TECHNICKÁ UNIVERZITA V LIBERCI
Fakulta zdravotnických studií

Studium biofilmové rezistence na vybrané spektrum antibiotik

Bakalářská práce

Studijní program: B3944 – Biomedicínská technika
Studijní obor: 3901R032 – Biomedicínská technika

Autor práce: **Petra Šubrtová**
Vedoucí práce: doc. Mgr. Irena Lovětinská-Šlamborová, Ph.D.

Liberec 2017

TECHNICAL UNIVERSITY OF LIBEREC
Faculty of Health Studies

Study of Biofilm Resistance on Chosen Antibiotic Spectra

Bachelor thesis

Study programme: B3944 – Biomedical Technology
Study branch: 3901R032 – Biomedical Technology

Author: **Petra Šubrtová**
Supervisor: doc. Mgr. Irena Lovětinská-Šlamborová, Ph.D.

Liberec 2017

Technická univerzita v Liberci
Fakulta zdravotnických studií
Akademický rok: **2015/2016**

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení:	**Petra Šubrtová**
Osobní číslo:	**D15000154**
Studijní program:	**B3944 Biomedicínská technika**
Studijní obor:	**Biomedicínská technika**
Název tématu:	**Studium biofilmové rezistence na vybrané spektrum antibiotik**
Zadávající katedra:	**Fakulta zdravotnických studií**

Zásady pro vypracování:

Cíle práce:
Vypracování rešerše na dané téma: biofilmová rezistence na antibiotika. Výběr biofilm pozitivních bakteriálních kmenů a jejich kultivace. Výběr vhodného spektra antibiotik vzhledem k testovaným bakteriálním kmenům, zjištění MIC (minimální inhibiční koncentrace testovaného antibiotika) a MBEC (nejnižší koncentrace antibiotika, kde je ještě prokázána eradikace biofilmu). Testy budou prováděny modifikovanou Christensenovou zkumavkovou metodou.
Teoretická východiska (včetně výstupu z BP):
V laboratoři budou kultivovány a testovány vybrané biofilm-pozitivní mikrooragnismy. K jejich kultivačnímu médiu (BHI) budou přidávána vybraná antibiotika v různém ředění a bude zjišťována MIC a MBEC. Výběr testovaných mikroorganismů a antibiotik bude prováděn dle modelu reálných situací (konzultace v KNL - oddělení Klinická mikrobiologie a virologie). V rámci studia bude sledována růstová rychlost mikroorganismů, která dle literárních zdrojů v biofilmu ovlivňuje jeho citlivost na antibiotika.
Výzkumné otázky:
Hlavní výzkumnou otázkou práce: jaká je MIC a MBEC u konkrétních mikroorganismů a testovaných antibiotik. Jaký vliv má citlivost testovaných antibiotik na růstovou rychlost mikroorganismů. Dalším výstupem je přehled vhodných antibiotik na biofilm-pozitivní bakteriální kmeny.
Metoda:
Kvantitativní
Technika práce, vyhodnocení dat:
Jedná se o práci experimentální (laboratorní).
Práce v mikrobiologické laboratoři - vlastní testování, optimalizace metody, studium a testování MIC a MBEC.
Získané výsledky (data) budou zpracována pomocí grafických softwarů a výpočetních metod. Vizualizace bude prováděna pomocí optického mikroskopu. Dle dosažených výsledků bude provedeno vyhodnocení jednotlivých zadaných úkolů a výzkumných otázek.
Místo a čas realizace výzkumu:
Práce bude probíhat v laboratořích Ústavu zdravotnických studií TUL v měsících květen až listopad.
Vzorek:
Hodnoceným vzorkem budou vybrané bakteriální kmeny G+ a G- bakterií, dále spektrum antibiotik.

Rozsah grafických prací:

Rozsah pracovní zprávy: **50 - 70**

Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná/elektronická**

Seznam odborné literatury: **viz příloha**

Vedoucí bakalářské práce: **doc. Mgr. Irena Lovětinská-Šlamborová, Ph.D.**
Katedra chemie

Datum zadání bakalářské práce: **1. srpna 2016**

Termín odevzdání bakalářské práce: **30. dubna 2017**

Technická univerzita v Liberci Fakulta zdravotnických studií 16

L.S.

Mgr. Marie Frošková
pověřena vedením fakulty

V Liberci dne 30. listopadu 2016

Příloha zadání bakalářské práce

Seznam odborné literatury:

1. RULÍK, M. Mikrobiální biofilmy. Univerzita Palackého v Olomouci, 2011. ISBN 978-80-244-2747-8.
2. RŮŽIČKA, F., V. HOLÁ a M. VOTAVA. Možnosti průkazu tvorby biofilmu v rutinní mikrobiologické praxi. Epidemiologie, mikrobiologie, imunologie. 2006, 1(55), 2329. ISSN 1210-7913.
3. DJORDJEVIC, D., M. WIEDMANN a L. A. MCLANDSBOROUGH. Microtiter Plate Assay for Assessment of Listeria monocytogenes Biofilm Formation. Applied and Environmental Microbiology. 2002, 68(6), 2950 - 2958. ISSN 0099-2240.
4. SCHINDLER, J. Mikrobiologie: pro studenty zdravotnických oborů. Praha: Grada, 2010. ISBN 978-80-247-3170-4.
5. SCHINDLER, J. Mikrobiologie: pro studenty zdravotnických oborů. 2., dopl. a přeprac. vyd. Praha: Grada, 2014.
ISBN 978-80-247-4771-2.
6. BROWN, M. R. W., D. G. ALLISON a P. GILBERT. Resistance of bacterial biofilms to antibiotics a growth-rate related effect? Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 1988, 22(6), 777 - 780. ISSN 0305-7453.
7. MAH, T. C a G. A O'TOOLE. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents.Trends in Microbiology. 2001, 9(1), 3439. ISSN 0966-842X.
8. STEWART, P. S. Mechanisms of antibiotic resistance in bacterial biofilms. International Journal of Medical Microbiology. 2002, 292(2), 107 - 113. ISSN 1438-4221.
9. STEWART, P. S. a J. W. COSTERTON. Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. The Lancet. 2001, 358(9276), 135 - 138.
ISSN 0140-6736.
10. DOBROVOLNÁ, L. Biochemické aspekty užívání antibiotik [online]. Brno, 2010 [cit. 2016-03-28]. Dostupné z:https://is.muni.cz/th/220879/pedf_b/Bakalarska_prace.pdf. Bakalářská práce. Vedoucí práce Mgr. Petr Ptáček, Ph.D.

Prohlášení

Byla jsem seznámena s tím, že na mou bakalářskou práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb., o právu autorském, zejména § 60 – školní dílo.

Beru na vědomí, že Technická univerzita v Liberci (TUL) nezasahuje do mých autorských práv užitím mé bakalářské práce pro vnitřní potřebu TUL.

Užiji-li bakalářskou práci nebo poskytnu-li licenci k jejímu využití, jsem si vědoma povinnosti informovat o této skutečnosti TUL; v tomto případě má TUL právo ode mne požadovat úhradu nákladů, které vynaložila na vytvoření díla, až do jejich skutečné výše.

Bakalářskou práci jsem vypracovala samostatně s použitím uvedené literatury a na základě konzultací s vedoucím mé bakalářské práce a konzultantem.

Současně čestně prohlašuji, že tištěná verze práce se shoduje s elektronickou verzí, vloženou do IS STAG.

Datum: 28. 4. 2017

Podpis:

Poděkování:

Na tomto místě bych ráda poděkovala vedoucí práce doc. Mgr. Ireně Lovětínské-Šlamborové, Ph.D. za její cenné rady, připomínky a čas, který mi věnovala při vytváření mé bakalářské práce. Dále bych chtěla poděkovat Mgr. Marii Froňkové za konzultace a rady při vytváření citací. A také bych chtěla poděkovat svému partnerovi a rodině, kteří mě po celou dobu studia podporovali.

Anotace v českém jazyce

Autor:	Petra Šubrtová
Instituce:	Technická univerzita v Liberci, Fakulta zdravotnických studií

Název práce:	Studium biofilmové rezistence na vybrané spektrum antibiotik
Vedoucí práce:	doc. Mgr. Irena Lovětínská-Šlamborová, Ph.D.
Počet stran:	63
Počet příloh:	5
Rok obhajoby:	2017
Klíčová slova:	biofilm, testování biofilmu, biofilmová rezistence, antibiotika, růstová křivka bakterií

Anotace: Obsahem této bakalářské práce je testování vlivu konkrétního antibiotika na vybrané bakteriální kmeny. Cílem bylo určit nejnižší možné koncentrace antibiotika, kde je stále možné prokázat eradikaci biofilmu. Dalším cílem práce bylo zjistit minimální inhibiční koncentraci testovaného antibiotika.

Anotace v anglickém jazyce

Annotation

Author:	Petra Šubrtová
Institution:	Technical university of Liberec, Faculty of Health Studies

Title:	Study of Biofilm Resistance on Chosen Antibiotic Spectra
Supervisor:	doc. Mgr. Irena Lovětínská-Šlamborová, Ph.D.
Pages:	63
Apendix:	5
Year:	2017
Keywords:	biofilm, biofilm testing, biofilm rezistence, antibiotics, growth curve of bacteria

Annotation: This bachelor thesis disserts upon testing of particular antibiotic influence on selected bacterial phyla. The main goal was to establish antibiotic's minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum biofilm eliminating concentration (MBEC) for selected bacterial biofilm.

Obsah

Seznam symbolů a zkratek 12
Úvod 13
1 Teoretická část 14
1.1 Biofilm 14
1.1.1 Rezistence 16
1.1.1 Možnosti testování biofilmu 16
1.2 Antibiotika 18
1.2.1 Účinek antibiotik 18
1.2.2 Rozdělení antibiotik podle způsobu inhibice 19
1.2.3 Vyšetření citlivosti 24
1.2.4 Augmentin 25
1.2.5 Tetracyklin 25
1.3 Bakterie 26
1.4 Testované bakterie 28
1.4.1 Escherichia coli 28
1.4.2 Staphylococcus aureus 28
1.4.3 MRSA 29
1.4.1 Pseudomonas aeruginosa 29
1.4.1 Proteus vulgaris 30
2 Výzkumná část 31
2.1 Cíle a výzkumné předpoklady 31
2.2 Metodika výzkumu 31
2.2.1 Modifikovaná Christensenova zkumavková metoda 31
2.2.2 Test planktonických buněk biofilmu 36
2.2.3 RTS-1C Personal Bioreactor 37
2.3 Analýza výzkumných dat 40
Závěr 55
Seznam použité literatury 57
Seznam tabulek 60
Seznam obrázků 61
Seznam grafů 62
Seznam příloh 63

Seznam symbolů a zkratek

BHI	Brain Heart Infusion Agar
CD	Compact Disc
CFU	jednotky tvořící kolonie (Colony Forming Units)
cm	centimetr
DNA	deoxyribonukleová kyselina
G+	grampozitivní
G-	gramnegativní
h	hodina
KV	kompaktní výsev
l	litr
M	molární hmotnost
MBEC	nejnižší koncentrace antibiotika, kde je ještě prokázána eradikace biofilmu
mg	miligram
MH	Müller Hinton
MIC	minimální inhibiční koncentrace
mm	milimetr
nm	nanometr
MRSA	Meticillin - rezistentní zlatý stafylokok
Obr.	obrázek
PBP	penicillin-binding protein
pdf	Portable Document Format
pH	síla vodíku (potential of hydrogen)
RNA	ribonukleová kyselina
rpm	otáčky za minutu (revolutions per minute)
Tab.	tabulka
tzv.	takzvaně
WHO	Světová zdravotnická organizace
°C	stupeň Celsia
μm	mikrometr

Úvod

Již od vzniku života na naší planetě byly bakterie vždy hlavními činiteli všech důležitých událostí. Důležitou roli hrají v každodenních procesech kolem nás, například při výrobě potravin nebo rozkladu různých materiálů. Dříve bakterie způsobovaly epidemie a ztráty životů mnoha lidí. Dnes již o bakteriích a jejich životě víme mnoho informací a snažíme se problémům, které bakterie způsobují, předejít. Tvorba nových bakteriálních rezistencí neustále stoupá. Vzhledem k vysokým nákladům na vývoj a výrobu antibiotik i k vysokým požadavkům kontrolních úřadů léčiv tak mohou zavádět nové preparáty pouze finančně nejsilnější společnosti.

Přirozenou formou života většiny bakterií je mikrobiální biofilm. Buňky žijící v biofilmu se od buněk žijících planktonicky odlišují především zvýšenou rezistencí vůči antimikrobiálním látkám, antibiotikům. V medicíně se mikrobiální biofilmy stávají velkým problémem především díky své schopnosti přilnout k povrchům implantovaných chirurgických náhrad nebo proto, díky infekcím, které komplikují léčbu pacienta. Přirozený vznik rezistencí mikrobiálních biofilmů můžeme označit za neustálý boj člověka s přírodou, kde člověk na jedné straně neustále vyvíjí lepší a účinnější antibiotika nebo aplikuje antimikrobiální látky a na straně druhé se na ně příroda adaptuje a tvoří si bariéry, díky kterým je imunní.

Je důležité, aby při mikrobiální léčbě byla antibiotika používána v co nejnižší koncentraci. Zbytečně velké dávky antibiotik pacientův organismus pouze zatíží, což může působit další zdravotní komplikace. Tato práce se zabývá testováním Augmentinu a Tetracyklinu na daných bakteriálních kmenech a zkoumáním jejich účinku při různých koncentracích. Tato antibiotika byla vybrána z toho důvodu, aby byly pokryty oba typy inhibice. Augmentin je bakteriostatické a Tetracyklin bakteriocidní antibiotikum. Velkým přínosem jsou získané unikátní výsledky z RST-1C Personal Bioreactor, což je nový přístroj s převratnou technologií inovativního principu mikrobiální kultivace, kdy můžeme okamžitě pozorovat, co se s testovanou bakteriální suspenzí děje. Tento přístroj nám umožní získat data, která ještě nebyla nikdy publikovaná. Pro ověření správnosti výsledků byly použité další postupy a metody, které potvrdily získané výsledky.

1 Teoretická část

1.1 Biofilm

Biofilm je vrstva tvořená jednotlivými buňkami trvale přichycenými k povrchu nebo k okolním buňkám, které spolu komunikují. Zpravidla bývá zachycený v extracelulární (mimobuněčné) hmotě, která je vylučovaná samotnou populací biofilmu. Jedná se o přisedlé struktury, kdy bakterie tvoří odolná společenství. Umožňuje buňkám lepší adaptaci na podmínky okolního prostředí, efektivnější využití živin a zvýšenou odolnost vůči vnějším vlivům. Též tedy napomáhá ke zvýšené rezistenci buněk v biofilmu na antibiotika.

Vznik biofilmu začíná adsorpcí organických molekul na pevný povrch následovaný přichycením mikrobiálních buněk k tomuto povrchu. Jakmile se bakterie zachytí k vyhovujícímu povrchu, začnou se rozmnožovat dělením. Následně se mohou shlukovat a vytvářet primární biofilm, na který se mohou přichytávat další buňky z okolí (sekundární biofilm). Rozšiřuje se pomocí koagregace, tedy vazby bakterií k bakteriím v biofilmu. Usazené buňky tvoří polymerní látky, především polysacharidy, které jsou jednou ze základních stavebních složek biofilmové vrstvy. Plně vyzrálý biofilm není homogenní, ale má heterogenní strukturu. Vytváří jej velké množství buněk rozptýlených v matrici s mezerami a kanálky naplněnými vodou a propojenými s okolním kapalným prostředím kvůli příjmu živin a odvádění metabolitů pryč. Bakterie v biofilmu žijí v mikrokoloniích, jako jsou shluky kuželovitého nebo houbovitého tvaru.

Ve chvíli, kdy zralý biofilm dosáhne určité buněčné hustoty, začnou se z něho oddělovat buď jednotlivé buňky, nebo jejich shluky i s částmi biofilmu. Buňky se tak dostávají zpět do okolního prostředí a mohou kolonizovat další, pro ně vyhovující, povrchy.

Buňky v biofilmu spolu metabolicky spolupracují a díky velice blízkému kontaktu si mohou vyměňovat genetickou informaci přenosem plazmidů a konjugací. Tímto způsobem se v biofilmu mohou rychle šířit plazmidy kódující rezistenci k antibiotikům.

Bakteriální biofilmy jsou velice rozšířeny a jejich přítomnost má vliv na spoustu průmyslových činností. Například v potravinářském průmyslu mohou ovlivňovat kvalitu a bezpečnost potravinářských výrobků. Dále pak mikroorganismy v biofilmu katalyzují chemické a biologické reakce a reakce způsobující korozi kovů v nádržích i potrubích. Naopak využít jich můžeme při čištění odpadních vod, kde je biofilm uchycen na povrchu filtru a čistí vodu, která jím protéká. Z lékařského hlediska je nejznámějším biofilmem pravděpodobně plak, který se neustále tvoří na zubní sklovině.

Pro člověka je biofilm velkou komplikací ve spojení s různými typy infekcí. Patogenní bakterie se mohou usadit například na sliznici nebo ve tkáni, kde mohou způsobit například srdeční zánět, kdy biofilm pokrývá chlopeň. Biofilmy se dále mohou tvořit na cizích tělesech v lidském těle (např. katetry, kloubní náhrady nebo kontaktní čočky). Tyto infekce mohou být často léčeny pouze odstraněním implantátu, čímž se zvyšuje jak trauma pro pacienta, tak i náklady na léčbu. Také se odhaduje, že biofilmy způsobují až 65% nozokomiálních infekcí.

Za nejzávažnější onemocnění způsobené biofilmem můžeme považovat infekci umělých implantátů zavedených do krevního řečiště. Jedná se tedy především o katetry, cévní protézy, kardiostimulační elektrody nebo umělé chlopně. Biofilm, který se vytvoří na katetrech, se často stává zdrojem dalších infekcí a může vést až k sepsi a selhání životně důležitých orgánů.

V dnešní době existuje velké množství studií, jak se biofilmu zbavit. Jeho odstraňování pomocí fyzikálních metod, jako jsou například ultrazvuk či mechanické čištění, je dostatečně účinné (60% - 70%), ale v praxi se dá jen obtížně kontrolovat. Chemické metody jsou často neúčinné, protože si na ně biofilm díky své vysoké adaptivitě během krátké doby vytvoří rezistenci. Pokud nedojde k včasnému odstranění biofilmu z implantátů, vzniká v těle pacienta infekce, která prodlužuje dobu léčení, zvyšuje náklady na léčbu a v některých případech je jejím jediným řešením odstranění implantátu z pacientova těla. Prozatím je nejúčinnějším způsobem odstranění biofilmu kombinace antibiotik a působení elektrického pole.

Tato kapitola byla zpracována na základě citací [1], [2], [3] a [4].

1.1.1 Rezistence

U některých bakterií se přirozeně vyvíjí rezistence k určitým antibiotikům. Tento fakt může být zapříčiněný několika faktory. Nejčastěji se setkáme s rezistencí způsobenou nepropustností zevní membrány buňky nebo produkcí inaktivujících enzymů. Rezistence může být způsobena i nedostatečnou citlivostí cílových struktur k antibiotiku. Je důležité znát tyto přirozené rezistence u daných bakteriálních druhů, aby se předešlo problémům spojeným s neúčinností antibiotika. Rezistence může vznikat také v důsledku nesprávného dávkování, nedodržování předepsané doby léčby či častého a nadměrné užívání. Světová zdravotnická organizace (WHO) klasifikuje problém s rezistencí na antibiotika jako jednu z největších hrozeb pro lidské zdraví.

Vývoj rezistencí můžeme označit za neustálý boj člověka s přírodou, kde člověk na jedné straně neustále vyvíjí lepší a účinnější antibiotika a na druhé straně se na ně příroda adaptuje a tvoří si bariéry, díky kterým je imunní. Moderní éra začala objevem penicilinu Alexandrem Flemingem v roce 1928 a jeho výrobou v průběhu druhé světové války. Podrobnější přehled vývoje antibiotik a následných rezistencí na ně můžete vidět na obrázku 16 v příloze A.

Tato kapitola byla zpracována na základě citací [5] a [6].

1.1.1 Možnosti testování biofilmu

Jak již bylo zmíněno výše, množství rezistentních bakterií se zvyšuje především díky tvorbě jejich biofilmu, ve kterém jsou mnohem odolnější než jako osamocené buňky. Proto je potřeba k jeho detekci používat standardizované metody. Metody dělíme na genetické a fenotypové. Genetické metody jsou založeny na průkazu genů kódujících enzymy tvořící biofilm nebo na studiu genové exprese za daných podmínek. Fenotypové metody se zakládají na kultivaci mikroorganismu a následném obarvení vzniklého biofilmu (Christensenova metoda), na posouzení vzhledu na půdách s kongo-červení, či na posuzování povrchových vlastností dané bakterie. Tyto metody jsou popsané níže.

Princip Christensenovy zkumavkové metody je založený na kultivaci testované bakterie ve zkumavce s tryptonosojovým bujonem nebo Brain Heart Infusion Agar (BHI) a následném obarvení vzniklého biofilmu. Kultivační médium je zpravidla

inokulováno mikrobiální suspenzí o hustotě 1 podle McFarlandovy zákalové stupnice tak, aby výsledná hodnota bakteriálních buněk v médiu byla 10^6 – 10^7 buněk/ml. Je dokázáno, že s rostoucí hustotou inokula roste i denzita biofilmu. To je pádný důvod pro to, aby se používalo standardizované inokulum. Inkubace probíhá obvykle při teplotě 37 °C v rozmezí 24 až 48 hodin. Po inkubaci jsou zkumavky vyprázdněny a promyty destilovanou vodou a fyziologickým roztokem kvůli vyplavení přichycených buněk. Následuje fixace a barvení krystalovou violetí, safraninem či karbolfuchsinem. Jako biofilm pozitivní se hodnotí kmeny, které mají dobře patrnou obarvenou vrstvu v části, kde byla zkumavka naplněna médiem. Jako biofilmnegativní se pak hodnotí kmeny, které nevykazují žádnou obarvenou vrstvu na stěnách zkumavky. Díky nenáročnosti k laboratornímu vybavení a jednoduchosti provedení je tato metoda řazena mezi nejčastěji využívané metody v klinické biologii.

Často se používá modifikace Christensenovy metody pro provedení v mikrotitračních destičkách nebo na podložních sklech. Postup je shodný s původní metodou s tím rozdílem, že vzorky se inkubují v mikrotitračních destičkách a následné vyhodnocení probíhá spektrofotometricky. Je využívána především v případech, kdy je nutné testovat velké množství vzorků najednou.

Při studiu biofilmů se také využívá mikroskopických metod: rastrovací i transmisní elektronová mikroskopie, konfokální rastrovací laserová mikroskopie, fluorescenční mikroskopie i běžná světelná mikroskopie. Pro všechny mikroskopické techniky je také nutné vzorek nejprve připravit například fixací, barvením, dehydratací, sušením nebo řezáním.

Další možností průkazu biofilmu je kultivace bakterií na agaru s kongočervení. Tento agar se připravuje z BHI, 5% sacharózy a kongočerveně. Nárůst kolonií a jejich vzhled se obvykle hodnotí po 24 a 48 hodinách. Pokud jsou narostlé kolonie na agaru černé a suché, jde o biofilm pozitivní kmen. Pokud jsou narostlé kolonie červené a hladké, pak se jedná o biofilm-negativní kmen. Ovšem vyhodnocování je zde velice subjektivní a často se stává, že testování biofilmu touto metodou je nevypovídající.

Tato kapitola byla zpracována na základě citací [7] a [8].

1.2 Antibiotika

Antibiotika jsou látky původně mikrobiálního původu, které jsou užívány pro léčbu infekčních onemocnění. Problémy s mikrobiálními infekcemi jsou popisovány již ve starověkém Egyptě, Řecku i Číně. Moderní éra antibiotik však začala objevem penicilinu v roce 1928 Alexandrem Flemingem. Od té doby byla antibiotika vylepšena moderní medicínou do velké dokonalosti a zachránila milióny životů. Postupem času byl setřen rozdíl mezi antibiotiky a chemoterapeutiky, která byla vytvořena podle vzoru antibiotik nebo podle způsobu jejich účinku. Dnes se tedy hovoří přesněji o antimikrobiálních látkách, které ovšem z větší části obsahují antibiotika.

V dnešní době je možné na trhu najít přibližně 150 druhů antibiotik. Vzhledem k požadavkům kontrolních úřadů léčiv a k příliš vysokým nákladům na výrobu i vývoj, mohou pouze finančně nejsilnější společnosti zavádět nové preparáty. K tomu, aby se mikrobiální látka dala využívat jako lék, musí splnit celou řadu požadavků. V první řadě nesmí v žádném ohledu poškozovat eukaryotní buňky. Dále je nutné, aby účinkovala již při nízkých koncentracích, řádově v mg/l. Dalším požadavkem je jejich přiměřeně rychlá reakce. A v neposlední řadě musí splňovat přísné farmakologické požadavky. Tvorba látek s antibiotickým účinkem byla v největší míře pozorována u půdních mikroorganismů.

Tato kapitola byla zpracována na základě citací [9],[10] a [11].

1.2.1 Účinek antibiotik

Pokud antibiotika pouze zabraňují růstu a množení bakterií, jsou označována jako bakteriostatická. Účinek bakteriocidní je charakterizován usmrcováním bakterií. Toto rozdělení však není zcela přesné, protože velké množství bakteriostatických antibiotik působí ve vyšších koncentracích také bakteriocidně. Jednou z nejpoužívanějších a nejstarších metod pro zjištění účinnosti antibiotik v praxi neboli v klinických laboratořích je tzv. disková difuze. Je vhodná k testování většiny bakteriálních patogenů, vyhovuje pro vyšetřování téměř všech antibiotik, a navíc nevyžaduje žádné zvláštní vybavení. Účinek antibiotik je sledován na agarové plotně. Disk s agarem nasyceným roztokem antibiotika o vhodné koncentraci se položí na plotnu, na které jsou hustě naočkovány bakterie. Antibiotikum se šíří ve směru svého poloměru do agarového

gelu. Na živné půdě vyrostou bakterie všude tam, kde není antibiotikum v inhibiční koncentraci. Tím se v určité vzdálenosti od okraje disku vytvoří inhibiční zóna. Její průměr závisí na hustotě bakteriálního inokula a difuzi antibiotika. Velikost průměru inhibiční zóny při použití standardního kmene se známou citlivostí slouží k určení koncentrace antibiotik v roztocích i tělesných tekutinách. [9], [12]

1.2.2 Rozdělení antibiotik podle způsobu inhibice

Antibiotika specifickým způsobem zasahují do syntézy makromolekul buňky. Ačkoli je antibiotik velké množství, existuje jen několik buněčných procesů, u kterých uplatňují svoji aktivitu:

- syntéza buněčné stěny
- syntéza bílkovin
- syntéza nukleových kyselin
- alterace selektivní permeability buněčné membrány
- inhibice metabolických drah.

Především díky omezenému počtu míst, kde může antibiotikum působit, snadno dochází k vytvoření rezistence u původně citlivých buněk. Vývoj nových účinných antibiotik je tímto faktem výrazně limitován.

Antibiotika, inhibující syntézu buněčné stěny, jsou baktericidního typu. Murein (peptidoglykan), který tvoří buněčnou stěnu, je v konečné fázi síťován a zpevňován enzymy PBP (penicillin-binding protein). PBP obsahují vazebné místo pro penicilin a další ß-laktamy, jejichž struktura je ve vazebném místě podobná dipeptidu mureinu. Po navázání dochází k acylaci PBP, čímž PBP ztrácí schopnost enzymaticky síťovat murein a buňka tak není schopná dělení a umírá. Růst buněčné stěny inhibují i glykopeptidy vážící se na prekursor mureinu a zabraňují tak dalšímu síťování. Použití glykopeptidů je účinné jen u grampozitivních bakterií.

Ribozom je buněčná organela odpovědná za syntézu bílkovin, která může být narušena několika způsoby. Jedním je vazba antibiotika na tzv. 30S podjednotku ribozomu. Tím se zabrání v přístupu aminokyselinám, ze kterých by se vytvářela bílkovina, což je případ tetracyklinů. Druhým způsobem je inhibice iniciačního komplexu na 30S podjednotce pomocí aminoglykosidů. Výsledkem je předčasné

ukončení translace, a tedy nedokončená bílkovina. Vznik peptidů lze také narušit při transpeptidaci na 50S podjednotce ribozomu. Bakteriostatickým účinkem je zde zabránění vzniku peptidové vazby během elongace peptidu. Na 50S podjednotku lze působit i kompeticí vazebného místa.

Antibiotika mohou dále inhibovat syntézu nukleových kyselin, DNA a RNA. Během syntézy DNA, tzv. replikaci DNA, dochází k inhibici například navázáním chinolinů na gyrázu, enzymu odpovědného za rozplétání řetězců DNA, čímž dojde k jeho zablokování.

Dalším mechanismem působení antibiotik je poškození buněčné membrány. K tomu může docházet například snížením povrchového napětí fosfolipidů a tím poškození cytoplazmatické membrány. Membrány některých organismů obsahují steroly, které v kombinaci s antibiotiky vytváří detergentní komplex a také rozpouští cytoplazmatickou membránu. Některé látky dokáží inhibovat enzymy potřebné k syntéze membrán.

Metabolismus buňky inhibují zejména sulfonamidy kompetitivní inhibicí přeměny kyseliny p-aminobenzoové na dihydrolistovou. Sulfonamidy vykazují v kombinaci s trimetroprimem a pyrimetaminem synergický efekt, tyto dvě látky také kompetitivně inhibují metabolické děje týkající se derivátů kyseliny listové. V obou případech se jedná o bakteriostatické působení.

Velice rozdílná je i chemická stavba antibiotik. Jejich molekuly jsou tvořeny aminokyselinami a obvykle také D-enantiomery nekódovaných aminokyselin či cukry a jejich deriváty. Mohou obsahovat steroidní skelet nebo být odvozená od purinových a pyrimidinových nukleosidů. Pomocí chemické struktury dělíme antibiotika na několik skupin:

- β-laktamy
- aminoglykosidy
- tetracykliny
- makrolidy
- linkosamidy
- glykopeptidy
- chinolony

- antimykotika
- sulfonamidy.

Toto rozdělení antibiotik i s konkrétními zástupci naleznete v tabulce 1 a tabulce 2.

Tato kapitola byla zpracována na základě citace [9].

Tab. 1 - Rozdělení antibiotik 1 Převzato a upraveno autorkou z [9]

Skupina	Zařazení podskupin		Názvy zástupců		
β-laktamy	Peniciliny	*Přirozené peniciliny*	penicilin G	penicilin V	
		Peniciliny rezistentní k β-laktamázám	oxalicin dicloxacilin	nafcilin fluoxacilin	cloxacilin
		Aminopeniciliny	ampicilin amoxicilin	amoxicilin/klavulanát ampicilin/sulbactam	
		Peniciliny protipseudomonadové	ticarcilin mezlocilin	ticarcilin/sulbactam piperacilin	
	Cefalosporiny	*Cefalosporiny 1. generace*	cefalotin	cefazolin	cefalexin
		Cefalosporiny 2. generace	cefuroxim cefoxitin	cefuroxim axetil cefaclor	cefamandol
		Cefalosporiny 3. generace	ceftriaxon ceftazidim	cefotaxim moxalactam	cefoperazon
		Cefalosporiny 4. generace	cefepim	cefpirom	
	Karbapenemy		imipenem	meropenem	
	Monobactamy		aztreonam		

Tab. 2 - Rozdělení antibiotik 2 Převzato a upraveno autorkou z [9]

Skupina	**Názvy zástupců**					
Aminoglykosidy	streptomycin	kanamycin	gentamicin	tobramycin	netilmicin	amikacin
Tetracykliny	tetracyklin	doxycyklin	minocyklin			
Makrolidy	erythromycin	roxitromycin	azitromycin	josamycin		
Linkosamidy	linkomycin	clindamycin				
Glykopeptidy	vancomycin	teicoplanin				
Chinolony	ciprofloxacin	norfloxacin	ofloxacin	perfloxacin	lomefloxacin	
Antimykotika	amphotericin B	ketoconazol	fluconazol	clotrimazol	flucytosin	miconazol
	chloramfenikol					
	spectinomycin					
	rifampin					
	colistin					
	fusidová kyselina					
Sulfonamidy	sulfametoxazol	sulfonamid/trimetoprim				

1.2.3 Vyšetření citlivosti

Testování citlivosti se provádí s cílem zjistit, zda je daná bakterie citlivá vůči dané látce a v jakém množství. Metody, kterými se citlivost zjišťuje, se rozdělují na kvalitativní a kvantitativní, přičemž může jít o metody přímé a nepřímé.

Diskový difuzní test je nepřímá kvalitativní metoda založená na měření inhibiční zóny kolem antibiotika. Tento test je striktně standardizován. Provádí se na tzv. MH (Müller Hinton) agaru, který je nalitý v Petriho misce do standardizované vrstvy s kontrolovaným pH v rozmezí 7,2 až 7,4. Standardní inokulum obsahuje bakterie s koncentrací 10^8 na 1 ml roztoku. Inokulum se pomocí sterilního tamponu nanáší na ztuhlý MH agar rovnoměrně po celé ploše. Následně se aplikují disky obsahující různá antibiotika. Po skončení inkubace (18 až 24 hodin) se změří průměry inhibičních zón, které se následně interpretují podle tabulek hraničních hodnot daných pro jednotlivé antibiotikum i bakterii.

Dilučním testem v bujonu se zjišťuje minimální inhibiční koncentrace (MIC) antibiotické látky. Jde o nejnižší koncentraci antibiotika, při které nedochází k viditelnému růstu bakterie. Při tomto testu se každý následující roztok antibiotika dvojnásobně ředí z předešlého roztoku. Běžně se používá 100 ml bujonu o osmi různých koncentracích antibiotika, kterými se naplní jamky mikrotitrační destičky. Následně se jehlami očkuje 1 ml až 2 ml standardního inokula, tedy s koncentrací 10^8 bakterií na 1 ml. Po inkubaci se hledá první nezakalená jamka s co nejmenší koncentrací antibiotika.

Alternativou k dilučnímu testu v bujonu je diluční test v agaru. Do Petriho misek jsou nalité standardizované agary s různými koncentracemi antibiotika. Na agar se jehlově očkuje 30 až 40 kmenů a po inkubaci se sleduje růst kolonie. Opět se hledá MIC antibiotika, kde již není růst pozorován.

Posledním způsobem, jak najít MIC, je tzv. E-test. Jedná se o metodu, kdy je na agar aplikován kalibrovaný proužek obsahující gradientově umístěné koncentrace antibiotika. Kolem proužku se po inkubaci vytvoří inhibiční zóna směřující od konce proužku s nejvyšší koncentrací až po bod s koncentrací, která odpovídá MIC.

Tato kapitola byla zpracována na základě citace [9].

1.2.4 **Augmentin**

Augmentin je směs dvou léčivých látek s antibakteriálními účinky, amoxicilinu a inhibitoru ß-laktamázy, kyseliny klavulanové. Jejich sumární vzorec je $C_{16}H_{19}N_3O_5S \cdot 3H_2O$, strukturní vzorce můžete vidět na obrázku 17 a obrázku 18 v příloze B. Fungují na stejném principu jako ostatní penicilíny, tedy inhibují syntézu buněčné stěny bakterií.

Působení amoxicilinu je účinné při syntéze peptidoglykanu v růstové fázi množení. Amoxicillin je polysyntetické širokospektrální antibiotikum. Je účinné na G+ i G- mikroorganismy. Není však odolný vůči β-laktamázám, což je důvod proč spektrum jeho účinku nezahrnuje mikroorganismy produkující tyto enzymy. Augmentin proto obsahuje i kyselinu klavulanovou, která chrání amoxicillin před rozkladem β-laktamázami. Tím významně rozšiřuje antibakteriální spektrum amoxicillinu o mikroorganismy, které by vůči němu byly jinak rezistentní.

Využívá se nejčastěji při léčbě:

- bakteriálních zánětů lokalizovaných v dýchacích cestách
- zánětech středního ucha
- různých zánětech močového ústrojí, chlamydiových infekcích
- lymské borelióze
- salmonelóze
- příležitostně může být používán při léčbě akné.

Tato kapitola byla zpracována na základě citací [13],[14],[15],[16]

1.2.5 **Tetracyklin**

Tetracyklin je širokospektrální antibiotikum, které působí bakteriostaticky. Používá se na většinu G+ i G- bakterií včetně anaerobů, dále na mykoplasmata, chlamydie, spirochety a améby. Vykazují však řadu nežádoucích vedlejších účinků. K nejzávažnějším patří deformace zubů, kostí a někdy i inhibice jejich růstu. Proto se nedoporučuje jejich podávání dětem mladším 6 let a těhotným ženám. Jako první ze skupiny tetracyklinů byl v roce 1948 popsán chlortetracyklin a krátce po něm

i oxytetracyklin jako metabolické produkty z různých druhů streptomycet. Dnes se připravují jako semisyntetické látky zahrnující tetracyklin.

Do buněk bakterií pronikají difuzí přes jejich buněčnou stěnu i přes cytoplazmatickou membránu pomocí aktivního transportu. Uvnitř buňky se reverzibilně váží na receptor 30S podjednotky ribozomů. Zde Tetracyklin brání vazbě aminoacyl - tRNA a mRNA a nemůže tedy dojít k navázání aminokyselin k právě vytvářenému peptidovému řetězci. Způsobuje inhibici proteosyntézy a zastavuje růst bakterie. Strukturní vzorec tetracyklinu můžete vidět na obrázku 19 v příloze B.

V dnešní době se již často setkáme s rezistencí na Tetracyklin, především u G- bakterií jako jsou rody *Pseudomonas* a druh *Proteus vulgaris*. Působení nejčastěji selhává díky interferenci aktivního transportu tetracyklinu do buňky a jeho příliš velkému vypuzování z nitra buňky. Dalším důvodem selhání účinnosti může být buněčná ochrana ribozomů, při které je proces výroby proteinů chráněn proti jeho utlumení prostřednictvím cytoplazmatických proteinů. Rezistence proti jednomu konkrétnímu Tetracyklinu znamená rezistenci proti celé skupině.

Tato kapitola byla zpracována na základě citací [13], [17], [18].

1.3 **Bakterie**

Živé organismy, jejichž základem je buněčný typ organizace, můžeme rozdělit do pěti říší: Protista (prvoci a eukaryotické řasy), Fungi (houby), Animalia (mnohobuněční živočichové), Plantae (vyšší rostliny) a Procaryotae. Do poslední skupiny patří Bacteria (bakterie) a Cyanobacteria (prokaryotické řasy).

Podle základní buněčné organizace a struktury rozeznáváme dva typy buněk - prokaryotická a eukaryotická. Do eukaryotických buněk spadají říše Protista, Fungi, Animali a Plantae. Prokaryota jsou vždy jednobuněčné organismy, které nikdy netvoří funkčně a morfologicky diferencované tkáně, ale mohou se shlukovat a tvořit kolonie. Mívají kokovitý či tyčinkovitý tvar a dosahují velikosti v řádu několika mikrometrů. Součástí bakteriálních buněk je jaderná oblast, neboli nukleoid, ribozomy (podílející se na výrobě bílkovin), plazmidy, cytoplazma, cytoplazmatická membrána a buněčná stěna. Průřez prokaryotickou buňkou můžete vidět na obrázku 20 v příloze C.

Bakterie jsou nejrozšířenější skupinou organismů na světě. Jejich přirozeným prostředím je voda, půda, povrch těla i sliznice živočichů. Rozmnožují se pouze nepohlavně, většinou příčným dělením buněk nebo pučením. Při příčném dělení se mateřská buňka prodlužuje až do dvojnásobku své původní délky. Následně se uprostřed buňky vytvoří septum (cytoplazmatická membrána a buněčná stěna), které rozdělí mateřskou buňku na dvě stejné sesterské buňky. Některé bakterie se rozmnožují pučením. Jakmile mateřská buňka doroste do své normální velikosti a dozraje k rozmnožování, začne se na jejím povrchu tvořit nová buňka. Nově vznikající dceřiná buňka je menší než buňka mateřská a označuje se jako pupen. Jakmile do ní mateřská buňka vyšle rozdělené jádro, dojde k zaškrcení a oddělení. Následně dceřiná buňka dorůstá do velikosti mateřské.

Rychlost množení bakterií při statické kultivaci je ovlivněna nejen stářím inokula, ale také změnami v prostředí. Sled jednotlivých fází množení v závislosti na době kultivace můžeme graficky vyjádřit pomocí růstové křivky bakterií, která je na obrázku 21 v příloze C. Růstovou křivku dělíme na 4 fáze. První je lag fáze neboli klidové období. Nastává ve chvíli přenosu bakterie do nového prostředí. Buňky se téměř nemnoží, jejich počet se může dokonce snižovat odumíráním vývojově starších. Přežívající bakterie se přizpůsobují novým podmínkám a připravují se na dělení. Další částí růstové křivky je fáze exponenciální, při které nastává intenzivní množení bakteriálních buněk, jejichž počet narůstá geometrickou řadou. Následuje stacionární fáze, při níž se postupně zpomaluje proces množení i celkový metabolismus, až do stádia rovnováhy, kdy se už počet buněk výrazně nemění. Tato fáze bývá spojena především s postupným vyčerpáním živin a hromaděním metabolických produktů toxické povahy. Nakonec nastává fáze odumírání, kdy už převyšuje počet odumřelých buněk nad vzniklými.

Grammovo barvení umožňuje rozdělit bakterie na dvě skupiny; grampozitivní (G+) s modrým zabarvením a gramnegativní (G-) s červeným zabarvením. Výsledky barvení vedoucí k rozdělení na dvě základní skupiny jsou založené na různé stavbě bakteriální stěny. G+ mají v buněčné stěně silnou vrstvu peptidoglykanu, která zabrání vymytí modrého barviva z buňky acetonem. G- mají, na rozdíl od G+, vnější membránu (fosfolipidovou dvojvrstvu), v níž jsou obsaženy poriny umožňující pasivní transport nízkomolekulárních látek do bakteriální buňky. To má význam především při transportu některých antibiotik, kdy druhy s velkou molekulou (glykopeptidy) přes poriny

nepřecházejí, a proto na G- bakterie nepůsobí. Navíc mají jen tenkou vrstvu peptidoglykanu a z toho důvodu se acetonem odbarví. Následně se obarví karbolfuchsinem a jsou pod mikroskopem vidět červeně.

Tato kapitola byla zpracována na základě citací [11], [19] a [20].

1.4 Testované bakterie

1.4.1 Escherichia coli

E. coli je bakterie, kterou v roce 1885 popsal bakteriolog a pediatr Theodor Escherich. Představuje gramnegativní, fakultativně anaerobní bakterii (roste lépe v přítomnosti kyslíku, ale dokáže růst i bez něho). *E. coli* je nesporotvorná tyčinka, která se pohybuje pomocí bičíku. Patří do kmene *Proteobacteria*, do čeledi *Enterobacteriaceaea*. Tvoří tyčinkovité buňky o velikosti cca 2 μm a tloušťce 0,5 μm. Je schopná růst za teploty od 10 do 46 °C, ovšem její optimální teplota je 37 °C. Rozsah pH pro růst se pohybuje v rozmezí 6 – 8. Za ideálních podmínek dosahuje její generační doba dvaceti minut. [21]

E. coli můžeme najít u většiny teplokrevných organismů. Tvoří součást fyziologické mikroflóry tlustého a části tenkého střeva. Jedince kolonizuje prakticky hned po narození. Patří mezi symbionty, svým působením znemožňuje průnik patogenů. Produkce takzvaných kolicinů může být toxická pro ostatní bakterie. Dále se přímo podílí na tvorbě některých vitamínů, především vitamínu K. Patogenní kmeny tohoto druhu však mohou vyvolávat onemocnění dýchacích cest, gastrointestinálního i urogenitálního traktu nebo centrální nervové soustavy. Slouží jako nejběžnější indikátor fekálně znečištěné vody. Největší problémy způsobuje v rozvojových zemích, především u kojenců a malých dětí. Vidět ji můžete na obrázku 23A v příloze D. [4]

1.4.2 Staphylococcus aureus

S. aureus byl poprvé objeven ve Skotsku v roce 1880 chirurgem Alexandrem Ogstonem jako grampozitivní fakultativně anaerobní nesporulující bakterie. Patří do

kmene *Firmicutes*, do čeledi *Staphylococcaceae*. Buňky mají tvar koků o průměru 0,7-1,2 μm. Vyskytuje se v poměrně velkých shlucích připomínajících hrozny žluté barvy. Teplotní rozmezí, ve kterém může růst, je od 15 °C až do 45 °C avšak ideální teplota je 37 °C.

Více než 20 % naší populace tvoří dlouhodobé přenašeče *S. aureus*, přestože se u nich často nevyskytují žádné známky onemocnění. I když je lidský organismus proti stafylokokovým infekcím značně odolný, může způsobovat hnisavé kožní infekce, bronchopneumonie, sepse, urogenitální infekce, meningitidy a endokarditidy. Vidět ho můžete na obrázku 23 B v příloze D.

Tato kapitola byla zpracována na základě citací [9], [21].

1.4.3 **MRSA**

MRSA je Meticillin - rezistentní zlatý stafylokok. Označuje kmeny bakterie *Staphylococcus aureus*, které vykazují minimální inhibiční koncentraci (MIC) pro meticillin ≥ 4 mg/l. Kromě meticillinu jsou tyto kmeny rezistentní i vůči ostatním antibiotikům ze skupiny beta-laktamů, mezi něž patří peniciliny a cefalosporiny.

MRSA se vyskytuje jako komenzál na pokožce i sliznicích zhruba u třetiny naší populace. Ovšem, pokud pronikne přes přirozené tělní bariéry, může vyvolat nejen lehčí záněty kůže a sliznic, ale i záněty vnitřních orgánů nebo způsobit sepsi či celkové selhání organismu. Vývoj rezistence MRSA bakterií je znázorněný na obrázku 22. [22]

1.4.1 **Pseudomonas aeruginosa**

Pseudomonas aeruginosa je aerobní gramnegativní bakterie. Má tvar tyčky o průměru 1 mm x 3 mm. Najdeme u ní polární bičíky a mívá povrch buňky pokrytý hlenovou substancí. Patří mezi extrémně adaptivní a nenáročné bakterie. Ideální růstová teplota je 35 °C, ale teplotní rozmezí, ve kterém zvládá prosperovat, je od 10 °C až po 42 °C. Inkubační doba se pohybuje v rozmezí 24 - 72 h. Patří do kmene *Pseudomonas*, do čeledi *Pseudomonadaceae*. [21]

Vyskytuje se běžně po celém světě v přírodě, v půdě a ve vodě. Najdeme ji na lidské kůži i v mnoha člověkem vytvořených prostředcích. Jako živiny je schopna

využívat široké spektrum organických látek, proto má možnost kolonizovat různá přírodní i umělá prostředí. Její infekce obvykle způsobují záněty a sepse. *P. aeruginosa* je nejčastější příčinou infekce popálenin, zánětů vnějšího středního ucha i kontaminace katetrů a ostatních zdravotnických pomůcek. Vidět ji můžete na obrázku 23 C v příloze D. [21]

1.4.1 **Proteus vulgaris**

Proteus vulgaris poprvé popsal v roce 1885 německý patolog G. Hauser jako gramnegativní fakultativně anaerobní nesporulující bakterii. Buňky mají tvar rovných nebo zahnutých tyčinek. Jeho specifickou vlastností je plazivý růst. Patří do kmene *Proteus*, do čeledi *Enterobacteriaceae*. Ideální růstová teplota je 37 °C. [23]

Nejčastěji ho můžeme najít jako rozkladače organické hmoty v odpadcích, ve výkalech lidí i zvířat, na rostlinách i v půdě. Jako komenzál se vyskytuje v trávicím traktu člověka. Často migruje do močových cest, kde způsobuje infekce. Má silnou schopnost přežívat v nemocničním prostředí. Často se tedy podílí na vzniku infekcí, především tam, kde jsou narušené bariéry - rány, popáleniny, cizí tělesa. Vidět ho můžete na obrázku 23 D v příloze D. [9]

2 Výzkumná část

2.1 Cíle a výzkumné předpoklady

Po zpracování rešerší na téma biofilm, a jeho rezistence na antibiotika bylo dalším cílem vybrat biofilm pozitivní bakteriální kmeny, které se budou v rámci této bakalářské práce testovat. Aby bylo možné zajistit stejné podmínky pro všechna testování, bylo vybráno pět bakteriálních kmenů. Jednalo se o kmeny:

- *Escherichia coli (CCM 2024)*
- *Proteus vulgaris (CCM 1956)*
- *Pseudomonas aeruginosa (CCM 1959)*
- *Staphylococcus aureus (CCM 2260)*
- *MRSA (CCM 4223).*

Bližší vlastnosti těchto kmenů byly specifikované v teoretické části práce. Stejně tak byla výše popsána i antibiotika, která byla k výzkumu použita, tedy Tetracyklin a Augmentin.

Dalšími cíli této práce bylo zjistit MIC (minimální inhibiční koncentrace testovaných antibiotik k biofilmu) a MBEC (nejnižší koncentrace antibiotika, kde je ještě prokázána eradikace biofilmu). Tyto výzkumné cíle byly testovány pomocí tří základních metod: modifikovanou Christensenovou zkumavkovou metodou, testem planktonických buněk biofilmu a pomocí přístroje RTS-1C Personal Bioreactor, který je určený ke sledování mikrobiálního růstu v reálném čase.

2.2 Metodika výzkumu

2.2.1 Modifikovaná Christensenova zkumavková metoda

Christensenova zkumavková metoda je metoda osvědčená při průkazech schopnosti daného mikroorganismu tvořit biofilm. V našem případě je metoda modifikovaná, neboť testy byly prováděny ve skleněných kontejnerech na podložních sklech, místo zkumavek.

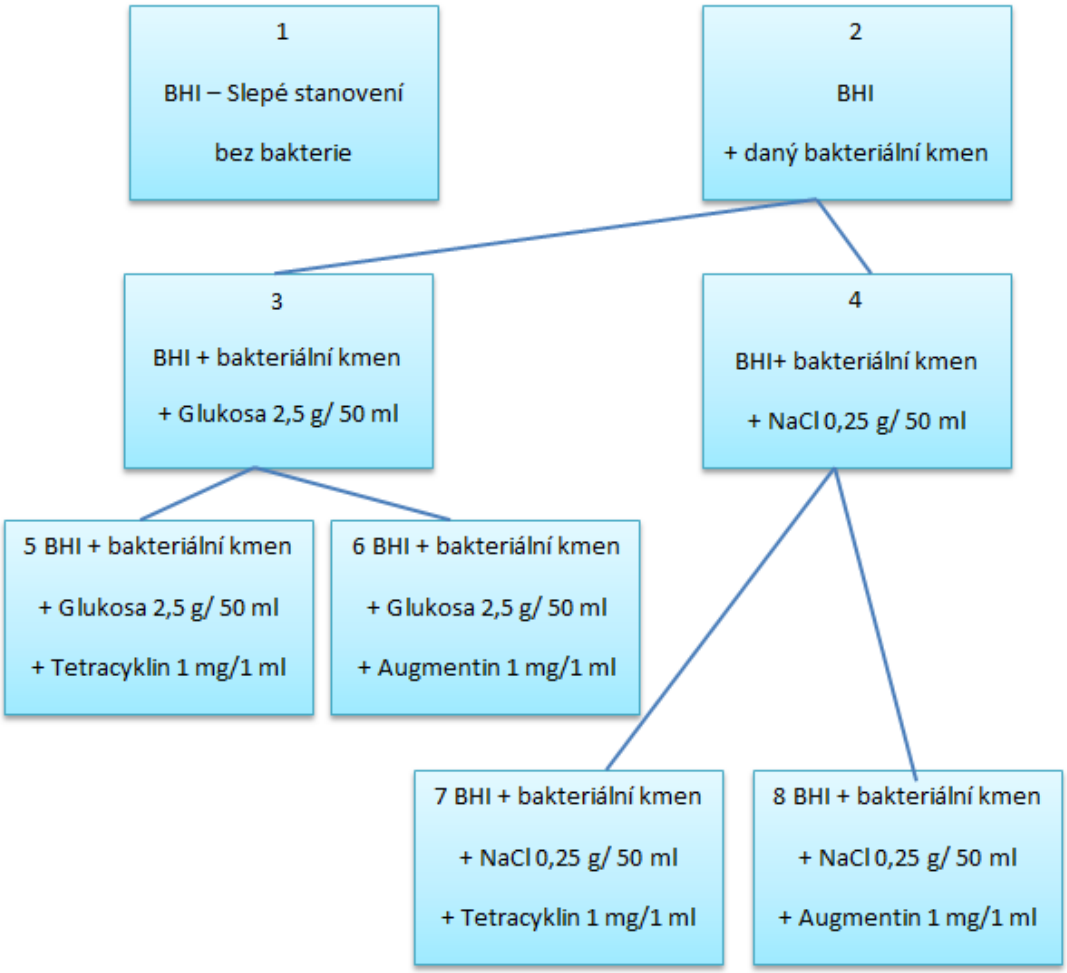
Nejdříve bylo nutné oživit daný bakteriální kmen. Všechny použité kmeny byly pořizovány z České sbírky mikroorganismů v Brně, lyofilizované a uchovávané ve skleněných ampulích obsahujících silikagel kvůli vlhkosti. Oživení lyofilizované kultury probíhalo v několika krocích. Nejprve se skleněná ampule v označeném místě narušila pomocí pilníku a pak se vlivem tepla nechala prasknout. Vrchní část ampule se odlomila a do zbylé části, která obsahovala lyofilizát se přidalo 0,3 ml bujónu. Po několika minutách se suspenze mohla přenést na misku s krevním agarem nebo do tekutého média, kde se při ideálních podmínkách kultivovala 24 hodin. Takto nakultivované bakterie se uschovávaly v kryozkumavkách dodávaných firmou Itest plus s.r.o. v mrazáku při -85 °C.

Z kryozkumavky byla vyjmuta jedna kulička daného bakteriálního kmene a umístěna do malé skleněné sterilní kádinky. Následně byla zalita 1 ml fyziologického roztoku, který byl připraven navážením 8,5 g NaCl, zalitím jedním litrem destilované vody a následně vysterilizován při 100 °C po dobu 60 minut autoklávu. Roztok s bakteriální suspenzí byl po 5 minutách odpočinku nalit na misku s krevním agarem a do druhého dne nechán při 37 °C inkubovat. Druhý den byl bakteriální kmen přeočkován na misky s krevním agarem a ponechán v chlazeném laboratorním inkubátoru Q-CELL 60 - 240 dalších 24 hodin, aby bylo možné oddělit jednotlivé kolonie.

Bakteriální kmeny byly v této metodě testovány v BHI od firmy Sigma Aldrich s.r.o. připraveném dle navážky 26 g/l. Takto navážené BHI bylo nutné sterilizovat za stálého míchání po dobu 15 minut na 121 °C. Uvařené BHI bylo rozlito po 50 ml do sterilních lahví na vzorky o objemu 100 ml. Následně bylo do lahví přidáno 5 jednotlivých kolonií daného bakteriálního kmene. Dále byly do vzorku přidány živiny v podobě glukózy nebo chloridu sodného (NaCl) dle schématu na obrázku 1. Glukóza byla přidána jako 5% roztok, tedy 2,5 g / 50 ml a chlorid sodný jako 0,5% roztok, tedy 0,5 g / 50 ml. Lahve se vzorky byly důkladně promíchány pomocí IKA® vortexu Genius 3 po dobu jedné minuty a uloženy na 24 hodin do inkubátoru při 37 °C.

Další den experimentu byly vzorky vyjmuty z inkubátoru a byla do nich přidána antibiotika. Následovalo řádné promíchání každého vzorku na vortexu po dobu jedné minuty. Potom byly jednotlivé vzorky přelity do skleněných kyvet, do kterých se vzápětí vložila sterilní podložní mikroskopická skla tak, aby byla ze dvou třetin

ponořená ve vzorku. Kyvety se zakryly víčkem a uložily do inkubátoru na 72 hodin při teplotě 37 °C.

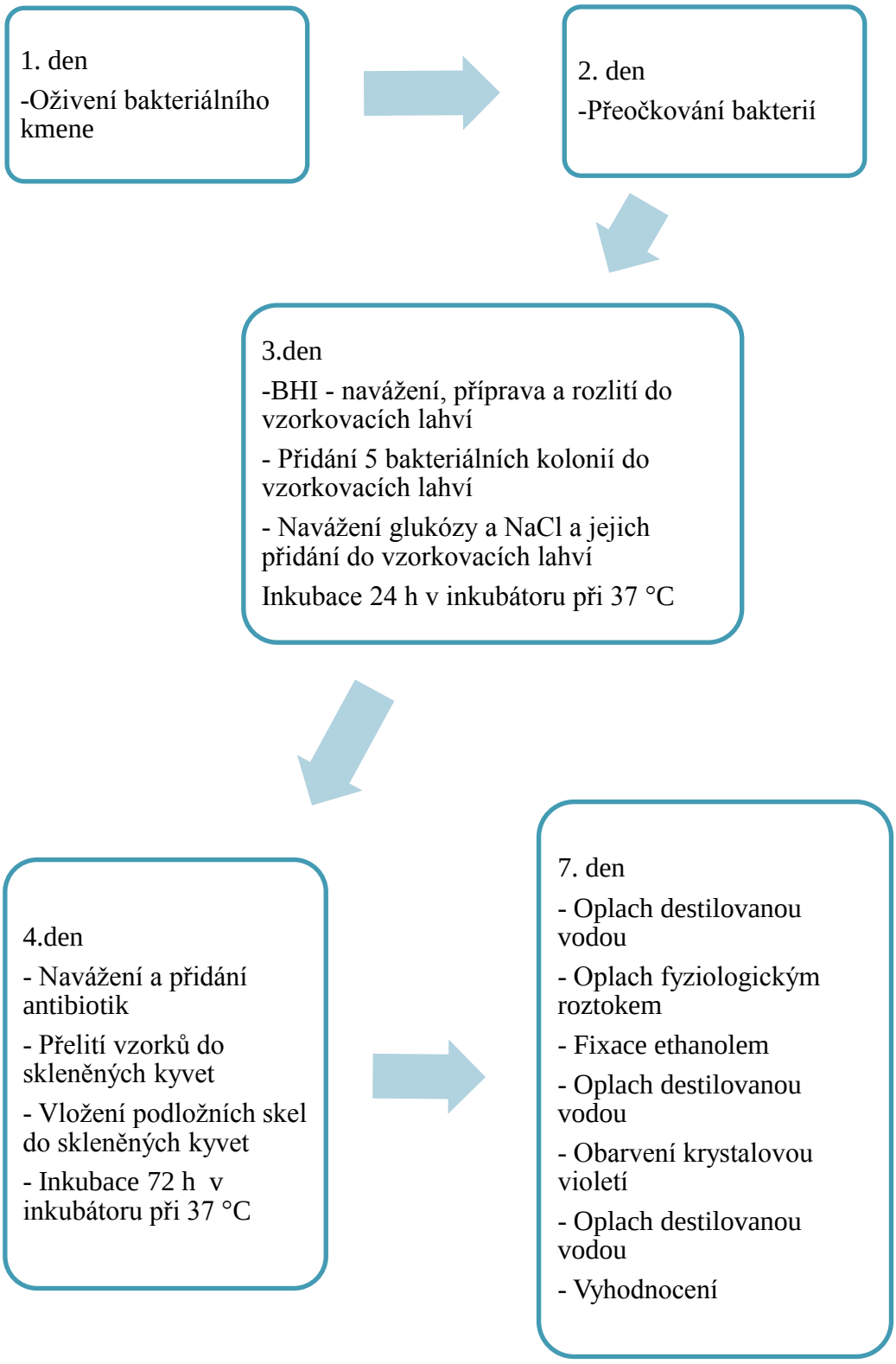


Obr. 1 - Schéma vzorků při modifikované Christensenově zkumavkové metodě [Zdroj: Autorka]

Po 72 hodinách byly kyvety se vzorky vyjmuty z inkubátoru. Podložní skla byla důkladně opláchnuta nejdříve ve dvou kádinkách s destilovanou vodou získanou z přístroje Smart2Pure Ultrapure water systems 08.2030 (3 Standard) od firmy TKA a následně ve dvou kádinkách s fyziologickým roztokem. Takto důkladné oplachování bylo nutné z toho důvodu, aby se všechny planktonické buňky přichycené na skle smyly a zůstal pouze pevně přichycený bakteriální biofilm. Po oplachu se skla ponořila na 20 minut do kontejneru s 96% ethanolem z důvodu fixace biofilmu na skle před barvením. Po uplynutí 20 minut se skla z etanolu vyjmula a jednou opláchla destilovanou vodou.

Posledním krokem byla detekce biofilmu jeho obarvením. Oschlá a zafixovaná skla byla uložena do kontejneru s krystalovou violetí na 45 minut. Následně bylo sklo odebráno z kontejneru a několikrát opláchnuto v destilované vodě. Po oschnutí bylo sklo připraveno k pozorování pod optickým mikroskopem a k vyhodnocení. Celý postup této metody naleznete graficky znázorněný na obrázku 2. Všechna testování modifikovanou Christensenovou zkumavkovou metodou byla prováděna v duplikátu, aby se tyto výsledky daly považovat za relevantní.

Roztok krystalové violeti, která byla v experimentu použita, byl připraven následujícím postupem. Bylo rozpuštěno 2,5 g krystalové violeti ve 100 ml etanolu během 24 hodin při 37 °C. Dále se rozpustily 4 g šťavelanu amonného ve 400 ml destilované vody. Oba tyto roztoky byly smíchány a přefiltrovány přes filtrační papír. Vznikl stálý roztok, který byl uchováván v lednici.



Obr. 2 - Schématické znázornění postupu při modifikované Christensenově zkumavkové metodě [Zdroj: Autorka]

2.2.2 **Test planktonických buněk biofilmu**

Test planktonických buněk biofilmu byl prováděn z toho důvodu, aby bylo možné vyjádřit kvantitativní množství planktonických buněk uchycených na podložním skle. U této metody bylo také nutné si nejdříve oživit daný bakteriální kmen. 5 jednotlivých kolonií bylo aplikováno do 50 ml připraveného BHI, které bylo nalito ve sterilních lahvích na vzorky s objemem 100 ml. Dále byla do BHI přidána glukóza nebo chlorid sodný, viz schéma na obrázku 1. Každý vzorek byl řádně vortexován po dobu 1 minuty a na 24 hodin byl inkubován při 37 °C.

Další den bylo do směsi přidáno antibiotikum. Směs byla opět vortexována po dobu jedné minuty a následně přelita do skleněných kyvet, kam byla umístěna i podložní mikroskopická skla. Skleněné kyvety byly uzavřeny pomocí víčka a směs byla inkubována po dobu 72 hodin při 37 °C. Po této inkubaci byla skla vyjmuta z kyvet a postupně opláchnuta ve dvou kádinkách s destilovanou vodou.

Před následujícím krokem bylo nutné připravit fosfátový pufr s pH 7,2. Ten byl připraven smícháním roztoku A s roztokem B. Roztok A byl 0,1 M KH_2PO_4, tedy 13,61 g KH_2PO_4 rozpuštěného v jednom litru destilované vody. Roztok B byl připraven 0,1 M $Na_2HPO_4 \cdot 12\ H_2O$, tedy 35,81 g $Na_2HPO_4 \cdot 12\ H_2O$ rozpuštěného v jednom litru destilované vody.

Z opláchnutých podložních skel byly pomocí sterilních vatových tamponů namočených ve fosfátovém pufru provedeny stěry (o velikosti 2,5 cm x 2,5 cm), viz ČSN ISO 17604 - stanovení celkového počtu mokroorganismů a vyhláška MZd 289/207 Sb. v platném znění (Stěry z povrchu -z plochy 10 cm2). Na jednom vatovém tamponu byly setřené planktonické buňky z obou stran podložního skla. Vatový tampon, kterým byl proveden stěr, byl vložen do sterilní vzorkovací nádoby a bylo k němu napipetováno 10 ml fosfátového pufru. Vzorek byl řádně uzavřen víčkem a vortexován po dobu 2 minut. Po promíchání bylo ze vzorku odebráno 500 µl vzorku, který byl následně vyočkován na krevní agar. Misky s krevním agarem byly inkubovány po dobu 24 hodin a poté bylo spočítáno, kolik jednotlivých kolonií z daného stěru narostlo. U této metody bylo měření každého vzorku prováděno v triplikátu aby mohly být výsledky považovány za relevantní.

Test planktonických buněk biofilmu se vyhodnocuje pomocí vzorce na obrázku 3, kde R vyjadřuje, jak moc je biofilm pozitivní. Zjistí se tak, že se zlogaritmuje počet bakteriálních kolonií, které narostly na misce vůči standardu základního použitého ředění (CFU).

$$R = \log(CFU)\ [cm^{-2}]$$

Kmeny slabě pozitivní (+)

$$2 < R \leq 3$$

Kmeny středně pozitivní (++)

$$3 < R \leq 4$$

Kmeny extrémně pozitivní (+++)

$$R > 5$$

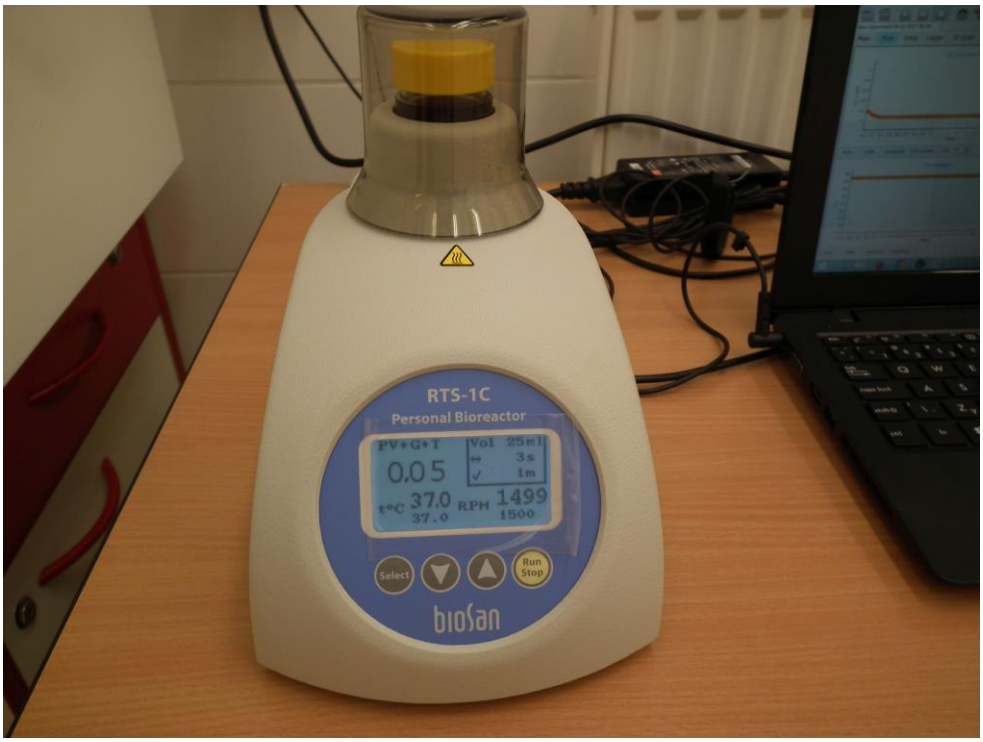
Obr. 3 - Vzorec pro vyhodnocování testu planktonických buněk biofilmu [Zdroj: Autorka]

2.2.3 RTS-1C Personal Bioreactor

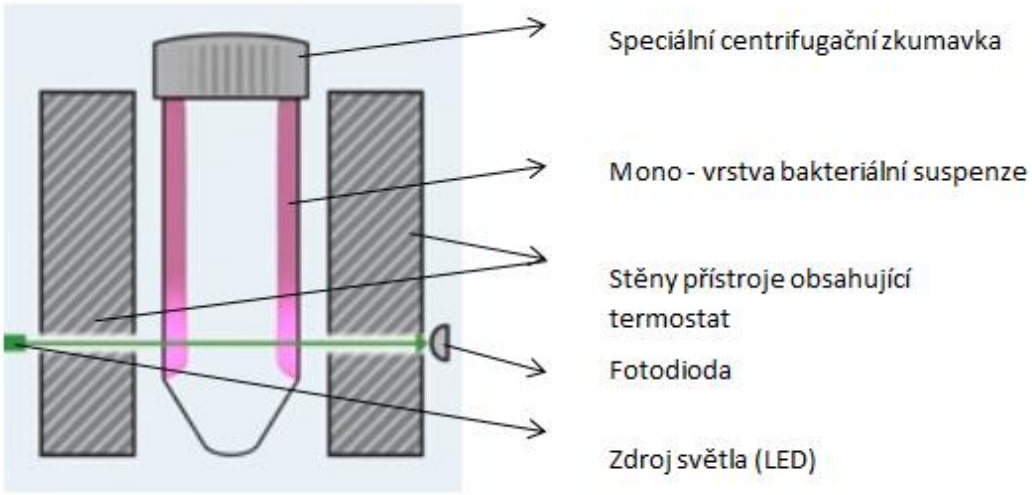
Biosan RTS-1C je bioreaktor, který poskytuje data o agregaci mikrobiálního růstu dané bakterie v reálném čase. Představuje inovativní princip mikrobiální kultivace, kde můžeme okamžitě pozorovat, co se s testovanou bakteriální suspenzí děje. Je vhodný pro kultivace v rozmezí +4 °C až +70 °C, požadovanou teplotu je třeba vyplnit v nastavení s přesností ±0,1 °C. Měření se provádí se speciálními centrifugačními zkumavkami o objemu 50 ml, které mají ve víčku membránový filtr pro aerobní nebo anaerobní měření. Lze nastavit i rychlost otáčení zkumavky okolo její středové osy v rozmezí 50 – 2000 rpm. Obrázek 4 ukazuje přístroj Biosan.

Po nastavení a zapnutí začne přístroj pracovat. Rovnoměrné míchání suspenze je zajištěno centrifugačním pohybem. Získávání dat funguje na principu měření optické denzity při vlnové délce 850 nm bez závislosti na barvě bakteriální suspenze. Přístroj zrychlí otáčení centrifugační zkumavky na 2000 rpm, čímž vznikne monovrstva buněčné suspenze po stěnách zkumavky, která zkracuje optickou dráhu vzorku. V ten

okamžik vyjde ze světelného zdroje paprsek, který je na detektoru (fotodiodě) odečten a zaznamenán. Schéma přístroje při měření optické denzity můžete vidět na obrázku 5.



Obr. 4 - RTS-1C Personal Bioreactor [Zdroj: Autorka]



Obr. 5 - Schéma RTS-1C při měření optické denzity [Zdroj: Autorka]

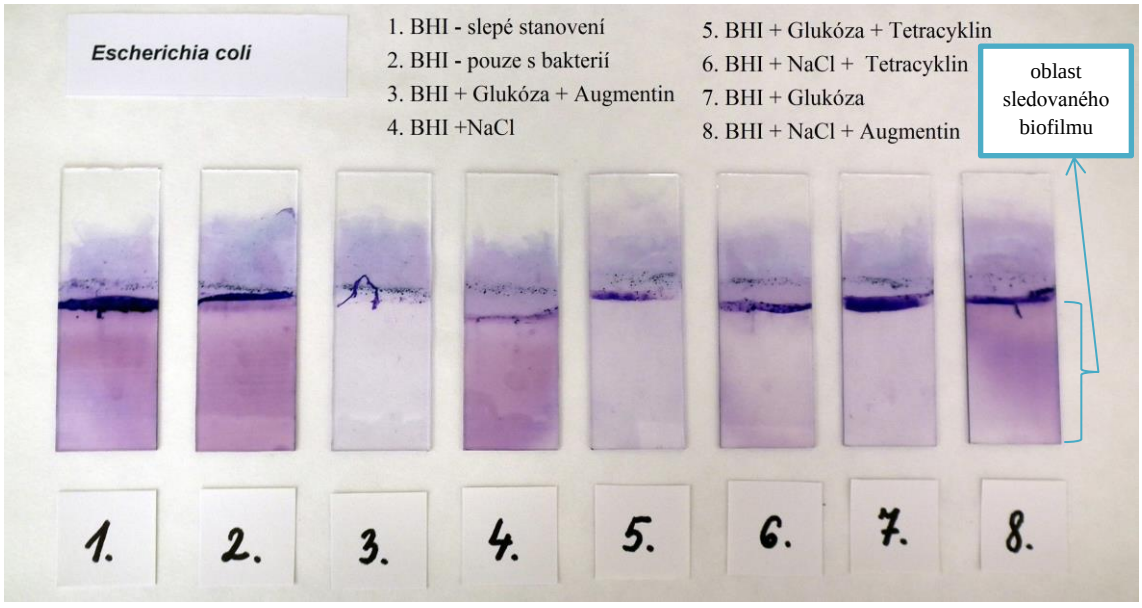
Tato metoda byla vybrána z důvodu, že přístroj simuluje vnitřní prostředí organismu a tak vytváří ideální prostředí pro bakterie. Data se shromažďují průběžně, proto je možné sledovat průběh účinku dávkovaných antibiotik v dané koncentraci na daný kmen. Jako u předešlých metod bylo nejprve nutné oživit bakteriální kmen. Do zkumavky bylo napipetováno 5 ml fyziologického roztoku. Dále byla očkovací kličkou přidána jedna kolonie testované bakterie. Směs byla řádně promíchána pomocí vortexu a změřena na densitometru DEN-1 od firmy Biosan. Směs se ředila tak dlouho, dokud nebylo dosaženo koncentrace 10^8 CFU/ml.

Do sterilní centrifugační zkumavky se speciální aerobní membránou bylo nadávkováno 20 ml živného bujonu číslo 2 a 10 μl připravené bakteriální suspenze o koncentraci 10^8 CFU/ml. Testování probíhalo podle stejného schématu jako u modifikované Christensenovy zkumavkové metody, které je na obrázku 1. Ovšem zde se muselo množství živin a antibiotik přepočítat na celkový objem 20 ml místo 50 ml. Glukózy se přidával 1g, chloridu sodného 0,25 g, Augmentinu 0,2 g a Tetracyklinu 0,2 g.

Před začátkem testování se do bakteriální suspenze přidaly navážené živiny a antibiotikum. Poté byla centrifugační zkumavka pečlivě uzavřena a vložena do přístroje. Přístroj byl propojen s počítačem a k jeho ovládání byl využit software RTS control program, verze 2.7.3.6. Po spuštění softwaru byla nejdříve vyplněna kolonka s názvem vzorku, teplota 37 °C a objem vzorku 20 ml. Dále byla doplněna rychlost otáčení zkumavky na 1500 rpm, a frekvence změny směru otáčení zkumavky na 3 sekundy. Po spuštění už byly všechny nastavené parametry přístrojem dodržovány. Optická denzita vzorku byla měřena při vlnové délce 850 nm. Měření každého vzorku probíhalo zpravidla 24 hodin.

2.3 Analýza výzkumných dat

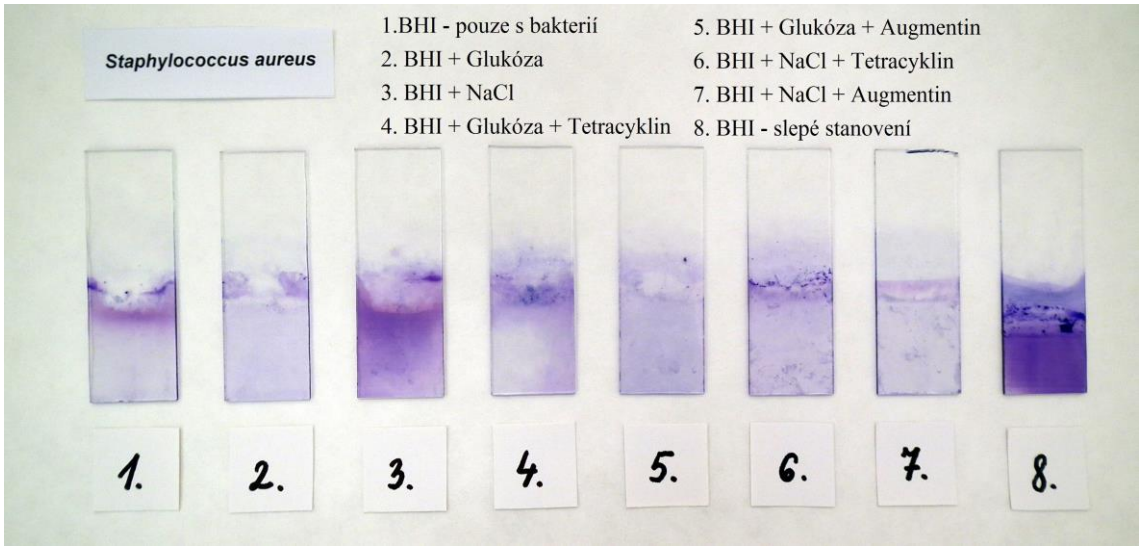
První použitou metodou byla modifikovaná Christensenova metoda, která je popsána v kapitole 2.2.1. Na základě literatury byla zvolena první testovaná koncentrace antibiotik v suspenzi 1 mg/ml. Na obrázku 6 je zobrazen výsledek tetování biofilmu na osmi podložních sklech testovaných na kmenu *Escherichia coli*. Je viditelný rozdíl mezi výsledky růstu biofilmu, který se projevil intenzitou obarvení biofilmu. Nejintenzivněji se projevil růst biofilmu na skle 2 (tento vzorek považujeme jako standard). Vzorek byl testován pouze v BHI s bakteriálním kmenem. Nejlepší účinek antibiotika a téměř žádný nárůst biofilmu je patrný na skle 3 (glukóza + Augmentin). Potlačení růstu biofilmu působením antibiotik je viditelné i na sklech 5 (glukóza + Tetracyklin) a 6 (NaCl + Tetracyklin).



Obr. 6 - Christensenova metoda pro Escherichia coli, 1 mg antibiotika na 1 ml vzorku. [Zdroj: Autorka]

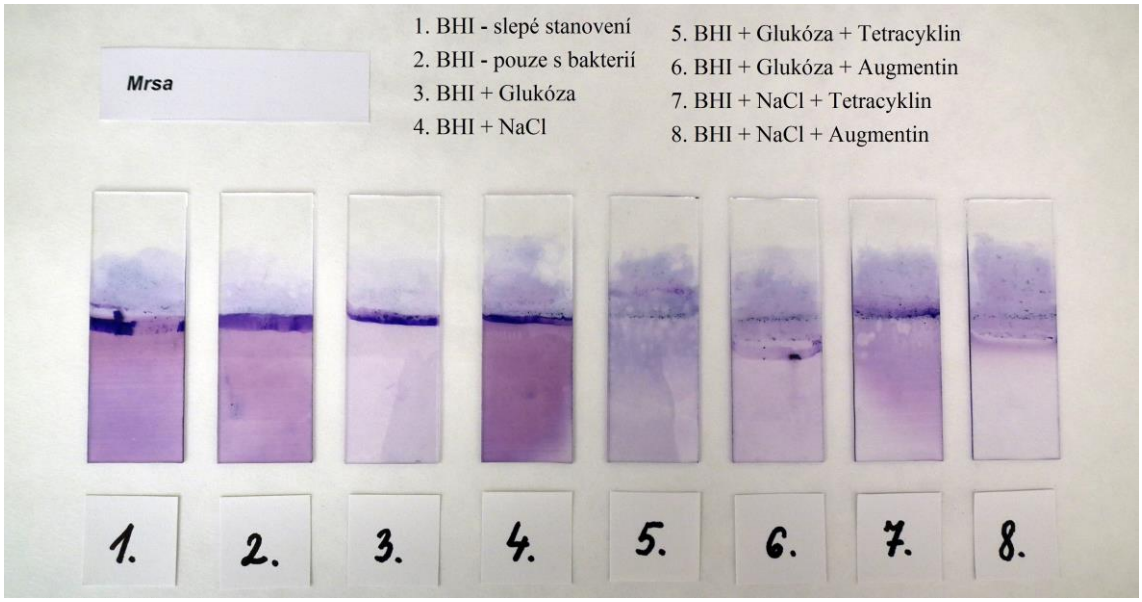
Druhým testovaným kmenem byl *Staphyloccoccus aureus.* Výsledky tohoto testu jsou na obrázku 7. Podle zabarvení byl nejvýraznější nárůst biofilmu na skle 8, přestože to bylo slepé stanovení na BHI. Nejvyšší nárůst biofilmu byl předpokládán na skle číslo 1 (BHI pouze s bakterií) na kterém se měl přirozeně nejlépe tvořit. Naopak u skel

6 (NaCl + Tetracyklin) a 7 (NaCl + Augmentin) byl splněn předpoklad, že zde bude méně biofilmu než na skle 4 (BHI + NaCl).



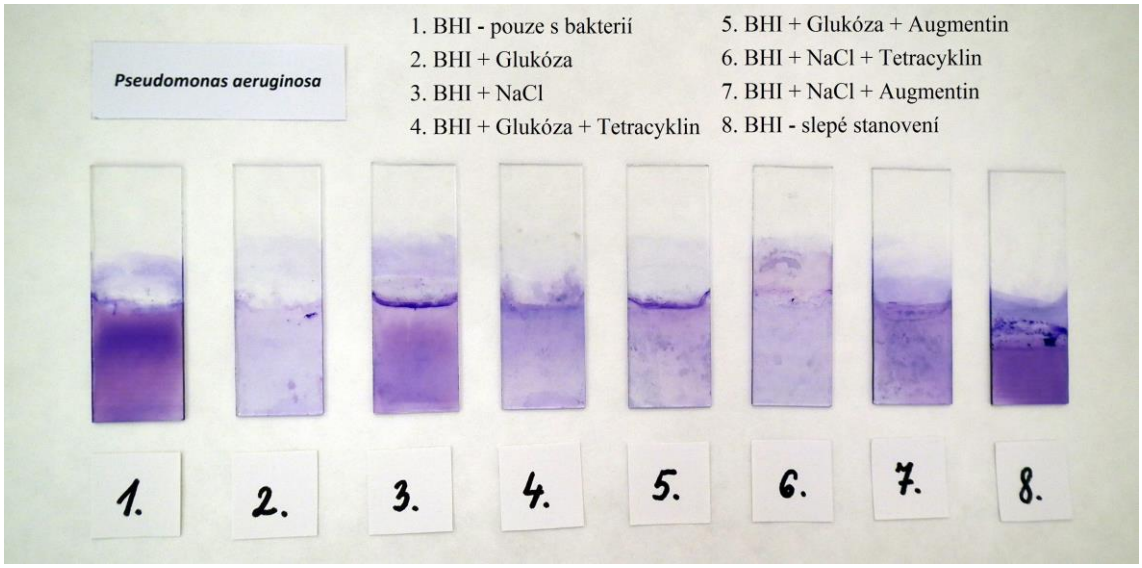
Obr. 7 - Christensenova metoda pro Staphylococcus aureus, 1 mg antibiotika na 1 ml vzorku. [Zdroj: Autorka]

Třetím testovaným kmenem byla *MRSA*. Výsledky tohoto testu jsou na obrázku 8. Největší nárůst biofilmu byl na skle 4, což odpovídá předpokladům, neboť NaCl byl do vzorků přidáván jako živiny pro podporu tvorby biofilmu. Dále je ze zabarvení skel patrné, že všechny čtyři vzorky (5, 6, 7, 8), do kterých byla dávkována antibiotika, obsahovaly méně biofilmu než vzorek kontrolní (2).



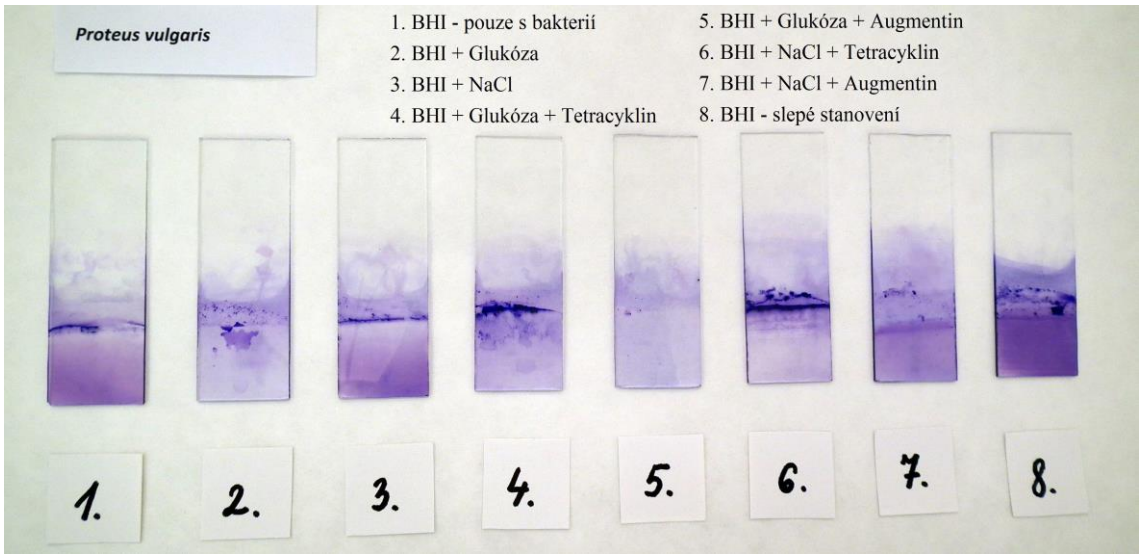
Obr. 8 - Christensenova metoda pro MRSA, 1 mg antibiotika na 1 ml vzorku. [Zdroj: Autorka]

Čtvrtým testovaným kmenem byla *Pseudomonas aeruginosa.* Výsledky tohoto testu jsou na obrázku 9. V tomto testu se opět potvrdila hypotéza, že nejlepší z testovaných podmínek pro růst biofilmu bylo samotné BHI s testovanou bakterií a BHI s přídavkem NaCl. Naopak glukóza se u tohoto kmene neprojevila jako dobrý substrát pro tvoření biofilmu. Podle předpokladu ve všech čtyřech vzorcích, do kterých byla dávkována antibiotika, byla pozorována nižší tvorba biofilmu než u kontrolního vzorku.



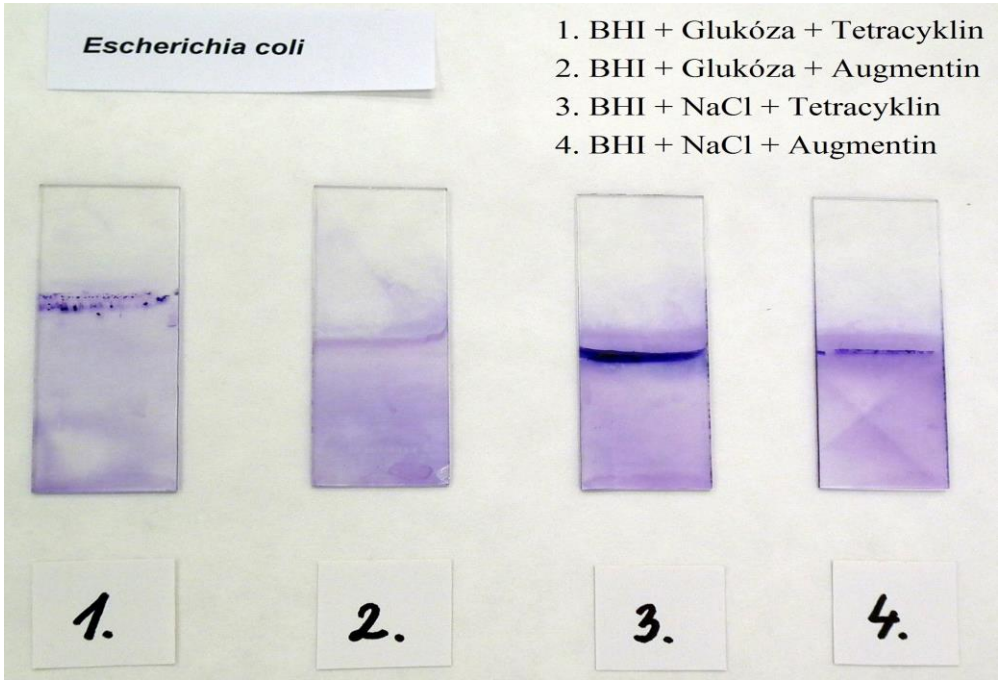
Obr. 9 - Christensenova metoda pro Pseudomonas aeruginosa, 1 mg antibiotika na 1 ml vzorku. [Zdroj: Autorka]

Posledním testovaným kmenem byl *Proteus vulgaris*. Výsledky tohoto testu jsou na obrázku 10. Jako v předchozích testech i v tomto bylo možné sledovat, že biofilm nejlépe narostl na vzorcích BHI se samotnou bakterií (1) a BHI s přídavkem NaCl (3). Na vzorcích 4 až 7 byl pozorován vliv dávkovaných antibiotik, který výrazně snížil tvorbu biofilmu.



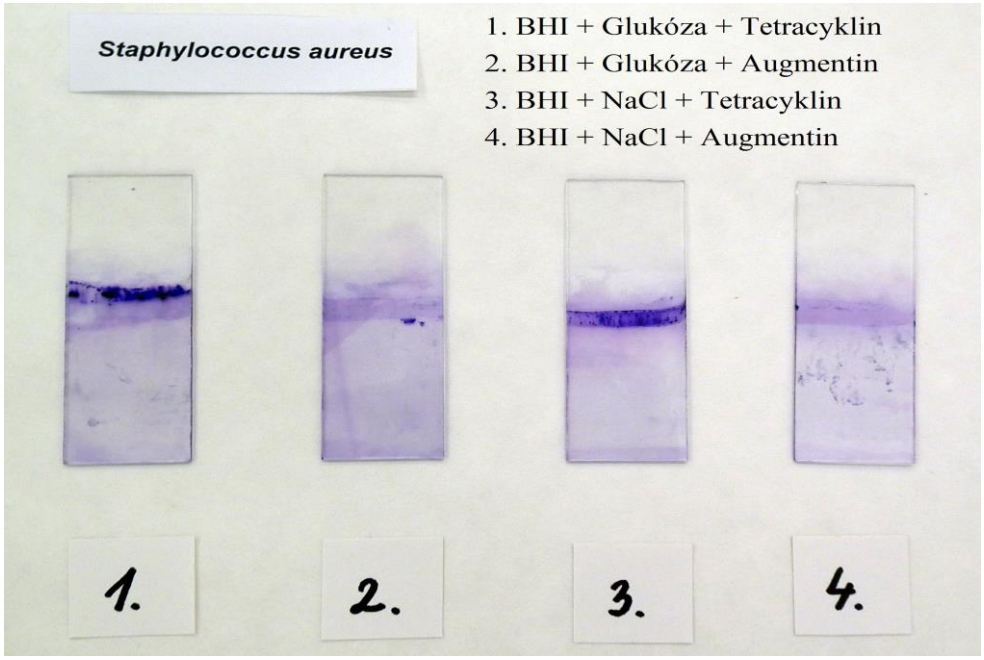
Obr. 10 - Christensenova metoda pro Proteus vulgaris, 1 mg antibiotika na 1 ml vzorku. [Zdroj: Autorka]

U všech předešlých testů bylo prokázáno, že přídavek antibiotik v daných vzorcích měl na tvorbu biofilmu významný vliv. Ve všech případech, kde byla dávkována antibiotika, byla tvorba biofilmu viditelně nižší než na vzorcích, kde antibiotika dávkována nebyla (standard). Na druhou stranu lze říci, že u žádného ze vzorků nenastala situace, kdy by biofilm nenarostl vůbec. Z toho důvodu byla pro testování zvolena vyšší koncentrace dávkovaných antibiotik a to 5 mg na 1 ml vzorku. Na obrázku 11 je vidět výsledek tohoto testování u kmene *Escherichia coli*. Nejvýznamnější vliv na snížení růstu biofilmu měl vzorek obsahující kombinaci glukózy a Tetracyklinu. Nejmenší vliv na potlačení růstu biofilmu měl v tomto případě vzorek s kombinací NaCl a Augmentinu.



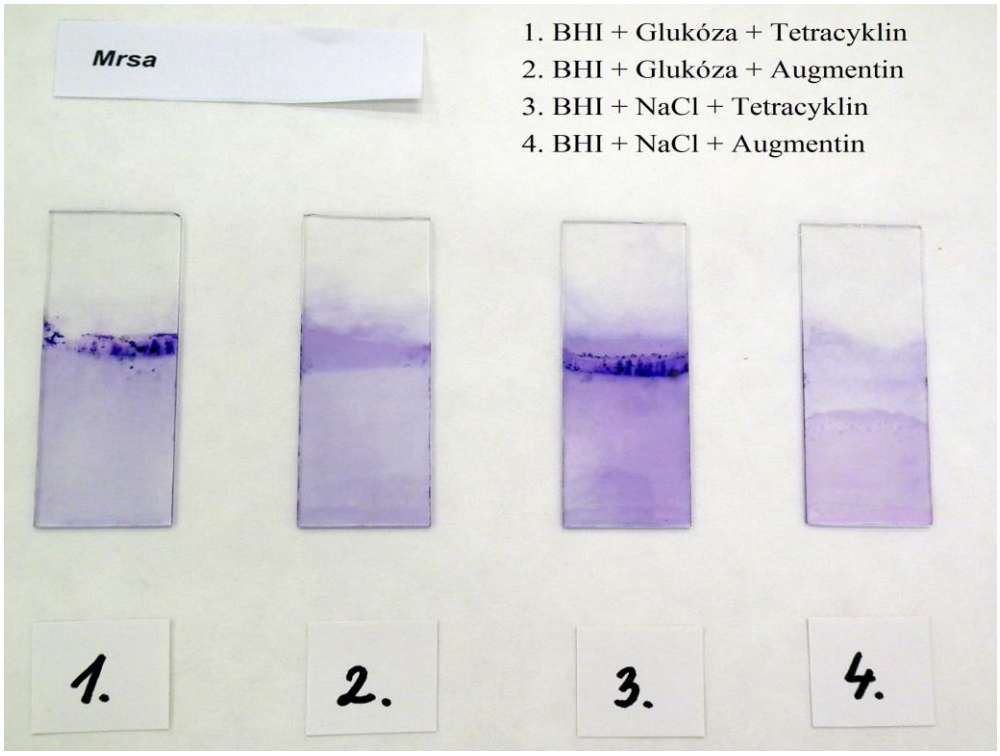
Obr. 11 - Christensenova metoda pro Escherichia coli, 5 mg antibiotika na 1 ml vzorku. [Zdroj: Autorka]

Na obrázku 12 je vidět výsledek testování kmene *Staphylococcus aureus* s přídavkem antibiotik v koncentraci 5 mg antibiotika na 1 ml vzorku. Zde byla sytost obarvených skel téměř srovnatelná, tedy všechny kombinace antibiotik se živinami byly přibližně stejně účinné v potlačení růstu biofilmu.



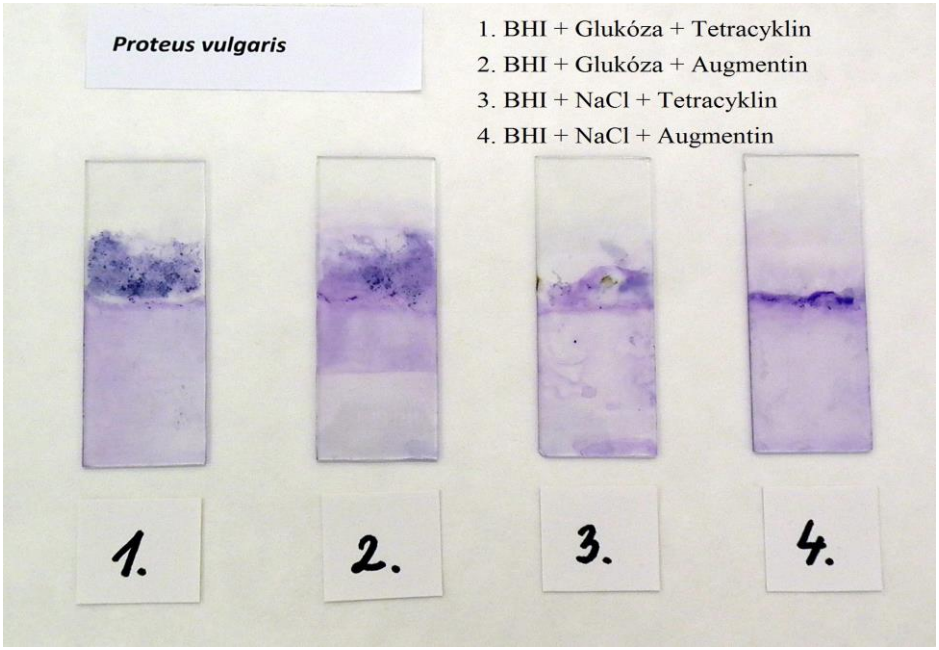
Obr. 12 - Christensenova metoda pro Staphylococcus aureus, 5 mg antibiotika na 1 ml vzorku. [Zdroj: Autorka]

Další testování s danou koncentrací dávkovaných antibiotik probíhalo na kmeni *MRSA*. Výsledky tohoto testu jsou na obrázku 13. Největší vliv v potlačení tvorby biofilmu byl pozorován u kombinace glukózy a Tetracyklinu. U ostatních vzorků byl vliv antibiotik viditelný, ale ne tak významný jako u kombinace glukózy a Tetracyklinu.



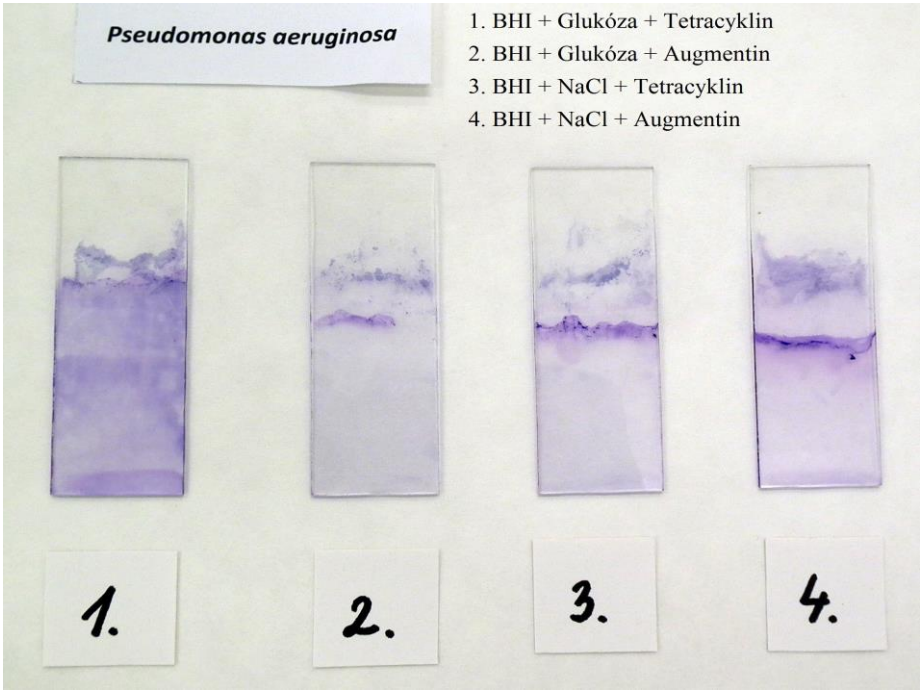
Obr. 13 - Christensenova metoda pro MRSA, 5 mg antibiotika na 1 ml vzorku. [Zdroj: Autorka]

Stejná koncentrace dávkovaných antibiotik byla testována i na kmeni *Proteus vulgaris.* Výsledky tohoto testování jsou na obrázku 14. Opět bylo pozorováno, že všechny kombinace dávkovaných antibiotik potlačily růst biofilmu. Zároveň se ale ani v jednom případě nepovedlo zabránit růstu biofilmu úplně.



Obr. 14 - Christensenova metoda pro Proteus vulgaris, 5 mg antibiotika na 1 ml vzorku. [Zdroj: Autorka]

Koncentrace 5 mg antibiotika na 1 ml vzorku byla dávkována také na kmeni *Pseudomonas aeruginosa.* Výsledky tohoto testování jsou na obrázku 15. Znovu bylo pozorováno, že všechny tyto kombinace dávkovaných antibiotik potlačily růst biofilmu, ale zároveň se ani v jednom případě nepovedlo zabránit růstu biofilmu úplně.



Obr. 15 - Christensenova metoda pro Pseudomonas aeruginosa, 5 mg antibiotika na 1 ml vzorku. [Zdroj: Autorka]

Druhou použitou metodou pro testování účinnosti kombinací antibiotik a živin byl test planktonických buněk biofilmu. Tato metoda je podrobně popsána v kapitole 2.2.2. Test planktonických buněk biofilmu byl prováděn, aby bylo možné vyjádřit kvantitativní množství planktonických buněk uchycených na podložním skle. V tabulce 3 jsou uvedena výsledná data z měření touto metodou na kmeni *MRSA* pro koncentraci antibiotik 1 mg na 1 ml vzorku. *MRSA* byla jediným testovaným kmenem, kde bylo po vyočkování vzorku na misku s krevním agarem možné alespoň u části vzorků spočítat jednotlivé narostlé kolonie. Po dosazení do vzorce na obrázku 3 vyšla u třech vzorků slabá biofilm pozitivita. U všech čtyř zbylých testovaných kmenů byly všechny misky s vyočkovanými vzorky přerostlé a nebylo možné spočítat jednotlivé kolonie. Takto nepočitatelné vzorky nazýváme kompaktním výsevem (KV) a jsou extrémně biofilm pozitivní.

Tab. 3 - Test planktonických buněk biofilmu pro MRSA, 1 mg antibiotik na 1 ml vzorku

	MRSA					
	A	B	C	Průměr	Pozitivita	
1	KV	KV	KV	-	+++	BHI - slepé stanovení
2	KV	KV	KV	-	+++	BHI – pouze s bakterií
3	KV	KV	KV	-	+++	BHI + Glukóza
4	KV	KV	KV	-	+++	BHI + NaCl
5	168	178	190	179	+	BHI + Glukóza + Tetracyklin
6	268	200	190	219	+	BHI + Glukóza + Augmentin
7	168	166	172	169	+	BHI + NaCl + Tetracyklin
8	KV	KV	KV	-	+++	BHI + NaCl + Augmentin

I v této metodě byla druhá testovaná koncentrace 5 mg dávkovaného antibiotika na 1 ml vzorku. V tabulce 4 jsou uvedeny výsledky pro měření s kmenem *Escherichia coli.* Zde byl pozorován již viditelný rozdíl v porovnání s původní testovanou koncentrací antibiotik. U všech vzorků vyočkovaných na krevním agaru bylo možné spočítat množství jednotlivých kolonií. Tyto hodnoty nebyly nulové, ale míra biofilmové pozitivnosti byla pod hranicí významnosti.

Tab. 4 - Test planktonických buněk biofilmu pro Escherichia coli, 5 mg antibiotik na 1 ml vzorku

Escherichia coli						
	A	B	C	Průměr	Pozitivita	
1	21	8	9	13	ø	BHI + Glukóza + Tetracyklin
2	14	23	22	20	ø	BHI + Glukóza + Augmentin
3	40	43	52	45	ø	BHI + NaCl + Tetracyklin
4	4	37	20	20	ø	BHI + NaCl + Augmentin

Výsledky testování kmene *Staphylococcus aureus* jsou uvedeny v tabulce 5. Všechny testované vzorky byly po vyočkování na misku s krevním agarem počitatelné. Avšak po dosazení do vzorce popsaného v teorii byla míra pozitivnosti mikrobiálního biofilmu pod hranicí.

Tab. 5 - Test planktonických buněk biofilmu pro Staphylococcus aureus, 5 mg antibiotik na 1 ml vzorku

Staphylococcus aureus						
	A	B	C	Průměr	Pozitivita	
1	4	3	66	24	ø	BHI + Glukóza + TKC
2	3	10	70	28	ø	BHI + Glukóza + Augmentin
3	14	60	21	32	ø	BHI + NaCl + TKC
4	46	36	48	43	ø	BHI + NaCl + Augmentin

S koncentrací 5 mg dávkovaného antibiotika na 1 ml testovaného vzorku bylo testování prováděno i pro kmen *MRSA*. Výsledky tohoto testování jsou v tabulce 6. I zde bylo možné u všech vzorků vyočkovaných na misce s krevním agarem spočítat jednotlivé kolonie. Výsledky se zde již lehce lišily. U vzorků, kde byl dávkovaný Tetracyklin, byla míra pozitivnosti mikrobiálního biofilmu pod hranicí. Ovšem u vzorků, kde byl dávkovaný Augmentin, byly vzorky slabě biofilm pozitivní.

Tab. 6 - Test planktonických buněk biofilmu pro MRSA, 5 mg antibiotik na 1 ml vzorku

MRSA						
	A	B	C	Průměr	Pozitivita	
1	25	50	5	27	ø	BHI + Glukóza + Tetracyklin
2	120	33	250	134	+	BHI + Glukóza + Augmentin
3		3	6	12	ø	BHI + NaCl + Tetracyklin
4	93	200	200	164	+	BHI + NaCl + Augmentin

Dalším testovaným kmenem byl *Proteus vulgaris.* Výsledky z tohoto testování jsou uvedeny v tabulce 7. V tomto případě byl patrný rozdíl mezi jednotlivými kombinacemi dávkovaných antibiotik, jako bylo u předešlého kmene. V případě kombinace NaCl s Augmentinem byl výsledek slabě pozitivní. U ostatních kombinací testovaných na tomto kmeni vyšla míra pozitivnosti pod hranicí.

Tab. 7 - Test planktonických buněk biofilmu pro Proteus vulgaris, 5 mg antibiotik na 1 ml vzorku

Proteus vulgaris						
	A	B	C	Průměr	Pozitivita	
1	1	4	1	2	ø	BHI + Glukóza + Tetracyklin
2	1	3	1	2	ø	BHI + Glukóza + Augmentin
3	1	2	2	2	ø	BHI + NaCl + Trtracyklin
4	304	365	315	328	+	BHI + NaCl + Augmentin

Posledním testovaným kmenem s koncentrací 5 mg antibiotika na 1 ml vzorku byla *Pseudomonas aeruginosa.* Pro vzorek s glukózou a Tetracyklinem vyšla míra pozitivnosti mikrobiálního biofilmu pod hranicí. Vzorky, ve kterých byl dávkován NaCl s Tetracyklinem a NaCl s Augmentinem, vyšly biofilm středně pozitivní. A vzorek, kde byla dávkovaná glukóza s Augmentinem vyšel extrémně biofilm pozitivní.

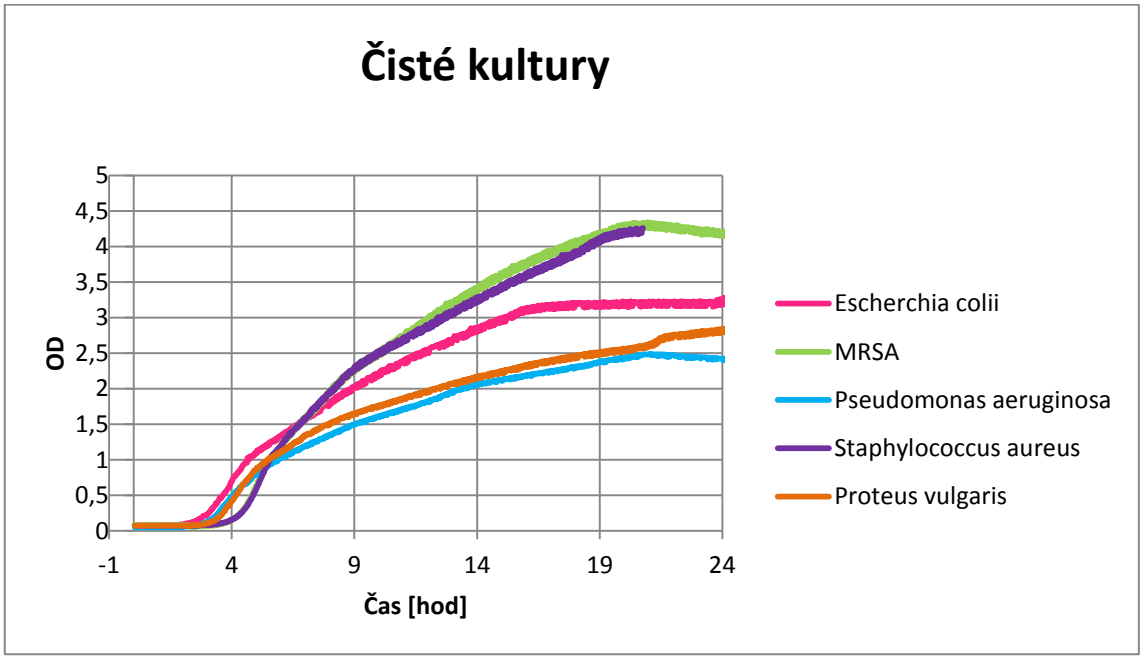
Tab. 8 - Test planktonických buněk biofilmu pro Pseudomonas aeruginosa, 5 mg antibiotik na 1 ml vzorku

Pseudomonas aeruginosa						
	A	B	C	Průměr	Pozitivita	
1	17	19	17	18	ø	BHI + Glukóza + Tetracyklin
2	KV	KV	KV	-	+++	BHI + Glukóza + Augmentin
3	700	700	700	700	++	BHI + NaCl + Tetracyklin
4	800	800	800	800	++	BHI + NaCl + Augmentin

Bioreaktor RTS-1C od firmy Biosan byl použit jako třetí způsob testování vlivu různých koncentrací antibiotik na danou mikrobiální suspenzi. Tento typ měření byl zvolen z důvodu poskytování dat o agregaci mikrobiálního růstu dané bakterie v reálném čase. Pomocí bioreaktoru je možné pozorovat, jak se mikrobiální suspenze chová v jednotlivých fázích bakteriálního růstu.

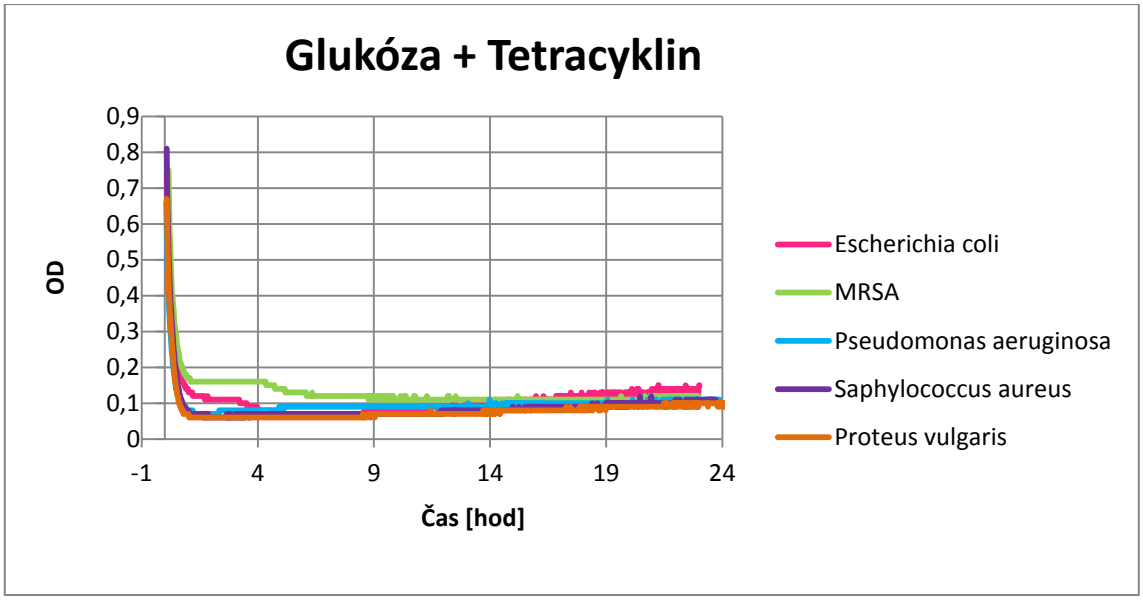
Nejprve bylo potřeba otestovat čisté bakteriální kmeny v suspenzi s BHI pro možné porovnání s následujícími testy, kde byla dávkována antibiotika. Srovnání jednotlivých

bakteriálních kmenů v suspenzi s BHI je znázorněno v grafu 1. U všech testovaných kmenů trvala první fáze růstové křivky, tedy lag fáze, po dobu přibližně čtyř hodin od začátku testování. Poté následovala fáze exponenciálního růstu bakterií, kde se již tvořily rozdíly v délce trvání mezi jednotlivými kmeny. Pro kmeny *Staphylococcus aureus, MRSA* a *Pseudomonas aeruginosa* nastal konec exponenciální fáze růstu kolem devatenácté hodiny od počátku testování. Pro *Escherichia coli* byla exponenciální fáze růstu ukončena již mezi patnáctou a šestnáctou hodinou testování. Naopak u *Proteus vulgaris* za celých 24 hodin testování nenastalo ukončení exponenciálního růstu.



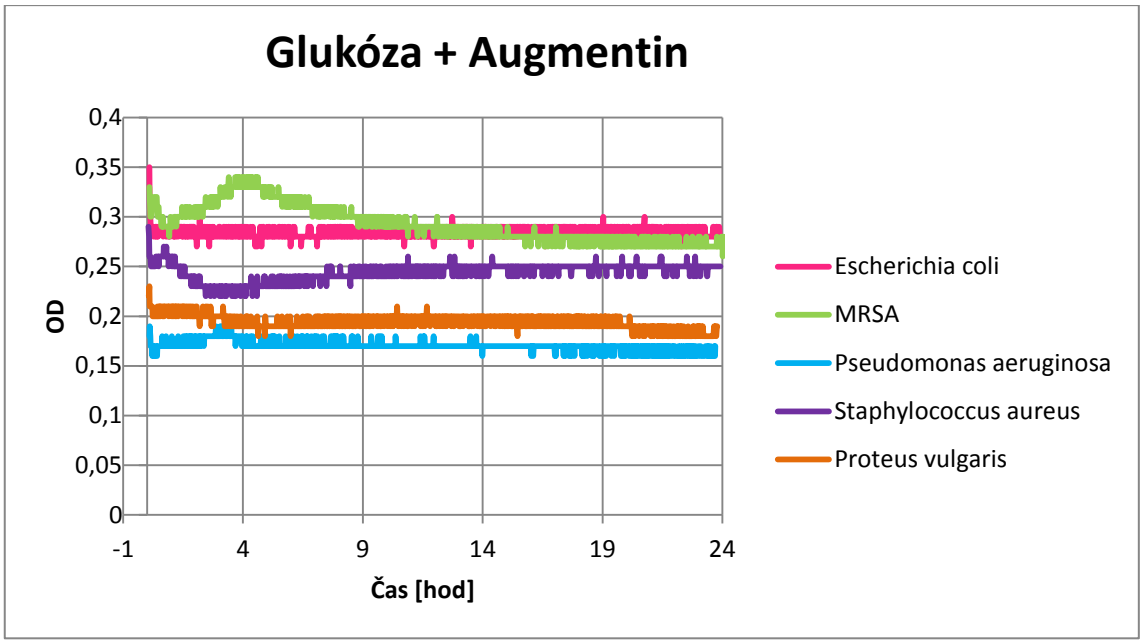
Graf 1- Biosan RTS-1C - přehled růstových křivek testovaných čistých kultur

Při dalším testování na bioreaktoru byla již dávkována antibiotika. V grafu 2 jsou zaznamenány průběhy růstu mikrobiálních suspenzí s danými testovanými kmeny, ke kterým byla dávkována glukóza a 1 mg Tetracyklinu na 1 ml vzorku. Zde byl již během první hodiny testování pozorován významný účinek antibiotika, díky kterému se ani jeden z testovaných kmenů po dobu 24 hodin nedostal do exponenciální růstové fáze.



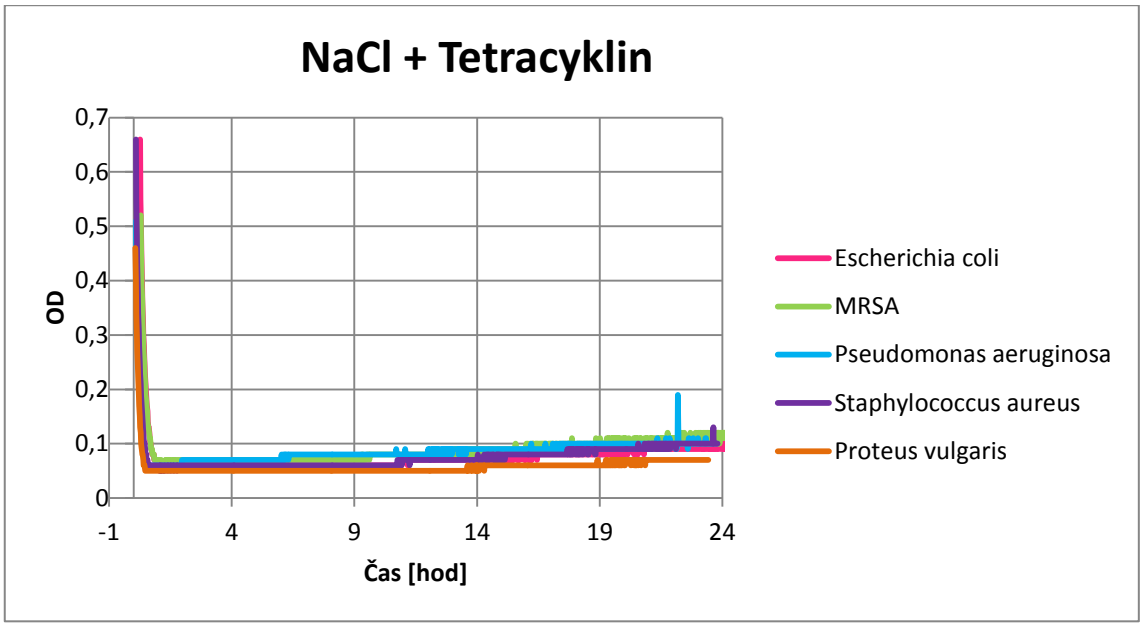
Graf 2 - Biosan RTS-1C - přehled růstových křivek testovaných bakterií s 1 g glukózy a 1 mg/ ml Tetracyklinu

V grafu 3 jsou znázorněny průběhy růstu všech testovaných bakteriálních kmenů, kde byla dávkována glukóza a 1 mg Augmentinu na 1 ml vzorku. Stejně jako v předchozím grafu i zde byly účinky antibiotika natolik silné, že potlačily růst bakteriálních kmenů. Ani zde se tedy populace bakterií nedostala do exponenciální růstové fáze.



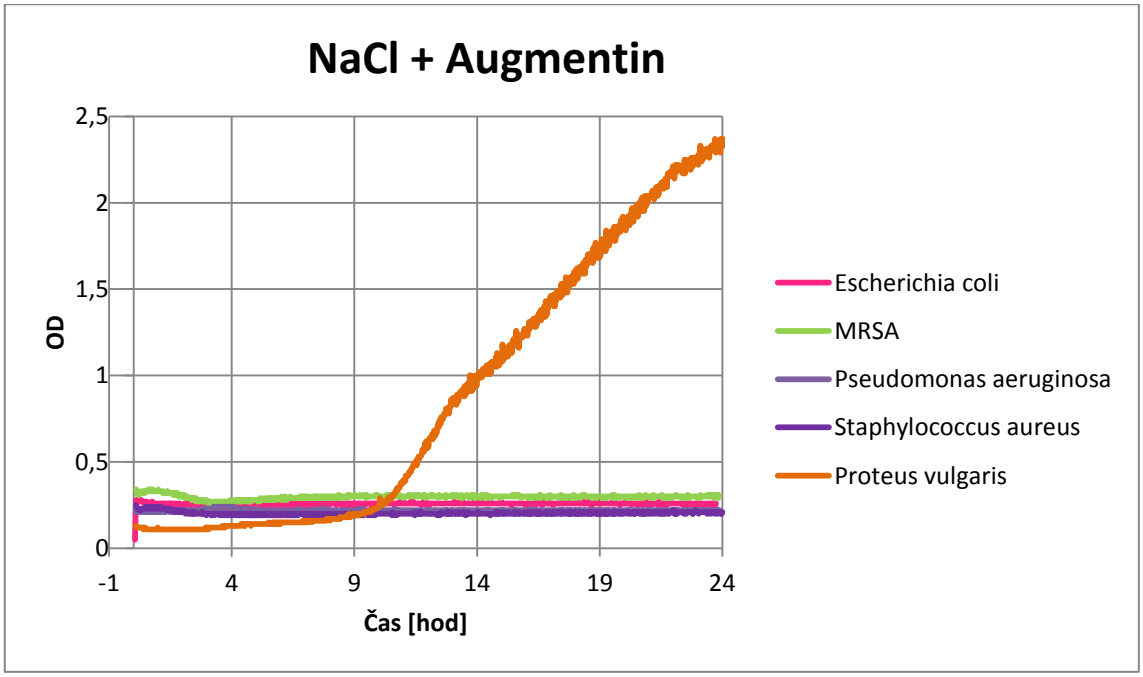
Graf 3 - Biosan RTS-1C - přehled růstových křivek testovaných bakterií s 1 g glukózy a 1 mg/ ml Augmentinu

Níže je graf 4, ve kterém jsou zaznamenány průběhy růstu všech testovaných bakteriálních kmenů s nadávkovaným NaCl a 1 mg Tetracyklinu na 1 ml vzorku. I zde byl významný vliv přidaného antibiotika, neboť se ani jeden z bakteriálních kmenů za dobu 24 hodin nedostal z klidové fáze.



Graf 4 - Biosan RTS-1C - přehled růstových křivek testovaných bakterií s 0,2 g NaCl a 1 mg/ ml Tetracyklinu

V grafu 5 jsou zaznamenány průběhy růstu všech pěti testovaných bakteriálních kmenů, do kterých byl dávkován NaCl s 1 mg Augmentinu na 1 ml celkového vzorku. Pro kmeny *Escherichia coli*, *MRSA*, *Pseudomonas aeruginosa* i *Staphylococcus aureus* byl účinek nadávkovaného antibiotika natolik významný, že se po dobu 24 hodin nedostaly z lag fáze. *Proteus vulgaris* překonal účinky nadávkovaného Augmentinu zhruba po 10 hodinách měření a po zbylou dobu měření setrval ve fázi exponenciálního růstu.



Graf 5 - Biosan RTS-1C - přehled růstových křivek testovaných bakterií s 0,2 g NaCl a 1 mg/ ml Augmentinu

Všechny testy prováděné pomocí bioreaktoru RTS-1C byly ukončeny po 24 hodinách měření, aby byly zajištěny stejné podmínky pro porovnání jednotlivých kmenů. Po ukončení každého měření byl vzorek promíchán pomocí vortexu. Z promíchaného vzorku bylo odpipetováno 1 ml, který byl následně naočkován na krevní agar sterilní očkovací kličkou. Takto připravené misky byly umístěny do inkubátoru po dobu 24 hodin při 37 °C. Další den byly na miskách s krevním agarem počítány jednotlivé narostlé kolonie. Výsledky z této části testu jsou uvedeny v tabulce 9. Data v této tabulce jsou kontrolou výsledků z průběhů růstových křivek

zaznamenaných pomocí bioreaktoru TRS-1C. Kmeny *MRSA*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* i *Pseudomonas aeruginosa* narostly na miskách v zanedbatelném počtu, což odpovídá i všem zaznamenaným průběhům růstu. *Proteus vulgaris* v obou případech dávkování Tetracyklinu měl také zanedbatelný počet jednotlivých narostlých kolonií na miskách. V případě kombinace s NaCl a Augmentinem narostl na misce s krevním agarem kompaktní výsev, což odpovídá i zaznamenané růstové křivce. Jediný případ, kdy se neshodovalo toto kontrolní testování se zaznamenaným průběhem růstové křivky, nastal v případě *Proteus vulgaris* a dávkovanou kombinací glukózy s Augmentinem. Toto měření bylo pro jistotu zopakováno se srovnatelným výsledkem, takže ho lze považovat za relevantní.

Tab. 9 - Biosan RTS-1C, přehled počtu narostlých kolonií u jednotlivých vzorků po ukončení měření

Živný bujón v množství 20 ml	Bakteriální kmen o c = 10^8 CFU/ml v množství 10 µl	+ 1 g Glukózy + 0,02 g Tetracyklinu	+ 1 g Glukózy + 0,02 g Augmentinu	+ 0,1 g NaCl + 0,02 g Tetracyklinu	+ 0,1 g NaCl + 0,02 g Augmentinu
MRSA	Kompaktní výsev	0	0	0	55
Escherichia coli	Kompaktní výsev	0	6	0	17
Staphylococcus aureus	Kompaktní výsev	0	3	0	30
Pseudomonas aeruginosa	Kompaktní výsev	0	45	0	35
Proteus vulgaris	Kompaktní výsev	2	Kompaktní výsev	1	Kompaktní výsev

Závěr

Na základě rešerše byly vybrány bakteriální kmeny *Escherichia coli, Staphylococcus aureus, MRSA, Proteus vulgaris* a *Pseudomonas aeruginosa*. Na těchto kmenech byl testován účinek antibiotik Augmentinu a Tetracyklinu v různých kombinacích s přítomností růstových faktorů glukózoy a NaCl.

Při pilotních testech byla použita koncentrace antibiotik 1 mg/ml živného média. První použitou metodou pro zjištění účinnosti antibiotika na růst mikrobiálního filmu byla modifikovaná Christensenova zkumavková metoda (2.2.1). Výsledkem testování například u kmene *Escherichia coli* byla prokázána účinnost kombinace glukóza-Augmentin nebo glukóza-Tetracyklin. Naproti tomu test planktonických buněk biofilmu (2.2.2) zjistil, že při této koncentraci měla antibiotika účinek pouze na kmen *MRSA* v kombinacích glukóza-Tetracyklin, glukóza-Augmentin a NaCl-Tetracyklin, u kterých se projevil mírný růst mikrobiálního biofilmu (Tab. 3). U všech ostatních kombinací, i u výše zmíněné *Escherichia coli*, došlo k výraznému nárůstu kompaktního výsevu, což značí příliš nízkou koncentraci antibiotik. Tento rozpor si vysvětluji rozdílným přístupem metod – u planktonického testu se sklíčko se vzorkem oplachuje pouze dvakrát destilovanou vodou, kdežto u Christensenovy metody se vzorek oplachuje dvakrát destilovanou vodou a dvakrát fyziologickým roztokem. Zatímco u planktonického testu se poté provádí stěr a kultivují se kolonie, které můžeme spočítat, u Christensenovy metody se spoléháme pouze na optickém posouzení zbarvení skla, které je subjektivní. Vyhodnocení růstových křivek na přístroji Biosan dále ukázalo, že při této koncentraci antibiotik dojde u všech kmenů ke znatelnému zpomalení růstu až stagnaci s výjimkou kombinace NaCl-Augmentin u kmene *Proteus vulgaris*, kde byla po devíti hodinách pozorována fáze exponenciálního růstu.

Vzhledem k vysokému počtu kolonií v testu planktonických buněk biofilmu byla pro další testování zvýšena koncentrace antibiotik na 5 mg/ml. Při této koncentraci bylo dosaženo hodnot, které se dají považovat za MIC u kmene MRSA pro kombinaci glukóza-Augmentin a NaCl-Augmentin, což potvrdila i Christensenova metoda. Hodnoty blížící se MIC se podařilo zjistit ještě u kmene *Escherichia coli* a *Staphylococcus aureus* – zde byla koncentrace o něco vyšší, než bylo potřeba. U zbytku vzorků byla tato koncentrace podstatně vzdálena od MIC. Ve všech případech, ale antibiotika účinkovala tak, že kmeny byly buďto slabě pozitivní, nebo

bylo antibiotikum příliš koncentrované. Výjimkou byla jediná kombinace a to glukóza-Augmentin na kmeni *Pseudomonas aeruginosa*, kdy došlo ke vzniku kompaktního výsevu.

U prováděných testů byly použity růstové faktory glukózy a NaCl. Po celkovém zhodnocení Christensenovy metody můžeme říci, že jako lepší podpůrný faktor pro tvorbu biofilmu fungoval NaCl. Ve všech případech testování bez přídavku antibiotika měl totiž vzorek s glukózou menší intenzitu zabarvení, než vzorek s NaCl. Stejně tomu bylo i u většiny testů prováděných s přídavkem antibiotika. Lepší účinnost antibiotika v kombinaci s glukózou byla opět prokázána menší intenzitou zabarvení, než kombinace s NaCl. Tento výsledek pro mne byl překvapivý, neboť se v dostupných zdrojích uvádí, že zdroj energie a uhlíku je při kultivaci bakterií zajišťován především glukózou, kdežto NaCl je používán především k udržení isotonie kultivačního prostředí.

Na základě získaných výsledků bych navrhovala pokračování v tomto testování, abychom mohli získat detailní MIC i u ostatních bakteriálních kmenů. Protože je toto testování časově a laboratorně náročné, nebylo již možné ho do mé bakalářské práce zařadit.

Seznam použité literatury

[1] SCHINDLER, Jiří. *Mikrobiologie: pro studenty zdravotnických oborů*. Praha: Grada, 2014. ISBN 978-80-247-4771-2.

[2] RULÍK, Martin, UNIVERZITA PALACKÉHO a PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA. *Mikrobiální biofilmy*. Olomouc: Univerzita Palackého v Olomouci, 2011. ISBN 978-80-244-2747-8.

[3] SATPATHY, Soumya, Sudip Kumar SEN, Smaranika PATTANAIK a Sangeeta RAUT. Review on bacterial biofilm: An universal cause of contamination. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* [online]. 2016, **7**, 56–66. ISSN 18788181. Dostupné z: doi:10.1016/j.bcab.2016.05.002

[4] VICKERY, Karen, Aniko PAJKOS a Yvonne COSSART. Removal of biofilm from endoscopes: evaluation of detergent efficiency☆. *American Journal of Infection Control* [online]. 2004, **32**(3), 170–176. ISSN 01966553. Dostupné z: doi:10.1016/j.ajic.2003.10.009

[5] BROWN, M. R., D. G. ALLISON a P. GILBERT. Resistance of bacterial biofilms to antibiotics: a growth-rate related effect? *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 1988, **22**(6), 777–780. ISSN 0305-7453 0305-7453.

[6] *Rezistence na antibiotika / Časopis Vesmír / 78, 27, 1999/1 / vesmir.cz* [online]. [vid. 2017-04-30]. Dostupné z: http://casopis.vesmir.cz/clanek/rezistence-na-antibiotika

[7] HOLÁ, Veronika. *Metody průkazu tvorby biofilmu u lékařsky významných mikrobů [online]* [online]. B.m., 2007 [vid. 2017-04-30]. Disertační práce. Masarykova univerzita, Lékařská fakulta, Brno. Dostupné z: Dostupné z WWW <http://is.muni.cz/th/77354/lf_d/>

[8] HASSAN, Afreenish, Javaid USMAN, Fatima KALEEM, Maria OMAIR, Ali KHALID a Muhammad IQBAL. Evaluation of different detection methods of biofilm formation in the clinical isolates. *The Brazilian journal of infectious diseases : an official publication of the Brazilian Society of Infectious Diseases*. 2011, **15**(4), 305–311. ISSN 1678-4391 1413-8670.

[9] BEDNÁŘ, Marek. *Lékařská mikrobiologie: bakteriologie, virologie, parazitologie*. Praha: Marvil, 1996. ISBN 978-80-238-0297-9.

[10] VENTOLA, C Lee. The Antibiotic Resistance Crisis: Part 1: Causes and Threats. *Pharmacy and Therapeutics*. 2015, **40**(4), 277–283. ISSN 1052-1372.

[11] ROSYPAL, Stanislav. *Obecná bakteriologie*. 1. Praha: Státní pedagogické nakladatelství, 1981.

[12] *EUCAST - vyšetření citlivosti k antibiotikům – disková difuzní metoda* [online]. B.m.: EUCAST. 2013 [vid. 2017-04-30]. Dostupné z: http://www.szu.cz/uploads/documents/CeM/NRLs/atb/EUCAST/Diskova_metoda/EUCAST_Disk_Manual_v.3.0_2013.pdf

[13] ŠIMŮNEK, Jan a Jiří SMOLA. *Antimikrobiální léčiva ve veterinární medicíně*. 1. vydání. Hradec Králové: Prion, 2007. ISBN 80-903188-8-6.

[14] *Augmentin Indication and Dosage* [online]. B.m.: RxList. [vid. 2017-04-19]. Dostupné z: http://www.rxlist.com/augmentin-drug/indications-dosage.htm

[15] *Příbalový leták - Augmentin* [online]. [vid. 2017-04-19]. Dostupné z: http://www.pribalovy-letak.cz/43-augmentin-1-g

[16] PSOHLAVCOVÁ, Zuzana. *Ekotoxikologický screening vybraného antibiotika* [online]. B.m.: Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, 2008 [vid. 2017-04-19]. Dostupné z: Dostupné z WWW <https://is.cuni.cz/webapps/zzp/download/120019584/?lang=en>

[17] HAMPL, František, Stanislav RÁDL a Jaroslav PALEČEK. *Farmakochemie*. 2015. ISBN 978-80-7080-875-7.

[18] LÜLLMANN, Heinz, Klaus MOHR a Martin WEHLING. *Farmakologie a toxikologie 47 tabulek*. Praha: Grada Publ., 2004. ISBN 978-80-247-0836-2.

[19] SCHINDLER, Jiří. *Ze života bakterií*. Vyd. 1. Praha: Academia, 2008. Průhledy, sv. 5. ISBN 978-80-200-1666-9.

[20] METZLER, David E. *Biochemistry: the Chemical Reactions of Living Cells*. [online]. Burlington: Elsevier, 2003 [vid. 2017-05-01]. ISBN 978-0-08-092471-7. Dostupné z: http://www.myilibrary.com?id=176867

[21] PHARMA AND BIOTECH INDUSTRY REPORTS (FIRMA). *Klinicky významné bakterie*. Praha: Triton, 2012. ISBN 978-80-7387-588-6.

[22] BECKER, K., A. W. FRIEDRICH, G. LUBRITZ, M. WEILERT, G. PETERS a C. VON EIFF. Prevalence of Genes Encoding Pyrogenic Toxin Superantigens and Exfoliative Toxins among Strains of Staphylococcus aureus Isolated from Blood and Nasal Specimens. *Journal of Clinical Microbiology* [online]. 2003, **41**(4), 1434–1439. ISSN 0095-1137. Dostupné z: doi:10.1128/JCM.41.4.1434-1439.2003

[23] PEROUTKOVÁ, Tereza. *Tvorba biofilmu a další faktory virulence u baktérií rodu Proteus [online]* [online]. B.m.: Masarykova univerzita, Přírodovědecká fakulta, Brno, 2009 [vid. 2017-06-03]. Dostupné z: Dostupné z WWW <http://theses.cz/id/nww0jo/>

[24] Augmentin (Amoxicillin Clavulanate): Side Effects, Interactions, Warning, Dosage & Uses. *RxList* [online]. [vid. 2017-04-30]. Dostupné z: http://www.rxlist.com/augmentin-drug.htm

[25] Tetracycline 87128. *Sigma-Aldrich* [online]. [vid. 2017-04-30]. Dostupné z: http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/87128

[26] SNYDER, Kendra. Genomes of Two Popular Research Strains of E. coli Sequenced. *Brookhaven National Laboratory* [online]. 2009 [vid. 2017-04-30]. Dostupné z: https://www.bnl.gov/newsroom/news.php?a=111019

[27] *Multiresistant pathogens – a self-inflicted threat?* [online]. 2014 [vid. 2017-04 30]. Dostupné z: https://www.gesundheitsindustrie-bw.de/en/article/dossier/multiresistant-pathogens-a-self-inflicted-threat/

[28] *Details - Public Health Image Library (PHIL)* [online]. [vid. 2017-04-30]. Dostupné z: https://phil.cdc.gov/phil/details_linked.asp?pid=229

[29] *Proteus vulgaris bacteria, SEM - Stock Image B220/1726 - Science Photo Library* [online]. [vid. 2017-04-30]. Dostupné z: http://www.sciencephoto.com/media/12281/view

[30] FAKULTA ZDRAVOTNICKÝCH STUDIÍ TECHNICKÉ UNIVERZITY V LIBERCI. *Metodika zpracování kvalifikačních prací 2016 (bakalářské, diplomové)*. 1. 2016. ISBN 978-80-7494-317-1

[31] BARRY, Dana M, Hideyuki KANEMATSU a SPRINGER SCIENCE+BUSINESS MEDIA. *Biofilm and materials science*. Cham: Springer International Publishing Switzerland, 2015. ISBN 978-3-319-14564-8.

[32] SCHÄBERLE, Till F a Ingrid M HACK. Overcoming the current deadlock in antibiotic research. *Trends in microbiology*. 2014, **22**(4), 165–167.

Seznam tabulek

Tab. 1 - Rozdělení antibiotik 1 Převzato a upraveno autorkou z [9] 22
Tab. 2 - Rozdělení antibiotik 2 Převzato a upraveno autorkou z [9] 23
Tab. 3 - Test planktonických buněk biofilmu pro MRSA, 1 mg antibiotik na 1 ml vzorku 47
Tab. 4 - Test planktonických buněk biofilmu pro Escherichia coli, 5 mg antibiotik na 1 ml vzorku 48
Tab. 5 - Test planktonických buněk biofilmu pro Staphylococcus aureus, 5 mg antibiotik na 1 ml vzorku 48
Tab. 6 - Test planktonických buněk biofilmu pro MRSA, 5 mg antibiotik na 1 ml vzorku 48
Tab. 7 - Test planktonických buněk biofilmu pro Proteus vulgaris, 5 mg antibiotik na 1 ml vzorku 49
Tab. 8 - Test planktonických buněk biofilmu pro Pseudomonas aeruginosa, 5 mg antibiotik na 1 ml vzorku 49
Tab. 9 - Biosan RTS-1C, přehled počtu narostlých kolonií u jednotlivých vzorků po ukončení měření 54

Seznam obrázků

Obr. 1 - Schéma vzorků při modifikované Christensenově zkumavkové metodě [Zdroj: Autorka] 33
Obr. 2 - Schématické znázornění postupu při modifikované Christensenově zkumavkové metodě [Zdroj: Autorka] 35
Obr. 3 - Vzorec pro vyhodnocování testu planktonických buněk biofilmu [Zdroj: Autorka] 37
Obr. 4 - RTS-1C Personal Bioreactor [Zdroj: Autorka] 38
Obr. 5 - Schéma RTS-1C při měření optické denzity [Zdroj: Autorka] 38
Obr. 6 - Christensenova metoda pro Escherichia coli, 1 mg antibiotika na 1 ml vzorku. [Zdroj: Autorka] 40
Obr. 7 - Christensenova metoda pro Staphylococcus aureus, 1 mg antibiotika na 1 ml vzorku. [Zdroj: Autorka] 41
Obr. 8 - Christensenova metoda pro MRSA, 1 mg antibiotika na 1 ml vzorku. [Zdroj: Autorka] 41
Obr. 9 - Christensenova metoda pro Pseudomonas aeruginosa, 1 mg antibiotika na 1 ml vzorku. [Zdroj: Autorka] 42
Obr. 10 - Christensenova metoda pro Proteus vulgaris, 1 mg antibiotika na 1 ml vzorku. [Zdroj: Autorka] 43
Obr. 11 - Christensenova metoda pro Escherichia coli, 5 mg antibiotika na 1 ml vzorku. [Zdroj: Autorka] 44
Obr. 12 - Christensenova metoda pro Staphylococcus aureus, 5 mg antibiotika na 1 ml vzorku. [Zdroj: Autorka] 44
Obr. 13 - Christensenova metoda pro MRSA, 5 mg antibiotika na 1 ml vzorku. [Zdroj: Autorka] 45
Obr. 14 - Christensenova metoda pro Proteus vulgaris, 5 mg antibiotika na 1 ml vzorku. [Zdroj: Autorka] 46
Obr. 15 - Christensenova metoda pro Pseudomonas aeruginosa, 5 mg antibiotika na 1 ml vzorku. [Zdroj: Autorka] 46
Obr. 16 - Vývoj rezistencí antibiotik v čase [10] 64
Obr. 18 - Amoxicillin [24] 65
Obr. 19 - Kyselina klavulanová [24] 65
Obr. 20 - Tetracyklin [25] 65
Obr. 21 - Průřez prokaryotní buňkou. Převzato a upraveno z [10] 66
Obr. 22 - Růstová křivka bakterií [Zdroj: Autorka] 66
Obr. 23 - Schéma vývoje rezistence MRSA [11] 66
Obr. 24 - Použité bakteriální kmeny [26], [27], [28], [29] 67

Seznam grafů

Graf 1- Biosan RTS-1C - přehled růstových křivek testovaných čistých kultur 50
Graf 2 - Biosan RTS-1C - přehled růstových křivek testovaných bakterií s 1 g glukózy a 1 mg/ ml Tetracyklinu..... 51
Graf 3 - Biosan RTS-1C - přehled růstových křivek testovaných bakterií s 1 g glukózy a 1 mg/ ml Augmentinu 52
Graf 4 - Biosan RTS-1C - přehled růstových křivek testovaných bakterií s 0,2 g NaCl a 1 mg/ ml Tetracyklinu..... 52
Graf 5 - Biosan RTS-1C - přehled růstových křivek testovaných bakterií s 0,2 g NaCl a 1 mg/ ml Augmentinu 53

Seznam příloh

Příloha A - Vývoj rezistencí antibiotik v čase

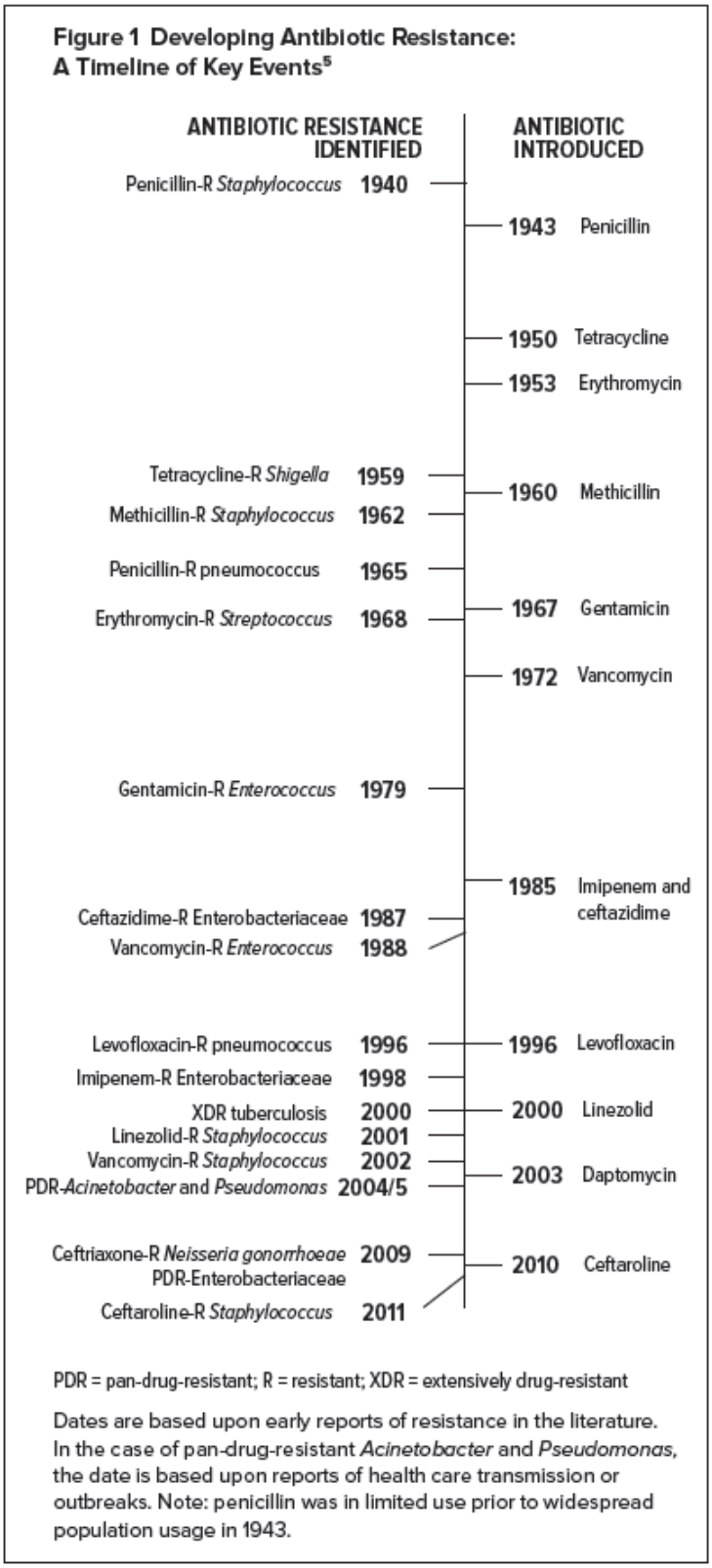
Příloha B - Chemické strukturní vzorce antibiotik

Příloha C - Prokariotická buňka, růstová křivka bakterií a vývoj rezistence MRSA

Příloha D - Použité bakteriální kmeny

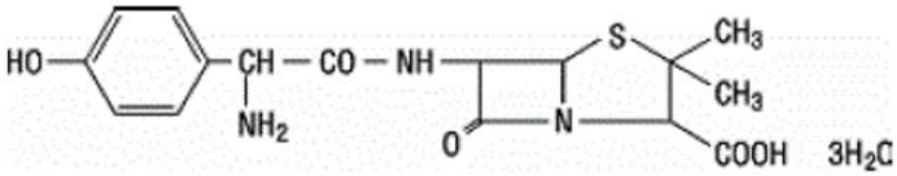
Příloha E – Obsah přiloženého CD

Příloha A Vývoj rezistencí antibiotik v čase

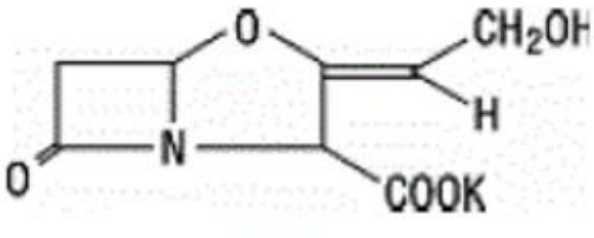


Obr. 16 - Vývoj rezistencí antibiotik v čase [10]

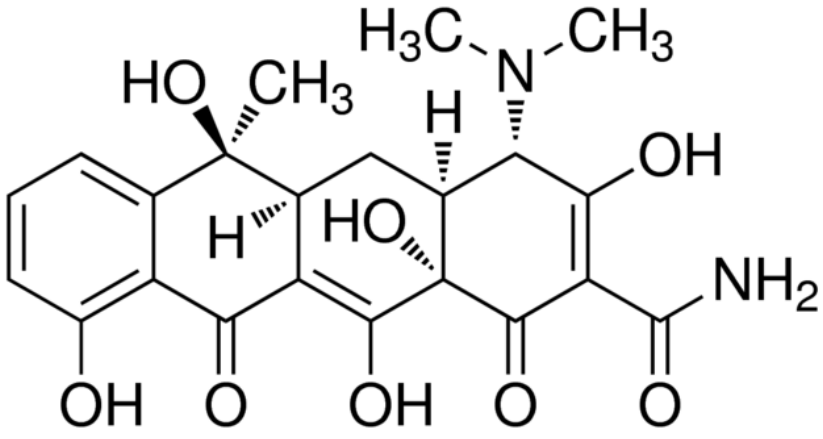
Příloha B Chemické strukturní vzorce antibiotik



Obr. 17 - Amoxicillin [24]

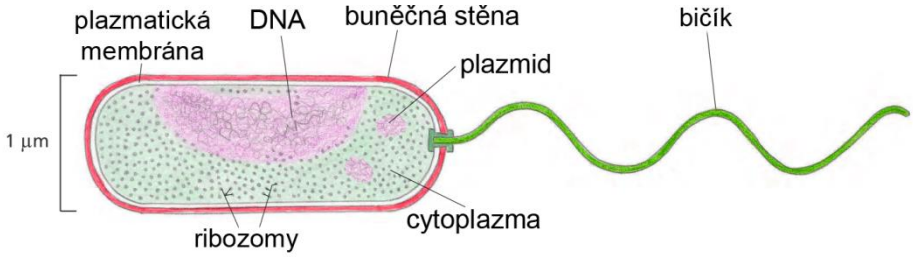


Obr. 18 - Kyselina klavulanová [24]

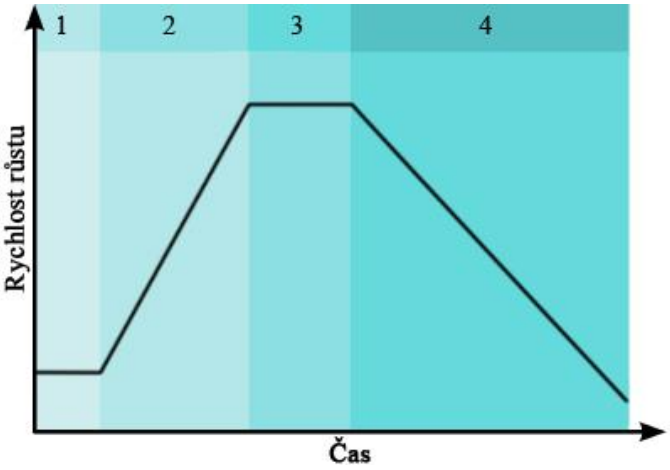


Obr. 19 - Tetracyklin [25]

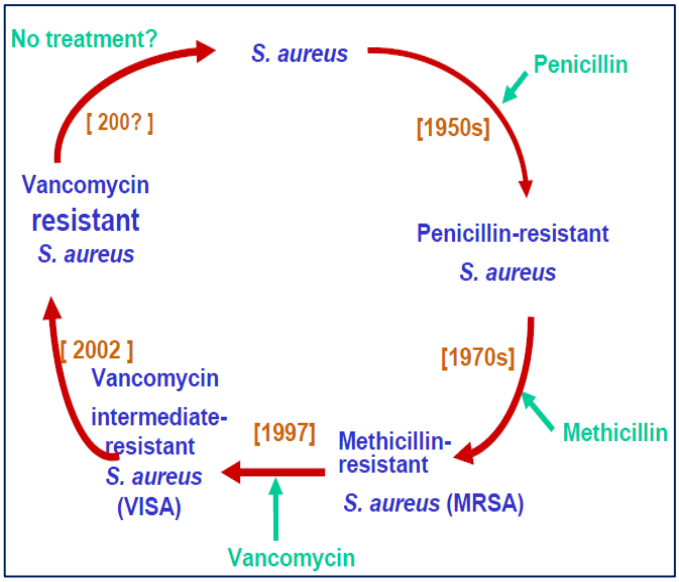
Příloha C Prokariotická buňka, růstová křivka bakterií a vývoj rezistence MRSA



Obr. 20 - Průřez prokaryotní buňkou. Převzato a upraveno z [10]

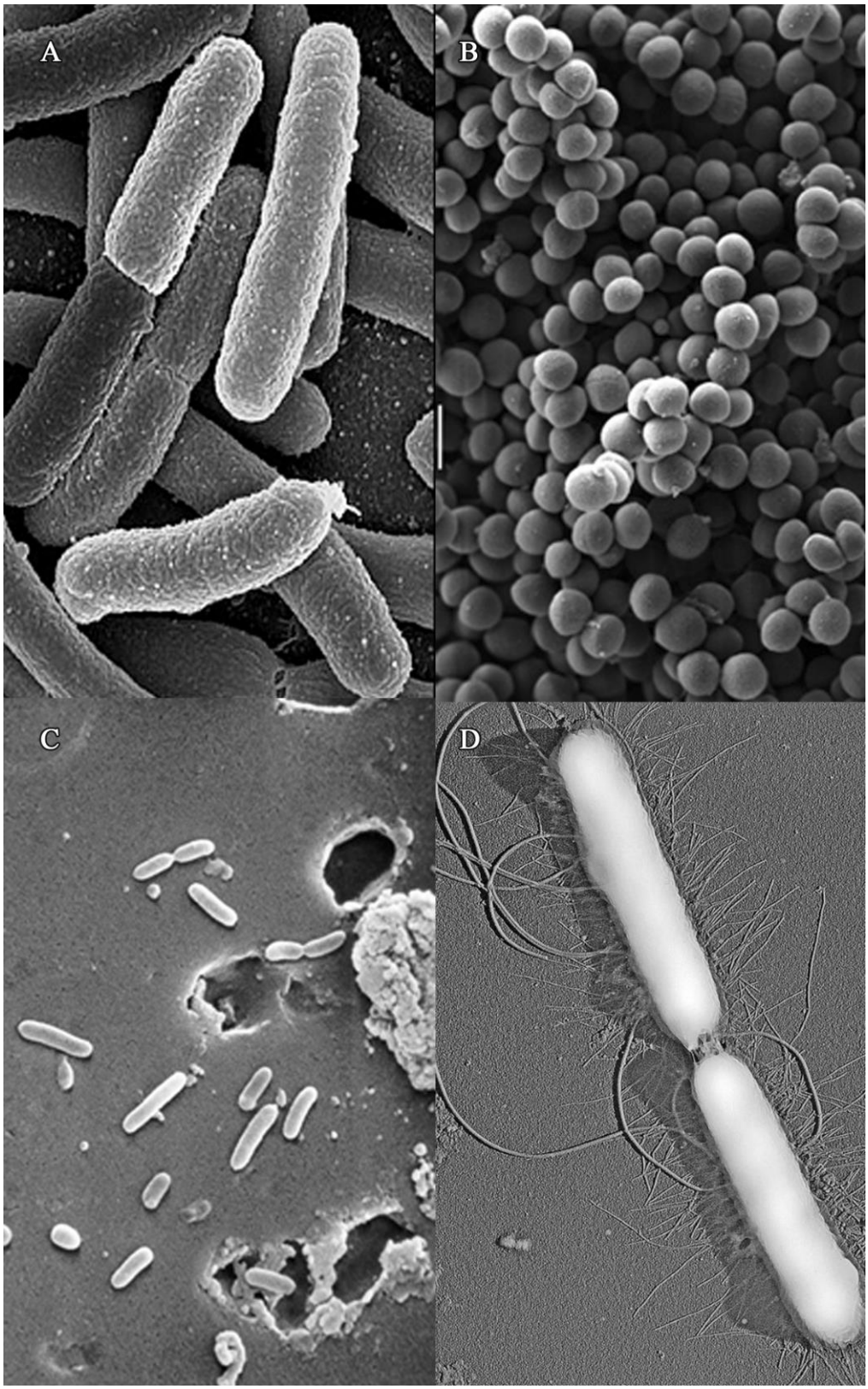


Obr. 21 - Růstová křivka bakterií [Zdroj: Autorka]



Obr. 22 - Schéma vývoje rezistence MRSA [11]

Příloha D Použité bakteriální kmeny



Obr. 23 - Použité bakteriální kmeny [26], [27], [28], [29]

Příloha E – Obsah přiloženého CD

- Text bakalářské práce
    - bakalarska_prace_2017_Petra_Šubrtová.pdf
- Tabulky a grafy
    - Bakterie na miskách po stěrech.xlsx
    - Biosan grafy.xlsx