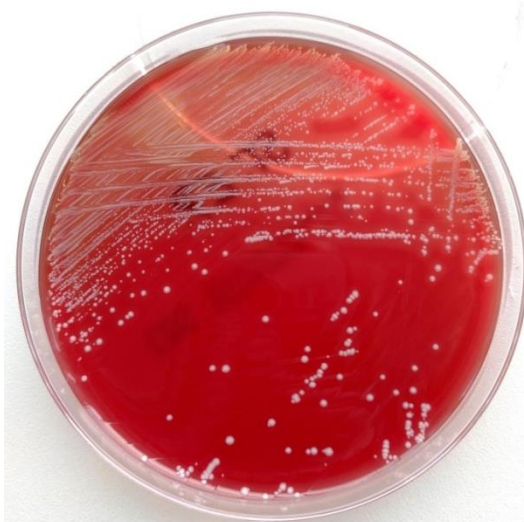
### **Methicilin-rezistentní *Staphylococcus aureus***

Jedná se kmen *Staphylococcus aureus*, který je rezistentní na dříve používaný lék volby – methicilin. V současnosti představuje MRSA velmi závažnou komplikaci především v souvislosti s pobytem ve zdravotnickém zařízení. Je jeden z původců nozokomiálních nákaz. Nyní jsou k dispozici již diagnostické sady, kterými je možné potvrdit či vyloučit (na základě imunochemických testů) přítomnost methicilin-rezistentního stafylokoků. Popřípadě existují také kultivační půdy pro jeho záchyt. Velkým problémem výskytu MRSA je jeho přirozená rezistence (díky přítomnosti typického genu *mecA*) na všechna  $\beta$ -laktamová antibiotika včetně jejich kombinace s inhibitory  $\beta$ -laktamas. Léčba infekcí způsobených methicilin-rezistentním stafylokokem je komplikovaná a obtížná (Julák, 2010; Votava, 2003).

### ***Staphylococcus epidermidis***

*Staphylococcus epidermidis* (SE) se řadí mezi koagulasa-negativní stafylokoky (Obrázek 16). To znamená, že nemá enzym plazmakoagulasu, čímž se liší od SA. Jedná se o grampozitivní nepohyblivé koky, které jsou součástí běžné bakteriální flóry. Nejhojněji se *Staphylococcus epidermidis* vyskytuje na kůži, méně pak v horních dýchacích cestách. Je řazen mezi podmíněně patogenní bakterie. V případě, že se dostane na místo, kde se fyziologicky nevyskytuje, způsobuje zdravotní komplikace. Často vyvolává onemocnění u oslabených či jinak kompromitovaných jedinců. Typickým příkladem jsou pacienti s umělými cizími tělesy (močové katetry, kanyly, náhrady chlopni, kardiostimulátory, kloubní protézy), kdy SE osídluje právě tyto

náhrady a vytváří na nich biofilm, který je velmi odolný. Antibiotická terapie je proto často neúčinná a je nutná výměna těchto implantátů. Proto je velmi důležitá prevence, která spočívá v dodržování zásad hygieny a asepse při invazivních výkonech. V některých případech je možné podávat před zákrokem antibiotickou profylaktickou léčbu. Právě osídlování umělých náhrad způsobuje dle typu implantátu potíže. Například při kolonizaci katétrů může docházet ke vzniku katérové sepse, při osídlení umělých srdečních chlopní se může rozvinout endokarditida či zánět chlopní. Většina těchto stavů končí celkovou sepsí, což znamená vážné ohrožení lidského života (Juhaňák, 2012; Julák, 2010; Mahon, 2015).



**Obrázek 16 – *Staphylococcus epidermidis* na krevním agaru**

(Zdroj: spolupráce s Bc. Janou Marinčákovou)

### ***Enterococcus faecalis***

*Enterococcus faecalis* (EF) patří do rodu *Enterococcus*, který je příbuzný streptokokům. Dříve byly enterokoky řazeny mezi streptokoky skupiny D. EF je grampozitivní kokovitá až oválná bakterie. Kultivačně je nenáročný a velmi odolný vůči vnějším vlivům. Je schopen přežít různé změny pH, teploty i vysoké koncentrace žlučových kyselin a solí. EF je běžnou součástí střevní flóry. Jedná se však o podmíněně patogenní bakterii. U oslabených jedinců či hospitalizovaných osob může způsobit zejména infekce močového systému. Enterokokové infekce jsou v nemocničním prostředí poměrně běžné. *Enterococcus faecalis* (stejně jako ostatní enterokoky) je v současnosti velmi rezistentní bakterie. Stále častěji se vyskytuje rezistence na vankomycin. Tyto rezistentní enterokoky jsou označovány jako

VRE (vankomycin-rezistentní enterokoky). Lékem volby u VRE je linezolid (Votava, 2003; Juhaňák, 2013, Julák, 2010).

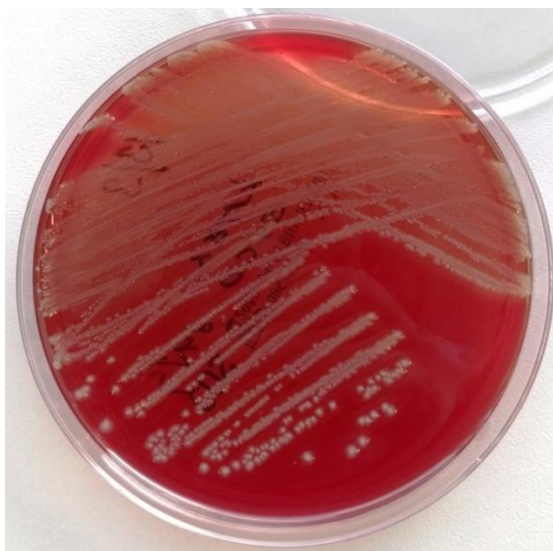


**Obrázek 17 – *Enterococcus faecalis* na krevním agaru**

(Zdroj: spolupráce s Bc. Janou Marinčákovou)

### ***Escherichia coli***

*Escherichia coli* (EC) je nejznámější bakterie z čeledi *Enterobacteriaceae*. Jedná se o gramnegativní nesporulující bakterii tyčinkovitého tvaru, která je biochemicky aktivní. Je nezbytnou součástí běžné střevní flóry, kde plní prospěšnou funkci. Podílí se na tvorbě vitamínu K a vytváří příznivé střevní prostředí a chrání zažívací systém před osídlením patogenními bakteriemi. Jako extraintestinální patogen způsobuje nejčastěji močové infekce. Lékem volby u těchto infekcí je například ampicilin. Většina kmenů EC jsou nepatogenní, ale existují kmeny, které způsobují závažná onemocnění vlivem produkce toxinů. Jedná se například o enterotoxigenní *E. coli* (ETEC), která produkuje tzv. enterotoxiny. Projevem jsou vodnaté průjmy především u cestovatelů. Enteropatogenní *E. coli* (EPEC) způsobuje novorozenecké průjmy. Enterohemoragické kmeny (EHEC) jsou velmi nebezpečné a způsobují vážné poškození střevní sliznice až její destrukci. Projevuje se vodnatými průjmy s příměsí krve. Vážnou komplikací těchto patogenních EC je průnik do tkání a krevního oběhu, který vede až k hemolyticko-uremickému syndromu (HUS). Jeho typickým příznakem je hemolytická anémie a selhání ledvin (Julák, 2010; Juhaňák, 2013; Votava, 2003, Mahon, 2015).



**Obrázek 18 – *Escherichia coli* na krevním agaru**

(Zdroj: spolupráce s Bc. Janou Marinčákovou)

### ***Klebsiella pneumoniae***

*Klebsiella pneumoniae* (KP) je gramnegativní nepohyblivá tyčinkovitá bakterie. Zpravidla roste na bakteriálních půdách v podobě mukózních kolonií díky polysacharidovému pouzdru. Běžně se KP vyskytuje ve střevě a je schopna velmi dobře přežít v okolním prostředí. Po *E. coli* je druhý nejčastější původce močových infekcí. Jako patogen se také významně uplatňuje při infekcích horních dýchacích cest, kdy způsobuje pneumonie. Vyvolává nozokomiální infekce (sepse, meningitidy, pneumonie) především u pacientů na jednotkách intenzivní péče. Obecně jsou klebsiely rezistentní například vůči ampicilinu. Komplikací léčby v nemocnicích je však výskyt multirezistentních kmenů KP (Greenwood, 1999; Julák, 2010; Votava, 2003).



**Obrázek 19 – *Klebsiella pneumoniae* na krevním agaru**

(Zdroj: spolupráce s PharmDr. Ondřejem Jand'ourkem, Ph.D.)

### ***Serratia marcescens***

*Serratia marcescens* (SEMA) patří mezi gramnegativní tyčinkovité bakterie z čeledi *Enterobacteriaceae*. Je pohyblivá a schopna růstu ve velmi širokém rozmezí teplot (5 až 40° C). SEMA se nachází nejčastěji ve vlhkém prostředí (koupelny, bazény). Živí se také látkami obsahující fosfor, mezi která patří například zbytky mýdel a šampónů. Na těchto místech roste formou slizovitého povlaku, který je odolný vůči běžným čisticím prostředkům. *Serratia marcescens* se vyskytuje v trávicím traktu, ale také může způsobovat povlak na zubech se vznikem pigmentu. Vyvolává ale řadu infekcí, mezi které patří především ty nozokomiální (močové, infekce ran, katéetrová sepe). Většina kmenů SEMA je přirozeně rezistentní k řadě antibiotik, proto je léčba obtížná (Juhaňák, 2013).



**Obrázek 20 – *Serratia marcescens* na krevním agaru**

(Zdroj: spolupráce s Bc. Janou Marinčákovou)

### ***Pseudomonas aeruginosa***

*Pseudomonas aeruginosa* (PA) je gramnegativní nesporulující tyčinkovitá bakterie, která se pohybuje pomocí jednoho či dvou bičků. Produkuje velké množství pigmentů a vyznačuje se charakteristickou vůní po jasmínu. Jedná se o klinicky nejvýznamnější druh celého rodu a zároveň typického původce nozokomiálních nákaz. Má totiž schopnost osídlit lékařské nástroje a pomůcky včetně katétrů a kanyl. Často napadá oslabené či nemocné jedince. PA je schopna vyvolat infekci téměř jakéhokoli orgánu. Mezi velmi závažné komplikace patří kolonizace popálenin a ran, kdy znesnadňuje jejich hojení a může touto branou vstupu proniknout do krevního oběhu



a způsobit celkovou sepsi. *Pseudomonas aeruginosa* je přirozeně rezistentní k řadě antibiotik, a navíc má vlastnost přejímat rezistenci od jiných bakteriálních druhů pomocí plazmidů. Jako účinná terapie se proto často volí kombinace minimálně dvou antibiotik (Votava, 2003; Julák, 2010; Juhaňák, 2013).



**Obrázek 21 – *Pseudomonas aeruginosa* na krevním agaru**

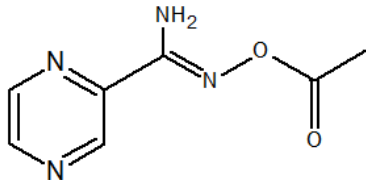
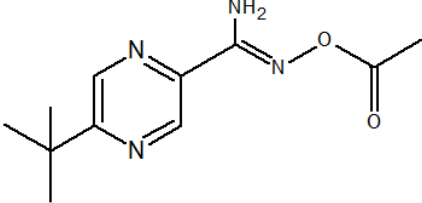
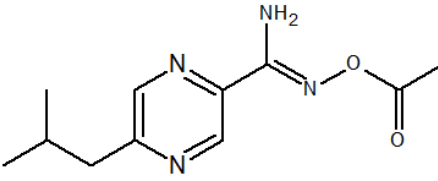
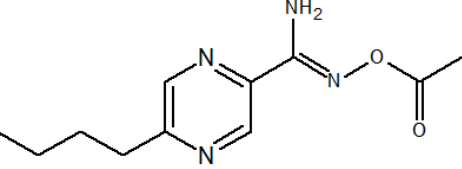
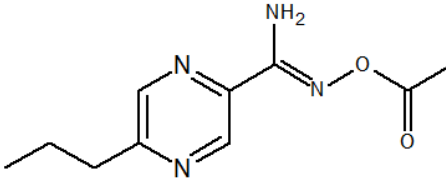
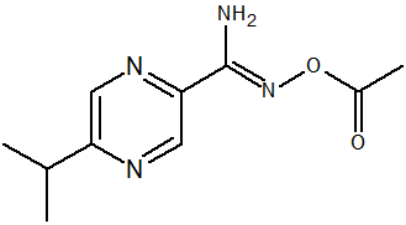
(Zdroj: spolupráce s Bc. Janou Marinčákovou)

#### **4.2.2 Přehled testovaných látek**

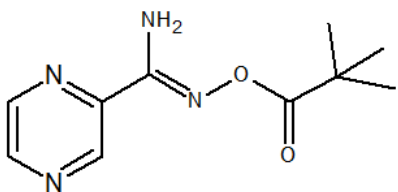
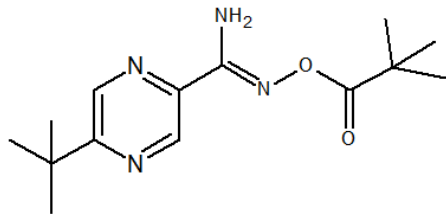
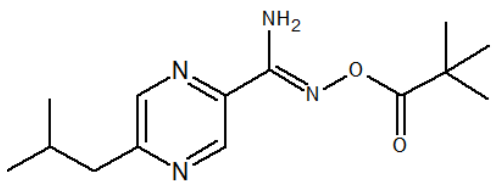
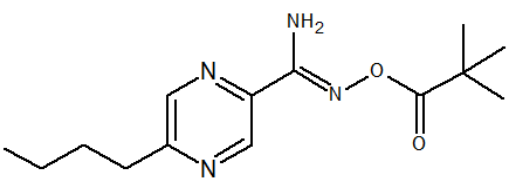
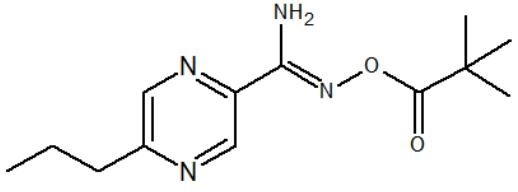
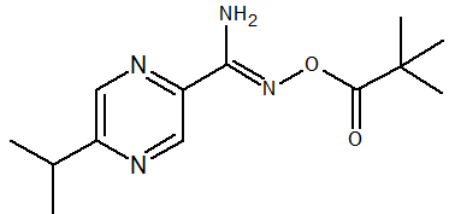
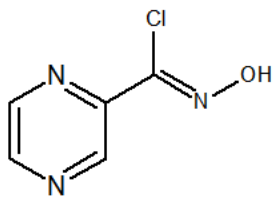
Do laboratoře byly dodány jednotlivé látky v podobě pevné krystalické sloučeniny s dalšími údaji včetně konkrétní hmotnosti navážené látky. Každá látka má svoje kódové označení, vzorec a molekulovou hmotnost (Tabulka 5). Látky byly v laboratoři rozpuštěny a testovány (viz Pracovní postup). Koncentrace každé testované látky: (500; 250; 125; 62,5; 31,25; 15,62; 7,81; 3,9; 1,95; 0,98 a 0,49)  $\mu\text{mol.l}^{-1}$ .

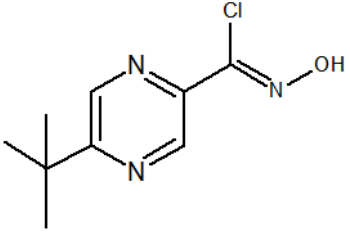
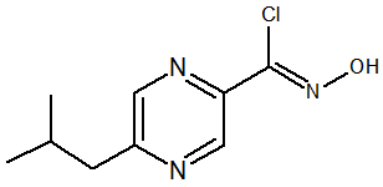
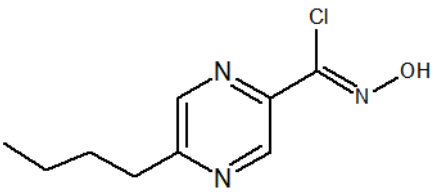
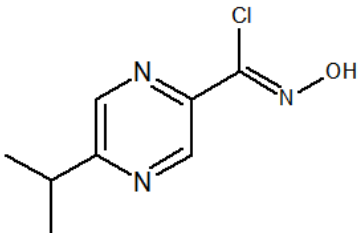
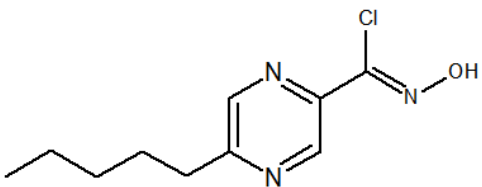
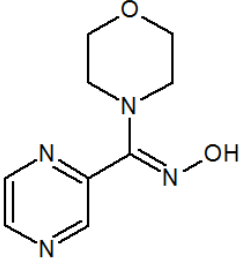
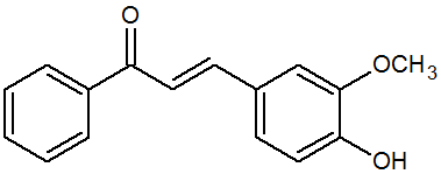
### Tabulka 5 – Přehled testovaných látek

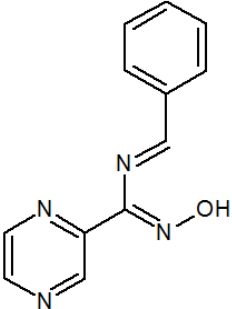
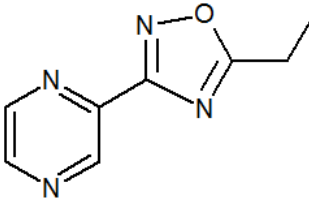
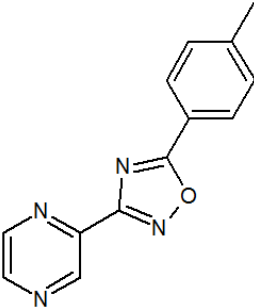
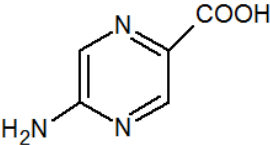
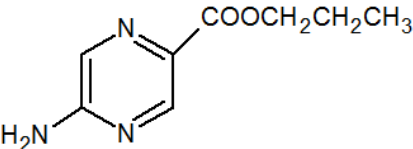
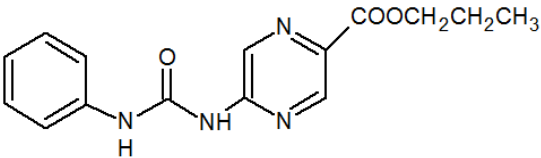
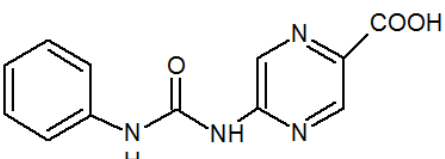
Tabulka popisuje jednotlivé testované látky včetně jejich kódového označení, molekulové hmotnosti a dodané navážky.

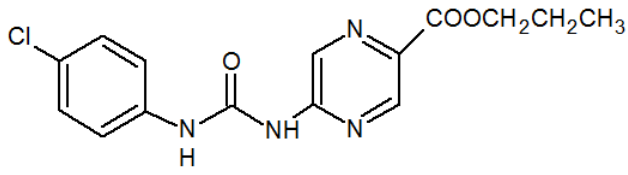
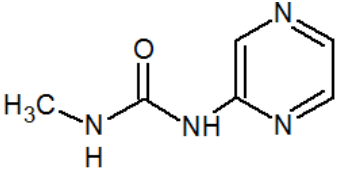
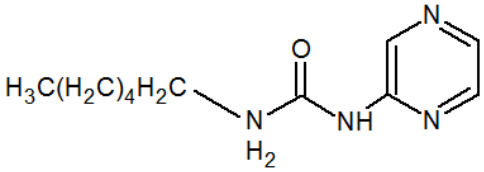
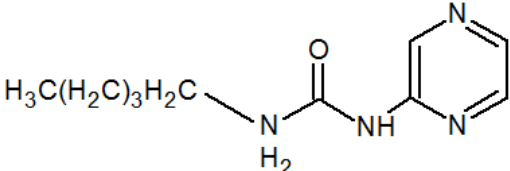
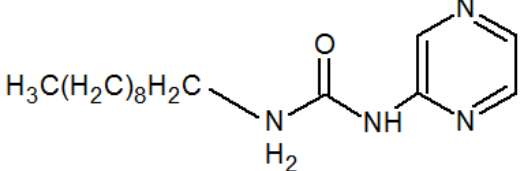
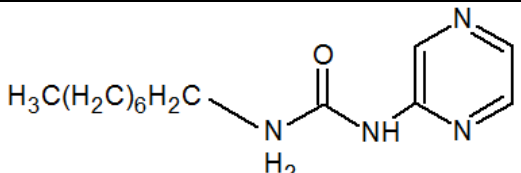
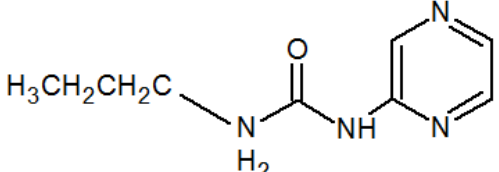
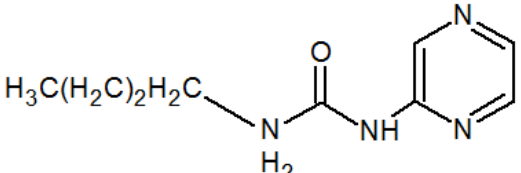
Kód látky	Vzorec	$M_r$	Navážka (mg)
E-0a		180,17	8,3
E-1a		236,28	11,7
E-2a		236,28	11,1
E-3a		236,28	10,3
E-4a		222,25	9,6
E-10a		222,25	10,4

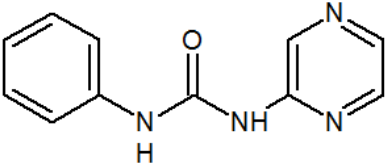
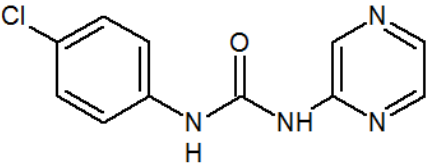
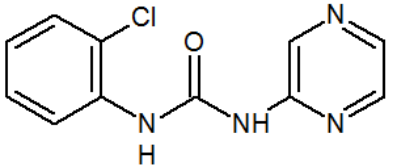
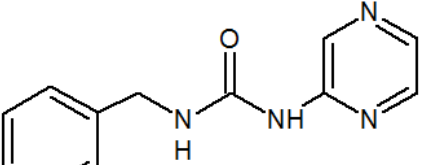
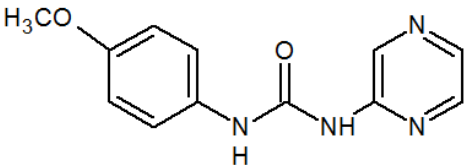
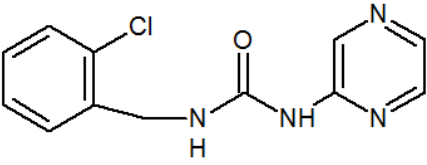
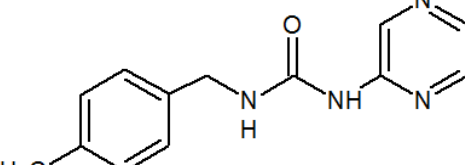


E-0b		222,25	10,0
E-1b		278,36	12,7
E-2b		278,36	14,9
E-3b		278,36	12,7
E-4b		264,33	12,4
E-10b		264,33	11,8
Cl-0		157,56	9,0

Cl-1		213,67	8,8
Cl-2		213,67	10,1
Cl-3		213,67	10,0
Cl-10		199,64	8,9
Cl-13		227,69	9,6
MOR-T		208,22	9,0
Ac-0a		254,29	16,8

OXDI-0b3		226,24	9,4
OX-0c		176,18	11,6
OXI-T2		238,25	9,7
F.B.S.A		139,11	8,4
F.B.S.E		181,20	13,2
F.B.2		300,32	12,4
F.B.2.H		258,24	11,1

F.B.5		334,76	15,4
P.N.1		152,16	7,3
P.N.2		222,29	9,6
P.N.3		208,27	8,7
P.N.4		278,40	12,7
P.N.6		250,35	11,2
P.N.7		180,21	7,4
P.N.8		194,24	8,0

M.J.1		214,23	9,0
M.J.2		248,67	12,2
M.J.3		248,67	11,8
M.J.4		228,67	9,6
M.J.6		244,25	9,9
M.J.7		262,70	11,2
M.J.8		242,28	11,5

### 4.2.3 Standardy antibiotik

Jako standardy byla na základě směrnice vybrána 2 antibiotika – ciprofloxacin a gentamicin. S tím, že ciprofloxacin je doporučen jako standard pro gramnegativní bakterie a gentamicin je doporučen jako standard pro grampozitivní bakterie. Hodnoty uvedené v Tabulce 6 byly prozatím zpracovány pro 4 kmeny, které jsou

referenční – SA, EF, EC, PA. Tyto hodnoty lze na základě porovnání s breakpointy uvedenými ve směrnici EUCAST využít k ověření funkčnosti námi vybrané metody.

**Tabulka 6 – Hodnoty standardů**

Kmen		Testovaná látka – MIC ( $\mu\text{mol.l}^{-1}$ )			
		Gentamicin	dle EUCAST	Ciprofloxacin	dle EUCAST
SA	16-20h	1	0,125-1	0,25	0,125-0,5
	48h	1	-	0,25	-
EF	16-20h	4	4-16	0,125	0,25-2
	48h	8	-	0,25	-
EC	16-20h	1	0,25-1	0,004	0,004-0,016
	48h	1	-	0,004	-
PA	16-20h	0,25	0,5-2	0,062	0,25-1
	48h	0,25	-	0,062	-

## 4.3 Pracovní postupy

### Pomůcky

- sterilní mikrotitrační destičky s víčky
- mikropipety
- sterilní špičky
- rezervoár na médium (12-ti jamkový)
- očkovací kličky
- sterilní umělohmotné a skleněné zkumavky
- stojánky na zkumavky

### Přístroje a chemikálie

- laminární box
- termostat
- denzitometr
- vortex
- ultrazvuková lázeň
- dimethylsulfoxid (DMSO)

- sterilní voda
- růstové médium: Mueller-Hintonův bujon (pH 7,0)

### **4.3.1 Příprava suspenzí kmenů bakterií**

- sterilní zkumavky označíme zkratkami bakteriálních kmenů
- do každé zkumavky napipetujeme 3 ml sterilní vody
- z kultury jednotlivých kmenů (narostlých na Mueller-Hintonově agaru) odebereme malou část kolonie a rozsuspundujeme ji do sterilní vody ve zkumavce
- řádně promícháme na vortexu
- hustotu suspenze si ověříme na denzitometru
- výsledná hustota suspenze by měla být 0,5 dle McFarlanda

### **4.3.2 Příprava ředící řady testované látky**

- navážku dané látky rozpustíme v příslušném objemu DMSO (výpočet níže), aby první testovaná koncentrace byla  $500 \mu\text{mol.l}^{-1}$  a zároveň koncentrace DMSO v jamce nepřesáhla 2,5 %
- promícháme na vortexu
- pokud se látka rozpustí nebo vytvoří homogenní suspenzi, přistoupíme k dalšímu kroku. Jestliže se látka vysráží nebo nerozpustí, přidáme druhý případně třetí ekvivalent rozpouštědla. Každým přidáním ekvivalentu rozpouštědla se posouvá 1. testovaná koncentrace o 1 ředění zpět (například: z  $500 \mu\text{mol.l}^{-1}$  na  $250 \mu\text{mol.l}^{-1}$ )
- k lepšímu rozpuštění můžeme použít ultrazvukovou lázeň
- do sterilní umělohmotné zkumavky (označíme 1) napipetujeme 1,98 ml růstového média a přidáme 20  $\mu\text{l}$  rozpuštěné testované látky
- promícháme na vortexu
- zkontrolujeme, jestli se látka v růstovém médiu nevysrážela. Pokud nedojde ke srážení, přistoupíme k dalšímu bodu. Pokud ano, přidáme druhý případně třetí ekvivalent růstového média. Každým přidáním ekvivalentu růstového média se posouvá 1. testovaná koncentrace o 1 ředění zpět
- tímto postupem získáme pracovní roztok 1. testované koncentrace, který později sterilně přemístíme do 1. jamky rezervoáru

- dále si do 10 sterilních skleněných zkumavek (označíme 2–11) připravíme dvojkovou ředící řadu testované látky v DMSO:
- do každé zkumavky napipetujeme 250  $\mu\text{l}$  DMSO
- stejný objem vezmeme z dodané rozpuštěné látky a napipetujeme jej do skleněné zkumavky (označené 2). Z druhé zkumavky do třetí a tak dále až po poslední skleněnou zkumavku. Látku vždy pomocí pipety opatrně promícháme
- do jamek (2 až 12) 12-ti jamkového rezervoáru napipetujeme 1,98 ml růstového média
- postupně přidáváme 20  $\mu\text{l}$  naředěné testované látky z ředící řady ve skleněných zkumavkách (tzn. ze zkumavky 2 do jamky 2, ze zkumavky 3 do jamky 3 atd.)
- do poslední (12.) jamky přidáme 20  $\mu\text{l}$  samotného DMSO (jedná se o kontrolu)
- v každé jamce rezervoáru tak získáme 2 ml pracovního roztoku s příslušnou koncentrací testované látky

### Výpočet objemu DMSO

Objem DMSO byl spočítán pro každou látku dle vztahu

$$V_{\text{DMSO}} = \frac{m \cdot 10^9}{c \cdot M_r \cdot 100}$$

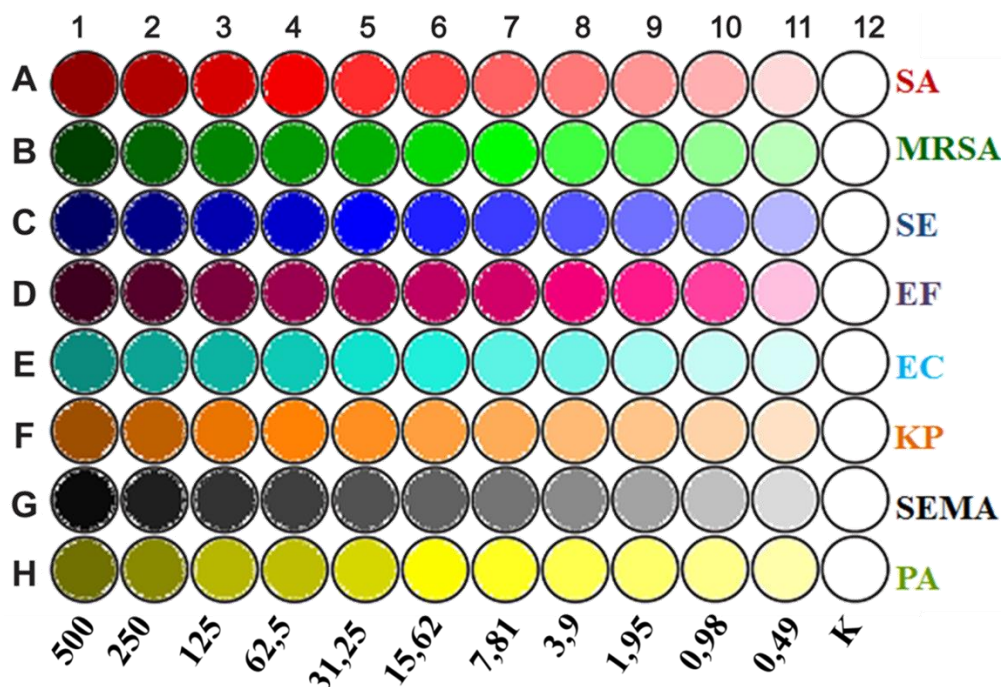
kde **m** je hmotnost navážky (mg), **c** je první testovaná koncentrace ( $\mu\text{mol.l}^{-1}$ ), a **M<sub>r</sub>** je molární hmotnost. Výsledný objem má jednotku  $\mu\text{l}$ .

### 4.3.3 Pipetování do mikrotitrační destičky

- sterilní mikrotitrační destičku si řádně označíme (číslo, kód testované látky, datum, příslušný kmen)
- pomocí dvanáctikanálové pipety napipetujeme 200  $\mu\text{l}$  zásobního roztoku z odpovídajícího rezervoáru do všech řádků jedné mikrotitrační destičky. To znamená, že 1 mikrotitrační destička odpovídá 1 testované látce
- do každé jamky řádků 1 až 8 (na destičce A–H) napipetujeme 10  $\mu\text{l}$  připravené příslušné suspenze dané bakterie. Z toho vyplývá, že v jednom řádku je příslušný bakteriální kmen



- takto připravenou destičku přiklopíme víčkem a inkubujeme v termostatu při teplotě 35 °C (± 2 °C)
- odečet se provádí za 24 hodin a 48 hodin



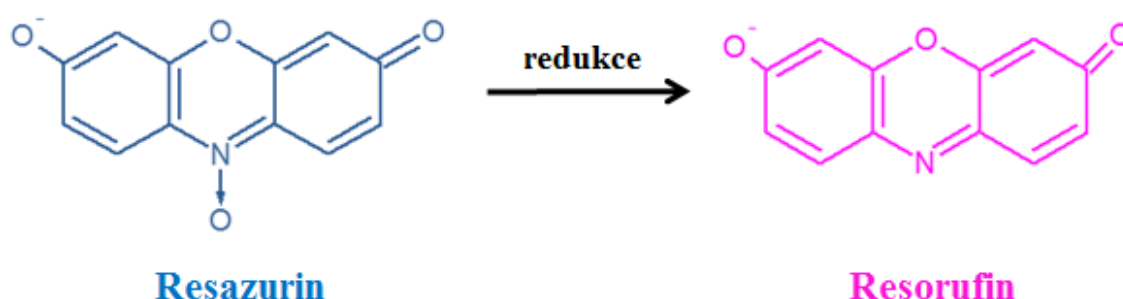
**Obrázek 22 – Schéma mikrotitrační destičky**

Obrázek znázorňuje mikrotitrační destičku, ve které je vždy jedna konkrétní látka o klesající koncentraci (svislé sloupce 1-12). Koncentrace v první jamce je 500  $\mu\text{mol.l}^{-1}$  a dále je ředěna dvojkovou řadou. Poslední sloupec (12) je kontrola, ve které se nachází pouze DMSO. Ve vodorovných řádcích (A-H) jsou jednotlivé bakteriální kmeny.

#### 4.3.4 Hodnocení

Vyhodnocení se provádí vizuálně po uplynutí inkubační doby a hodnotí se MIC nárůstu v jamkách (zákal). V případě nejasností ohledně růstu bakterií lze provést jednoduchý test pomocí indikátoru Alamar Blue. Ten je založený na detekci přítomnosti či nepřítomnosti životaschopných buněk a jejich metabolické aktivity. Základní složkou testu je resazurin (diazoresorcinol, azoresorcín). Jedná se o modré nefluorescenční barvivo, které se v případě zachycení metabolické aktivity (výskytu živých bakterií) redukuje na růžově zbarvený resorufin (Obrázek 23). Barvivo působí jako elektronový akceptor. Při příjmu elektronů se mění se z oxidovaného, nefluorescenčního stavu na redukovaný, fluorescenční stav. Vzniká tak jasná a stabilní odlišná změna, kterou lze snadno měřit a interpretovat. Hodnocení mohou být kvalitativní (okem viditelná jasná

změna barvy) nebo kvantitativní, kdy je možné odečet provádět spektrofotometricky či fluorimetricky. Druhý zmíněný způsob hodnocení je citlivější a využívá toho, že redukovaná forma (resorufin) je vysoce fluoreskující. Intenzita produkované fluorescence je přímo úměrná množství živých a přítomných bakterií. Alamar Blue tedy působí jako přímý indikátor pro měření životaschopnosti buněk. Výhodou testu je také jeho jednoduchost. Díky rozpustnosti indikátoru ve vodě jsou eliminovány kroky promývání. Provedení je také velmi snadné. Do každé jamky mikrotitrační destičky (již inkubované s testovanými bakteriálními kmeny) se přidá 20 µl indikátoru Alamar Blue a inkubuje se 1 až 4 hodiny při 37 °C. Následně je výsledek hodnocen výše popsány mi způsoby (Rampersad, 2012; [www.bio-rad-antibodies.com](http://www.bio-rad-antibodies.com); [www.thermofisher.com](http://www.thermofisher.com)).



### Obrázek 23 – Barevná změna indikátoru Alamar Blue

*Při inkubaci s životaschopnými bakteriemi, které jsou metabolicky aktivní, indikátor mění barvu z modré na růžovou a stane se fluorescenčním.*

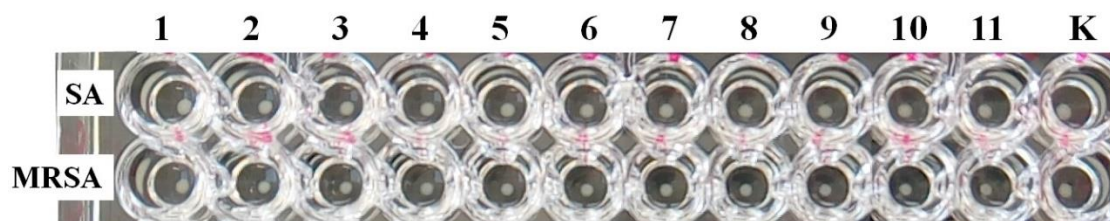
(Zdroj: [www.bio-rad-antibodies.com](http://www.bio-rad-antibodies.com)) – upraveno

## 5 Výsledky

Tabulka 7 – Výsledky testovaných látek (skupina 1)

Kmen	Inkub.	TESTOVANÁ LÁTKA (kód) – MIC ( $\mu\text{mol.l}^{-1}$ )									
		E-0a	E-1a	E-2a	E-3a	E-4a	E-10a	E-0b	E-1b	E-2b	E-3b
SA	24h	>500	>500	>500	>500	>250	>250	>500	>500	>125	>125
	48h	>500	>500	>500	>500	>250	>250	>500	>500	>125	>125
MRSA	24h	>500	>500	>500	>500	>250	>250	>500	>500	>125	>125
	48h	>500	>500	>500	>500	>250	>250	>500	>500	>125	>125
SE	24h	>500	>500	>500	>500	>250	>250	>500	>500	>125	>125
	48h	>500	>500	>500	>500	>250	>250	>500	>500	>125	>125
EF	24h	>500	>500	>500	>500	>250	>250	>500	>500	>125	>125
	48h	>500	>500	>500	>500	>250	>250	>500	>500	>125	>125
EC	24h	>500	>500	>500	>500	>250	>250	>500	>500	>125	>125
	48h	>500	>500	>500	>500	>250	>250	>500	>500	>125	>125
KP	24h	>500	>500	>500	>500	>250	>250	>500	>500	>125	>125
	48h	>500	>500	>500	>500	>250	>250	>500	>500	>125	>125
SEMA	24h	>500	>500	>500	>500	>250	>250	>500	>500	>125	>125
	48h	>500	>500	>500	>500	>250	>250	>500	>500	>125	>125
PA	24h	>500	>500	>500	>500	>250	>250	>500	>500	>125	>125
	48h	>500	>500	>500	>500	>250	>250	>500	>500	>125	>125

Z tabulky 7 vyplývá, že všechny testované látky v příslušném ředění jsou na testované bakterie neúčinné. Lze tak usuzovat, protože ve všech jamkách mikrotitrační destičky byl po inkubaci pozorován zákal. A to i při nejvyšší možné koncentraci látky (hodnoty:  $>500$ ,  $>250$  a  $>125 \mu\text{mol.l}^{-1}$ ). U látek *E-4a* a *E-10a* byla (s ohledem na její rozpustnost) použita nejvyšší možná koncentrace  $250 \mu\text{mol.l}^{-1}$ . U látek *E-2b* a *E-3b* byla z důvodu jejich špatné rozpustnosti použita nejvyšší možná koncentrace  $125 \mu\text{mol.l}^{-1}$  (viz Příloha 1).



Obrázek 24 – Účinek látky *E-0a* na vybrané bakterie

Obrázek znázorňuje ředící řadu (1-11) vybrané látky (*E-0a*). Číslo 1 je koncentrace  $500 \mu\text{mol.l}^{-1}$ . Dále pokračuje klasické dvojkové ředění. Písmeno *K* značí kontrolu. Jedná se o vzorek, ve kterém není přítomna příslušná látka. Je to tedy kontrola, zda jsou dané

bakterie schopny růst i bez testované látky. Řádek SA (*Staphylococcus aureus*) a MRSA (methicilin-rezistentní *Staphylococcus aureus*) jsou testované bakterie. Z výsledku je patrné, že látka E-0a není na tyto dvě bakterie účinná. Zákal (růst bakterií) je přítomný při všech koncentracích testované látky.

**Tabulka 8 – Výsledky testovaných látek (skupina 2)**

Kmen	Inkub.	TESTOVANÁ LÁTKA (kód) – MIC ( $\mu\text{mol.l}^{-1}$ )										
		E-4b	E-10b	Cl-0	Cl-1	Cl-2	Cl-3	Cl-10	Cl-13	MOR-T	Ac-0a	
SA	24h	>125	>125	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	<b>250</b>
	48h	>125	>125	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	<b>500</b>
MRSA	24h	>125	>125	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	<b>500</b>
	48h	>125	>125	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	<b>500</b>
SE	24h	>125	>125	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	<b>500</b>
	48h	>125	>125	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
EF	24h	>125	>125	>500	<b>250</b>	<b>500</b>	<b>500</b>	<b>500</b>	<b>500</b>	>500	>500	<b>500</b>
	48h	>125	>125	>500	<b>250</b>	<b>500</b>	<b>500</b>	<b>500</b>	<b>500</b>	>500	>500	>500
EC	24h	>125	>125	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
	48h	>125	>125	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
KP	24h	>125	>125	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
	48h	>125	>125	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
SEMA	24h	>125	>125	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
	48h	>125	>125	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
PA	24h	>125	>125	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
	48h	>125	>125	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500

Z testovaných látek skupiny 2 (Tabulka 8) lze vybrat látky účinkující na některé bakterie. Jedná se například o látku Cl-1, která je v koncentraci  $250 \mu\text{mol.l}^{-1}$  účinná na bakterii *Enterococcus faecalis* (EF). A to i po 48 hodinové inkubaci. Látky Cl-2, Cl-3 a Cl-10 jsou účinné na tutéž bakterii, ovšem až v koncentraci  $500 \mu\text{mol.l}^{-1}$ . Za velice slabě účinnou lze považovat také látku Ac-0a, která interaguje s nejvíce bakteriálními kmeny. Na MRSA účinkuje při koncentraci  $500 \mu\text{mol.l}^{-1}$ . Do jisté míry je účinná také proti SA. Konkrétně po 24 hodinách byla minimální inhibiční koncentrace  $250 \mu\text{mol.l}^{-1}$ , ale po 48 hodinové inkubaci se hodnota MIC změnila na  $500 \mu\text{mol.l}^{-1}$ . U *Staphylococcus epidermidis* a *Enterococcus faecalis* měla látka Ac-0a po 24 hodinové inkubaci MIC  $500 \mu\text{mol.l}^{-1}$ , ale po 48 hodinách inkubace již byla neúčinná. Ostatní testované látky z této skupiny jsou na dané bakterie neúčinné.

**Tabulka 9 – Výsledky testovaných látek (skupina 3)**

Kmen	Inkub.	TESTOVANÁ LÁTKA (kód) – MIC ( $\mu\text{mol.l}^{-1}$ )									
		FBSA	FBSE	FB2	FB2H	FB5	PN1	PN2	PN3	PN4	PN6
SA	24h	>500	>500	>125	>500	>125	>500	>500	>500	>250	>500
	48h	>500	>500	>125	>500	>125	>500	>500	>500	>250	>500
MRSA	24h	>500	>500	>125	>500	>125	>500	>500	>500	>250	>500
	48h	>500	>500	>125	>500	>125	>500	>500	>500	>250	>500
SE	24h	>500	>500	>125	>500	>125	>500	>500	>500	>250	>500
	48h	>500	>500	>125	>500	>125	>500	>500	>500	>250	>500
EF	24h	>500	>500	>125	>500	>125	>500	>500	>500	>250	>500
	48h	>500	>500	>125	>500	>125	>500	>500	>500	>250	>500
EC	24h	>500	>500	>125	>500	>125	>500	>500	>500	>250	>500
	48h	>500	>500	>125	>500	>125	>500	>500	>500	>250	>500
KP	24h	>500	>500	>125	>500	>125	>500	>500	>500	>250	>500
	48h	>500	>500	>125	>500	>125	>500	>500	>500	>250	>500
SEMA	24h	>500	>500	>125	>500	>125	>500	>500	>500	>250	>500
	48h	>500	>500	>125	>500	>125	>500	>500	>500	>250	>500
PA	24h	>500	>500	>125	>500	>125	>500	>500	>500	>250	>500
	48h	>500	>500	>125	>500	>125	>500	>500	>500	>250	>500

Z tabulky 9 vyplývá, že všechny testované látky v příslušném ředění jsou na testované bakterie neúčinné. Lze tak usuzovat, protože ve všech jamkách mikrotitrační destičky byl po inkubaci pozorován zákal. A to i při nejvyšší možné koncentraci látky (hodnoty: >500, >250 a >125  $\mu\text{mol.l}^{-1}$ ). U látek *F.B.2* a *F.B.5* byla (s ohledem na její rozpustnost) použita nejvyšší možná koncentrace 125  $\mu\text{mol.l}^{-1}$ . U látky *P.N.4* byla z důvodu její špatné rozpustnosti použita nejvyšší možná koncentrace 250  $\mu\text{mol.l}^{-1}$  (viz Příloha 4).



**Obrázek 25 – Účinek látky *P.N.1* na vybrané bakterie**

Obrázek znázorňuje ředící řadu (1-11) vybrané látky (*P.N.1*). Číslo 1 je koncentrace 500  $\mu\text{mol.l}^{-1}$ . Dále pokračuje klasické dvojkové ředění. Písmeno K značí kontrolu. Jedná se o vzorek, ve kterém není přítomna příslušná látka. Je to tedy kontrola, zda jsou dané bakterie schopny růst i bez testované látky. Řádek PA (*Pseudomonas aeruginosa*) je použitá bakterie. Z výsledku je patrné, že látka *P.N.1* není na tuto bakterii účinná. Zákal (růst bakterie) je přítomný při všech koncentracích látky.





Při testování látky M.J.2 nebyl zákal u bakterie EF (*Enterococcus faecalis*) příliš patrný. Ověřeno pomocí indikátoru Alamar Blue. Po dvouhodinové inkubaci jamky změnila barvu na růžovou. Bylo potvrzeno, že bakterie jsou životaschopné. Výsledkem je, že látka M.J.2 je neúčinná na EF, ale také na všechny ostatní bakterie včetně EC (*Escherichia coli*) a KP (*Klebsiella pneumoniae*).

**Tabulka 11 – Výsledky testovaných látek (skupina 5)**

Kmen	Inkub.	TESTOVANÁ LÁTKA (kód) – MIC ( $\mu\text{mol.l}^{-1}$ )		
		OXDI-0b3	OX-0c	OXDI-T2
SA	24h	>500	>500	>500
	48h	>500	>500	>500
MRSA	24h	>500	>500	>500
	48h	>500	>500	>500
SE	24h	>500	>500	>500
	48h	>500	>500	>500
EF	24h	>500	>500	>500
	48h	>500	>500	>500
EC	24h	>500	>500	>500
	48h	>500	>500	>500
KP	24h	>500	>500	>500
	48h	>500	>500	>500
SEMA	24h	>500	>500	>500
	48h	>500	>500	>500
PA	24h	>500	>500	>500
	48h	>500	>500	>500

Z tabulky 11 vyplývá, že všechny testované látky v příslušném ředění jsou na vybrané bakterie neúčinné. Lze tak usuzovat, protože ve všech jamkách mikrotitrační destičky byl po inkubaci pozorován zákal. A to i při nejvyšší možné koncentraci látky (hodnoty:  $>500 \mu\text{mol.l}^{-1}$ ).

## 6 Diskuze

Dle Žemličkové, 2012 se antibiotika stala samozřejmou součástí léčebných postupů a často jsou pacienti i vyžadována. Mnohdy je však jejich indikace iracionální. Právě omezením chybného užívání antibiotik a všemi postupy, které souvisí s antimikrobiální léčbou, se zabývá antibiotická politika.

Existuje velké množství organizací, které se touto problematikou zabývají. Nejedná se pouze o Českou republiku, která je do projektu zapojena, ale je to téměř celosvětová kampaň s jasnými cíli. Lze říci, že se jedná o způsob osvěty laické i odborné veřejnosti. Jejím cílem je přiblížit problém rezistence (včetně možností jejího vzniku), vysvětlit základní principy účinku antibiotik, jejich roli v léčbě a seznámit veřejnost s možnostmi prevence vzniku rezistence. Důraz těchto kampaní je také kladen na minimalizování možných chyb, které vznikají v souvislosti s antibiotickou léčbou. Mezi nejznámější kampaně patří Evropský antibiotický den. Tento projekt má napomoci k zodpovědnému zacházení s antibiotiky a upozornit na rizika spojená s jejich nevhodným užíváním. Na webových stránkách Státního zdravotního ústavu jsou k dispozici různé materiály, které vedou k dodržování pravidel. Stránky jsou navrženy jak pro veřejnost a pacienty, tak pro lékaře a zdravotnický personál. Lékaři mají navíc možnost si veškeré plakáty a poutače stáhnout, vytisknout a vyvěsit ve svých ordinacích a čekárnách – pro širší rozsah osvěty. Do evropského antibiotického dne se zapojuje také naše fakulta – konkrétně Spolek českých studentů farmacie při Farmaceutické fakultě UK. Tento spolek pořádá v první polovině listopadu tzv. Antibiotický týden. Součástí jsou přednášky pro studenty zaměřené na témata týkající se antibiotik, ale také právě cílená osvěta laické veřejnosti. Cílem projektu je rozšiřování znalostí o antibiotikách a celkově o tématech s nimi spojenými. Díky všem takto organizovaným projektům je široká veřejná společnost informována o důležitosti zodpovědného užívání antibiotik. A jak na webových stránkách uvádí Národní antibiotický program, při dodržování správných postupů a zásad v souvislosti s antibiotiky je možné zamezit vzniku a šíření nebezpečných rezistentních bakterií a pomoci tak zachování účinných léků a látek pro budoucí generace.

Celkovou situaci hodnotí ve svém článku Kolář, 2007. Stav, ve kterém se v dnešní době nacházíme, nazývá jako krizi antibiotické účinnosti. Údajně je způsobena nárůstem bakteriální rezistence v různých oblastech. Nejedná se tedy pouze



o případy z humánní medicíny, ale také z veterinární či hospodářské praxe. Problémem je, jak uvádí Národní antibiotický program (NAP), že k léčbě a prevenci bakteriálních infekcí u hospodářských zvířat jsou používána stejná antibiotika jako u lidí. Závěr hodnocení NAP je takový, že zvířata mohou získat bakterie, které jsou rezistentní vůči antibiotikům používaných při léčbě lidských infekčních onemocnění. A z toho vyplývá, že se lidé mohou těmito rezistentními bakteriemi nakazit například přímým kontaktem se zvířaty či konzumací některých hospodářských produktů. I přesto však stále hlavní příčinou bakteriální rezistence zůstává používání antibiotik v humánní medicíně. Kolář, 2007 se také ztotožňuje s názorem, že se na této situaci podílí zvyšující se četnost výskytu multirezistentních kmenů a tím pádem selhání příslušné antibiotické léčby.

Jako vhodné a jednoduché východisko ze situace, kdy ubývá účinných antibiotik a přibývá rezistentních bakteriálních kmenů, se jeví použití nových, zatím nepoužívaných antibiotik. Existuje tak určitá potřeba jiných látek s novými mechanismy účinku. Tato situace však není tak prostá. Nasir, 2015 tento problém popisuje tak, že tempo bakteriální rezistence na antibiotika je mnohem rychlejší než objev nových antimikrobiálních látek. Jak uvádí Kolář, 2007 a Schindler, 2008 v dnešní době je velmi komplikované vyvinout novou látku a vymyslet tak něco tzv. „co tu ještě nebylo“.

Vznik, výzkum a vývoj nových léčiv je omezen velkým množstvím faktorů. Prvním významným faktorem je ekonomická stránka věci. Farmaceutickým společnostem se výzkum a případná výroba antibiotik nevyplácí. Nalezení nového léku je totiž velmi nákladné. Dalším velmi významným ovlivňujícím faktorem je problém s nalezením nového cílového místa pro antibiotikum v bakterii. Všechna dosud objevená cílová místa účinku dosavadních antibakteriálních látek jsou již vyčerpána. Je tedy nouze najít v bakteriální buňce místo nové, na které by antibiotikum spolehlivě působilo. Značnou komplikací je také fakt, že výzkumu nových látek brání rozmnožování bakterií. Rychle se množící bakterie si zároveň stejně rychle předávají informace o rezistenci.

Stále se tedy usiluje o novou účinnou látku. Dle Koláře, 2007 lze při vývoji těchto nových antimikrobiálních léčiv použít několik způsobů a principů, na které je třeba se dále zaměřit. Jednou z možností může být modifikace základní struktury (popřípadě molekuly) již známých antibiotik. Dalším řešením je nalezení nového cílového místa. V současnosti jsou snahy lépe prozkoumat bakteriální genom a najít slibná místa. Řešením je také objevení originální a zcela odlišné chemické struktury, která by měla natolik dobré vlastnosti a zároveň byla na bakterie účinná.

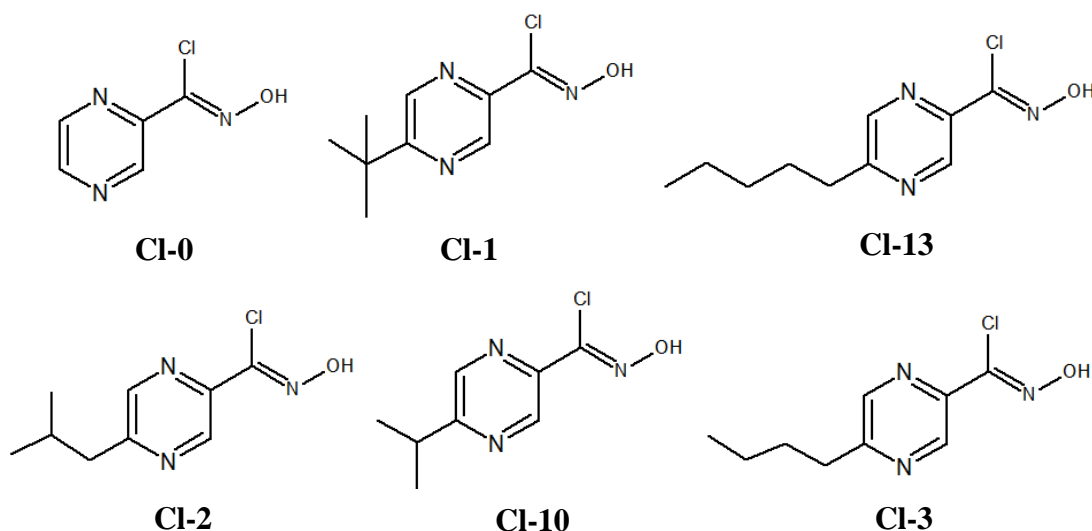
Aby bylo antibiotikum co nejučinnější a klinicky užitečné, mělo by podle Todara, 2012 splňovat několik vlastností nebo alespoň co nejvíce z těchto vlastností. Především je důležitá jeho netoxičita pro hostitele a co nejméně nežádoucích (vedlejších) účinků, nejlépe žádné. Dále by nemělo eliminovat běžnou bakteriální flóru jedince. Další vlastností je jeho snadná výroba, dostupnost a chemická stabilita. Co se týká rezistence, neměla by vůči němu vzniknout vůbec nebo by její vznik měl být velice vzácný a nepravděpodobný. A zároveň by dané antibiotikum excelovalo schopností zabíjet či inhibovat růst mnoha různých (ale pouze patogenních) bakterií. Ovšem taková látka zatím není k dispozici. Goering, 2016 ve své knize uvádí, že zpomalení vývoje nových látek, které účinně působí na bakterie (především na multirezistentní), je celosvětově považováno za vážnou hrozbu. Především pokud se jedná o léčbu závažných a život ohrožujících infekcí.

Žemličková, 2012 ve svém článku poukazuje v souvislosti s antibiotiky na další významný problém. Velká část populace se domnívá, že léčba penicilinem je stará a v dnešní době již překonaná a neúčinná. Opak je ale pravdou. Novější přípravky nebo modifikované účinné látky vyvolávají rezistenci mnohem rychleji a efektivněji než právě peniciliny. Co se týká porovnání zemí v zahraničí, je zde jasná jedna skutečnost. Země s nízkou spotřebou antibiotik a současnými preferencemi k používání základních penicilinů (především v primární péči) nemají příliš velké komplikace a problémy se vzrůstající bakteriální rezistencí. Proto by bylo dobré zamyslet se nad faktem, zda se nevrátit k těmto látkám a využívat je o to racionálněji a lépe (bez chyb). Celkově by se antibiotická politika (včetně témat vzniku rezistence) neměla přehlížet, ale naopak řešit a přibližovat celé populaci včetně České republiky a dalších států.

Co se týká námi testovaných látek, lze říci, že téměř všechny jsou prakticky neúčinné. Z celkového množství látek lze vybrat šest, které mají alespoň patrnou velice slabou účinnost.

Minimální inhibiční koncentrace (MIC) látky **CI-1**, která je účinná na kmen *Enterococcus faecalis*, je 250  $\mu\text{mol.l}^{-1}$ . Podobně je na tom také látka **CI-2**, její MIC je však 500  $\mu\text{mol.l}^{-1}$ . Látky **CI-3** a **CI-10** jsou také účinné na kmen *Enterococcus faecalis* a jejich MIC je shodně 500  $\mu\text{mol.l}^{-1}$  (Tabulka 8). Všechny tyto sloučeniny mají podobnou strukturu, a to může vést k podobným výsledkům. Rozdíl struktur těchto sloučenin a struktury sloučeniny **CI-0** je patrný na první pohled. U látek vykazujících slabou aktivitu přibyl postranní řetězec v poloze 4- benzenového jádra, který může být pro účinek tím pádem výhodný. Tuto domněnku ale moc nepodporuje fakt, že

sloučenina **Cl-13** má tento postranní řetězec také a navíc o 1 uhlík delší (Obrázek 27). Ve většině případů vede prodloužení alkylového řetězce, resp. zvýšení lipofility, ke zvýšení účinku. V našem případě nikoliv. To může podpořit skutečnost, že nejvýhodnější pro účinek je postranní řetězec o délce 3-4 uhlíků (bez závislosti na izomerii) anebo tento fakt na účinek vůbec vliv nemá.



**Obrázek 27 – Porovnání postranních řetězců aktivních sloučenin**

Látka **M.J.8** vykazala MIC rovnou  $500 \mu\text{mol.l}^{-1}$ . A to pro kmeny *Staphylococcus aureus* a methicilin-rezistentní *Staphylococcus aureus*. Na ostatní bakteriální kmeny nebyla tato látka účinná (Tabulka 10). Díky tomu, že ve své skupině byla tato aktivita jediná, pak není možné vyvozovat žádné závěry o vztahu aktivity a chemické struktury, tzv. Structure-Activity relationships (SAR).

Jako nejúčinnější se jeví látka **Ac-0a**, která je účinná na kmeny: *Staphylococcus aureus*, methicilin-rezistentní *Staphylococcus aureus*, *Serratia marcescens*, *Enterococcus faecalis*. Její MIC je 250 či  $500 \mu\text{mol.l}^{-1}$ . Ale při delší inkubační době (48 hodin) se její účinnost u některých kmenů (*Serratia marcescens*, *Enterococcus faecalis*)

ztrácí – Tabulka 8. Tento fakt podporuje myšlenku, že takováto sloučenina bude mít spíše bakteriostatický než baktericidní efekt. Co se týče SAR, tak zde opět není žádná opora pro vyvození těchto vztahů, a to z důvodů nedostatečného počtu účinných sloučenin v dané skupině látek.

Posuzování účinnosti jednotlivých látek je však velmi komplikované, protože účinná koncentrace každé látky je individuální. Ve srovnání látek se standardy lze říci,

že ani jedna z látek není dostatečně účinná v použitelné koncentraci. Hodnoty zvoleného standardu ciprofloxacinu jsou v rozmezí 0,004 – 0,250  $\mu\text{mol.l}^{-1}$ . Rozmezí hodnot pro standard gentamicin je 0,250 – 8,0  $\mu\text{mol.l}^{-1}$ . Na to, aby mohla být považována za účinnou je nutná hodnota MIC alespoň 31,25  $\mu\text{mol.l}^{-1}$ . Tato hodnota je zvolena v rámci výzkumu účinnosti nových potenciálně antibakteriálně účinných látek na Katedře biologických a lékařských věd Farmaceutické fakulty v Hradci Králové a není jednoznačná. Ke každé sloučenině se přistupuje individuálně s ohledem na spektrum účinku a potenciální toxicitě.

## 7 Závěr

Téma diplomové práce se týkalo *in vitro* screeningu nových potenciálně antibakteriálně účinných látek.

Cílem diplomové práce bylo testování nových potenciálně antibakteriálně účinných látek, které byly dodány výzkumnou skupinou prof. Doležala z katedry Farmaceutické chemie a Farmaceutické analýzy, a stanovení jejich MIC. Dílčím cílem bylo zhodnotit reakci daných látek na vybrané bakteriální kmeny a určit tak účinnost či neúčinnost těchto látek. Cíle této diplomové práce byly splněny. Na základě provedení mikrodiluční bujónové metody jsme jednotlivé dodané látky otestovali a zhodnotili, zda jsou na vybrané bakteriální kmeny účinné či nikoli. U účinných látek jsme určili jejich MIC – Tabulka 6 a Tabulka 10.

Ze 42 testovaných látek bylo účinných jen velmi malé množství. Konkrétně šest sloučenin – **CI-1**, **CI-2**, **CI-3**, **CI-10**, **Ac-0a**, **M.J.8**. Ovšem i ty byly účinné jen na několik bakteriálních kmenů a pouze v nejvyšších koncentracích (250 či 500  $\mu\text{mol.l}^{-1}$ ). Nižší koncentrace těchto látek bakterie nezabíjely a ani bakteriím v růstu nebránily (Tabulka 7 a Tabulka 9).

Pro úplné potvrzení či vyvrácení účinnosti látek je zapotřebí dalších výzkumů a testů. Není to vůbec jednoduchý proces. Než je vyvinuta nová látka a otestována (chemicky a klinicky), uplyne řada let. Osud vyvíjených a testovaných látek tak může být různý. Mohou skončit a dále se nezkoušet již při prvních testovacích metodách. Nebo je zjištěno, že daná látka je nevhodná pro klinické studie, případně v těchto studiích neobstojí. Celý děj vývoje a výzkumu nejen antibakteriálních látek se tak vrací na začátek a hledají se či syntetizují další nové látky, které budou podrobeny testování.

## 8 Seznam použitých zdrojů

### Literární zdroje

- ANDERSON, Rosaleen, et al. *Antibacterial agents: chemistry, mode of action, mechanisms of resistance, and clinical applications*. Chichester: Wiley, 2012. ISBN 978-0-470-97245-8.
- BURSOVÁ, Šárka a kol. *Mikrobiologické laboratorní metody*. Brno: Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, 2014. ISBN 978-80-7305-675-9.
- CUPÁKOVÁ, Šárka a kol. *Mikrobiologie potravin - praktická cvičení I: obecná mikrobiologie*. Brno: Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, 2008. ISBN 8073050439.
- FINCH, Roger, et al. *Antimicrobial chemotherapy*. 6th edition. Oxford: Oxford University Press, 2012. ISBN 978-0-19-969765-6.
- GOERING, Richard V. a kol. *Mimsova lékařská mikrobiologie*. 5. vydání. Praha: Triton, 2016. ISBN 978-80-7387-928-0
- GREENWOOD, David a kol. *Lékařská mikrobiologie: přehled infekčních onemocnění: patogeneze, imunita, laboratorní diagnostika a epidemiologie*. Praha: Grada, 1999. ISBN 80-7169-365-0.
- HORÁČEK, Jiří a kol. *Základy lékařské mikrobiologie*. Praha: Karolinum, 2000. ISBN 80-246-0006-4.
- JÍLEK, Petr a kol. *Úvod do mikrobiologických vyšetřovacích metod ve zdravotnictví*. Praha: Karolinum, 2002. Učební texty Univerzity Karlovy v Praze. ISBN 8024604590.
- JINDRÁK, Vlastimil a kol. *Antibiotická politika a prevence infekcí v nemocnici*. Praha: Mladá fronta, 2014. Aeskulap. ISBN 978-80-204-2815-8.
- JUHAŇÁK, Stanislav. *Klinicky významné bakterie*. Praha: Triton, 2012. ISBN 978-80-7387-588-6.
- JULÁK, Jaroslav a Emil PAVLÍK. *Lékařská mikrobiologie pro zubní lékařství*. Praha: Karolinum, 2010. ISBN 978-80-246-1792-3.

- JULÁK, Jaroslav. *Úvod do lékařské bakteriologie*. 2. vydání. Praha: Univerzita Karlova v Praze, nakladatelství Karolinum, 2015. ISBN 978-80-246-3210-0.
- KUKLÍK, Rostislav. Antibiotická politika. *Zdravotnické noviny*. Avicenum/Mladá fronta, 2007, 56(27-28), 14-17. ISSN 1805-2355-1214-7664.
- LEVINSON, Warren. *Review of medical microbiology and immunology*. 13th edition. New York: McGraw-Hill Education Medical, 2014. ISBN 9780071818117.
- LINCOVÁ, Dagmar a Hassan FARGHALI. *Základní a aplikovaná farmakologie*. Praha: Galén, 2002. ISBN 80-7262-168-8.
- LÜLLMANN, Heinz a kol. *Barevný atlas farmakologie*. 3. vydání. Praha: Grada, 2007. ISBN 978-80-247-1672-5.
- LÜLLMANN, Heinz a kol. *Farmakologie a toxikologie*. 2. vydání. Praha: Grada, 2004. ISBN 80-247-0836-1.
- MAHON, Connie R. et al. *Textbook of diagnostic microbiology*. 5th edition. Maryland Heights, Missouri: Elsevier, 2015. ISBN 978-0-323-08989-0.
- MARTÍNKOVÁ, Jiřina a kol. *Farmakologie pro studenty zdravotnických oborů*. Praha: Grada, 2007. ISBN 9788024713564.
- MELTER, Oto a Annika MALMGREN. *Principy a praktika lékařské mikrobiologie*. Praha: Karolinum, 2014. ISBN 978-80-246-2414-3.
- NAVRÁTIL, Milan a kol. *Kapitoly z molekulární biologie a genetiky mikroorganismů*. Olomouc: Univerzita Palackého v Olomouci, 2015. ISBN 9788024446516.
- NĚMEC, Miroslav a Dagmar MATOULKOVÁ. *Základy obecné mikrobiologie*. Brno: Masarykova univerzita, 2015. ISBN 978-80-210-7923-6.
- PALMER, Michael, et al. *Biochemical pharmacology*. Hoboken: Wiley, c2012. ISBN 978-0-470-17445-6.
- PŘÍBORSKÝ, Jan. *Makrolidy*. Praha: Maxdorf, c2001. ISBN 80-85912-53-8.
- PŘÍBORSKÝ, Jan. *Peniciliny*. Praha: Maxdorf, c2004. ISBN 80-73-45-026-7.

- SCHARFEN, Josef. *Diferenciální diagnostika v klinické mikrobiologii*. Praha: Nucleus HK, 2013. Mikrobiologie. ISBN 978-80-87009-32-1.
- SCHINDLER, Jiří. *Ze života bakterií*. Praha: Academia, 2008. ISBN 978-80-200-1666-9.
- URBÁNEK, Karel. *Nežádoucí účinky antibiotik na gastrointestinální trakt*. *Klinická farmakologie a farmacie*. 2003, 17(2), 92-95.
- VOTAVA, Miroslav a kol. *Lékařská mikrobiologie - vyšetřovací metody*. Brno: Neptun, 2010. ISBN 978-80-86850-04-8.
- VOTAVA, Miroslav. *Lékařská mikrobiologie obecná*. 2. přepracované vydání. Brno: Neptun, 2005. ISBN 80-86850005.
- VOTAVA, Miroslav. *Lékařská mikrobiologie speciální*. Brno: Neptun, 2003. ISBN 80-902896-6-5.

## Internetové zdroje

- ADÁMKOVÁ, Václava. Antibiotická léčba. *Medicina pro praxi* [online]. Solen, 2015, 12(5), 227-230 [cit. 2017-10-06]. ISSN 1803-5310. Dostupné z: <https://www.medicinapropraxi.cz/pdfs/med/2015/05/05.pdf>
- ADÁMKOVÁ, Václava. Dobrý den, rezistence, mohu dál? I. *Medicina pro praxi* [online]. Solen, 2012, 9(2), 67-69 [cit. 2017-10-07]. Dostupné z: <https://www.medicinapropraxi.cz/pdfs/med/2012/02/06.pdf>
- AlamarBlue®: Rapid & Accurate Cell Health Indicator. *Thermo Fisher Scientific* [online]. 2018 [cit. 2018-03-30]. Dostupné z: <https://www.thermofisher.com/cz/en/home/brands/molecular-probes/key-molecular-probes-products/alarablue-rapid-and-accurate-cell-health-indicator.html>
- AlamarBlue®: The fast, non-toxic, simple and reliable cell proliferation and viability reagent. *Bio-Rad*[online]. 2018 [cit. 2018-03-30]. Dostupné z: <https://www.bio-rad-antibodies.com/alarablue-cell-viability-assay-resazurin.html>



- Antibiotická politika: Subkomise pro antibiotickou politiku. *Česká lékařská společnost Jana Evangelisty Purkyně* [online]. Praha: ČLS JEP, 2017 [cit. 2017-08-23]. Dostupné z: <http://www.cls.cz/antibioticka-politika-a>
- Antibiotické středisko. *Krajská nemocnice T. Bati, a.s.* [online]. Zlín: Krajská nemocnice T. Bati, a. s., 2012 [cit. 2017-08-23]. Dostupné z: <http://www.kntb.cz/antibioticke-stredisko>
- BENEŠ, Jiří. Čím se antibiotika odlišují od jiných léků. *Vesmír* [online]. 2014, 93(17), 17-19 [cit. 2017-10-07]. ISSN 0042-4544. Dostupné z: <http://casopis.vesmir.cz/clanek/cim-se-antibiotika-odlisuji-od-jinych-leku>
- BROŽÁK, Miloš a kol. Antibiotická profylaxe v urologii. *Urologie pro praxi* [online]. Solen, 2010, 11(2), 97-100 [cit. 2017-10-07]. ISSN 1803-5299. Dostupné z: <https://www.urologiepropraxi.cz/pdfs/uro/2010/02/10.pdf>
- CABRITA, Lisa et al. Probing ribosome-nascent chain complexes produced in vivo by NMR spectroscopy. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [online]. 2009, 106(52), 22239-22244 [cit. 2018-03-23]. DOI: 10.1073/pnas.0903750106. ISSN 0027-8424. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2799734/>
- *Centers for Disease Control and Prevention* [online]. USA: CDC, 2017 [cit. 2017-09-06]. Dostupné z: <https://www.cdc.gov/>
- Clinical Practice Guidelines for Antimicrobial Prophylaxis in Surgery. *ASHP - American Society of Health-System Pharmacists* [online]. Bethesda, USA: ASHP, 2013 [cit. 2017-10-07]. Dostupné z: <https://www.ashp.org/-/media/assets/policy-guidelines/docs/therapeutic-guidelines-antimicrobial-prophylaxis-surgery.pdf>
- *CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute* [online]. USA: CLSI, 2017 [cit. 2017-09-16]. Dostupné z: <http://www.clsi.org>
- Česko. Vláda. Usnesení Vlády České republiky ze dne 4. května 2009 č. 595 o ustanovení Národního antibiotického programu. In *Věstník Ministerstva zdravotnictví České republiky*. roč. 2009, částka 9, s. 5. Dostupný z: [http://www.mzcr.cz/Legislativa/dokumenty/vestnik-c\\_3698\\_1779\\_11.html](http://www.mzcr.cz/Legislativa/dokumenty/vestnik-c_3698_1779_11.html)

- DALE-SKINNER, John W. a Boyan B. BONEV. Molecular Mechanisms of Antibiotic Resistance: The Need for Novel Antimicrobial Therapies. *New Strategies Combating Bacterial Infection* [online]. Weinheim, Germany, 2008, 1-46 [cit. 2018-03-17]. DOI: 10.1002/9783527622931.ch1. ISBN 9783527622931. Dostupné z: [https://application.wiley-vch.de/books/sample/352732206X\\_c01.pdf](https://application.wiley-vch.de/books/sample/352732206X_c01.pdf)
- DOSTÁL, Václav. Používáme antimikrobiální terapii racionálně? *Medicina pro praxi* [online]. Solen, 2011, 8(12), 518-522 [cit. 2017-11-03]. ISSN 1803-5310. Dostupné z: <https://www.solen.cz/pdfs/med/2011/12/05.pdf>
- EDELSTEIN, P. *Epidemiologic Cutoff Values* [online]. 2017 [cit. 2017-10-06]. Dostupné z: [http://www.uphs.upenn.edu/bugdrug/antibiotic\\_manual/ECV.htm](http://www.uphs.upenn.edu/bugdrug/antibiotic_manual/ECV.htm)
- *ESCMID - European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* [online]. Švýcarsko: ESCMID, 2017 [cit. 2017-9-16]. Dostupné z: <https://www.escmid.org>
- *EUCAST - The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* [online]. Švédsko: EUCAST, 2017 [cit. 2017-9-16]. Dostupné z: <http://www.eucast.org>
- *European Antibiotic Awareness Day* [online]. Švédsko: ECDC, 2017 [cit. 2017-09-06]. Dostupné z: <http://antibiotic.ecdc.europa.eu>
- *European Centre for Disease Prevention and Control: An agency of the European Union* [online]. Švédsko: ECDC, 2017 [cit. 2017-09-06]. Dostupné z: <https://ecdc.europa.eu/en>
- FELMINGHAM, David a Derek F. J. BROWN. Instrumentation in antimicrobial susceptibility testing. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* [online]. 2001, 48 (suppl\_1), 81-85 [cit. 2017-09-22]. DOI: 10.1093/jac/48.suppl\_1.81. ISSN 1460-2091. Dostupné z: [http://academic.oup.com/jac/article/48/suppl\\_1/81/2473522/Instrumentation-in-antimicrobial-susceptibility](http://academic.oup.com/jac/article/48/suppl_1/81/2473522/Instrumentation-in-antimicrobial-susceptibility)

- GAYNOR, Marne a Alexander S. MANKIN. Macrolide Antibiotics: Binding Site, Mechanism of Action, Resistance. *Current Topics in Medicinal Chemistry* [online]. 2003, 3(9), 949-961 [cit. 2018-03-17]. DOI: 10.2174/1568026033452159. Dostupné z: <http://mankin-vazquez.lab.uic.edu/html/publications/2003-CurrTopMedChem-3-949-961.pdf>
- GOODSELL, David. Penicillin-binding Proteins. *RCSB Protein Data Bank* [online]. 2002, [cit. 2018-02-02]. DOI: 10.2210/rcsb\_pdb/mom\_2002\_5. ISSN 1234-432x. Dostupné z: <http://pdb101.rcsb.org/motm/29>
- Historie antibiotik. In: *Hyde Park Civilizace* [televizní pořad]. ČT24, 2013
- JINDRÁK, Vlastimil. Antibiotická politika v České republice. *Postgraduální medicína* [online]. Mladá fronta, 2013, 13(08), 10-15 [cit. 2017-08-23]. ISSN 1212-4184. Dostupné z: <http://zdravi.euro.cz/clanek/postgradualni-medicina/antibioticka-politika-v-ceske-republice-472463>
- JORGENSEN, James et al. Antimicrobial Susceptibility Testing: A Review of General Principles and Contemporary Practices. *Clinical Infectious Diseases* [online]. 2009, 49 (11), 1749-1755 [cit. 2017-09-22]. DOI: 10.1086/647952. ISSN 1058-4838. Dostupné z: <https://academic.oup.com/cid/article-lookup/doi/10.1086/647952>
- KANNAN, Krishna a Alexander S. MANKIN. Macrolide antibiotics in the ribosome exit tunnel: species-specific binding and action. *Annals of the New York Academy of Sciences* [online]. 2011, 1241(1), 33-47 [cit. 2018-03-17]. DOI: 10.1111/j.1749-6632.2011.06315.x. ISSN 00778923. Dostupné z: <http://web.a.ebscohost.com/ehost/pdfviewer/pdfviewer?vid=2&sid=bd767531-2b02-467d-92cc-bf2aa54d3698%40sessionmgr4008>
- KANNAN, Krishna. The general mode of translation inhibition by macrolide antibiotics. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [online]. 2014, 111(45), 15958-15963 [cit. 2018-03-17]. DOI: 10.1073/pnas.1417334111. ISSN 0027-8424. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4234590/pdf/pnas.201417334.pdf>

- KOLÁŘ, Milan. Vývoj bakteriální rezistence a nová antimikrobní léčiva. *Interní medicína pro praxi* [online]. Solen, 2007, 5, 213-216 [cit. 2017-11-04]. ISSN 1803-5256. Dostupné z: <https://www.internimedicina.cz/pdfs/int/2007/05/03.pdf>
- LOCHMANNOVÁ, Jindra a kol. Antibiotická léčba bakteriálních infekcí z pohledu klinika, mikrobiologa a farmakologa. *Medicína pro praxi* [online]. Solen, 2004, 15-18 [cit. 2017-11-03]. ISSN 1803-5310. Dostupné z: <https://www.medicinapropraxi.cz/pdfs/med/2004/01/04.pdf>
- MELNIKOV, Sergey et al. One core, two shells: bacterial and eukaryotic ribosomes. *Nature structural & molecular biology* [online]. 2012, 19(6), 560-567 [cit. 2018-03-17]. DOI: 10.1038/nsmb.2313. ISSN 1545-9993. Dostupné z: <http://web.a.ebscohost.com/ehost/pdfviewer/pdfviewer?vid=1&sid=cd70b5bf-a5ff-4ca9-b6a5-7cffcae8b1e2%40sessionmgr4009>
- Národní antibiotický program v České republice. *Medical Tribune CZ: Tribuna lékařů a zdravotníků* [online]. Praha: Vlastimil Jindrák, 2010 [cit. 2017-08-23]. Dostupné z: <https://www.tribune.cz/clanek/16873-narodni-antibioticky-program-v-ceske-republice>
- NASIR, Bakht et al. Recent Trends and Methods in Antimicrobial Drug Discovery from Plant Sources [online]. *Austin Journal of Microbiology*. Pakistan: Austin Publishing Group, 2015, 1-12. ISSN 2471-0296. Dostupné z: <http://austinpublishinggroup.com/microbiology/fulltext/ajm-v1-id1002.php>
- NEU, Harold a Thomas GOOTZ. Antimicrobial Chemotherapy. BARON, Samuel. *Medical Microbiology*[online]. 4th edition. Galveston, Texas: University of Texas Medical Branch at Galveston, 1996 [cit. 2018-03-11]. ISBN 0963117211. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK7986/#A672>
- Nobel Prizes and Laureates: Sir Alexander Fleming. Nobelprize.org: The Official Web Site of the Nobel Prize [online]. Swedish: Nobel Media AB, 2017 [cit. 2017-09-03]. Dostupné z: [https://www.nobelprize.org/nobel\\_prizes/medicine/laureates/1945/fleming-bio.html](https://www.nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/1945/fleming-bio.html)

- ORELLE, Cédric a Erik D. CARLSON. Protein synthesis by ribosomes with tethered subunits. *Nature*[online]. 2015, 524(7563), 119-124 [cit. 2018-03-17]. DOI: 10.1038/nature14862. ISSN 0028-0836. Dostupné z: <http://web.ebscohost.com/ehost/pdfviewer/pdfviewer?vid=1&sid=3c85e1de8a4c-4a37-96ac-d39003d3346f%40sessionmgr101>
- PATEROVÁ, Pavla a kol. Principy racionální léčby antibiotiky (část I.). *Intervenční a akutní kardiologie* [online]. Solen, 2016, 15(2), 85-89 [cit. 2017-11-03]. ISSN 1803-5302. Dostupné z: <https://www.iakardiologie.cz/pdfs/kar/2016/02/06.pdf>
- PRÁZNOVCOVÁ, Lenka. *Compliance pacienta* [online]. 2013 [cit. 2018-03-17]. Dostupné z: [https://www.pace.cz/wp-content/uploads/2013/03/5\\_compliance\\_pacienta.pdf](https://www.pace.cz/wp-content/uploads/2013/03/5_compliance_pacienta.pdf)
- RAMPERSAD, Sephra N. Multiple Applications of Alamar Blue as an Indicator of Metabolic Function and Cellular Health in Cell Viability Bioassays. *Sensors* [online]. 2012, 12(9), 12347-12360 [cit. 2018-03-30]. DOI: 10.3390/s120912347. ISSN 1424-8220. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3478843/>
- RYSKA, O. a Šerclová Z. Antibiotická profylaxe u akutních výkonů. *Akutne.cz* [online]. Praha, 2014 [cit. 2017-10-07]. Dostupné z: <http://www.akutne.cz/res/publikace/6-sepse2014-atbprof-emerg2.pdf>
- SPÍŽEK, Jaroslav. Rezistence na antibiotika. *Vesmír* [online]. 1999, 27, 27-32 [cit. 2018-01-30]. ISSN 0042-4544. Dostupné z: <https://vesmir.cz/cz/casopis/archiv-casopisu/1999/cislo-1/rezistence-antibiotika.html>
- ŠTURMA, Jan. Národní antibiotický program. *Státní zdravotní ústav* [online]. Praha, 2011 [cit. 2017-08-23]. Dostupné z: <http://www.szu.cz/narodni-antibioticky-program>

- Terminology relating to methods for the determination of susceptibility of bacteria to antimicrobial agents. *Clinical Microbiology and Infection* [online]. 2000, 6(9), 503-508 [cit. 2017-09-03]. DOI: 10.1046/j.1469-0691.2000.00149.x. ISSN 1198743x. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1198743X14631578>
- TODAR, Kenneth. *Todar's Online Textbook of Bacteriology* [online]. Wisconsin, 2012 [cit. 2017-08-24]. Dostupné z: <http://textbookofbacteriology.net/index.html>
- WAUDBY, Christopher A et al. Protein folding on the ribosome studied using NMR spectroscopy. *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy* [online]. 2013, 74, 57–75 [cit. 2018-03-23]. DOI: 10.1016/j.pnmrs.2013.07.003. ISBN 10.1016/j.pnmrs.2013.07.003. ISSN 0079-6565. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3991860/>
- WHO: *Regional Office for Europe* [online]. Dánsko: WHO, 2017 [cit. 2017-09-06]. Dostupné z: <http://www.euro.who.int>
- WILSON, Daniel N. The A–Z of bacterial translation inhibitors. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* [online]. 2009, 44(6), 393-433 [cit. 2018-03-17]. DOI: 10.3109/10409230903307311. ISSN 1040-9238. Dostupné z: <http://web.a.ebscohost.com/ehost/pdfviewer/pdfviewer?vid=0&sid=de5acf0c-eb9b-447a-92ad-bdc764bce99f%40sessionmgr4007>
- ŽEMLIČKOVÁ, Helena. Penicilinová ATB – chyby a mýty v jejich podávání. *Medical Tribune* [online]. Medical Tribune CZ, 2012, 19 [cit. 2018-01-30]. ISSN 1214-8911. Dostupné z: <https://www.tribune.cz/clanek/28125-penicilinova-atb-chyby-a-myty-v-jejich-podavani%20s>

## 9 Seznam obrázků

Obrázek 1 – Organizační struktura NAP .....	14
Obrázek 2 – Struktura $\beta$ -laktamových antibiotik.....	20
Obrázek 3 – Struktura tetracyklinů .....	21
Obrázek 4 – Struktura erytromycinu .....	22
Obrázek 5 – Schéma mechanismu účinku antibiotik na buňku .....	35
Obrázek 6 – Srovnání buněčné stěny u grampozitivních a gramnegativních bakterií....	36
Obrázek 7 – Schématické znázornění struktury peptidoglykanu.....	37
Obrázek 8 – Podjednotky ribozomu .....	39
Obrázek 9 – Struktura ribozomu.....	39
Obrázek 10 – Schématické znázornění proteosyntézy .....	40
Obrázek 11 – Schématické znázornění výstupu peptidového řetězce z ribozomu .....	41
Obrázek 12 – Vývoj bakteriální rezistence .....	43
Obrázek 13 – Porovnání velikosti inhibičních zón s breakpointy .....	50
Obrázek 14 – Výsledek E-testu .....	51
Obrázek 15 – <i>Staphylococcus aureus</i> na krevním agaru .....	58
Obrázek 16 – <i>Staphylococcus epidermidis</i> na krevním agaru .....	59
Obrázek 17 – <i>Enterococcus faecalis</i> na krevním agaru.....	60
Obrázek 18 – <i>Escherichia coli</i> na krevním agaru.....	61
Obrázek 19 – <i>Klebsiella pneumoniae</i> na krevním agaru .....	61
Obrázek 20 – <i>Serratia marcescens</i> na krevním agaru .....	62
Obrázek 21 – <i>Pseudomonas aeruginosa</i> na krevním agaru.....	63
Obrázek 22 – Schéma mikrotitrační destičky .....	73
Obrázek 23 – Barevná změna indikátoru Alamar Blue .....	74
Obrázek 24 – Účinek látky <i>E-0a</i> na vybrané bakterie .....	75
Obrázek 25 – Účinek látky <i>P.N.I</i> na vybrané bakterie.....	77
Obrázek 26 – Ověření růstu bakterií pomocí indikátoru .....	78
Obrázek 27 – Porovnání postranních řetězců aktivních sloučenin .....	83

## 10 Seznam tabulek

Tabulka 1 – Skupiny antibiotik a zástupci.....	24
Tabulka 2 – Dělení antibiotik dle typu jejich účinku.....	25
Tabulka 3 – Nežádoucí účinky antibakteriálních látek.....	27
Tabulka 4 – Mechanismus účinku ATB včetně zástupců.....	34
Tabulka 5 – Přehled testovaných látek .....	64
Tabulka 6 – Výsledky testovaných látek (skupina 1).....	75
Tabulka 7 – Výsledky testovaných látek (skupina 2).....	76
Tabulka 8 – Výsledky testovaných látek (skupina 3).....	77
Tabulka 9 – Výsledky testovaných látek (skupina 4).....	78
Tabulka 10 – Výsledky testovaných látek (skupina 5).....	79



## **11 Seznam příloh**

Příloha 1 – Protokol č. 017-178d-bakt.....	98
Příloha 2 – Protokol č. 017-179d-bakt.....	100
Příloha 3 – Protokol č. 017-180d-bakt.....	102
Příloha 4 – Protokol č. 017-181d-bakt.....	104
Příloha 5 – Protokol č. 017-182d-bakt.....	106

# 12 Přílohy

## Příloha 1 – Protokol č. 017-178d-bakt.

PROTOKOL - MIKRODILUČNÍ BUJONOVÝ TEST											
Č. 017-178d-bakt.						Zadavatel: prof. Doležal M., Dr.Kučerová M.					
Vykonal: Dr.Konečná K., Dr.Jand'ourek O., Dufková I., Bc. Davidová L.						Dne : 19.7. – 28.7. 2017					
<b>Testované látky</b>											
Generický název (skupinový):											
Číslo, kód (sumární vzorec / substituent) m.h.						m.h.					
1. E-0a	180,17	6. E-10a	222,25								
2. E-1a	236,28	7. E-0b	222,25								
3. E-2a	236,28	8. E-1b	278,36								
4. E-3a	236,28	9. E-2b	278,36								
5. E-4a	222,25	10.E-3b	278,36								
<b>Metoda- mikrodiluční bujónová</b> v destičkách – (200µl media + 10µl suspenze inokula)											
Médium: Mueller Hintonův bujon č.2 (CAMHB) pH 7,0 Inokulum: 0.5 McFarlandovy stup.											
Délka inkubace: 24 - 48h Teplota: 35°± 2° C											
Způsob inkubace: statický, ve tmě, humidní atmosféra											
Odečítání: vizuální MIC Indikátor: AlamarBlue (použití dle dohody)											
<b>Testované kmeny</b> (kód, číslo)											
1. SA	<i>Staphylococcus aureus</i> spp. <i>aureus</i>					ATCC 29213, CCM 4223, lab.ID 142-2016					
2. MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> spp. <i>aureus</i>					ATCC 43300, CCM 4750, lab.ID 143-2016					
3. SE	<i>Staphylococcus epidermidis</i>					klinický izolát, lab.ID 112-2016					
4. EF	<i>Enterococcus faecalis</i>					ATCC 29212, CCM 4224, lab.ID 164-2016					
5. EC	<i>Escherichia coli</i>					ATCC 25922, CCM 3954, lab.ID 162-2016					
6. KP	<i>Klebsiella pneumoniae</i>					klinický izolát, lab.ID 64-2016					
7. SEMA	<i>Serratia marcescens</i>					klinický izolát, lab.ID 62-2016					
8. PA	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>					ATCC 27853, CCM 3955, lab.ID 163-2016					
<b>Výsledky</b>											
+		TESTOVANÁ LÁTKA (kód) –MIC (µmol.l <sup>-1</sup> )									
KMEN											
(kód)		E-0a	E-1a	E-2a	E-3a	E-4a	E-10a	E-0b	E-1b	E-2b	E-3b
SA	24h	>500	>500	>500	>500	>250	>250	>500	>500	>125	>125
	48h	>500	>500	>500	>500	>250	>250	>500	>500	>125	>125
MRSA	24h	>500	>500	>500	>500	>250	>250	>500	>500	>125	>125
	48h	>500	>500	>500	>500	>250	>250	>500	>500	>125	>125
SE	24h	>500	>500	>500	>500	>250	>250	>500	>500	>125	>125
	48h	>500	>500	>500	>500	>250	>250	>500	>500	>125	>125
EF	24h	>500	>500	>500	>500	>250	>250	>500	>500	>125	>125
	48h	>500	>500	>500	>500	>250	>250	>500	>500	>125	>125
EC	24h	>500	>500	>500	>500	>250	>250	>500	>500	>125	>125
	48h	>500	>500	>500	>500	>250	>250	>500	>500	>125	>125
KP	24h	>500	>500	>500	>500	>250	>250	>500	>500	>125	>125
	48h	>500	>500	>500	>500	>250	>250	>500	>500	>125	>125
SEMA	24h	>500	>500	>500	>500	>250	>250	>500	>500	>125	>125
	48h	>500	>500	>500	>500	>250	>250	>500	>500	>125	>125
PA	24h	>500	>500	>500	>500	>250	>250	>500	>500	>125	>125
	48h	>500	>500	>500	>500	>250	>250	>500	>500	>125	>125

PROTOKOL č. 017-178d-bakt.

Dne: 28.7. 2017

PROTOKOL - MIKRODILUČNÍ BUJŇONOVÝ TEST

<b>Připrava testovacího média a ředění testované látky</b>						
<b>LÁTKA</b>		<b>ROZPOUŠTĚNÍ</b>		<b>FINÁLNÍ ROZTOK (ředění)</b>		
č.	kód	X = navážka + DMSO (mg)	vysl (μl)	X (μl)+Y (médium, ml)	vysl	Max koncent. látky μmol.L <sup>-1</sup> / DMSO (%)
1	E-0a	8,3 + 921,4	+	20 + 1,98	+	500
2	E-1a	11,7 + 990,4	+	20 + 1,98	+	500
3	E-2a	11,1 + 939,6	+	20 + 1,98	+	500
4	E-3a	10,3 + 871,8	+	20 + 1,98	+	500
5	E-4a	9,6 + 863,9 + 863,9	- + UZ	20 + 1,98	+	250
6	E-10a	10,4 + 935,6 + 935,6	- + UZ	20 + 1,98	+	250
7	E-0b	10,0 + 899,9	+	20 + 1,98	+	500
8	E-1b	12,7 + 912,5	+	20 + 1,98	ZKL	500
9	E-2b	14,9 + 1070,6 + 1070,6	- +	20 + 1,98 + 1,98	SR SR	125
10	E-3b	12,7 + 912,5 + 912,5	- +	20 + 1,98 + 1,98	SR SR	125

X – počet μL naředěné látky v DMSO tak, aby konečná koncentrace DMSO byla ≤ 2.5%

Y – počet mL (testovací médium - MHBujon)

+ – látka je rozpustná v DMSO/ v MHB nebo tvoří homogenní suspenzi (před naředěním)

- látka je nerozpustná v DMSO nebo nevratně vysráží v MHB

UZ – rozpuštěno za pomoci ultrazvuku

SR – přítomny drobné sraženiny

ZKL – zákal



**Příloha 2 – Protokol č. 017-179d-bakt.**

* PROTOKOL - MIKRODILUČNÍ BUJONOVÝ TEST											
<b>Č. 017-179d-bakt.</b>						Zadavatel: prof. Doležal M., Dr.Kučerová M.					
Vykonal: Dr.Konečná K., Dr.Jand'ourek O., Dufková I., Bc. Davidová L.						Dne : 31.7. – 10.8. 2017					
<b>Testované látky</b>											
<b>Generický název (skupinový):</b>											
<b>Číslo, kód (sumární vzorec / substituent) m.h.</b>						<b>m.h.</b>					
1. E-4b	264,33	6. Cl-3	213,67								
2. E-10b	264,33	7. Cl-10	199,64								
3. Cl-0	157,56	8. Cl-13	227,69								
4. Cl-1	213,67	9. MOR-T	208,22								
5. Cl-2	213,67	10.Ac-0a	254,29								
<b>Metoda- mikrodiluční bujónová</b> v destičkách – (200µl media + 10µl suspenze inokula)											
Médium: Mueller Hintonův bujon č.2 (CAMHB) pH 7,0 Inokulum: 0.5 McFarlandovy stup.											
Délka inkubace: 24 - 48h Teplota: 35°± 2° C											
Způsob inkubace: statický, ve tmě, humidní atmosféra											
Odečítání: vizuální MIC Indikátor: AlamarBlue (použití dle dohody)											
<b>Testované kmeny (kód, číslo)</b>											
1. SA	<i>Staphylococcus aureus</i> spp.aureus					ATCC 29213, CCM 4223, lab.ID 142-2016					
2. MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> spp.aureus					ATCC 43300, CCM 4750, lab.ID 143-2016					
3. SE	<i>Staphylococcus epidermidis</i>					klinický izolát, lab.ID 112-2016					
4. EF	<i>Enterococcus faecalis</i>					ATCC 29212, CCM 4224, lab.ID 164-2016					
5. EC	<i>Escherichia coli</i>					ATCC 25922, CCM 3954, lab.ID 162-2016					
6. KP	<i>Klebsiella pneumoniae</i>					klinický izolát, lab.ID 64-2016					
7. SEMA	<i>Serratia marcescens</i>					klinický izolát, lab.ID 62-2016					
8. PA	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>					ATCC 27853, CCM 3955, lab.ID 163-2016					
<b>Výsledky</b>											
KMEN (kód)		TESTOVANÁ LÁTKA (kód) –MIC (µmol.l <sup>-1</sup> )									
		E-4b	E-10b	Cl-0	Cl-1	Cl-2	Cl-3	Cl-10	Cl-13	MOR-T	Ac-0a
SA	24h	>125	>125	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	<b>250</b>
	48h	>125	>125	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	<b>500</b>
MRSA	24h	>125	>125	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	<b>500</b>
	48h	>125	>125	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	<b>500</b>
SE	24h	>125	>125	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	<b>500</b>
	48h	>125	>125	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
EF	24h	>125	>125	>500	<b>250</b>	<b>500</b>	<b>500</b>	<b>500</b>	>500	>500	<b>500</b>
	48h	>125	>125	>500	<b>250</b>	<b>500</b>	<b>500</b>	<b>500</b>	>500	>500	>500
EC	24h	>125	>125	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
	48h	>125	>125	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
KP	24h	>125	>125	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
	48h	>125	>125	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
SEMA	24h	>125	>125	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
	48h	>125	>125	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
PA	24h	>125	>125	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
	48h	>125	>125	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500

PROTOKOL č. 017-179d-bakt.

Dne: 10.8. 2017

PROTOKOL - MIKRODILUČNÍ BUJŇONOVÝ TEST

<b>Připrava testovacího média a ředění testované látky</b>						
<b>LÁTKA</b>		<b>ROZPOUŠTĚNÍ</b>		<b>FINÁLNÍ ROZTOK (ředění)</b>		
č.	kód	X = navážka + DMSO (mg)	vysl	X (μl)+Y (médium, ml)	vysl	Max koncent. látky μmol.L <sup>-1</sup> / DMSO (%)
1	E-4b	12,4 + 938,2	+	20 + 1,98	SR	
				+ 1,98	SR	
				+ 1,98	+	125
2	E-10b	11,8 + 892,8	-			
		+ 892,8	+	20 + 1,98	SR	250
				+ 1,98	+	125
3	Cl-0	9,0 + 1142,4	+	20 + 1,98	+	500
4	Cl-1	8,8 + 823,7	+	20 + 1,98	+	500
5	Cl-2	10,1 + 945,4	+	20 + 1,98	+	500
6	Cl-3	10,0 + 936,0	+	20 + 1,98	+	500
7	Cl-10	8,9 + 891,6	+	20 + 1,98	+	500
8	Cl-13	9,6 + 843,3	+	20 + 1,98	ZKL	500
9	MOR-T	9,0 + 864,5	+	20 + 1,98	+	500
10	AC-0a	16,8 + 1321,3	+	20 + 1,98	ZKL	500

X – počet μL naředěné látky v DMSO tak, aby konečná koncentrace DMSO byla ≤ 2.5%

Y – počet mL (testovací médium - MHBujon)

+ – látka je rozpustná v DMSO/ v MHB nebo tvoří homogenní suspenzi (před naředěním)

- látka je nerozpustná v DMSO nebo nevratně vysráží v MHB

UZ – rozpuštěno za pomoci ultrazvuku

SR – přítomny drobné sraženiny

ZKL – zákal



**Příloha 3 – Protokol č. 017-180d-bakt.**

PROTOKOL - MIKRODILUČNÍ BUJONOVÝ TEST				
Č. 017-180d-bakt.			Zadavatel: prof. Doležal M., Dr.Kučerová M.	
Vykonal: Dr.Konečná K., Dr.Jand'ourek O., Dufková I., Bc. Davidová L.			Dne : 31.7. – 10.8. 2017	
<b>Testované látky</b>				
Generický název (skupinový):				
Číslo, kód (sumární vzorec / substituent) m.h.			m.h.	
1.OXDI-0b3	226,24	6.		
2.OX-0c	176,18	7.		
3.OXDI-T2	238,25	8.		
4.		9.		
5.		10.		
<b>Metoda</b> - mikrodiluční bujónová v destičkách – (200µl media + 10µl suspenze inokula)				
Médium: Mueller Hintonův bujon č.2 (CAMHB) pH 7,0 Inokulum: 0.5 McFarlandovy stup.				
Délka inkubace: 24 - 48h Teplota: 35°± 2° C				
Způsob inkubace: statický, ve tmě, humidní atmosféra				
Odečítání: vizuální MIC Indikátor: AlamarBlue (použití dle dohody)				
<b>Testované kmeny</b> (kód, číslo)				
1. SA	<i>Staphylococcus aureus</i> spp. <i>aureus</i>		ATCC 29213, CCM 4223, lab.ID 142-2016	
2. MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> spp. <i>aureus</i>		ATCC 43300, CCM 4750, lab.ID 143-2016	
3. SE	<i>Staphylococcus epidermidis</i>		klinický izolát, lab.ID 112-2016	
4. EF	<i>Enterococcus faecalis</i>		ATCC 29212, CCM 4224, lab.ID 164-2016	
5. EC	<i>Escherichia coli</i>		ATCC 25922, CCM 3954, lab.ID 162-2016	
6. KP	<i>Klebsiella pneumoniae</i>		klinický izolát, lab.ID 64-2016	
7. SEMA	<i>Serratia marcescens</i>		klinický izolát, lab.ID 62-2016	
8. PA	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		ATCC 27853, CCM 3955, lab.ID 163-2016	
<b>Výsledky</b>				
KMEN (kód)	TESTOVANÁ LÁTKA (kód) –MIC (µmol.l <sup>-1</sup> )			
	OXDI-0b3	OX-0c	OXDI-T2	
SA	24h	>500	>500	>500
	48h	>500	>500	>500
MRSA	24h	>500	>500	>500
	48h	>500	>500	>500
SE	24h	>500	>500	>500
	48h	>500	>500	>500
EF	24h	>500	>500	>500
	48h	>500	>500	>500
EC	24h	>500	>500	>500
	48h	>500	>500	>500
KP	24h	>500	>500	>500
	48h	>500	>500	>500
SEMA	24h	>500	>500	>500
	48h	>500	>500	>500
PA	24h	>500	>500	>500
	48h	>500	>500	>500

PROTOKOL č. 017-180d-bakt.

Dne: 10.8. 2017

PROTOKOL - MIKRODILUČNÍ BUJONOVÝ TEST

<b>Příprava testovacího média a ředění testované látky</b>						
<b>LÁTKA</b>		<b>ROZPOUŠTĚNÍ</b>		<b>FINÁLNÍ ROZTOK (ředění)</b>		
č.	kód	X = navážka + DMSO (mg)	vysl (μl)	X (μl)+Y (médium, ml)	vysl	Max koncent. látky μmol.L <sup>-1</sup> / DMSO (%)
1	OXDI-0b3	9,4 + 831,0	+	20 + 1,98	+	500
2	OX-0c	11,6 + 1316,8	+	20 + 1,98	+	500
3	OXDI-T2	9,7 + 814,3	+	20 + 1,98	ZKL	500
4						
5						
6						
7						
8						
9						
10						

X – počet μL naředěné látky v DMSO tak, aby konečná koncentrace DMSO byla ≤ 2.5%

Y – počet mL (testovací médium - MHBujon)

+ – látka je rozpustná v DMSO/ v MHB nebo tvoří homogenní suspenzi (před naředěním)

- látka je nerozpustná v DMSO nebo nevratně vysráží v MHB

UZ – rozpuštěno za pomoci ultrazvuku

SR – přítomny drobné sraženiny

ZKL – zákal



**Příloha 4 – Protokol č. 017-181d-bakt.**

+ PROTOKOL - MIKRODILUČNÍ BUJONOVÝ TEST <span style="float: right;">1</span>											
<b>č. 017-181d-bakt.</b>						Zadavatel: prof. Doležal M., Dr. Bouz G.					
Vykonal: Dr.Konečná K., Dr.Jandřourek O., Dufková I., Bc. Davidová L.						Dne : 7.8. – 21.8. 2017					
<b>Testované látky</b>											
Generický název (skupinový):											
Číslo, kód (sumární vzorec / substituent) m.h.						m.h.					
1.F.B.S.A	139,11	6. P.N.1	152,16								
2.F.B.S.E	181,20	7. P.N.2	222,29								
3.F.B.2	300,32	8. P.N.3	208,27								
4. F.B.2.H	258,24	9. P.N.4	278,40								
5. F.B.5	334,76	10.P.N.6	250,35								
<b>Metoda</b> - mikrodiluční bujónová v destičkách – (200µl media + 10µl suspenze inokula)											
Médium: Mueller Hintonův bujon č.2 (CAMHB) pH 7,0 Inokulum: 0.5 McFarlandovy stup.											
Délka inkubace: 24 - 48h Teplota: 35°± 2° C											
Způsob inkubace: statický, ve tmě, humidní atmosféra											
Odečítání: vizuální MIC						Indikátor: AlamarBlue (použití dle dohody)					
<b>Testované kmeny</b> (kód, číslo)											
1. SA	<i>Staphylococcus aureus</i> spp.aureus					ATCC 29213, CCM 4223, lab.ID 142-2016					
2. MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> spp.aureus					ATCC 43300, CCM 4750, lab.ID 143-2016					
3. SE	<i>Staphylococcus epidermidis</i>					klinický izolát, lab.ID 112-2016					
4. EF	<i>Enterococcus faecalis</i>					ATCC 29212, CCM 4224, lab.ID 164-2016					
5. EC	<i>Escherichia coli</i>					ATCC 25922, CCM 3954, lab.ID 162-2016					
6. KP	<i>Klebsiella pneumoniae</i>					klinický izolát, lab.ID 64-2016					
7. SEMA	<i>Serratia marcescens</i>					klinický izolát, lab.ID 62-2016					
8. PA	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>					ATCC 27853, CCM 3955, lab.ID 163-2016					
<b>Výsledky</b>											
KMEN (kód)		TESTOVANÁ LÁTKA (kód) –MIC (µmol.l <sup>-1</sup> )									
		F.B.S.A	F.B.S.E	F.B.2	F.B.2.H	F.B.5	P.N.1	P.N.2	P.N.3	P.N.4	P.N.6
SA	24h	>500	>500	>125	>500	>125	>500	>500	>500	>250	>500
	48h	>500	>500	>125	>500	>125	>500	>500	>500	>250	>500
MRSA	24h	>500	>500	>125	>500	>125	>500	>500	>500	>250	>500
	48h	>500	>500	>125	>500	>125	>500	>500	>500	>250	>500
SE	24h	>500	>500	>125	>500	>125	>500	>500	>500	>250	>500
	48h	>500	>500	>125	>500	>125	>500	>500	>500	>250	>500
EF	24h	>500	>500	>125	>500	>125	>500	>500	>500	>250	>500
	48h	>500	>500	>125	>500	>125	>500	>500	>500	>250	>500
EC	24h	>500	>500	>125	>500	>125	>500	>500	>500	>250	>500
	48h	>500	>500	>125	>500	>125	>500	>500	>500	>250	>500
KP	24h	>500	>500	>125	>500	>125	>500	>500	>500	>250	>500
	48h	>500	>500	>125	>500	>125	>500	>500	>500	>250	>500
SEMA	24h	>500	>500	>125	>500	>125	>500	>500	>500	>250	>500
	48h	>500	>500	>125	>500	>125	>500	>500	>500	>250	>500
PA	24h	>500	>500	>125	>500	>125	>500	>500	>500	>250	>500
	48h	>500	>500	>125	>500	>125	>500	>500	>500	>250	>500

PROTOKOL č. 017-181d-bakt.

Dne: 21.8. 2017



PROTOKOL - MIKRODILUČNÍ BUJONOVÝ TEST

<b>Příprava testovacího média a ředění testované látky</b>						
<b>LÁTKA</b>		<b>ROZPOUŠTĚNÍ</b>		<b>FINÁLNÍ ROZTOK (ředění)</b>		
č.	kód	X = navážka + DMSO (mg)	vysl	X (μl)+Y (médium, ml)	vysl	Max koncent. látky μmol.L <sup>-1</sup> / DMSO (%)
1	F.B.S.A	8,4 + 1207,7	+	20 + 1,98	+	500
2	F.B.S.E	13,2 + 1457,0	+	20 + 1,98	+	500
3	F.B.2	12,4 + 825,8	+	20 + 1,98	SR	
				+ 1,98	SR	
				+ 1,98	ZKL	125
4	F.B.2.H	11,1 + 859,7	+	20 + 1,98	+	500
5	F.B.5	15,4 + 920,1	-			
		+ 920,1	+UZ	20 + 1,98	SR	
				+ 1,98	+	125
6	P.N.1	7,3 + 959,5	+UZ	20 + 1,98	+	500
7	P.N.2	9,6 + 863,7	+UZ	20 + 1,98	+	500
8	P.N.3	8,7 + 835,5	+	20 + 1,98	+	500
9	P.N.4	12,7 + 912,4	-			
		+ 912,4	+UZ	20 + 1,98	ZKL	250
10	P.N.6	11,2 + 894,7	+	20 + 1,98	ZKL	500

X – počet μL naředěné látky v DMSO tak, aby konečná koncentrace DMSO byla ≤ 2.5%

Y – počet mL (testovací médium - MHBujon)

+ – látka je rozpustná v DMSO/ v MHB nebo tvoří homogenní suspenzi (před naředěním)

- látka je nerozpustná v DMSO nebo nevratně vysráží v MHB

UZ – rozpuštěno za pomoci ultrazvuku

SR – přítomny drobné sraženiny

ZKL – zákal

PROTOKOL č. 017-181d-bakt

Dneš: 21.8. 2017

**Příloha 5 – Protokol č. 017-182d-bakt.**

PROTOKOL - MIKRODILUČNÍ BUJONOVÝ TEST										
Č. 017-182d-bakt.					Zadavatel: prof. Doležal M., Dr. Bouz G.					
Vykonal: Dr.Konečná K., Dr.Jand'ourek O., Dufková I., Bc. Davidová L.					Dne : 7.8. – 21.8. 2017					
<b>Testované látky</b>										
Generický název (skupinový):										
Číslo, kód (sumární vzorec / substituent) m.h.					m.h.					
1. P.N.7	180,21	6. M.J.4	228,26							
2. P.N.8	194,24	7. M.J.6	244,25							
3.M.J.1	214,23	8. M.J.7	262,70							
4. M.J.2	248,67	9. M.J.8	242,28							
5. M.J.3	248,67	10.								
<b>Metoda - mikrodiluční bujónová</b> v destičkách – (200µl media + 10µl suspenze inokula)										
Médium: Mueller Hintonův bujon č.2 (CAMHB) pH 7,0 Inokulum: 0.5 McFarlandovy stup.										
Délka inkubace: 24 - 48h Teplota: 35°± 2° C										
Způsob inkubace: statický, ve tmě, humidní atmosféra										
Odečítání: vizuální MIC Indikátor: AlamarBlue (použití dle dohody)										
<b>Testované kmeny</b> (kód, číslo)										
1. SA	<i>Staphylococcus aureus</i> spp.aureus				ATCC 29213, CCM 4223, lab.ID 142-2016					
2. MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> spp.aureus				ATCC 43300, CCM 4750, lab.ID 143-2016					
3. SE	<i>Staphylococcus epidermidis</i>				klinický izolát, lab.ID 112-2016					
4. EF	<i>Enterococcus faecalis</i>				ATCC 29212, CCM 4224, lab.ID 164-2016					
5. EC	<i>Escherichia coli</i>				ATCC 25922, CCM 3954, lab.ID 162-2016					
6. KP	<i>Klebsiella pneumoniae</i>				klinický izolát, lab.ID 64-2016					
7. SEMA	<i>Serratia marcescens</i>				klinický izolát, lab.ID 62-2016					
8. PA	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>				ATCC 27853, CCM 3955, lab.ID 163-2016					
<b>Výsledky</b>										
KMEN (kód)		TESTOVANÁ LÁTKA (kód) –MIC (µmol.l <sup>-1</sup> )								
		P.N.7	P.N.8	M.J.1	M.J.2	M.J.3	M.J.4	M.J.6	M.J.7	M.J.8
SA	24h	>500	>500	>500	>500	>125	>500	>500	>500	500
	48h	>500	>500	>500	>500	>125	>500	>500	>500	500
MRSA	24h	>500	>500	>500	>500	>125	>500	>500	>500	500
	48h	>500	>500	>500	>500	>125	>500	>500	>500	500
SE	24h	>500	>500	>500	>500	>125	>500	>500	>500	>500
	48h	>500	>500	>500	>500	>125	>500	>500	>500	>500
EF	24h	>500	>500	>500	>500	>125	>500	>500	>500	>500
	48h	>500	>500	>500	>500	>125	>500	>500	>500	>500
EC	24h	>500	>500	>500	>500	>125	>500	>500	>500	>500
	48h	>500	>500	>500	>500	>125	>500	>500	>500	>500
KP	24h	>500	>500	>500	>500	>125	>500	>500	>500	>500
	48h	>500	>500	>500	>500	>125	>500	>500	>500	>500
SEMA	24h	>500	>500	>500	>500	>125	>500	>500	>500	>500
	48h	>500	>500	>500	>500	>125	>500	>500	>500	>500
PA	24h	>500	>500	>500	>500	>125	>500	>500	>500	>500
	48h	>500	>500	>500	>500	>125	>500	>500	>500	>500

PROTOKOL č. 017-182d-bakt. Dne: 21.8. 2017



PROTOKOL - MIKRODILUČNÍ BUJONOVÝ TEST

<b>Příprava testovacího média a ředění testované látky</b>						
<b>LÁTKA</b>		<b>ROZPOUŠTĚNÍ</b>		<b>FINÁLNÍ ROZTOK (ředění)</b>		
č.	kód	X = navážka + DMSO (mg)	vysl (μl)	X (μl)+Y (médium, ml)	vysl	Max koncent. látky μmol.L <sup>-1</sup> / DMSO (%)
<b>1</b>	<b>P.N.7</b>	7,4 + 821,3	+	20 + 1,98	+	500
<b>2</b>	<b>P.N.8</b>	8,0 + 823,7	+	20 + 1,98	+	500
<b>3</b>	<b>MJ.1</b>	9,0 + 840,2	+	20 + 1,98	ZKL	500
<b>4</b>	<b>MJ.2</b>	12,2 + 981,2	+	20 + 1,98	ZKL	500
<b>5</b>	<b>MJ.3</b>	11,8 + 949,0	+UZ	20 + 1,98 + 1,98 + 1,98	SR SR +	125
<b>6</b>	<b>MJ.4</b>	9,6 + 841,1	+UZ	20 + 1,98	+	500
<b>7</b>	<b>MJ.6</b>	9,9 + 810,6	+UZ	20 + 1,98	ZKL	500
<b>8</b>	<b>MJ.7</b>	11,2 + 852,7	+	20 + 1,98	+	500
<b>9</b>	<b>MJ.8</b>	11,5 + 949,3	+	20 + 1,98	ZKL	500
<b>10</b>						

**X** – počet **μL** naředěné látky v DMSO tak, aby konečná koncentrace DMSO byla ≤ 2.5%

**Y** – počet **mL** (testovací médium - MHBujon)

**+** – látka je rozpustná v DMSO/ v MHB nebo tvoří homogenní suspenzi (před naředěním)

- látka je nerozpustná v DMSO nebo nevratně vysráží v MHB

**UZ** – rozpuštěno za pomoci ultrazvuku

**SR** – přítomny drobné sraženiny

**ZKL** – zákal ,