

ZÁPADOČESKÁ UNIVERZITA V PLZNI
FAKULTA ZDRAVOTNICKÝCH STUDIÍ

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

2020

Barbora Učíková

FAKULTA ZDRAVOTNICKÝCH STUDIÍ

Studijní program: Specializace ve zdravotnictví B5345

Barbora Učíková

Studijní obor: Zdravotní laborant 5345R020

**TESTOVÁNÍ ÚČINNOSTI ANTIBIOTIK A PŘÍRODNÍCH
LÁTEK PROTI BAKTERIÍM *IN VITRO***

Bakalářská práce

Vedoucí práce: doc. RNDr. Eva Kmoníčková CSc.

PLZEŇ 2020

ZÁPADOČESKÁ UNIVERZITA V PLZNI

Fakulta zdravotnických studií

Akademický rok: 2019/2020

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Barbora UČÍKOVÁ**
Osobní číslo: **Z17B0102P**
Studijní program: **B5345 Specializace ve zdravotnictví**
Studijní obor: **Zdravotní laborant**
Téma práce: **Testování účinnosti antibiotik a přírodních látek proti bakteriím in vitro**
Zadávající katedra: **Katedra záchranářství, diagnostických oborů a veřejného zdravotnictví**

Zásady pro vypracování

- Zpracovat seznam odborné literatury na vybrané téma
- Stanovit cíl kvalifikační práce
- Zpracovat teoretickou a praktickou část práce dle požadavků FZS
- Popsat metodiku praktické části
- Vypracovat diskuzi a závěr kvalifikační práce
- Dodržet formální úpravu kvalifikační práce dle požadavků FZS
- Dodržet citační normu

Rozsah bakalářské práce:
Rozsah grafických prací:
Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam doporučené literatury:

- PHARMA-REPORTS. Klinicky významné bakterie. Přeložil JULÁK, Jaroslav. Praha: Triton, 2012. 123 s. ISBN: 978-80-7387-588-6
- PŘÍBORSKÝ, Jan. Peniciliny: farmakologie a klinická farmakologie. Praha: Maxdorf, 2004. ISBN 80-7345-026-7.
- VOTAVA, Miroslav, a kol. Lékařská mikrobiologie speciální. Brno: NEPTUN, 2003. str. 495. ISBN 80-902896-6-5.
- JAHODÁŘ, Luděk. Farmakobotanika 3. uprav. a dopl. vyd. Praha: Karolinum, 2011. ISBN 978-80-246-2015-2.
- BARNES, Joanne, Linda A Anderson a J David Phillipson. Herbal Medicines. 2. ed. London: Pharmaceutical Press. ISBN 0-85369-474-5.

Vedoucí bakalářské práce: **Doc. RNDr. Eva Kmoníčková, CSc.**

Datum zadání bakalářské práce: **18. června 2019**

Termín odevzdání bakalářské práce: **31. března 2020**

PhDr. Lukáš Štich
děkan



Mgr. Stanislava Reichertová
vedoucí katedry

V Plzni dne 31. ledna 2020

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně a všechny použité prameny jsem uvedla v seznamu použitých zdrojů.

V Plzni dne 28. 4. 2020.

.....

vlastnoruční podpis

ABSTRAKT

Příjmení a jméno: Učíková Barbora

Katedra: Katedra záchranářství, diagnostických oborů a veřejného zdravotnictví

Název práce: Testování účinnosti antibiotik a přírodních látek proti bakteriím *in vitro*

Vedoucí práce: doc. RNDr. Kmoníčková Eva CSc.

Počet stran – číslované: 62

Počet stran – nečíslované: 49

Počet příloh: 8

Počet titulů použité literatury: 55

Klíčová slova: Bakterie, antibakteriální účinky, antibiotika, rostlinné extrakty, polyfenoly

Souhrn:

Léčba infekčních onemocnění známými antibiotiky se stává čím dál více problematickou a globální kvůli rostoucí antibakteriální rezistenci a nedostatku účinných antibiotik. Cílem práce bylo prokázat antibakteriální působení *in vitro* vybraných rostlinných extraktů proti některým patogenním zástupcům Gram-pozitivních a Gram-negativních bakterií. Dále byl zkoumán vztah mezi účinkem tinktur a obsahem polyfenolů a flavonoidů v působení na bakterie a pro srovnání s účinky běžně užívaných antibiotik.

Citlivost bakterií se testovala difuzní metodou na agaru a mikrodiluční metodou v mikrotitrační destičce s použitím bujonu. V rostlinných tinkturách byly stanoveny celkové koncentrace polyfenolů a flavonoidů.

Největší inhibiční účinek byl zaznamenán u extraktů z květů hřebíčkovce vonného, listů medvědice lékařské a natě tymiánu obecného. Naopak žádný nebo jen minimální efekt byl pozorován u tinktur ze semen grapefruitu, plodů lichořeřišnice větší, oddenku zázvorovníku lékařského a cibule česneku setého. Výsledky antibakteriální účinnosti korelují s obsahem polyfenolů a flavonoidů v daných tinkturách.

ABSTRACT

Surname and name: Učíková Barbora

Department: Department of Rescue Services and Technical Fields

Title of thesis: *In vitro* evaluation of antibiotics and extracts of natural compounds on bacterial growth

Consultant: doc. RNDr. Kmoníčková Eva CSc.

Number of pages – numbered: 62

Number of pages – unnumbered: 49

Number of appendices: 8

Number of literature items used: 55

Keywords: Bacteria, antibacterial effects, antibiotics, plant extracts, polyphenols

Summary:

The treatment of infectious diseases with known antibiotic has become more problematic and global because of increasing antibacterial resistance and lack of proper antibiotics. The aim of the work was to demonstrate the *in vitro* antibacterial effects of selected plant extracts against some pathogenic specimens of Gram-positive and Gram-negative bacteria. Furthermore, possible relationships between the effects of the plant tinctures and the their content of polyphenols and flavonoids were searched, with regard to correlations between their effects and the effects of common antibiotics.

The sensitivity of the bacteria was tested using a diffuse method on agar and a microdilution method in a microtiter plate with broth. Total concentrations of polyphenols and flavonoids in herbal tinctures were analyzed.

The highest effect was observed in extracts of clove flower buds, bearberry leaves and herb of thyme. On the contrary, zero or minimal effect was observed in using tinctures of grapefruit seeds, garden nasturtium seeds, ginger rhizome and the bulb of garlic. The results show a correlation between antibacterial effects and concentrations of polyphenols and flavonoids in appropriate tinctures.

PŘEDMLUVA

V dnešní době představuje významným problémem zvyšující se výskyt rezistentních a multirezistentních kmenů patogenních bakterií. Sekundární metabolity některých rostlin mohou mít antimikrobiální účinek. Prokázání účinnosti by mohlo v budoucnu vést k vývoji nových léků. Cílem práce je poukázat na tuto možnost a zároveň informovat veřejnost o antibiotickém působení rostlinných extraktů *in vitro*.

Poděkování

Děkuji paní doc. RNDr. Evě Kmoníčkové CSc. za odborné vedení práce, poskytování rad a materiálních podkladů. Dále děkuji paní Ireně Lízalové, panu Ing. Bc. Tomáši Vlasovi, panu RNDr. Karlu Fajfrlíkovi Ph.D. a dalším pracovníkům Ústavu mikrobiologie FN Plzeň za poskytování cenných odborných rad. Kvalifikační práce byla sponzorována rostlinnými tinkturami od pana Ing. Pavla Kadaňky a jeho firmy Bylinné kapky, s.r.o.

OBSAH

SEZNAM OBRÁZKŮ	11
SEZNAM TABULEK	13
SEZNAM ZKRATEK	14
ÚVOD.....	17
TEORETICKÁ ČÁST	18
1 BAKTERIE.....	19
1.1 Stafylokoky	19
1.1.1 <i>Staphylococcus aureus</i>	20
1.1.2 <i>Staphylococcus epidermidis</i>	22
1.2 Streptokoky	22
1.2.1 <i>Streptococcus pyogenes</i>	23
1.2.2 <i>Streptococcus agalactiae</i>	24
1.2.3 <i>Streptococcus pneumoniae</i>	24
1.3 <i>Enterococcus</i>	26
1.4 <i>Enterobacteriaceae</i>	27
1.4.1 <i>Escherichia</i>	28
1.4.2 <i>Klebsiella</i>	29
1.4.3 <i>Proteus</i>	30
1.5 <i>Pseudomonas</i>	30
1.5.1 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	30
2 ANTIMIKROBIÁLNÍ LÁTKY	32
2.1 Mechanismy účinku antimikrobiálních látek.....	32
2.1.1 Inhibice syntézy buněčné stěny	32
2.1.2 Inhibice proteosyntézy.....	33
2.1.3 Inhibice syntézy nukleových kyselin.....	33
2.1.4 Inhibice metabolismu esenciálních látek.....	33
2.1.5 Inhibice funkce cytoplazmatické membrány.....	33
2.2 Běžně používaná antibiotika proti vybraným bakteriálním kmenům	33
2.2.1 Beta-laktamy.....	33
2.2.2 Glykopeptidy	35
2.2.3 Aminoglykosidy	36
2.2.4 Tetracykliny.....	36
2.2.5 Chloramfenikoly	37
2.2.6 Makrolidy	37
2.2.7 Linkosamidy	38

2.2.8	Oxazolidinony	38
2.2.9	Chinolony a fluorochinolony.....	38
2.2.10	Rifamyciny	39
2.2.11	Sulfonamidy	39
2.2.12	Trimethoprim a kotrimoxazol.....	40
2.2.13	Lipopeptidy.....	40
2.2.14	Polymyxiny.....	40
2.2.15	Nitrofurantoin	40
2.3	Vznik a mechanismy rezistence.....	41
2.4	Metody určení citlivosti bakterií na antimikrobiální látky	42
2.4.1	Diskový difuzní test.....	42
2.4.2	Minimální inhibiční koncentrace.....	42
2.4.3	Minimální baktericidní koncentrace.....	43
3	VYBRANÉ ROSTLINY A JEJICH ANTIMIKROBIÁLNÍ LÁTKY	44
3.1	Bergenie tučnolistá (<i>Bergenia crassifolia</i> L.).....	45
3.2	Česnek setý (<i>Allium sativum</i> L.)	45
3.3	Grapefruit (<i>Citrus paradisi</i> Macf.)	46
3.4	Hřebíčkovec vonný (<i>Syzygium aromaticum</i> L.)	47
3.5	Jitrocel kopinatý (<i>Plantago lanceolata</i> L.).....	48
3.6	Kalost luční (<i>Geranium pratense</i> L.).....	48
3.7	Lichořeřišnice větší (<i>Tropaeolum majus</i> L.).....	49
3.8	Medvědice lékařská (<i>Arctostaphylos uva-ursi</i> L.).....	50
3.9	Tymián obecný (<i>Thymus vulgaris</i> L.).....	51
3.10	Zázvorovník lékařský (<i>Zingiber officinale</i> Rosc.)	52
	PRAKTICKÁ ČÁST	53
4	CÍL A ÚKOLY PRÁCE	53
5	VÝZKUMNÉ PROBLÉMY/OTÁZKY	54
6	CHARAKTERISTIKA SLEDOVANÉHO SOUBORU	55
6.1	Bakterie.....	55
6.2	Rostlinné tinktury	55
6.3	Antibiotika	56
7	METODIKA PRÁCE	57
7.1	Difuzní test.....	57
7.2	Zjištění minimální inhibiční koncentrace	57
7.3	Zjištění minimální baktericidní koncentrace	58
7.4	Stanovení koncentrace polyfenolů v rostlinných extraktech	58
7.5	Stanovení koncentrace flavonoidů v rostlinných extraktech	59

8	ANALÝZA A INTERPRETACE VÝSLEDKŮ	60
8.1	Výsledky difuzních testů	60
8.2	Výsledky minimální inhibiční a minimální baktericidní koncentrace	65
8.3	Výsledky stanovení koncentrace polyfenolů v tinkturách	71
8.4	Výsledky stanovení koncentrace flavonoidů v tinkturách	72
	DISKUZE	73
	ZÁVĚR.....	78
	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	79
	SEZNAM PŘÍLOH	87
	PŘÍLOHY	88
	Příloha A – Difuzní testy	88
	Příloha B – Kompletní výsledky difuzních testů.....	94
	Příloha C – Minimální inhibiční a minimální baktericidní koncentrace	99
	Příloha D – Přepočítání koncentrace suchého extraktu	101
	Příloha E – Přepočítání koncentrací pro stanovení MIC a MBC.....	102
	Příloha F – Stanovení koncentrace polyfenolů v tinkturách	104
	Příloha G – Stanovení koncentrace flavonoidů v tinkturách.....	107
	Příloha H – Povolení sběru informací ve FN Plzeň	110

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1 Schéma penicilinů	34
Obrázek 2 Schéma cefalosporinů	34
Obrázek 3 Schéma karbapenemů	34
Obrázek 4 Schéma 2-deoxystreptaminu	36
Obrázek 5 Základní schéma tetracyklinů	37
Obrázek 6 Chloramfenikol s nitrobenzenovým jádrem.....	37
Obrázek 7 Kyselina nalidixová.....	39
Obrázek 8 Schéma sulfonamidu	39
Obrázek 9 Kyselina para-aminobenzoová	39
Obrázek 10 Nitrofurantoin.....	41
Obrázek 11 Bergenin	45
Obrázek 12 Arbutin	45
Obrázek 13 Alliin	46
Obrázek 14 Allicin.....	46
Obrázek 15 Naringenin.....	47
Obrázek 16 Eugenol	48
Obrázek 17 Aukubin.....	48
Obrázek 18 Kyselina skořicová	48
Obrázek 19 Geraniol.....	49
Obrázek 20 Citronelol	49
Obrázek 21 Glukotropeolin	50
Obrázek 22 Benzyliothiokyanát	50
Obrázek 23 Hydrochinon.....	51
Obrázek 24 <i>p</i> -methoxyfenol	51
Obrázek 25 Thymol	52
Obrázek 26 Karvakrol	52
Obrázek 27 6-gingerol.....	52
Obrázek 28 Zingeron.....	52
Obrázek 29 <i>S. epidermidis</i> a běžné ATB disky	88
Obrázek 30 <i>S. epidermidis</i> a ethanolové tinktury	88
Obrázek 31 <i>S. epidermidis</i> a lihoglycerolové tinktury	89
Obrázek 32 MRSA a ethanolové tinktury	89

Obrázek 33 MRSA a lihoglycerolové tinktury	90
Obrázek 34 <i>P. mirabilis</i> a ethanolové tinktury	90
Obrázek 35 <i>P. mirabilis</i> a lihoglycerolové tinktury	91
Obrázek 36 <i>K. pneumoniae</i> a lihoglycerolové tinktury	91
Obrázek 37 <i>P. aeruginosa</i> a lihoglycerolové tinktury	92
Obrázek 38 <i>S. pneumoniae</i> a ethanolové tinktury	92
Obrázek 39 <i>S. pneumoniae</i> a lihoglycerolové tinktury	93
Obrázek 40 <i>S. pneumoniae</i> a hřebíčková tinktura	93
Obrázek 41 MIC rostlinných tinktur použitých proti <i>S. epidermidis</i>	99
Obrázek 42 MBC rostlinných tinktur použitých proti MRSA	100
Obrázek 43 MBC rostlinných tinktur použitých proti <i>P. mirabilis</i>	100
Obrázek 44 Stanovení koncentrace polyfenolů v tinkturách	104
Obrázek 45 – graf 1: Kalibrační křivka kyseliny gallové pro stanovení koncentrace polyfenolů v rostlinných tinkturách	105
Obrázek 46 Stanovení koncentrace flavonoidů v tinkturách	107
Obrázek 47 – graf 2: Kalibrační křivka katechinu pro stanovení koncentrace flavonoidů v rostlinných tinkturách	108

SEZNAM TABULEK

Tabulka č. 1. Výsledky difuzních testů u stafylokoků	60
Tabulka č. 2. Výsledky difuzních testů u streptokoků	61
Tabulka č. 3. Výsledky difuzních testů u enterokoků	62
Tabulka č. 4. Výsledky difuzních testů u čeledi <i>Enterobacteriaceae</i>	63
Tabulka č. 5. Výsledky difuzních testů u pseudomonád	64
Tabulka č. 6. Výsledky MIC a MBC u stafylokoků	66
Tabulka č. 7. Výsledky MIC a MBC u streptokoků	67
Tabulka č. 8. Výsledky MIC a MBC u enterokoků	68
Tabulka č. 9. Výsledky MIC a MBC u <i>Enterobacteriaceae</i>	69
Tabulka č. 10. Výsledky MIC a MBC u pseudomonád	70
Tabulka č. 11. Koncentrace polyfenolů v koncentrovaných tinkturách	71
Tabulka č. 12. Koncentrace flavonoidů v koncentrovaných tinkturách	72
Tabulka B č. 13. Kompletní výsledky difuzních testů u stafylokoků	94
Tabulka B č. 14. Kompletní výsledky difuzních testů u streptokoků	95
Tabulka B č. 15. Kompletní výsledky difuzních testů u enterokoků	96
Tabulka B č. 16. Kompletní výsledky difuzních testů u <i>Enterobacteriaceae</i>	97
Tabulka B č. 17. Kompletní výsledky difuzních testů u pseudomonád	98
Tabulka D č. 18. Přepočet koncentrace sušiny extraktu na g/L	101
Tabulka E č. 19. Koncentrace sušiny extraktu v roztocích tinktur s bujonem pro stanovení MIC a MBC	102
Tabulka E č. 20. Koncentrace polyfenolů v roztocích tinktur s bujonem pro stanovení MIC a MBC	102
Tabulka E č. 21. Koncentrace flavonoidů v roztocích tinktur s bujonem pro stanovení MIC a MBC	103
Tabulka F č. 22. Absorbance roztoků kyseliny gallové	105
Tabulka F č. 23. Výpočet koncentrace polyfenolů v ethanolových tinkturách	106
Tabulka F č. 24. Výpočet koncentrace polyfenolů v lihoglycerolových tinkturách	106
Tabulka G č. 25. Absorbance roztoků katechinu	108
Tabulka G č. 26. Výpočet koncentrace flavonoidů v ethanolových tinkturách	109
Tabulka G č. 27. Výpočet koncentrace flavonoidů v ethanolových tinkturách	109

SEZNAM ZKRATEK

AML.....	Antimikrobiální látky
AmpC.....	Jeden z typů beta-laktamáz tvořený Gram-negativními bakteriemi
ATB	Antibiotika
ATP	Adenosintrifosfát
CAMP faktor.....	Christie Atkinson Munch-Petersen faktor, enzym <i>S. agalactiae</i>
CRP	C reaktivní protein
DNA.....	Kyselina deoxyribonukleová
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>E. faecalis</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>
<i>E. faecium</i>	<i>Enterococcus faecium</i>
EHEC	Enterohemoragické <i>E. coli</i>
EIEC.....	Enteroinvazivní <i>E. coli</i>
ENDO	Endův agar
EPEC.....	Enteropatogenní <i>E. coli</i>
ESBL.....	Beta-laktamázy širokého spektra (z angl. <i>extended spectrum beta-lactamase</i>)
Esp	<i>Enterococcal surface protein</i> , povrchový protein enterokoků
ETEC	Enterotoxigenní <i>E. coli</i>
Fbe	Fibrinogen vázající protein
fmet-tRNA	Formylmethionyl-transferová RNA

GISA	<i>S. aureus</i> intermediárně rezistentní k vankomycinu (z angl. <i>glycopeptide-intermediate resistant S. aureus</i>)
GRSA.....	Vankomycin-rezistentní <i>S. aureus</i>
IL-2	Interleukin-2
<i>K. pneumoniae</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
KA.....	Krevní agar
kbp	Kilobaze (z angl. <i>kilobase pair</i>)
KPC.....	Karbapenemázy
LAP.....	Leucinaminopeptidáza
MBC.....	Minimální baktericidní koncentraci
MBL.....	Metalo beta-laktamázy
MexAB-OprM	Jedna z efluxních pump u Gram-negativních bakterií
MH.....	Mueller-Hinton agar
MIC	Minimální inhibiční koncentrace
MLS rezistence	Makrolid-linkosamid-streptogramin rezistence
mRNA.....	Messenger RNA, mediátorová RNA
Mrs(A)	Jedna z efluxních pump u MRSA
MRSA	Methicilin-rezistentní <i>S. aureus</i>
<i>P. aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
<i>P. mirabilis</i>	<i>Proteus mirabilis</i>
<i>P. vulgaris</i>	<i>Proteus vulgaris</i>
PABA.....	Kyselina <i>para</i> -aminobenzoová
PBP	Penicilin vázající proteiny (z angl. <i>penicillin-binding proteins</i>)

PBP2a	Penicilin vázající protein (z angl. <i>penicillin-binding protein 2a</i>)
PIA	Polysacharidový intracelulární antigen
PS/A	Polysacharid-adhesin
PYR.....	Pyrrolidonylarylamidáza
RNA.....	Ribonukleová kyselina
rRNA.....	Ribozomální RNA
<i>S. agalactiae</i>	<i>Streptococcus agalactiae</i>
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i>
<i>S. epidermidis</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
<i>S. pneumoniae</i>	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
<i>S. pyogenes</i>	<i>Streptococcus pyogenes</i>
TEM-1	Nejběžnější beta laktamáza zprostředkovaná geny na plasmidu, vyskytuje se u některých Gram-negativních bakterií
Tet(K).....	Jedna z efluxních pump u <i>E. coli</i>
THFA	Kyselina tetrahydrofolová (forma kyseliny listové)
tRNA	Transferová RNA
TSST-1.....	Toxin syndromu toxického šoku 1
VISA	<i>S. aureus</i> intermediárně rezistentní k vankomycinu (z angl. <i>glycopeptide-intermediate resistant S. aureus</i>)
VRE	Vankomycin-rezistentní enterokoky
VRSA.....	Vankomycin-rezistentní <i>S. aureus</i>

ÚVOD

Medicínský potenciál látek přírodního původu je nezpochybnitelný. Jako typické příklady lze uvést léčiva široce užívaná v lékařské praxi jako kardioaktivní glykosid digoxin z náprstníku vlnatého (*Digitalis lanata*) při léčbě srdečního selhání nebo seskviterpenový lakton artemisinin obsažený v silici pelyňku ročního (*Artemisia annua*) pro léčbu malárie. (JAHODÁŘ, 2011). Mezi léčiva přírodního původu patří i antibiotika produkovaná plísněmi nebo bakteriemi. (BUHNER, 2014). Od objevu penicilinu Alexanderem Flemिंगem je to už více než 90 let. Od té doby se objevilo mnoho dalších antibakteriálních látek, ale bakterie s vývojem rezistence k těmto látkám nezůstávají pozadu. (RITTEROVÁ, 2018). Právě z důvodu rezistence je stále větším problémem léčba infekčních chorob vyvolaných bakteriemi. I v našich experimentech byly nalezeny rezistentní kmeny bakterií, u druhu *S. aureus* bylo úmyslně vybráno pro experimenty pět kmenů citlivých k methicilinu a pět kmenů rezistentních (MRSA).

Biologicky aktivní látky v rostlinách mohou působit proti bakteriím, virům, kvasinkám a plísním. Kromě zmíněného antimikrobiálního účinku mohou stimulovat imunitní systém. (BARNES, a další, 2002) (DITTRICH, a další, 1996) (RITTEROVÁ, 2018). V posledním desetiletí se výzkum zaměřuje na hledání přírodních látek s antibakteriální aktivitou. (BUHNER, 2014). Problémem širšího využití látek přírodního původu pro účely farmakoterapie zůstává jejich často nesnadná izolace a stanovení obsahu v daném rostlinném materiálu. Koncentrace jednotlivých chemických látek v dané části rostliny závisí na mnoha faktorech, jako je místo a způsob pěstování, klimatické podmínky a období sběru.

TEORETICKÁ ČÁST

1 BAKTERIE

Je známých hodně druhů bakterií, jsou všudypřítomné, ale jen některé z nich jsou patogenní. Taxonomicky se řadí se mezi prokaryota, nemají pravé jádro. Jejich genetická informace není ohraničena membránou. Tvoří ji dvouvláknová molekula DNA uspořádaná do kruhového chromozomu, tzv. nukleoid. (BEDNÁŘ, a kol., 1996; GOERING, a kol., 2016; PHARMA-REPORTS, 2012). Narozdíl od eukaryotních chromozomů neobsahuje introny, pouze geny – kódující úseky DNA. Mimo nukleoid nalézáme genetickou informaci bakterií v podobě plazmidů, malých kruhových molekul DNA. Pro určení bakterie a následnou léčbu pacienta jsou zásadní vlastnosti buněčné stěny bakteriální buňky. Podle její tloušťky (a tím i barvitelnosti) rozlišujeme bakterie na Gram-pozitivní a Gram-negativní. (BEDNÁŘ, a kol., 1996; GOERING, a kol., 2016).

Hlavní složkou buněčné stěny bakterií je peptidoglykan. Tento polymer, zvaný také murein, se nachází ve vrstvách ve vnější části buněčné stěny. Obsahuje kromě cukerných látek *N*-acetylglukosaminu a kyseliny *N*-acetylmuramové i krátké peptidové řetězce, které propojují jednotlivé vrstvy. (GOERING, a kol., 2016; JULÁK, 2006; VOTAVA, a kol., 2010). U Gram-pozitivních bakterií je buněčná stěna mohutná kolem 20 nm. Z této skupiny jsou nejvýznamnějšími patogeny rody *Staphylococcus*, *Streptococcus* a *Enterococcus*. (VOTAVA, a kol., 2010).

Gram-negativní bakterie mají narozdíl od Gram-pozitivních buněčnou stěnu silnou pouze kolem 15 nm. Obsahuje jen tenkou vrstvu peptidoglykanu, který je pomocí lipoproteinů spojen s vnější membránou. Fosfolipidová membrána na povrchu bakterie chrání vlastní buňku před pro ni nebezpečnými látkami, například před účinkem některých antibiotik. Po obou stranách peptidoglykanu, mezi vnější a vnitřní membránou, se nachází periplazmatický prostor. V něm se vyskytují různé enzymy a látky inhibující nebo rozkládající antibiotika, jako jsou beta-laktamázy. (VOTAVA, a kol., 2010).

1.1 Stafylokoky

Rod *Staphylococcus* zahrnuje nepohyblivé, nesporulující, Gram-pozitivní kulovité bakterie, které vytvářejí především hroznovitá uskupení. Jednotlivé koky nabývají velikosti kolem 1 μm . Až na výjimky (*Staphylococcus aureus* subsp. *anaerobius* a *Staphylococcus saccharolyticus*) se jedná o fakultativně anaerobní koky produkující katalázu. (BEDNÁŘ, a kol., 1996; JULÁK, 2006; VOTAVA, a kol., 2003).

Stafylokoky snáší 10% koncentraci NaCl, jsou přirozeně rezistentní k bacitracinu a lysozymu. Přežívají vyschnutí i zahřátí na 60 °C, mají relativně vysokou odolnost vůči fenolu, alkohol na ně působí spíše bakteriostaticky než baktericidně. Jsou citlivé k lysostafinu a furazolidinu, oproti Gram-negativním bakteriím jsou citlivější k nenasyceným mastným kyselinám zásaditým barvivům. Podle přítomnosti koagulázy je možné rozdělit je na plasmakoaguláza-pozitivní a plasmakoaguláza-negativní. (VOTAVA, a kol., 2003).

1.1.1 *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus subsp. *aureus* (dále jen *S. aureus*) je vyjma ojedinělých případů jediným pro člověka patogenním plasmakoaguláza-pozitivním stafylokokem. Na svém povrchu má na peptidoglykan kovalentně navázaný druhově specifický protein A. Tato bílkovina se dokáže nespecificky navázat na těžké řetězce imunoglobulinů (jejich konstantní část, Fc-fragment) a tím bakterii částečně chrání proti působení komplementu, opsonizaci a fagocytóze. (BEDNÁŘ, a kol., 1996; JULÁK, 2006; VOTAVA, a kol., 2003).

Dalším druhově specifickým antigenem je polysacharid A, jehož hlavní složkou je kyselina teichoová. Je tvořený polyribitolfosfátem s navázanými zbytky *N*-acetylglukosaminu a *D*-alaninu. Rozlišujeme dva sérotypy, polysacharid A α a A β , které se vzájemně liší prostorovou orientací *N*-acetylglukosaminu. (BEDNÁŘ, a kol., 1996). Polysacharid A je kovalentně spojen s peptidoglykanem a umožňuje navázání bakterie na fibronektin přítomný v ranách. Některé kmeny *S. aureus* dokáží vytvářet polysacharidové pouzdro, které je chrání před fagocytózou, protilátkami i působením komplementu. Díky tomu jsou opouzdřené kmeny vysoce virulentní. (VOTAVA, a kol., 2003).

Tzv. „zlatý stafylokok“ má schopnost tvořit řadu enzymů a toxinů. Jedním z enzymů je plasmakoaguláza (volná koaguláza), která s plasmatickým faktorem protrombinem tvoří stafylothrombin. Tento aktivní komplex katalyzuje přeměnu fibrinogenu na nerozpustný fibrin. Tvorba fibrinu má za následek častý vznik ohraničených zánětů. (BEDNÁŘ, a kol., 1996; VOTAVA, a kol., 2003). Podle Votavy a kol. (2003) by obalení bakterie fibrinem mohlo mít za následek její horší rozpoznatelnost imunitním systémem.

Opačný účinek oproti plasmakoaguláze má stafylokináza, taktéž zvaná fibrinolysin. Katalyzuje přeměnu plasminogenu na plasmin, který dokáže rozpouštět fibrin. Pomocí tohoto mechanismu se *S. aureus* může šířit do okolí zánětu. Šíření napomáhá také hyaluronidáza, za přítomnosti vody štěpí kyselinu hyaluronovou přítomnou v mezibuněčném materiálu a pojivových tkáních. Vysoce odolným enzymem termostabilní nukleáza, vydrží zahřátí

na 100 °C trvající 15 minut. Má schopnost odštěpovat fosfomononukleosidy z nukleových kyselin uložených v buněčných jádrech. (BEDNÁŘ, a kol., 1996). V dnešní době dokáže většina kmenů *S. aureus* tvořit penicilinázu (beta-laktamázu). S její pomocí hydrolyzují beta-laktamový kruh beta-laktamových antibiotik a tím způsobují jejich neúčinnost. (BEDNÁŘ, a kol., 1996; VOTAVA, a kol., 2003).

Mezi nejběžnější toxiny nalézané u kmenů *S. aureus* se řadí hemolyziny a leukocidin. Rozlišujeme čtyři typy hemolyzinu (alfa-hemolyzin, beta-hemolyzin, gama-hemolyzin, delta-hemolyzin), přičemž jednotlivé kmeny *S. aureus* se liší jejich tvorbou a mohou je vytvářet jednotlivě i v různých kombinacích. Alfa-hemolyzin projevující se na krevním agaru beta-hemolýzou je produkován většinou kmenů. Při podání intravenózně působí letálně, aplikace do kůže způsobí její nekrózu. Leukocidin, také nazývaný Panton-Valentinův toxin, má schopnost narušit propustnost a celistvost buněčných membrán a vyvolat lýzu zasažené buňky. (BEDNÁŘ, a kol., 1996; VOTAVA, a kol., 2003). Leukocidin napomáhá bakterii chránit se před působením leukocytů. (VOTAVA, a další, 2003).

Některé kmeny mohou produkovat další nebezpečné toxiny. Mezi ně patří toxin syndromu toxického šoku 1 (TSST-1), enterotoxiny a exfoliatiny (epidermolytické toxiny). Především TSST-1, ale i enterotoxiny, se mohou chovat jako superantigeny – stimulovat imunitní systém k nadprodukci cytokinů a následnému vzniku syndromu toxického šoku. V trávicím traktu odolávají přítomným enzymům a způsobují průjem a zvracení. (BEDNÁŘ, a kol., 1996; JULÁK, 2006; VOTAVA, a kol., 2003).

Při léčbě infekcí způsobených kmeny *S. aureus* jsou lékem volby penicilinová antibiotika rezistentní vůči beta-laktamáze, jako je oxacilin se svou obdobou methicilinem či kloxacilin. Velkým problémem jsou multirezistentní kmeny *S. aureus*. Jedním z nich je methicilin-rezistentní *S. aureus* (dále jen MRSA). Dlouhou dobu byly tyto kmeny záležitostí pouze nemocnic, ale v dnešní době se vyskytují i v komunitě. Jsou rezistentní ke všem beta-laktamovým antibiotikům včetně těch kombinovaných s inhibitory penicilináz, dále k makrolidům, aminoglykosidům, tetracyklinům, fluorochinolonům, chloramfenikolu a rifampicinu. Nejčastější příčinou odolnosti vůči methicilinu je přítomnost genu *mecA*, který kóduje modifikovaný penicilin vázající protein PBP2a (*penicillin-binding protein 2a*). Tento protein se podílí na stavbě buněčné stěny a narozdíl od své původní varianty není inhibován navázáním penicilinů. Některé kmeny jsou částečně rezistentní na vankomycin, tzv. VISA (případně GISA, *glycopeptide-intermediate resistant S. aureus*), s extrémně mohutnou

vrstvou peptidoglykanu. Od roku 2002 jsou zaznamenávány i kmeny úplně rezistentní ke všem glykopeptidům včetně vankomycinu (dále jen VRSA, případně GRSA). Jejich vysoká odolnost je dána přítomností genu *vanA*, který získaly od vankomycin rezistentních enterokoků. (VOTAVA, a kol., 2003).

1.1.2 *Staphylococcus epidermidis*

Nejběžnějším koaguláza-negativním stafylokokem je *Staphylococcus epidermidis* (dále jen *S. epidermidis*). Je podmíněným patogenem, může vyvolat infekci kolem implantátů, na kterých vytvoří slizový biofilm. Mezi hlavní složky biofilmu patří polysacharidový intracelulární antigen (PIA), přilnutí na povrchy zajišťuje kapsulární polysacharid-adhesin (PS/A), kyselina teichoová, fibrinogen vázající protein (Fbe) a další. Vzniklý slizový obal ztěžuje antibiotikům pronikat k bakteriím a reaguje s polymorfonukleáry, čímž jim zabraňuje ve fagocytóze. (VOTAVA, a kol., 2003).

S. epidermidis není schopen produkovat stafylokinázu ani nukleázu. Nevytváří ani toxiny jako jsou alfa- a beta-hemolyzin, leukocidin, TSST-1, enterotoxiny nebo exfoliatiny. (BEDNÁŘ, a kol., 1996). Za obsaženou toxickou látku lze považovat peptidoglykan podněcující uvolňování cytokinů z makrofágů a aktivaci komplementu. (VOTAVA, a kol., 2003).

Všechny koaguláza-negativní stafylokoky jsou vysoce odolné vůči antibiotikům. Jsou rezistentní k oxacilinu, tetracyklinu, gentamicinu, a klindamycinu. Odolnost proti oxacilinu zajišťuje gen *mecA*, stejně jako u MRSA. Většinou jsou citlivé na kotrimoxazol a fluorochinolony, ale narůstá poměr rezistentních kmenů. Bývají vnímavé k rifampicinu a vankomycinu. Na vankomycin se už objevuje zvýšená odolnost při zjišťování minimální inhibiční koncentrace. (VOTAVA, a kol., 2003).

1.2 Streptokoky

Do rodu *Streptococcus* zařazujeme Gram-pozitivní koky uspořádané do řetízků nebo do dvojic. Narozdíl od stafylokoků nevytváří katalázu. Většina jsou fakultativní anaeroby se schopností fermentovat cukry za vzniku kyseliny mléčné. Většinou mají ve svých stěnách přítomný skupinově specifický polysacharid C. Podle jeho složení se dělí do antigenních skupin dle Lancefieldové. (BEDNÁŘ, a kol., 1996; JULÁK, 2006).

Rozlišujeme tři typy hemolýzy, ale v praxi se streptokoky dělí do dvou skupin, na beta-hemolytické a non-beta-hemolytické. Beta-hemolytické streptokoky mají schopnost odbarvit a lyzovat erytrocyty, nejběžnějšími zástupci jsou *Streptococcus pyogenes* a

Streptococcus agalactiae. Alfa-hemolýza neboli viridace je charakteristická přeměnou hemoglobinu na zelený verdoglobin. (BEDNÁŘ, a kol., 1996; JULÁK, 2006; VOTAVA, a kol., 2003). Její podstatou je tvorba peroxidu vodíku bakteriemi. Růst streptokoků potencuje přítomnost krve nebo séra a zvýšená koncentrace oxidu uhličitého ve vzduchu. (VOTAVA, a kol., 2003).

1.2.1 *Streptococcus pyogenes*

Streptococcus pyogenes (dále jen *S. pyogenes*) vyžaduje ke svému růstu půdy s přídavkem krve nebo séra, v tekutém živném bujónu se mu příliš nedaří. Některé kmeny mohou být obklopeny pouzdrém z kyseliny hyaluronové. (VOTAVA, a kol., 2003). Ve svém povrchu má zabudovaný polysacharid C z antigenní skupiny A. Dalším antigenem je vláknitý M-protein, který zahrnuje velké množství sérotypů. Protein blízký M-proteinu, nazývaný sérový opacitní faktor, náleží svou funkcí mezi lipoproteinázy a způsobuje zakalení séra. (BEDNÁŘ, a kol., 1996; JULÁK, 2006). M-protein zaujímá adhezní funkci a zároveň pomáhá i chránit bakterii před fagocytózou. Ochrana je zajištěna navázáním komplement regulujícího faktor H, případně fibrinogenu, na řetězec M-proteinu. Vazba zamezí přilnutí C3b složky komplementu na povrch streptokoka a díky tomu zabrání aktivaci alternativní cesty komplementu. (VOTAVA, a kol., 2003).

S. pyogenes do svého okolí uvolňuje enzymy a toxiny. Produkuje hyaluronidázu, která hydrolyzuje kyselinu hyaluronovou jak ve tkáních hostitele, tak i ve vlastním pouzdrě streptokoka. Mezi hlavní toxiny produkované *S. pyogenes* patří hemolyziny, zde nazývané streptolyziny. (BEDNÁŘ, a kol., 1996; JULÁK, 2006). Streptolyzin O je biologicky aktivní jen v redukované formě, kdy se váže na cholesterol obsažený v cytoplazmatické membráně buněk hostitele. Kromě těchto vlastností má i kardiotoxický účinek. Jeho účinek podporují proteinázy štěpící bílkoviny, *in vitro* rozkládají i vlastní bílkoviny bakterie. Streptolyzin S je odpovědný za vznik úplné hemolýzy na kultivačních půdách. Narušuje propustnost membrán a uvnitř buněk jeví afinitu k mitochondriím. *S. pyogenes* vytváří toxické enzymy streptokinázy, které jsou obdobou stafylokináz. Katalyzují přeměnu plasminogenu na plasmin. Napomáhají tak fibrinolýze a následnému šíření infekce. Deoxyribonukleázy mají schopnost rozkládat DNA uvolněnou z poškozených buněk, do zdravých buněk neproniká. (BEDNÁŘ, a kol., 1996).

Patogenita závisí mimo jiné na produkci streptokokových pyrogenních neboli erytrogenních exotoxinů. Dělí se do několika skupin. Typy A a C mají za následek spálový

průběh onemocnění, geny kódující tyto typy se přenáší mezi kmeny pomocí bakteriofágů. Exotoxin typu B je cysteinová proteáza, usnadňuje šíření infekce. Gen pro její tvorbu je zabudován v nukleoidu všech kmenů. Exotoxiny mají vlastnosti superantigenů a mohou tak vyvolat syndrom streptokokového toxického šoku. (VOTAVA, a kol., 2003).

Lékem první volby při infekcích *S. pyogenes* je penicilin. Sulfonamidy a ko-trimoxazol nedokážou zabránit rozvoji pozdních následků onemocnění, jako je revmatická horečka a akutní glomerulonefritida. Většina kmenů je odolných k tetracyklinům. V případě alergie na penicilin se předepisují makrolidy, nosičství lze odstranit pomocí linkosamidů. (VOTAVA, a kol., 2003).

1.2.2 *Streptococcus agalactiae*

Dalším významným streptokokem je *Streptococcus agalactiae* (dále jen *S. agalactiae*), projevující se na krevním agaru neúplnou beta-hemolýzou. Může být nebezpečný především pro novorozence, u kterých dokáže vyvolat např. meningitidu. Na základě svého stěnového antigenu se řadí mezi streptokoky skupiny B dle Lancefieldové. (JULÁK, 2006; VOTAVA, a kol., 2003; VOTAVA, a kol., 2010). Podle typů proteinů obsažených v polysacharidovém pouzdře rozlišujeme 10 sérotypů (JULÁK, 2006), nejběžnější typ III má ve svém pouzdře zastoupenou kyselinu *N*-acetylneuraminovou (sialovou). Tato kyselina tlumí aktivaci alternativní dráhy komplementu a fagocytózu. (VOTAVA, a kol., 2003).

S. agalactiae produkuje CAMP faktor způsobující neúplnou hemolýzu, ale v přítomnosti sfingomyelinázy C dochází na krevním agaru k zesílení hemolýzy a vzniku projasnění. (BEDNÁŘ, a kol., 1996; JULÁK, 2006; VOTAVA, a kol., 2003).

K léčbě infekcí se používá ampicilin, při nosičství u rodiček penicilin nebo ampicilin. (JULÁK, 2006; VOTAVA, a kol., 2003; VOTAVA, a kol., 2010). Při profylaxi přenosu *S. agalactiae* během porodu pomocí penicilinových antibiotik hrozí vyšší riziko sepse způsobené Gram-negativní bakterií *Escherichia coli*. (VOTAVA, a kol., 2003).

1.2.3 *Streptococcus pneumoniae*

Tzv. pneumokok patří do skupiny non-beta-hemolytických streptokoků, na krevním agaru vytváří viridaci. Ve starší literatuře je možné ho najít pod názvem *Diplococcus pneumoniae* podle dvojic obklopených pouzdrem, ve kterých se bakterie často vyskytuje. *Streptococcus pneumoniae* (dále jen *S. pneumoniae*) vykazuje bližší genetickou příbuznost se streptokoky, proto byl mezi ně zařazen. (BEDNÁŘ, a kol., 1996; JULÁK, 2006).

Kmeny mohou být opouzdřené, v růstové S-fázi (*smooth*, hladká), nebo neopouzdřené, v R-fázi (*rough*, drsná). V případě, že S kmeny vytvářejí velké množství pouzdrného polysacharidu, bývají někdy označovány jako typ M (mukózní fáze). Vzájemně se liší množstvím látek obsažených v buněčné stěně a pouzdře, jako je pouzdrný polysacharid, kyselina teichoová a její polymery bohaté na cholin. Mezi ně patří Forssmanův antigen a stěnový polysacharid C, naprosto odlišný od stejnojmenného polysacharidu beta-hemolytických streptokoků. S polysacharidem C produkovaným *S. pneumoniae* reaguje C reaktivní protein (CRP), ukazatel akutní fáze zánětu. Forssmanův antigen (F-antigen) je podobný antigenům na povrchu savčích buněk. Variabilita pneumokoků má za následek rozdílnou náchylnost k fagocytóze, adhezi bakterií na buňky a tím i jejich rozdílnou virulenci. (BEDNÁŘ, a kol., 1996; JULÁK, 2006).

S. pneumoniae neprodukuje toxiny, k poškození organismu dochází zánětlivou reakcí. Z enzymů tvoří hyaluronidázu, amidázy a neuraminidázu. Neuraminidáza odštěpuje zbytky sialové kyseliny z glykoproteinů a glykolipidů a tím napomáhá šíření infekce ve tkáni. (JULÁK, 2006; VOTAVA, a kol., 2003). Amidázy jsou autolytické enzymy, štěpí vlastní peptidoglykan hydrolýzou peptidové vazby mezi *N*-acetylmuramovou kyselinou a alaninem. Z poškozených pneumokoků se uvolňuje pneumolysin se schopností lyzovat buněčné membrány a podporovat tvorbu zánětu. (BEDNÁŘ, a kol., 1996; JULÁK, 2006). Při kultivaci *S. pneumoniae* za přítomnosti kyslíku se v koloniích vytváří peroxid vodíku, který následně starší bakterie usmrcuje. (VOTAVA, a kol., 2003)

S. pneumoniae je citlivý k optochinu, čehož se využívá v diagnostice k odlišení od ostatních viridujících streptokoků pomocí diskového optochinového testu (vzniká inhibiční zóna s průměrem minimálně 15 mm). V přítomnosti žluči, přidáním deoxycholátu sodného, se zvyšuje účinnost autolytických enzymů a kolonie se rozpouští. (BEDNÁŘ, a kol., 1996; JULÁK, 2006; VOTAVA, a kol., 2003).

K léčbě infekcí se používá penicilin (případně ampicilin), ale některé kmeny k němu již získaly rezistenci přenesením DNA přes plasmidy nebo transdukci. Nejedná se o schopnost produkce beta-laktamáz, ale o změnu penicilin vázajícího proteinu. Asi v polovině případů se jedná pouze o částečnou rezistenci, kdy je možné použít k léčbě vyšší dávky penicilinu nebo amoxicilinu. (JULÁK, 2006; VOTAVA, a kol., 2003; VOTAVA, a kol., 2010).

1.3 *Enterococcus*

Enterokoky se řadí mezi Gram-pozitivní koky příbuzné streptokokům a stejně jako oni netvoří katalázu, ale nejsou kultivačně náročné. Jsou to fakultativní anaeroby, běžně se vyskytují ve střevě jako součást mikroflóry. Jako patogeny se většinou uplatňují až po proniknutí do jiných částí těla, nejčastěji v močovém ústrojí. Nevytváří spory a jsou vysoce odolné k vnějším vlivům. Nevadí jim změny pH (od 4,8 do 11) ani hypertonické prostředí do koncentrace 6,5 % NaCl. Mezi enterokoky náleží několik druhů, z nichž nejvýznamnější jsou *Enterococcus faecalis* (dále jen *E. faecalis*) a *Enterococcus faecium* (dále jen *E. faecium*). (BEDNÁŘ, a kol., 1996; JULÁK, 2006; VOTAVA, a kol., 2003).

Z cytoplazmatické membrány enterokoků vystupuje na povrch kyselina glycerolteichoová, kterou je tvořen skupinový stěnový antigen D. (BEDNÁŘ, a kol., 1996; VOTAVA, a kol., 2010). Enterokoky produkují enterociny řazené mezi bakteriociny, látky působící proti jiným bakteriím. Adhezi na epitel usnadňují fimbrie, povrchové polysacharidy a Esp (*enterococcal surface protein*) protein. Ochranu před fagocytózou poskytuje agregační substance, která navíc usnadňuje bakterii pronikání přes buněčné membrány. Enterokoky mají schopnost vytvářet želatinázu, která dokáže hydrolyzovat kolagen a hemoglobin. Některé kmeny mohou produkovat i hemolyzin. (JULÁK, 2006).

E. faecalis a *E. faecium* mají podobné vlastnosti, produkují pyrrolidonylarylamidázu a leucinaminopeptidázu (jsou PYR-pozitivní a LAP-pozitivní), díky kterým mají schopnost hydrolyzovat pyrrolidonyl- β -naftylamid a leucin- β -naftylamid. *E. faecium* rozkládá kvašením arabinózu a neštěpí pyruvát, *E. faecalis* naopak rozkládá pyruvát a nefermentuje arabinózu. *E. faecium* bývá rezistentní k ampicilinu, zatímco *E. faecalis* je k němu většinou citlivý. (VOTAVA, a kol., 2003; VOTAVA, a kol., 2010).

Mezi zvláštní vlastnosti *E. faecium* patří, že kmen *E. faecium* SF68 dokáže inhibovat růst salmonel, shigel a enterobakterů. Toho je možné využít při léčbě infekčních průjmů, místo předepsání antibiotik. Kmen *E. faecium* M 74 má podporující účinek na imunitu a snižuje hladinu cholesterolu v krvi. S používáním probiotik s *E. faecium* se pojí riziko přenosu genů pro rezistence na antibiotika mezi patogeny. (JULÁK, 2006).

Enterokoky snadno získávají rezistenci, především výměnou plazmidů. Vyznačují se vysokou přirozenou rezistencí, a to k cefalosporinům, oxacilinu, monobaktamům, k nízkým koncentracím aminoglykosidů a klindamycinu. Velké množství kmenů dnes vytváří beta-laktamázy, především *E. faecium*. (JULÁK, 2006). Významným problémem se dnes stává

rostoucí zastoupení vankomycin rezistentních enterokoků, známých jako VRE. Rezistenci k vankomycinu udává přítomnost genů *vanA*, *vanB* a *vanC*. (VOTAVA, a kol., 2003; VOTAVA, a kol., 2010).

Při léčbě močových infekcí se většinou používá ampicilin (případně s inhibitory beta-laktamáz – s kyselinou klavulanovou nebo sulbaktamem), amoxicilin/klavulanát, fluorochinolony nebo nitrofurantoin. U těžších infekcí a sepsí se volí k terapii kombinace antibiotika působícího na buněčnou stěnu (penicilin, ampicilin, glykopeptidy – vankomycin a teikoplanin) s aminoglykosidem. (VOTAVA, a kol., 2003; VOTAVA, a kol., 2010). K léčbě infekcí vyvolaných multirezistentními kmeny enterokoků se využívá linezolid, quinupristin/dalfopristin a nové fluorochinolony. (VOTAVA, a kol., 2003).

1.4 *Enterobacteriaceae*

Čeď *Enterobacteriaceae* je v klinické mikrobiologii nejvýznamnější čeledí Gram-negativních tyčinek. Běžně je nalézáme ve střevě obratlovců, což se projevuje na jejich růstu v přítomnosti žlučových solí. Jsou odolné k vnějším vlivům, jako jsou změny teplot nebo vyschnutí. Jsou fakultativně anaerobní, při růstu jim nevadí přítomnost kyslíku ani anaerobní prostředí, nevytváří spory. (VOTAVA, a kol., 2003). Většina zástupců je pohyblivá, mají větší množství bičíků rozmístěných po celém svém povrchu (peritrichální bičíky). Zároveň mají fimbrie podílející se na přilnutí bakterie k povrchu a sex-pili umožňující přenos genetické informace ve formě plazmidů. Bakterie z čeledi *Enterobacteriaceae* produkují katalázu, oxidázu netvoří. Fermentují cukry za vzniku kyselin, případně plynů. (BEDNÁŘ, a kol., 1996; JULÁK, 2006).

Zástupci této čeledi mají rozmanitou antigenní strukturu. Nachází se u nich termostabilní tělový lipopolysacharid O-antigen, který je specifický, variabilní a v rámci rodů rozděluje jednotlivé sérotypy. (BEDNÁŘ, a kol., 1996; JULÁK, 2006). Jeho část, zvaná lipid A, je zapuštěna do vnější membrány bakterie. Pro své působení bývá označován výrazem endotoxin. Přes oligosacharid obsahující zbytek 2-keto-3-deoxyoktanové kyseliny se k lipidu A váže polysacharidový řetězec. Tento hydrofilní polysacharid určuje konkrétní antigenní strukturu O-antigenů a chrání bakterii před působením komplementu. (VOTAVA, a kol., 2003). U pohyblivých enterobakterií jsou přítomny termolabilní H-antigeny. (BEDNÁŘ, a kol., 1996). Jsou určeny bílkovinou flagelinem obsaženou v bičících. (VOTAVA, a kol., 2003).

Některé rody mají schopnost vytvářet pouzdro. Kapsulární K-antigeny mohou být termostabilní, a to v případě, že jsou tvořeny polysacharidy bakteriálního pouzdra. Termolabilní jsou tvořeny bílkovinami fimbrií. K-antigeny se nalézají dále od povrchu bakterie než somatické O-antigeny, proto je mohou překrývat a tím znemožnit stanovit typ O-antigenu pomocí aglutinace. Tento jev se nazývá O-inaglutinabilita. (BEDNÁŘ, a kol., 1996; JULÁK, 2006; VOTAVA, a kol., 2003). Z dalších antigenů může být u *Enterobacteriaceae* přítomen M-antigen ve slizu na povrchu některých bakterií. (JULÁK, 2006). Stejně jako u *S. pneumoniae* se u některých salmonel a shigel vyskytuje Forssmanův antigen. (JULÁK, 2006; VOTAVA, a kol., 2003).

Antibiotika se při léčbě infekcí vyvolaných enterobakteriemi používají pouze pokud se nejedná o střevní infekci. U střevních infekcí se podávají především lokální střevní antiseptika s obsahem ftalylsulfathiazolu nebo chloroxinu. Užití antibiotik při průjmech by mělo negativní dopad na střevní mikroflóru, která napomáhá v boji proti infekci ve střevě. (VOTAVA, a kol., 2003; VOTAVA, a kol., 2010).

Velké množství enterobakterií produkuje beta-laktamázy širokého spektra (dále jen ESBL, *extended spectrum beta-lactamase*). Proti těmto ESBL nepůsobí ani inhibitory beta-laktamáz, jako je kyselina klavulanová nebo sulbaktam. V terapii těchto infekcí lze využít karbapenemy (imipenem, meropenem, ertapenem), v některých případech cefalosporiny čtvrté generace (cefepim). V případě citlivosti kmenu lze podat aminoglykosidy, fluorochinolony nebo kolistin. Kmeny s produkcí ESBL bývají často polyrezistentní se zvýšenou odolností proti dezinfekcím a antiseptikům. (VOTAVA, a kol., 2003). Při léčbě infekcí enterobakteriemi bez tvorby ESBL lze použít cefalosporiny první a druhé generace, aminopeniciliny, kotrimoxazol, doxycyklin nebo furantoin. Rezistenci k antibiotikům mohou kromě přítomnosti ESBL způsobovat i beta-laktamázy typu AmpC. (VOTAVA, a kol., 2010). Velkým problémem jsou kmeny produkující metallo beta-laktamázy (MBL) a karbapenemázy (KPC). (HRABÁK, a kol., 2009).

1.4.1 *Escherichia*

V rodu *Escherichia* najdeme několik druhů, z nichž nejvýznamnější je *Escherichia coli* (dále jen *E. coli*). *E. coli* má v mikrobiologii zvláštní postavení, používá se jako modelový organismus. Fermentuje glukózu za vzniku plynu, dokáže štěpit laktózu a produkuje indol. (VOTAVA, a kol., 2003; VOTAVA, a kol., 2010). Julák (2006) uvádí, že některé kmeny *E. coli* mají schopnost vytvářet volné i vázané hemolyziny. Účinkem hemolyzinů

dojde k rozpadu erytrocytů a následně siderofory aerobactin a enterochelin umožní bakterii vstřebání železa z uvolněného hemoglobinu. (JULÁK, 2006).

E. coli je součástí symbiotické střevní mikroflóry, kde vytváří vitamin K. Produkuje bílkoviny koliciny, které působí baktericidně na ostatní bakterie. (VOTAVA, a kol., 2003). Mimo trávicí trakt se uplatňují jako patogeny, podílí se především na infekcích močových cest, je možné ji nalézt u pneumonií, sepsí a infekcí ran. Některé kmeny jsou patogenní i ve střevě, kde mohou způsobit infekční průjem. Intestinální kmeny se rozdělují do čtyř základních kategorií, na enteropatogenní (EPEC), enterotoxigenní (ETEC), enteroinvazivní (EIEC) a enterohemoragické (EHEC). (BEDNÁŘ, a kol., 1996; JULÁK, 2006).

Na rozdíl od ostatních zástupců čeledi *Enterobacteriaceae* je *E. coli* primárně citlivá k ampicilinu, ale často u ní bývá zjištěná získaná rezistence. (VOTAVA, a kol., 2003). K léčbě se indikují cefalosporiny první a druhé generace, fluorované chinolony a antibiotika s kyselínou klavulanovou amoxicilin/klavulanát a kotrimoxazol. U infekcí močových cest lze kromě předchozích látek podat i chinolony nebo nitrofurantoin. (VOTAVA, a kol., 2003). Podle Bednáře a kol. (1996) je přirozeně rezistentní k benzylpenicilinu.

1.4.2 Klebsiella

Klinicky nejvýznamnějším zástupcem rodu *Klebsiella* je *Klebsiella pneumoniae* (dále jen *K. pneumoniae*). Běžně se vyskytují ve střevě, extraintestinálně způsobují především infekce močových a dýchacích cest. Tyto koliformní enterobakterie nejsou pohyblivé a bývají obaleny polysacharidovým pouzdrém. (BEDNÁŘ, a kol., 1996; JULÁK, 2006; VOTAVA, a kol., 2010). Přítomnost pouzdra snižuje imunitní odpověď hostitelského organismu, ale zároveň snižuje schopnost adheze bakterií k povrchu sliznic. (VOTAVA, a kol., 2003). Klebsiely štěpí laktózu a na rozdíl od *E. coli* vytvářejí bílý pigment. (JULÁK, 2006).

Celý rod je primárně rezistentní k ampicilinu. Kmeny vyskytující se v nemocnicích bývají multirezistentní. (JULÁK, 2006; VOTAVA, a kol., 2003; VOTAVA, a kol., 2010). Votava a kol. ve své publikaci z roku 2010 udává i primární rezistenci k tikarcilinu. K léčbě infekcí vyvolaných citlivými kmeny lze většinou použít cefalosporiny, chinolony, tetracykliny nebo kotrimoxazol. Případná rezistence k některým antibiotikům je způsobena produkcí beta-laktamázy, jako je ESBL. Kmeny vytvářející ESBL bývají citlivé ke karbapenemům a cefalosporinům čtvrté generace, v některých případech i k aminoglykosidům, nitrofurantoinu a kolistinu. (VOTAVA, a kol., 2003). Čím dál častěji je nutné proti

multirezistentním kmenům nasadit léčbu právě karbapenemy, jako jsou imipenem a meropenem. (VOTAVA, a kol., 2010).

1.4.3 *Proteus*

Do rodu *Proteus* spadají většinou výrazně pohyblivé enterobakterie, je pro ně charakteristický plazivý růst na agaru. (BEDNÁŘ, a kol., 1996; JULÁK, 2006; VOTAVA, a kol., 2003). Tato schopnost je umožněna díky přítomnosti více bičíků nacházejících se po celém povrchu bakterie. (VOTAVA, a kol., 2003).

Mohou se vyskytovat ve střevě, infekce většinou způsobují až při zanešení do močového ústrojí nebo kontaminací ran. Tyto koliformní bakterie rozkládají bílkoviny za vzniku amoniaku. (BEDNÁŘ, a kol., 1996; JULÁK, 2006). Podle Votavy a kol. (2003; 2010) dokáže celý rod produkovat sirovodík. Nejvýznamnějšími zástupci rodu *Proteus* jsou *Proteus mirabilis* (dále jen *P. mirabilis*) a *Proteus vulgaris* (dále jen *P. vulgaris*). (VOTAVA, a kol., 2003; VOTAVA, a kol., 2010).

P. mirabilis se od ostatních proteů se liší tím, že nevytváří indol. Je primárně rezistentní k nitrofurantoinu, většinou je citlivý k cefalosporinům. Oproti němu je *P. vulgaris* přirozeně rezistentní k cefalosporinům první a druhé generace a bývá citlivý na nitrofurantoin. Rod *Proteus* má zvýšenou odolnost k některým dezinfekcím, především k těm na bázi tenzidů. Jsou rezistentní ke kolicinu, čehož se využívá v diagnostice. (VOTAVA, a kol., 2003; VOTAVA, a kol., 2010).

1.5 *Pseudomonas*

Rod *Pseudomonas* tvoří skupina Gram-negativních, nefermentujících, nesporulujících a striktně aerobních tyčinek. Jsou pohyblivé, na svých polárních koncích mají umístěny bičíky a jsou kataláza- i oxidáza-pozitivní. (BEDNÁŘ, a kol., 1996; VOTAVA, a kol., 2010). Geny pro rezistenci se většinou nalézají na plazmidech a mohou být předány i jiným bakteriím. Při léčbě infekcí způsobených polyrezistentními kmeny pseudomonád se většinou využívá kombinace dvou antibiotik. (VOTAVA, a kol., 2003; VOTAVA, a kol., 2010). Jsou přirozeně rezistentní ke kotrimoxazolu a k sulfonamidům. (VOTAVA, a kol., 2010).

1.5.1 *Pseudomonas aeruginosa*

Nejvýznamnějším druhem z rodu *Pseudomonas* je *Pseudomonas aeruginosa* (dále jen *P. aeruginosa*). Roste i při vyšší koncentraci soli, snese přítomnost některých dezinfekcí. (JULÁK, 2006). K dezinfekci povrchů je možné využít chlorové prostředky, orthosan na pseudomonády nepůsobí. (BEDNÁŘ, a kol., 1996).

P. aeruginosa může mít slizový obal rozdělující kmeny podle růstových fází na R (drsnou), S (hladkou) a M (mukózní), stejně jako je tomu např. u *S. pneumoniae*. Kmeny rostoucí v mukózní fázi jsou obaleny alginátem. Tento extracelulárně vázaný polysacharid chrání bakterii před vnějšími vlivy a fagocytózou. (BEDNÁŘ, a kol., 1996; JULÁK, 2006). Podle Bednáře a kol. (1996) se v průběhu pasážování *in vitro* produkce alginátu snižuje.

Z látek tvořených *P. aeruginosa* jsou významné především proteázy, které mohou narušit funkci komplementu a zabránit opsonizaci a fagocytóze. Produkují také hemolyziny fosfolipázu C a cytotoxický termostabilní glykolipid. (VOTAVA, a kol., 2003). Vytváří pyociny (pyocyanin), které působí baktericidně proti Gram-pozitivním i některým Gram-negativním bakteriím. (BEDNÁŘ, a kol., 1996; JULÁK, 2006).

P. aeruginosa má značnou primární rezistenci proti antibiotikům. (JULÁK, 2006). Zároveň dokáže konjugací snadno přijímat (a předávat dál) geny rezistence od ostatních bakterií, díky čemuž vznikají multirezistentní kmeny. (VOTAVA, a kol., 2003; VOTAVA, a kol., 2010). Citlivost k antibiotikům bývá variabilní, mohou být citlivé k protipseudomonádovým penicilinům, jako je piperacillin nebo piperacillin s tazobaktamem. V některých případech je možné využít protipseudomonádové aminoglykosidy (amikacin), fluorochinolony (ciprofloxacin) a cefalosporiny třetí (ceftazidim) a čtvrté (cefepim) generace, případně lze podat karbapenemy. Pseudomonády bývají citlivé ke kolistinu. Některé kmeny *P. aeruginosa* mohou vytvářet metalo-beta-laktamázy. (VOTAVA, a kol., 2010).

2 ANTIMIKROBIÁLNÍ LÁTKY

K léčbě při infekcích vyvolaných bakteriemi se používají antimikrobiální látky (dále jen AML). Podle způsobu přípravy se rozdělují na přírodní antibiotika (dále jen ATB) a syntetická chemoterapeutika. Většina antibiotik se dnes připravuje uměle, z toho důvodu se někdy celá skupina antimikrobiálních látek označuje jako antibiotika. (GOERING, a kol., 2016; JULÁK, 2006). Antibiotika v pravém slova smyslu se vyvinula jako ochrana makroorganismů a v rámci konkurenčního boje mikroorganismů. (GOERING, a kol., 2016).

Antimikrobiální látky používané k terapii by se měly vyznačovat selektivní toxicitou, působit proti mikroorganismům a zároveň nepoškozovat makroorganismus. Této vlastnosti je možné dosáhnout díky rozdílům ve stavbě a metabolismu prokaryotických buněk bakterií a eukaryotických buněk savců. (GOERING, a kol., 2016).

2.1 Mechanismy účinku antimikrobiálních látek

Základní rozdělení antibiotik podle jejich účinku je na bakteriocidní a bakteriostatická. Bakteriocidní látky bakterii usmrcují, patří mezi ně například inhibitory syntézy buněčné stěny. Bakteriostatické látky pouze brání růstu a množení dané bakterie. (GOERING, a kol., 2016; JULÁK, 2006). Některé antibakteriální látky mohou působit na jednu bakterii bakteriocidně, ale na jiný druh pouze bakteriostaticky. Podle mechanismu účinku je možné antibiotika rozdělit do pěti skupin. (GOERING, a kol., 2016).

2.1.1 Inhibice syntézy buněčné stěny

Peptidoglykan v buněčné stěně je pro bakterie specifický a představuje tak ideální cíl účinku antibiotik, umožňuje jejich selektivní toxicitu. Inhibitory syntézy buněčné stěny působí bakteriocidně. Syntézu je možné rozdělit do několika fází. (GOERING, a kol., 2016).

Buněční stěna se začíná syntetizovat v cytoplazmě bakterií v podobě nízkomolekulárních prekurzorů. Tento krok je inhibován cykloserinem, který inhibuje začlenění alaninu do prekurzoru. (GOERING, a kol., 2016). Následuje enzymy katalyzovaný přenos prekurzorů přes cytoplazmatickou membránu. Uskutečnění této fáze brání bacitracin. (JULÁK, 2006). Glykopeptidy se naváží na prekurzory a brání jejich napojení do buněčné stěny. (GOERING, a kol., 2016). Posledním stupněm v syntéze peptidoglykanu je polymerace a navázání ke stěně pomocí transpeptidáz známých jako *penicillin-binding proteins* (dále jen PBP). Mohou je inhibovat beta-laktamová antibiotika. U bakterií se vyskytují různé typy PBP, z toho pramení variabilita účinku beta-laktamových antibiotik. (JULÁK, 2006).

2.1.2 Inhibice proteosyntézy

Tato skupina antimikrobiálních látek se váže na podjednotky ribozomů a tím zne-
možňuje jejich funkci, proteosyntézu. Tetracykliny a aminoglykosidy vytváří vazbu s pod-
jednotkou 30S. Na podjednotku 50S se vážou makrolidy, linkosamidy a chloramfenikol.
(JULÁK, 2006). Obě podjednotky tvoří společně ribozomální komplex 70S, symbol S značí
odlišné chování ribozomů v průběhu ultracentrifugace. (GOERING, a kol., 2016).

2.1.3 Inhibice syntézy nukleových kyselin

Některé látky s antibiotickým působením mohou inhibovat syntézu purinových i py-
rimidinových nukleotidů. Látky jako chloroquin, miracil D a akridinová barviva se vážou na
DNA a tím zabraňují replikaci. Z důvodu své vysoké toxicity a karcinogenity se nepoužívají.
Nejpoužívanějšími inhibitory syntézy nukleových kyselin jsou inhibitory polymeráz, např.
rifampicin inhibující RNA-polymerázu. Chinolony a fluorochinolony inhibují DNA gyrázu
a topoizomerázu. Nitroimidazoly (metronidazol) mohou přerušovat a rozkládat vlákna bak-
teriální DNA. (JULÁK, 2006). Podle Goeringa a kol. (2016) se mezi inhibitory syntézy nuk-
leových kyselin mohou řadit i antimetabolity inhibují syntézu prekurzorů nezbytných pro
následnou syntézu DNA, jako jsou sulfonamidy, trimethoprim a kotrimoxazol.

2.1.4 Inhibice metabolismu esenciálních látek

Narozdíl od savců nedokážou bakterie přijímat kyselinu listovou z okolí, musí si ji
vytvářet. Sulfonamidy a trimethoprim blokují její syntézu, ale každý jiným mechanismem
(viz. dále). (JULÁK, 2006).

2.1.5 Inhibice funkce cytoplazmatické membrány

Hlavním účinkem látek s touto schopností je narušení permeability membrány do-
provázené únikem kationtů a následnou smrtí buňky. Patří mezi ně některé polypeptidy jako
polymyxiny. Polymyxiny jsou nefro- a neurotoxické. Tvorbou pórů poškozují membránu i
gramicidiny, proto se používají pouze lokálně. (JULÁK, 2006). Dosažení selektivní toxicity
je možné díky rozdílům ve struktuře membrán prokaryotických a eukaryotických buněk.
(GOERING, a kol., 2016).

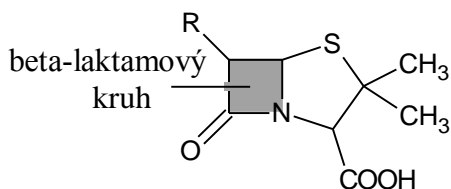
2.2 Běžně používaná antibiotika proti vybraným bakteriálním kmenům

2.2.1 Beta-laktamy

Beta-laktamová antibiotika se vyznačují čtyřčlenným beta-laktamovým kruhem
s postranními řetězci a navázaným dalším cyklem, s výjimkou monobaktamů. Beta-laktamy
se váží na PBP, enzymy typu transpeptidáz, transglykosyláz a karboxypeptidáz. PBP

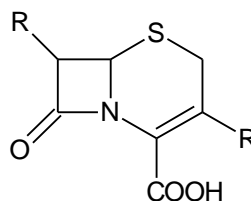
umožňují napojení prekurzorů do struktury buněčné stěny. (GOERING, a kol., 2016; PŘÍBORSKÝ, 2004). Při inhibici PBP jejich navázáním na beta-laktamy se prekurzory hromadí, což vede ke spuštění autolýzy buňky. (GOERING, a kol., 2016). Podle Příborského (2004) je lýza bakteriální membrány způsobena nedostatkem peptidoglykanu.

Obrázek 1 Schéma penicilinů



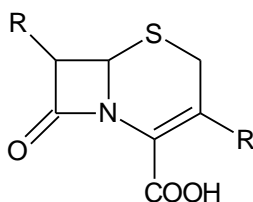
Zdroj: vlastní

Obrázek 2 Schéma cefalosporinů



Zdroj: vlastní

Obrázek 3 Schéma karbapenemů



Zdroj: vlastní

Mezi hlavní třídy beta-laktamů patří peniciliny s napojeným pětičlenným heterocyklem a cefalosporiny obsahující šestičlenný heterocyklus. Přírodní penicilin účinkuje jen na citlivé Gram-pozitivní bakterie, kloxacilin a methicilin (oxacilin) působí i na Gram-pozitivní bakterie produkující beta-laktamázy. Ampicilin a amoxicilin je možné použít nejen na Gram-pozitivní bakterie, ale i na některé Gram-negativní, jako je *P. mirabilis* nebo některé kmeny *E. coli*. (GOERING, a kol., 2016). Piperacillin se používá v kombinaci s tazobaktamem (inhibitor beta-laktamázy), společně působí na Gram-pozitivní a na některé Gram-negativní bakterie. Používají se zejména proti pseudomonádám. (BENEŠ, 2018).

Cefalosporiny první až třetí generace jsou účinné na Gram-pozitivní a na některé Gram-negativní bakterie, čtvrtá generace (cefepim) se vyznačuje zvýšeným působením proti Gram-negativním bakteriím. (GOERING, a kol., 2016). Z druhé generace je nejpoužívanějším cefalosporinem cefuroxim, ze třetí cefotaxim a ceftazidim. Ceftarolin se používá především proti MRSA. (BENEŠ, 2018; GOERING, a kol., 2016). Cefalosporinům druhé generace jsou podobné cefamyciny (cefoxitin), ale vyznačují se methoxylovou skupinou (-O-CH₃) navázanou na 7. atomu uhlíku. (BENEŠ, 2018).

Další třídu beta-laktamů tvoří karbapenemy účinné proti Gram-pozitivním i Gram-negativním bakteriím. Na beta-laktamový kruh mají připojený pětičlenný cyklus. Do této skupiny patří imipenem, meropenem, ertapenem a doripenem. Monobaktamy jako je aztreonam působí proti Gram-negativním bakteriím jako je *P. aeruginosa*. Ve své struktuře mají pouze beta-laktamový kruh s postranními řetězci, bez dalšího cyklu. (GOERING, a kol., 2016).

Rezistence proti beta-laktamům může být způsobena několika mechanismy. Stafylokoky rezistentní na methicilin mohou změnit cíl působení, když kromě běžných PBP syntetizují i pozměněný PBP2a s nižší afinitou k beta-laktamům. Pouze ceftarolin se dokáže navázat na PBP2a a tím inhibovat syntézu buněčné stěny. Beta-laktamázy katalyzují hydrolýzu beta-laktamového kruhu a tím inaktivují antimikrobiální látku. Gram-pozitivní bakterie uvolňují beta-laktamázy do svého okolí, u Gram-negativních bakterií zůstávají v periplazmatickém prostoru. Je známých mnoho druhů beta-laktamáz, které se liší pořadím aminokyselin. Podle sekvence aminokyselin mají rozdílnou afinitu k různým beta-laktamům. Mohou působit jak na jednu třídu beta-laktamů, tak mohou mít i široké spektrum účinku jako ESBL. Proti beta-laktamázám se používají inhibitory, jako je kyselina klavulanová. Obsahují beta-laktamový kruh, kterým se navážou na beta-laktamázy a brání jim ve vazbě na antibiotikum. Beta-laktamy by se z důvodu antagonického působení neměly užívat společně s makrolidy a tetracykliny. (GOERING, a kol., 2016).

2.2.2 Glykopeptidy

Glykopeptidy se účastní inhibice syntézy buněčné stěny tak, že se navážou na D-alanin-D-alanin konec pětičlenných peptidových řetězců na prekurzorech a znemožní jim začlenit se do peptidoglykanu buněčné stěny. Kvůli své velké molekule neprocházejí membránou a mohou působit jen na Gram-pozitivní bakterie. Do této skupiny antibakteriálních látek patří vankomycin a teikoplanin. Používají se pro léčbu infekcí způsobených Gram-pozitivními bakteriemi rezistentními k beta-laktamům, např. MRSA. (GOERING, a kol., 2016).

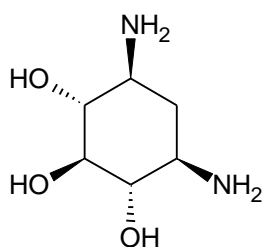
Proti glykopeptidům bývá často rezistentní rod *Enterococcus*, rezistentní kmeny se označují jako VRE (dále jen vankomycin-rezistentní enterokoky). Geny rezistence *vanA*, *vanB* a *vanD* zajišťují pomocí ligáz zakončení pentapeptidu koncem D-alanin-D-laktát, na který se glykopeptidy nevážou. Gen *vanA* se nalézá na malých transpozomech, může se přemisťovat mezi chromozomem a plazmidy a být předáván dál při konjugaci. Zajišťuje rezistenci k vankomycinu i teikoplaninu. Díky přítomnosti genu *vanB* získá bakterie rezistenci

pouze k vankomycinu. Gen *vanB* se může vyskytovat na velkých transpozonech a stejně jako gen *vanA* je přenositelný. Gen *vanD* je možné nalézt jako součást chromozomu enterokoků, proto nemůže být předán dalším bakteriím. Projevem přítomnosti genu *vanD* je rezistence k vysokým koncentracím vankomycinu a k nízkým koncentracím teikoplaninu. (GOERING, a kol., 2016).

2.2.3 Aminoglykosidy

Aminoglykosidy působí jako inhibitory buněčné stěny. Váží se na formylmethionyl-transferovou RNA (dále jen fmet-tRNA) obsaženou v ribozomální podjednotce 30S a brání syntéze bílkovin. Zároveň způsobují chybné čtení tripletů mRNA na ribozomech. Mohou obsahovat buď streptidin nebo 2-deoxystreptamin u gentamicinu, amikacinu, tobramycinu a netilmicinu. Amikacin a netilmicin bývají účinné i proti bakteriím rezistentním ke gentamicinu a tobramycinu. Streptidin je součástí nejstaršího aminoglykosidu, streptomycinu. Streptomycin se dnes používá pouze k léčbě tuberkulózy. Aminoglykosidy se používají při léčbě infekcí vyvolaných Gram-negativními bakteriemi, kromě anaerobních. Některé bakterie, především enterobakterie, mohou produkovat enzymy inaktivující aminoglykosidy na různých místech jejich molekuly. Geny pro produkci enzymů se nacházejí na transpozonech a pomocí plazmidů se mohou šířit mezi různými bakteriálními druhy. Aminoglykosidy se mohou používat i proti stafylokokům, většinou v kombinaci s beta-laktamy. Proti *P. aeruginosa* bývá nejúčinnější amikacin, ale v případě citlivosti lze použít i jiné aminoglykosidy obsahující 2-deoxystreptamin. (GOERING, a kol., 2016).

Obrázek 4 Schéma 2-deoxystreptaminu



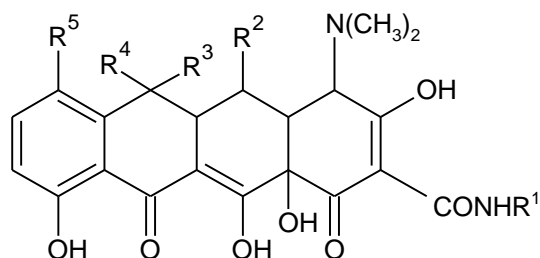
Zdroj: vlastní

2.2.4 Tetracykliny

Tetracykliny mají velkou molekulu obsahující čtyři cykly a pět míst pro substituenty. Všechny mají podobné spektrum účinku, používají se většinou proti chlamydiím, rickettsiím a mykoplazmatům. Váží se na malou ribozomální podjednotku a brání aminoacyl-transferové RNA přístupu na akceptorové místo ribozomu. Selektivní toxicitu zajišťuje větší absorpce tetracyklinů prokaryotickými buňkami. Případná rezistence bývá způsobena

přítomností efluxních pump, které čerpají antibiotickou látku z bakteriální buňky zpět do vnějšího prostředí. Mezi zástupce tetracyklinů patří například tetracyklin a tigecyklin, který je díky glycylycyklinové struktuře účinný i proti bakteriím rezistentním k tetracyklinům. (GOERING, a kol., 2016).

Obrázek 5 Základní schéma tetracyklinů

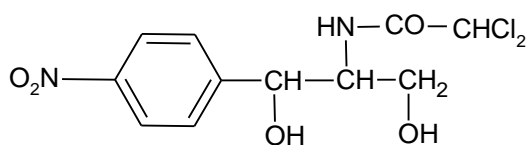


Zdroj: vlastní

2.2.5 Chloramfenikoly

Chloramfenikol se váže na velkou ribozomální podjednotku 50S, kde brání vzniku peptidové vazby inhibicí peptidové transferázy (peptidyltransferázy). Má afinitu i k podjednotce 70S mitochondriálních ribozomů eukaryot, což má za následek jeho toxicitu, především pro kostní dřeň. Používá se při bakteriálních meningitidách, působí proti velkému spektru Gram-pozitivních i Gram-negativních bakterií. Rezistence ke chloramfenikolu bývají většinou způsobené inaktivací látky chloramfenikolacetyltransferázou. Tento enzym je kódován plazmidem a může být předáván mezi Gram-negativními bakteriemi. (GOERING, a kol., 2016).

Obrázek 6 Chloramfenikol s nitrobenzenovým jádrem



Zdroj: vlastní

2.2.6 Makrolidy

Makrolidy jsou cyklické bakteriostatické látky obsahující čtrnácti- až šestnáctičlenný laktonový kruh. Hlavním zástupcem je erytromycin. Váže se na 23S rRNA na 50S ribozomální podjednotce. Po vzniku peptidové vazby při translaci blokuje uvolnění tRNA z ribozomu. Používá se k terapii infekcí způsobených Gram-pozitivními koky (zejména streptokoky), pokud nelze použít penicilin. Působí i proti legionelám, chlamydiím, rickettsiím, mykoplazmatům a *Campylobacter jejuni*. Případná rezistence může být způsobená efluxem

kódovaným geny *mef* nebo *erm* nalézajícími se na plazmidech. Rezistence k makrolidům může být také způsobena změnou cílové struktury, kdy pozměněná 23S rRNA má methylované dva adeninové nukleotidy. Ke změně dochází díky přítomnosti enzymu rRNA methylázy. Bakterie rezistentní k erytromycinu druhým zmíněným způsobem bývají současně rezistentní i ke klindamycinu a linkomycinu, což se nazývá makrolid-linkosamid-streptogramin rezistence (dále jen MLS rezistence). Účinnější jsou deriváty erytromycinu, ketolidy, např. roxitromycin. Vyznačují se vyšší afinitou k 50S ribozomální podjednotce. (GOERING, a kol., 2016).

2.2.7 Linkosamidy

Linkosamidy se váží na velkou ribozomální podjednotku 50S, kde zabraňují tvorbě peptidové vazby. Chlorovaný derivát linkomycinu, klindamycin, má podobné spektrum účinků jako erytromycin, ale s vyšší účinností proti anaerobním bakteriím. Špatně proniká přes vnější membránu aerobních Gram-negativních bakterií. Některé z kmenů s MLS rezistencí mohou vykazovat citlivost ke klindamycinu *in vitro*, ale *in vivo* bývají rezistentní. (GOERING, a kol., 2016).

2.2.8 Oxazolidinony

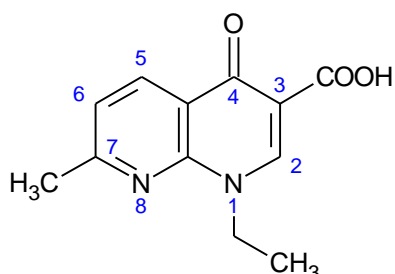
Oxazolidinony působí na Gram-pozitivní koky, většinou včetně multirezistentních kmenů. Hlavním zástupcem je linezolid, váže se na 23S rRNA v 50S ribozomální podjednotce a brání vytvoření funkčního komplexu 70S. Rezistence pozměněným cílem jsou vzácné, ale občas se mohou vyskytnout u *E. faecium*. (GOERING, a kol., 2016).

2.2.9 Chinolony a fluorchinolony

Chinolony jsou baktericidní látky, které brání replikaci bakteriální DNA. Dochází k tomu inhibicí DNA gyrázy a topoizomeráz, které zajišťují správnou konformaci nukleové kyseliny při replikaci (odstraňují a vytvářejí nadšroubovicové uspořádání DNA). První generaci chinolonů tvoří kyselina nalidixová. Používá se proti enterobakteriím. Následující generace chinolonů jsou fluorchinolony obsahující fluor v poloze 6 chinolonového kruhu. Tato substituce vede k lepšímu antibakteriálnímu účinku. Chinolony druhé generace, mezi které patří ciprofloxacin a norfloxacin, jsou účinné proti Gram-negativním bakteriím včetně pseudomonád a proti některým Gram-pozitivním kokům. Moxifloxacin ze třetí generace má oproti druhé generaci rozšířený účinek na větší spektrum Gram-pozitivních bakterií, je účinný i proti *S. pneumoniae*. (GOERING, a kol., 2016).

Rezistence vůči chinolonům může být kódována chromozomem i plazmidem. Chromozomem kódovaná rezistence může způsobit změnu cílových enzymů, snížit propustnost buněčné stěny pro chinolony nebo umožnit eflux. Plazmidem zprostředkovaná rezistence je spojená s tvorbou ochranných bílkovin (Qnr proteinů) znemožňujících vazbu chinolonů na enzymy podílející se na replikaci DNA. (GOERING, a kol., 2016).

Obrázek 7 Kyselina nalidixová



Zdroj: vlastní

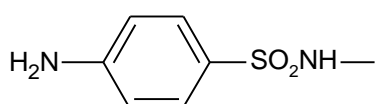
2.2.10 Rifamyciny

Rifamyciny jsou baktericidní látky s velkou molekulou. Hlavním zástupcem je rifampicin. Inhibuje syntézu mRNA tím, že se váže na bakteriální RNA-polymerázu. Dalšími zástupci jsou rifabutin a rifapentin s pomalejším vylučováním z organismu. Rifamyciny se používají proti mykobakteriím a meningokokům. V kombinaci s dalšími léky se mohou užít při stafylokoky způsobené endokarditidě umělé chlopně. Meningokoky i stafylokoky si mohou snadno tvořit rezistenci k rifamycinům. (GOERING, a kol., 2016).

2.2.11 Sulfonamidy

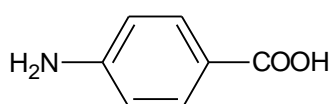
Bakteriostatický účinek sulfonamidů je dán podobností s kyselinou *para*-aminobenzoovou (dále jen PABA), se kterou soutěží o aktivní místo dihydropteroátsyntetázy. Dihydropteroátsyntetáza je enzym katalyzující syntézu kyseliny tetrahydrofolové (forma kyseliny listové, dále jen THFA). THFA je potřebná k syntéze purinových a pyrimidinových bází. K sulfonamidům jsou primárně citlivé Gram-negativní tyčinky kromě pseudomonád. Může k nim vznikat sekundární rezistence zprostředkovaná plazmidem, kdy dochází k tvorbě dihydropteroátsyntetázy s nižší afinitou k sulfonamidům. (GOERING, a kol., 2016).

Obrázek 8 Schéma sulfonamidu



Zdroj: vlastní

Obrázek 9 Kyselina para-aminobenzoová



Zdroj: vlastní

2.2.12 Trimethoprim a kotrimoxazol

Stejně jako sulfonamidy i trimethoprim znemožňuje syntézu THFA, ale trimethoprim v pozdějším kroku její syntézy. Inhibuje dihydrofolátreduktázu. Používá se při infekcích močových cest, působí proti Gram-negativním tyčinkám s výjimkou pseudomonád. Rezistence mohou být způsobeny přítomností plazmidového genu pro tvorbu pozměněné dihydrofolátreduktázy. (GOERING, a kol., 2016).

Trimethoprim se často užívá v kombinaci se sulfonamidy, v podobě např. kotrimoxazolu (kombinace trimethoprimu a sulfamethoxazolu, někdy bývá psaný také jako co-trimoxazol). Kombinací dvou bakteriostatických látek může při použití proti některým bakteriím dojít k bakteriocidnímu účinku. Kmeny s rezistencí k sulfonamidům i k trimethoprimu jsou zároveň rezistentní i ke kotrimoxazolu. (GOERING, a kol., 2016).

2.2.13 Lipopeptidy

Lipopeptidy působí baktericidně proti velkému spektru Gram-pozitivních koků včetně MRSA a VRE. Svým inhibičním vlivem na cytoplazmatickou membránu brání syntéze ATP a absorpci živin. Polypeptid bacitracin inhibuje defosforylaci a regeneraci fosfolipidového nosiče, čímž zabraňuje syntézy buněčné stěny. Z důvodu své toxicity se používá pouze lokálně. K dalšímu zástupci, daptomycinu, se rezistence vyskytuje jen výjimečně. (BENEŠ, 2018).

2.2.14 Polymyxiny

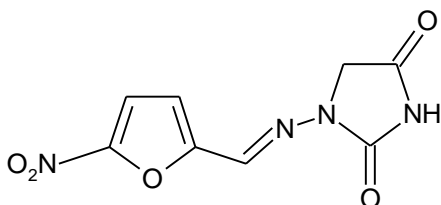
Polymyxiny jsou cyklické polypeptidy s baktericidním účinkem. Jelikož obsahují kromě aminokyselin i mastnou kyselinu, řadí se někdy mezi lipopeptidy. (BENEŠ, 2018). Jejich volné aminoskupiny narušují strukturu a celistvost buněčných membrán. Působí proti velkému množství Gram-negativních bakterií kromě rodu *Proteus*. Z důvodu jejich toxicity se většinou používají jen lokálně. Mezi nejběžnější zástupce patří kolistin (polymyxin E) produkovaný bakterií *E. coli* a polymyxin B. (GOERING, a kol., 2016).

2.2.15 Nitrofurantoin

Nitrofurantoin díky své lipofilní struktuře snadno proniká do prokaryot prostou difuzí. Po průniku do bakteriální buňky se díky přítomnosti bakteriálních enzymů (nitroreduktáz) redukuje nitroskupina nitrofurantoinu. To má za následek tvorbu volných radikálů a oxidaci bakteriálních makromolekul. Jelikož se nitrofurantoin koncentruje v moči, má využití především jako močové antiseptikum. Vzhledem k tomu, že bakterie potřebují ke svému životu nitroreduktázy, se získaná rezistence objevuje velmi vzácně. Aby rezistence vznikla, musí dojít k mnoha změnám, nestačí jediná mutace. Rezistentní ve více než 90 % bývají

zástupci rodu *Proteus* a druh *P. aeruginosa*, poměrně často se rezistence vyskytuje i u klebsiel. Citlivé bývají Gram-pozitivní bakterie, dále z Gram-negativních bakterií například *E. coli*. (BENEŠ, 2018).

Obrázek 10 Nitrofurantoin



Zdroj: vlastní

2.3 Vznik a mechanismy rezistence

Bakterie se mohou vyznačovat dvěma typy rezistence. Primární je přirozená, 100 % kmenů daného druhu je rezistentních k určité látce. Gram-negativní bakterie jsou primárně rezistentní k velkým molekulám, které neprojdou přes jejich vnější membránu. Druhým typem je sekundární, získaná rezistence, které mohou bakterie nabýt mutací, konjugací, transdukcí nebo transformací. (GOERING, a kol., 2016; JULÁK, 2006).

Rezistence mohou bakterie docílit změnou cílové struktury působení antibiotika, zabráněním jeho průniku dovnitř do buňky či jeho neustálým aktivním vypuzováním ven z buňky (tzv. eflux) nebo inaktivací antibiotika. (GOERING, a kol., 2016; JULÁK, 2006). Efluxní transmembránové pumpy se řadí mezi systémy aktivního transportu. Je známých pět skupin efluxních systémů, jako zdroj energie využívají ATP, gradient kationtů H⁺ nebo gradient Na⁺/H⁺. (BENEŠ, 2018).

Bakterie vyvinuly několik molekulárních mechanismů pro vznik rezistentních kmenů. Jsou jimi chromozomální mutace (např. mutace PBP u *S. pneumoniae*), geny rezistence umístěné na plasmidech přenášených konjugací (např. u enterobakterií) nebo geny rezistence na transpozonech. Přenos DNA mezi bakteriemi jednoho druhu může probíhat pomocí bakteriofágů s lyzogenním cyklem, některé bakterie jako *S. pneumoniae* dokáží přijmout DNA z okolí transformací. (GOERING, a kol., 2016).

Expese látek umožňujících rezistenci (enzymů, pozměněných proteinů, a dalších) vyžaduje určité množství energie. Z toho důvodu jsou rezistentní bakterie znevýhodněné v prostředí bez antimikrobiálních látek. Hendikep se může projevit například pomalejším růstem v porovnání s citlivými kmeny. (BENEŠ, 2018).

2.4 Metody určení citlivosti bakterií na antimikrobiální látky

V laboratoři je možné testovat citlivost bakterií pouze *in vitro*, tzv. ve zkumavce. Jde o izolované testy, které poukazují na chování mikroorganismu mimo hostitele. Umožňují s určitou pravděpodobností odhadnout výsledek léčby antibiotiky a na základě tohoto zjištění lékař zvolí vhodnou látku k terapii. Testy na vyšetření citlivosti bakterií je možné rozdělit na difuzní a diluční, které využívají ředění látek. (GOERING, a kol., 2016) Zda je bakterie citlivá, intermediárně (částečně) citlivá nebo rezistentní, se určuje podle hraničních hodnot, tzv. breakpointů. (BENEŠ, 2018).

2.4.1 Diskový difuzní test

Diskový difuzní test patří mezi kvalitativní stanovení citlivosti bakterie na antibiotika. Bakterie se inokulují na agar Mueller-Hinton (dále jen MH), pro náročnější mikroby jako streptokoky se používá MH s přídavkem krve. (VOTAVA, a kol., 2010). Následně se na plotnu položí disky z filtračního papíru napuštěné antibiotiky. Po 18 až 24 hodinách kultivace v termostatu se odečítají průměry inhibičních zón kolem disků, kde bakterie nerostou. Kromě velikosti zóny se posuzuje i její tvar a okraj. Pokud vykazuje deformaci, bakterie je považována za rezistentní. Ohledně okraje zóny se může vyskytnout buď ostrá hranice, nebo pozvolný přechod. Například aby byl *S. aureus* citlivý k benzylpenicilinu (penicilinu G), musí být zóna inhibice větší nebo rovna 26 mm tvořit pozvolný okraj. Oproti tomu kmeny enterokoků citlivé k vankomycinu vykazují inhibiční zónu větší nebo rovnu 12 mm s ostrým ohraničením. (THE EUROPEAN COMMITTEE ON ANTIMICROBIAL SUSCEPTIBILITY TESTING, 2018). Další používanou difuzní metodou je E-test, který využívá testovacího proužku napuštěného rostoucí koncentrací antibiotika. Proužek se položí na naočkovaný MH agar, po kultivaci vznikne inhibiční zóna v podobě kapky. V místě, kde protíná testovací proužek, se na stupnici odečítá hodnota minimální inhibiční koncentrace. (BENEŠ, 2018; VOTAVA, a kol., 2003).

2.4.2 Minimální inhibiční koncentrace

Pro kvantitativní zjištění citlivosti bakterie na danou antimikrobiální látku se stanovuje minimální inhibiční koncentrace (dále jen MIC). Její hodnota udává nejmenší koncentraci látky, která zabrání makroskopickému růstu bakterie. (GOERING, a kol., 2016; JULÁK, 2006; VOTAVA, a kol., 2010). Jedná se o mikrodiluční metodu, která využívá ředění antimikrobiálních látek. Ke stanovení se využívají mikrotitrační destičky s 96 jamkami. Všechny jamky obsahují živný bujon, ve 12 sloupcích jsou různá antibiotika. V rámci 8 řádků se jedná o koncentrace antibiotik, které jsou seřazeny sestupně dvojkovou řadou.

(GOERING, a kol., 2016; VOTAVA, a kol., 2010). V pravém horním rohu (v jamce 12A) se nalézá kontrola růstu. Do připravené destičky se jehlovým inokulátorem aplikuje suspenze bakterií. Po kultivaci se vždy odečítá poslední jamka bez zákalu a bez sedimentu. (VOTAVA, a kol., 2010).

2.4.3 Minimální baktericidní koncentrace

Kromě MIC je možné získat i hodnotu minimální baktericidní koncentraci (dále jen MBC), která vypovídá o nejmenší koncentraci látky nutné k usmrcení bakterie. (JULÁK, 2006). Zjišťuje se vyočkováním médií s bakteriemi a různými koncentracemi antimikrobiálních látek, kde při určování MIC nedošlo k makroskopickému růstu bakterií. (BENEŠ, 2018). V případě, že je MIC menší nebo rovna čtyřnásobku MBC, lze testovanou látku označit za baktericidní. (BENEŠ, 2018; VOTAVA, a kol., 2010).

3 VYBRANÉ ROSTLINY A JEJICH ANTIMIKROBIÁLNÍ LÁTKY

Rostliny jsou významným zdrojem nepřeberného množství biologicky aktivních látek, které mohou mít medicínský potenciál. Tyto sekundární metabolity pomáhají rostlinám v ochraně (před býložravci, konkurenčními rostlinami a mikroby) nebo mohou sloužit k usnadnění rozmnožování (přilákání opylovačů a přenašečů semen). (JAHODÁŘ, 2011). Mezi biologicky aktivními látkami rostlin najdeme i ty s antibakteriálním, antivirovým a fungicidním účinkem. (BARNES, et al., 2002; BUHNER, 2014; DITTRICH et LEITZMANN, 1996; JAHODÁŘ, 2011; RITTEROVÁ, 2018). Výhodou používání rostlin a extraktů z nich je to, že bakterie si na ně nevytváří rezistenci. Důvodem je komplexní směs mnoha chemicky různorodých látek obsažených v rostlinách, které vzájemně působí synergicky. (BUHNER, 2014; RITTEROVÁ, 2018). Například Gram-pozitivní bakterie bývají citlivé k inhibitorům hyaluronidázy, mezi které patří látky obsažené v třapatce úzkolisté (*Echinacea angustifolia*). (BUHNER, 2014).

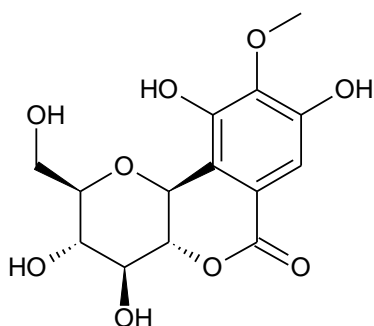
Na antibakteriálních účincích rostlin se podílejí zejména fenolické látky (BUTNARIU et BOSTAN, 2010), které mohou zároveň podporovat funkci imunity (DITTRICH et LEITZMANN, 1996). Polyfenoly dokážou vytvářet vodíkové a iontové vazby s proteiny, např. s enzymy nebo iontovými kanály. (JAHODÁŘ, 2011). Mezi polyfenoly patří velké množství sloučenin včetně fenolových kyselin, hydroxyskořicových kyselin (kyselina kávová, kyselina ferulová) a flavonoidů. Aby byly flavonoidy účinné proti bakteriím, musí být ve vysoké koncentraci. (DITTRICH et LEITZMANN, 1996).

Růstu některých mikroorganismů brání také saponiny a thioglykosidy (glukosinoláty). (DITTRICH et LEITZMANN, 1996). Saponiny mají antimikrobiální aktivitu díky schopnosti reagovat s membránami a poškozovat je. Thioglykosidy, chinolony a furanokumariny se mohou vázat na proteiny a měnit jejich biologickou aktivitu. Antimikrobiálně působí i anthokyany. Oproti tomu alkaloidy sloužící rostlině jako ochrana před pozřením obratlovci nemají antimikrobiální účinek. Lipofilní terpeny mohou měnit strukturu i vlastnosti buněčných membrán. (JAHODÁŘ, 2011). Sulfidy obsažené v česneku působí proti některým mikroorganismům a zároveň ovlivňují imunitní systém. (DITTRICH et LEITZMANN, 1996).

3.1 *Bergenie tučnolistá (Bergenia crassifolia L.)*

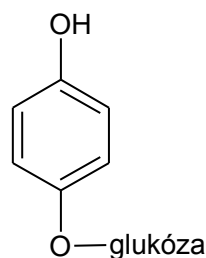
Bergenie je využívána v tradičních asijských medicínách k léčbě kašle a horečky a pro posílení imunity. (HENDRYCHOVÁ a TŮMOVÁ, 2012; SHIKOV, et al., 2014). Mezi hlavní obsahové látky patří polyfenoly bergenin, norbergenin, katechin, kyselina gallová a ellagová. Na biologickou aktivitu bergeninu mají vliv hydroxylové skupiny, bergenin podporuje imunitu, působí antivirově a protizánětlivě. Kromě polyfenolů obsahuje *bergenie* i glykosid arbutin. Antibakteriální a dezinfekční účinky arbutinu zajišťuje jeho aglykon hydrochinon. Arbutin se také vyznačuje schopností inhibovat syntézu melaninu v kůži. Při vyšších koncentracích v těle může působit toxicky na játra a ledviny. Izolovaný bergenin má negativní vliv na růst *E. coli*. Extrakty z *bergenie* vykazují inhibiční účinky také proti stafylokokům a *P. aeruginosa*. (HENDRYCHOVÁ a TŮMOVÁ, 2012). Podle Shikova et al. (2014) působí *bergenie* i proti enterokokům, proteům.

Obrázek 11 Bergenin



Zdroj: vlastní

Obrázek 12 Arbutin



Zdroj: vlastní

3.2 *Česnek setý (Allium sativum L.)*

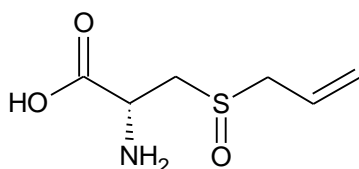
Rostlina se tradičně využívá v lidovém léčení a široké uplatnění má i v kuchyni. (DITTRICH et LEITZMANN., 1996; JAHODÁŘ, 2011; RITTEROVÁ, 2018). Používá se složená rozpadavá cibule (*Allii sativi bulbus pulveratus*). (JAHODÁŘ, 2011). Česnek má antiseptické, bakteriostatické a antivirové účinky. Používá se při akutních i chronických onemocněních dýchacích cest. Podporuje imunitu stimulací fagocytózy, proliferace lymfocytů a tvorbou interferonu γ . *In vitro* zvyšuje aktivitu NK buněk a T-lymfocytů a produkci cytokinů jako IL-2 (interleukin-2). V *in vivo* testu na myších u nich došlo k navýšení počtu B-lymfocytů. (BARNES, et al., 2002).

V cibuli česneku je z 0,1–0,36 % obsažena silice. (BARNES, et al., 2002). Nachází se v ní sírné sloučeniny odvozené od *S*-allyl-cysteinsulfoxidu, jako je např. alliin. (JAHODÁŘ, 2011). Mezi produkty enzymatické reakce alliinu s allináзой patří allicin

(diallyldisulfomonooxid), a další diallyldisulfidy. Allináza se z buněk uvolňuje při jejich poškození. Kondenzačním produktem alllicinu je ajoen. Dalšími látkami vyskytujícími se v česneku jsou terpeny jako citral, geraniol, linalool a felandren. (BARNES, et al., 2002).

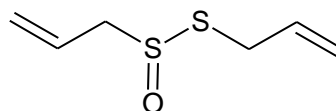
Antibakteriální účinky česneku zajišťuje především alllicin. Působí na rody *Staphylococcus*, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Proteus* a další. (BARNES, et al., 2002; RITTEROVÁ, 2018). Působení alllicinu odpovídá přibližně 1 % účinku penicilinu, ale na rozdíl od penicilinu nemá vedlejší účinky. Biologická aktivita prekurzorů alllicinu je významně nižší. (DITTRICH et LEITZMANN., 1996). Přesto samotný alllicin proti růstu druhu *Pseudomonas aeruginosa* nepůsobí, účinek se projevuje pouze při použití silice obsahující kromě alllicinu i diallyldisulfid. Česnek inhibuje syntézu RNA u bakterií v průběhu transkripce. (BARNES et al., 2002). Ajoen dokáže inhibovat buněčnou komunikaci (tzv. *quorum sensing*) pseudomonád, jejímž cílem je synchronizace exprese genů např. pro rezistenci. (JAKOBSEN et al., 2012).

Obrázek 13 Alliin



Zdroj: vlastní

Obrázek 14 Allicin



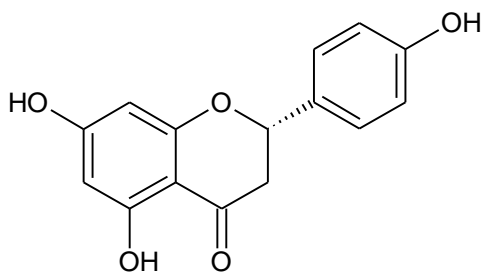
Zdroj: vlastní

3.3 Grapefruit (*Citrus paradisi* Macf.)

V grapefruitu se nachází polyfenoly, flavonoidy, limonoidy, steroly a další látky. (CVETNIČ a VLADIMIR-KNEŽEVIČ, 2004). Hydrofobní monoterpen limonen obsažený v grapefruitové silici získané ze slupky může působit jako inhibitor efluxních pump, především u *S. aureus*. Na inhibici efluxních pump se rovněž podílí i furanokumariny. Inhibiční vliv samotné grapefruitové silice se projevuje až při vyšších koncentracích, ale v kombinaci s antibiotiky působí už při nižších koncentracích. K tomu pravděpodobně dochází zmíněnou inhibicí efluxního mechanismu. (ABULROB, et al., 2004). Polyfenoly, flavonoidy a limonoidy jsou rovněž zastoupeny v semenech grapefruitu. Hlavními obsazenými flavonoidy jsou naringin a naringenin. (CARDELLINA, 2012; CVETNIČ a VLADIMIR-KNEŽEVIČ, 2004; KANMANI, et al., 2014; REAGOR, et al., 2002). Podle některých autorů se v semenech grepu nachází i flavonoidní glykosid hesperidin. (CVETNIČ a VLADIMIR-KNEŽEVIČ, 2004; REAGOR, et al., 2002).

Extrakt ze semen *Citrus paradisi* má antibakteriální a antivirové vlastnosti. (CVETNIČ a VLADIMIR-KNEŽEVIČ, 2004; JAISWAL, et al., 2019; REAGOR, et al., 2002; SONG, et al., 2019). Působí na široké spektrum bakterií (rody *Staphylococcus* a *Enterococcus* a *P. aeruginosa*), ale vyšší účinnost vykazuje proti Gram-pozitivním bakteriím. (CVETNIČ a VLADIMIR-KNEŽEVIČ, 2004; REAGOR, et al., 2002). Podle Cvetnič a Vladimír-Kneževiče působí na zmíněné bakterie a na rody *Streptococcus* a *Proteus* bakteriocidně, na *E. coli* bakteriostaticky. Extrakt ze semen grapefruitu poškozuje buněčnou membránu bakteriální buňky, což vede ke smrti bakterie. (CVETNIČ a VLADIMIR-KNEŽEVIČ, 2004; SONG, et al., 2019).

Obrázek 15 Naringenin



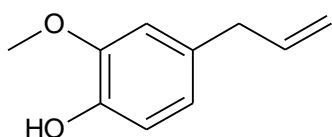
Zdroj: vlastní

3.4 Hřebíčkovce vonný (*Syzygium aromaticum* L.)

Hřebíčkovce vonný neboli hřebíčkovce kořený se je běžným kořením, používají se nerozvinuté květy (Caryophylli flos) a silice (Caryophylli floris etheroleum), které je v květních pupenech až 20 %. (JAHODÁŘ, 2011). V silici jsou obsaženy deriváty propenylfenolu (eugenol a eugenylacetát) a seskviterpen β -caryophyllen. Pro farmaceutické účely je hřebíčkovce nejpoužívanější v zubním lékařství. (BARNES, et al., 2002; JAHODÁŘ, 2011). Dalšími látkami v silici jsou methylsalicylát, methyleugenol, benzaldehyd, methylamylketon a α -ylangen. Ve hřebíčku najdeme také kampesterol, kaempferol, rhamnetin, sitosterol a stigmasterol. (BARNES, et al., 2002).

Hřebíčkovce dráždí kůži a sliznice, což může být způsobeno přítomným eugenolem. LD₅₀ hřebíčkové silice činí 2,5 mg/kg tělesné hmotnosti. Eugenol má antiseptické, analgetické a lokální anestetické účinky. Je významným inhibitorem funkce trombocytů, proto bývá doporučován pacientům s antikoagulační léčbou. (BARNES, et al., 2002). V kombinaci s penicilinem působí synergicky. (YADAV, et al., 2013). Podílí se na antibakteriálních vlastnostech hřebíčkovce. Hřebíčkovce je účinný proti *S. aureus*, *S. pyogenes*, *E. coli*, *K. pneumoniae* a *P. aeruginosa*. (NZEAKO, et al., 2006).

Obrázek 16 Eugenol



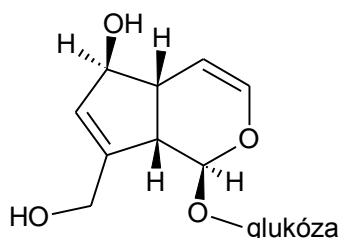
Zdroj: vlastní

3.5 Jitrocel kopinatý (*Plantago lanceolata* L.)

Jitrocel kopinatý je tradiční rostlinou používanou v lidovém léčitelství, lékopisnou surovinou je list (*Plantaginis folium*). (JAHODÁŘ, 2011). Z listů se získávají slizy, flavonoidy, fenolové kyseliny a iridoidní glykosidy včetně aukubinu. (BARNES, et al., 2002; JAHODÁŘ, 2011). Příbuzný jitrocel větší (*Plantago major* L.) obsahuje z fenolických kyselin kyselinu salicylovou, kyselinu *p*-hydroxybenzoovou, kyselinu gentisovou, kyselinu syringovou, kyselinu skořicovou, kyselinu kávovou, kyselinu *p*-kumarovou, kyselinu ferulovou, kyselinu chlorogenovou a kyselinu neochlorogenovou. Mezi flavonoidy jsou zastoupeny apigenin, baikalin, baikalein, skutelarein, homoplantaginin, nepitrin, luteolin a hispidulin. (BARNES, et al., 2002).

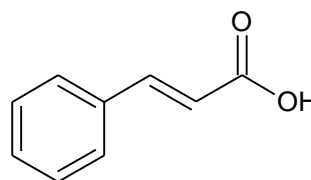
Jitrocel kopinatý se používá jako bronchodilatans (rozšiřuje průdušky) a obsažené kyseliny chlorogenová a neochlorogenová působí protizánětlivě. Aukubin inhibuje růst *S. aureus* a zároveň má hepatoprotektivní účinky. Jitrocel se vyznačuje nízkou toxicitou, nadměrné dávky mohou působit projímavě a snižovat krevní tlak. (BARNES, et al., 2002). Vykazuje inhibiční aktivitu proti *S. aureus*, *S. pyogenes*, *K. pneumoniae*, *P. vulgaris* a *P. aeruginosa*. (KOVÁČ, et al., 2015).

Obrázek 17 Aukubin



Zdroj: vlastní

Obrázek 18 Kyselina skořicová



Zdroj: vlastní

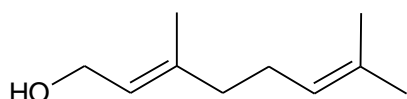
3.6 Kalost luční (*Geranium pratense* L.)

Rod *Geranium* produkuje silice obsahující monoterpeny (geraniol, citronelol), seskviterpeny, polyfenoly kyselinu ellagovou, ellagotaniny, gallotaniny, flavonoidy a

flavonoidní glykosidy. Tyto látky se podílejí na bakteriostatickém a fungicidním účinku kakostu. (JAHODÁŘ, 2011). Extrakt z kakostu inhibuje růst Gram-pozitivních bakterií (zejména *S. aureus*) a *P. aeruginosa*. (BURAKOVA, et al., 2012). Geraniol zvyšuje účinnost beta-laktamových antibiotik, chinolonů a chloramfenikolu proti multirezistentním bakteriím. Synergické působení geraniolu s některými antibiotiky může být dáno jeho schopností inhibovat určité efluxní pumpy. (LORENZI, et al., 2009). Citronelol podle LOPEZ-ROMERA et al. (2015) zvyšuje hydrofilní vlastnosti bakteriální buněčné membrány, narušuje její integritu a působí baktericidně pro *S. aureus* a *E. coli*. Antibakteriální účinek má také ellagotanin geraniin (LIS-BALCHIN, 2004), který působí proti *S. aureus* a *E. coli*. (CHENG, et al., 2016).

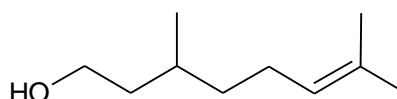
Z flavonoidních glykosidů jsou zastoupeny glykosidy kvercetinu, kaempferolu a myricetinu. (AKDEMIR, et al., 2001; KÜPELI, et al., 2007). Flavonoidy a jejich deriváty se podílejí na antioxidačním, antivirovém a protizánětlivém účinku kakostu. Zároveň podporují funkci imunity. (KÜPELI, et al., 2007). Rod *Geranium* je významným inhibitorem efluxních pump u MRSA a zvyšuje účinnost ciprofloxacinu a norfloxacinu. (BUHNER, 2014).

Obrázek 19 Geraniol



Zdroj: vlastní

Obrázek 20 Citronelol



Zdroj: vlastní

3.7 Lichořeřišnice větší (*Tropaeolum majus* L.)

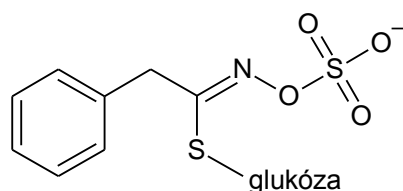
Lichořeřišnice se používá při léčbě onemocnění trávicího a močového systému a dýchacích cest, podporuje vykašlávání. (JAKUBCZYK, et al., 2018; RITTEROVÁ, 2018). Má antiseptické, antibakteriální, antivirové, antifungální a antiprotozoální (proti prvokům) účinky. V andské lidové medicíně se používala při léčbě onemocnění plic a průdušek. (JAKUBCZYK, et al., 2018).

V semenech lichořeřišnice větší se nalézá thioglykosid glukotropeolin s bakteriostatickým účinkem. (JAHODÁŘ, 2011; JAKUBCZYK, et al., 2018; JURCA, et al., 2018). Část glukotropeolinu se vysušením rozkládá, proto mají největší účinek čerstvé rostliny. (JAKUBCZYK, et al., 2018). Hlavními fenolickými kyselinami v *Tropaeolum majus* jsou kyselina *p*-kumarová, kyselina kávová a kyselina gallová. Převládajícími flavonoidy jsou katechin, epikatechin, luteolin a kvercetin. (JURCA, et al., 2018). Chemické složení extraktů

z rostliny se liší v závislosti na použité části rostliny, způsobu a místě pěstování a barvě květů. Květy obsahují anthokyaninová barviva, kaempferol, kvercetin, kyselinu chlorogenovou, myricetin a deriváty kyseliny hydroxyskořicové. V listech a semenech lichořeřišnice se nachází flavonoidy (deriváty kvercetinu a kaempferol), thioglykosidy (glukotropeolin, sinabin) a tetracyklické triterpeny kukurbitinu. (JAKUBCZYK, et al., 2018).

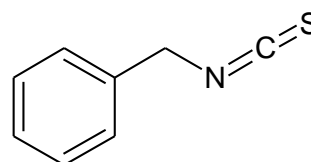
Glukotropeolin se ve vodě rozkládá na sirnou sloučeninu benzyliothiokyanát, který má antiseptické a antibiotické vlastnosti. (BUTNARIU et BOSTAN., 2010; JAKUBCZYK, et al., 2018). Benzyliothiokyanát se koncentruje v moči, kde může inhibovat případný růst bakterií. (JAKUBCZYK, et al., 2018). Působí synergicky s běžnými antibiotiky a zesiluje jejich účinek zvýšením propustnosti bakteriální membrány. Zároveň snižuje metabolickou aktivitu *P. aeruginosa*. Extrakt z květů lichořeřišnice má slabý antibakteriální účinek na *S. pneumoniae* a *S. pyogenes*. (JURCA, et al., 2018). Podle některých autorů působí lichořeřišnice proti *S. aureus*, *E. coli* a *P. aeruginosa*. (BUTNARIU et BOSTAN., 2010). Nejsilnější antibakteriální účinek mají listy. Extrakty z lichořeřišnice jsou účinné proti bakteriím rezistentním na sulfonamidy. (JAKUBCZYK, et al., 2018).

Obrázek 21 Glukotropeolin



Zdroj: vlastní

Obrázek 22 Benzyliothiokyanát



Zdroj: vlastní

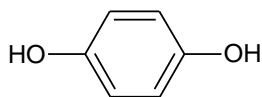
3.8 Medvědice lékařská (*Arctostaphylos uva-ursi* L.)

Pro farmaceutické účely se sbírají listy (*Uvae ursi folium*), které mohou obsahovat až 8 % fenolového glykosidu arbutinu a 20 % tříslovin. Rostlina má bakteriostatický účinek, čehož se využívá při zánětech močových cest. (JAHODÁŘ, 2011).

Medvědice lékařská obsahuje také flavonoidy (myricetin a kvercetin) a od nich odvozené glykosidy (hyperin, isokvercitrin, myricitrin a kvercitrin). Z iridoidů jsou obsaženy asperulosid a monotropein. V rostlině se nalézají také chinony jako hydrochinon, *p*-methoxyfenol a již zmíněný arbutin či jeho derivát methyl-arbutin. Dalšími obsaženými složkami jsou silice a kyselina chinová. (BARNES, et al., 2002).

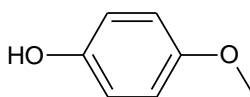
Za antiseptické účinky medvědice je zodpovědný hydrochinon a jeho deriváty. *In vitro* vykazuje extrakt z medvědice antimikrobiální účinek proti *S. aureus*, *E. coli* a dalším bakteriím. Antibakteriální účinky zajišťuje především arbutin, ale i další deriváty hydrochinonu. Minimální inhibiční koncentrace arbutinu se pohybuje mezi 0,4 až 0,8 % roztoku. Závisí na druhu testované bakterie a na aktivitě jejího enzymu β -glukosidázy. Při štěpení arbutinu β -glukosidázou dochází k tvorbě hydrochinonu a jeho koncentraci v moči. Nejvyšší enzymatická aktivita β -glukosidázy byla zjištěna u rodů *Enterobacter*, *Klebsiella* a *Streptococcus*, nejnižší u *Escherichia coli*. Hydrochinon působí hepatotoxicky, u arbutinu nebyl tento efekt zjištěn. (BARNES, et al., 2002).

Obrázek 23 Hydrochinon



Zdroj: vlastní

Obrázek 24 *p*-methoxyfenol



Zdroj: vlastní

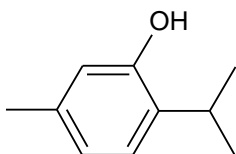
3.9 Tymián obecný (*Thymus vulgaris* L.)

Tymián obecný, známý také jako mateřídouška tymián, se vyznačuje tvorbou silic. (BARNES, et al., 2002; JAHODÁŘ, 2011; RITTEROVÁ, 2018). Silice obsahují monoterpeny jako je fungicidní thymol, dále cineol a karvakrol. V rámci druhů se mohou vyskytovat různé typy s odlišným složením silice. Sbírá se kvetoucí nať (Thymi herba), další lékopisnou surovinou je silice (Thymi etheroleum). (JAHODÁŘ, 2011). V rostlině dále najdeme *p*-cymen, γ -terpinen, linalool a thujan-4-ol. Z flavonoidů jsou zde zastoupeny cirsineol, 8-methoxycirsineol, thymonin a eriodiktyol. V tymiánu se vyskytují také kyselina kávová, kyselina rozmarýnová, saponiny a třísloviny. (BARNES, et al., 2002).

Tymián má baktericidní účinky. Antibakteriálně, antifungálně a anthelminticky (proti červům) působí thymol. Antifungální účinek má také karvakrol a tymiánová silice. Kyselina rozmarýnová působí protizánětlivě inhibicí komplementu a některých funkcí polymorfonukleárů. Tymiánová silice může dráždit kůži a sliznice, ve větších dávkách je toxická. (BARNES, et al., 2002). Tymián působí proti *S. aureus*, *S. pyogenes*, *E. coli* a *P. aeruginosa*. (NZEAKO, et al., 2006). Podle Ritterové (2018) inhibuje růst klebsiel a *Mycobacterium tuberculosis*. Tymián narušuje funkci efluxních pump MexAB-OprM u Gram-negativních bakterií, Mrs(A) u MRSA a Tet(K) u *E. coli*. Ohledně MexAB-OprM dokáže inhibovat i její genovou expresi. Díky tomu zvyšuje v bakteriích koncentraci použitých antibiotik jako beta-laktamů, tetracyklinů, chloramfenikolů, makrolidů a fluorochinolonů. Tymián

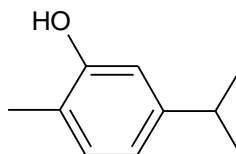
v kombinaci s tetracyklinem snižuje MIC tetracyklinu použitého proti rezistentním bakteriím více než 30krát. (BUHNER, 2014).

Obrázek 25 Thymol



Zdroj: vlastní

Obrázek 26 Karvakrol



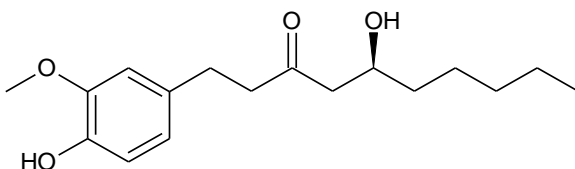
Zdroj: vlastní

3.10 Zázvorovník lékařský (*Zingiber officinale* Rosc.)

Zázvorovník, někdy nazývaný jen zázvor, se používá jako zelenina nebo koření. Využívá se oddenek (*Zingiberis rhizoma*), ze kterého se získává škrob a silice. (JAHODÁŘ, 2011; RITTEROVÁ, 2018). V silici jsou obsaženy především zingiberen a kurkumen (BARNES, et al., 2002; JAHODÁŘ, 2011), dále β -bisabolen, zingiberol, felandren, β -seskvifelandren, β -seskvifelandrol (*cis* a *trans*), geraniol a linalool (BARNES, et al., 2002). Zázvor také obsahuje gingeroly a jejich deriváty shogaoly a zingeron (dehydrované deriváty), 1-dehydrogingerdion a kyselinu 6-gingesulfonovou. (BARNES, et al., 2002).

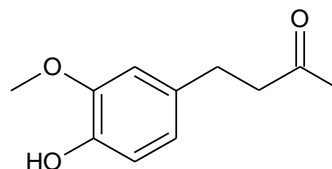
Zázvor působí protizánětlivě, čehož je možné využít při adjunktivní (doplňkové) léčbě osteoartritidy nebo revmatoidní artritidy. Častěji se využívá při zažívacích potížích, při nevolnosti a zvracení. Zázvorovník také vykazuje antimikrobiální účinky. Obsažené seskviterpeny (především β -seskvifelandren) působí *in vitro* proti rhinovirům způsobujícím rýmu. (BARNES, et al., 2002). V kombinaci s aminoglykosidy a některými dalšími antibiotiky účinkuje zázvor synergicky, zvyšuje jejich účinnost zvýšením permeability buněčné stěny bakterií a inhibicí efluxních pump. Zároveň působí proti stafylokokům, *E. coli*, *K. pneumoniae*, a *P. aeruginosa*. (BUHNER, 2014). Rostlina se vyznačuje nízkou toxicitou. Při použití gingerolu a shogaolu proti bakterii *Salmonella typhimurium* (kmenům TA100 a TA1535) se projevuje jejich mutagenní efekt. Zingeron naopak mutagenní aktivitu potlačuje. (BARNES, et al., 2002).

Obrázek 27 6-gingerol



Zdroj: vlastní

Obrázek 28 Zingeron



Zdroj: vlastní

PRAKTICKÁ ČÁST

4 CÍL A ÚKOLY PRÁCE

Hlavním cílem je zjistit, zda mají extrakty z deseti vybraných rostlin antibakteriální účinnost proti některým Gram-pozitivním a Gram-negativním bakteriím *in vitro*.

5 VÝZKUMNÉ PROBLÉMY/OTÁZKY

1. Jaká je kvalitativní účinnost rostlinných extraktů v difuzních testech?
2. Jaká je kvantitativní účinnost extraktů stanovená metodou MIC a MBC?
3. Má účinnost tinktur nějaké souvislosti s účinností běžně používaných antibiotik na konkrétní bakterie?
4. Jaké jsou koncentrace polyfenolů a flavonoidů v testovaných tinkturách?
5. Existuje vztah mezi obsahem fenolických látek v tinktuře a ovlivněním růstu, množení nebo životaschopnosti konkrétních druhů bakterií?

6 CHARAKTERISTIKA SLEDOVANÉHO SOUBORU

6.1 Bakterie

Pro testy bylo použito sedm kmenů Gram-pozitivních a čtyři kmeny Gram-negativních bakterií. Vzorky byly izolovány z biologického materiálu pacientů (nejčastěji z výtěrů krku / nosu / pochvy / rekta, z moči, krve nebo stolice. Ve skupině Gram-pozitivních koků byly stafylokoky (*S. aureus* včetně MRSA a *S. epidermidis*), streptokoky (*S. pyogenes*, *S. agalactiae*, *S. pneumoniae*) a enterokoky (*E. faecalis*, *E. faecium*). Mezi Gram-negativními tyčinkami byly *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. mirabilis* a *P. aeruginosa*.

6.2 Rostlinné tinktury

Proti bakteriím bylo použito deset průmyslově vyráběných rostlinných tinktur (Bylinné kapky, s.r.o., Česká republika). Pět extraktů obsahovalo 40% ethanol a dalších pět směs 40% ethanolu s glycerolem v poměru 2:1.

- **Lichořeřišnice (plod)** – lihový extrakt z plodu lichořeřišnice větší, s obsahem sušiny extraktu 37 mg v 60 kapkách tinktury
- **Jitrocel kopinatý** – lihový extrakt z listu jitrocele kopinatého, s obsahem sušiny extraktu 195 mg v 60 kapkách tinktury
- **Kakost luční** – lihový extrakt z natě kakostu lučního, s obsahem sušiny extraktu 62 mg v 60 kapkách tinktury
- **Tymián** – lihový extrakt z natě tymiánu obeckého, s obsahem sušiny extraktu 290 mg v 60 kapkách tinktury
- **Česnek setý** – lihový extrakt z cibule česneku setého, s obsahem sušiny extraktu 333 mg v 60 kapkách tinktury
- **Medvědice** – lihoglycerolový extrakt z listu medvědice lékařské, s obsahem sušiny extraktu 221 mg v 60 kapkách tinktury
- **Bergenie** – lihoglycerolový extrakt z oddenku a listu bergenie tučnolisté, s obsahem sušiny extraktu 54 mg v 60 kapkách tinktury
- **Grapefruit (Grep)** – lihoglycerolový extrakt ze semen grapefruitu, s obsahem sušiny extraktu 133 mg v 60 kapkách tinktury
- **Hřebíčkovce** – lihoglycerolový extrakt z květu hřebíčkovce vonného, s obsahem sušiny extraktu 218 mg v 60 kapkách tinktury

- **Zázvorovník (Zázvor)** – lihoglycerolový extrakt z oddenku zázvorovníku lékařského, s obsahem sušiny extraktu 11 mg v 60 kapkách tinktury

6.3 Antibiotika

Pro difuzní test byly použity disky filtračního papíru napuštěného antibiotikem o velikosti 6 mm (OXOID, Velká Británie).

- **Antibiotické disky použité proti stafylokokům:** Cefoxitin (30 µg), Erytromycin (15 µg), Klindamycin (2 µg), Tetracyklin (30 µg), Kotrimoxazol (Trimethoprim/Sulfamethoxazol 1:19, 25 µg), Gentamicin (10 µg), Ciprofloxacin (5 µg), Chloramfenikol (30 µg), Tigecyklin (15 µg), Linezolid (10 µg), Rifampicin (5 µg)
- **Antibiotické disky použité proti streptokokům:** Penicilin G (1 unit), Oxacilin (1 µg), Erytromycin (15 µg), Klindamycin (2 µg), Tetracyklin (30 µg), Kotrimoxazol (Trimethoprim/Sulfamethoxazol 1:19, 25 µg), Moxifloxacin (5 µg)
- **Antibiotické disky použité proti enterokokům:** Ampicilin (2 µg), Tetracyklin (30 µg), Vankomycin (5 µg), Teikoplanin (30 µg), Linezolid (10 µg), Tigecyklin (15 µg), Gentamicin (30 µg)
- **Antibiotické disky použité proti Gram-negativním tyčinkám:** Amoxicilin/Klavulanát (30 µg), Ampicilin (10 µg), Gentamicin (10 µg), Ciprofloxacin (5 µg), Piperacillin/Tazobaktam (36 µg), Cefotaxim (5 µg), Cefepim (30 µg), Imipenem (10 µg), Meropenem (10 µg), Amikacin (30 µg), Tigecyklin (15 µg), Ceftazidim (10 µg), Nitrofurantoin (100 µg), Kotrimoxazol (Trimethoprim/Sulfamethoxazol 1:19, 25 µg), Norfloxacin (10 µg), Cefuroxim (Cefuroxime Sodium, 30 µg)
- **Antibiotické disky použité proti pseudomonádám:** Piperacillin/Tazobaktam (36 µg), Ceftazidim (10 µg), Gentamicin (10 µg), Ciprofloxacin (5 µg), Imipenem (10 µg), Meropenem (10 µg), Amikacin (30 µg), Kolistin (10 µg), Cefepim (30 µg)

7 METODIKA PRÁCE

7.1 Difuzní test

Jednou z použitých metod pro zjištění účinku rostlinných extraktů *in vitro* byl jamkový difuzní test. Jamkový difuzní test je obdobou běžně používaného diskového difuzního testu, který využívá disky filtračního papíru napuštěného antibiotiky. (KOPECKÁ, a kol., 2017). MH agar ve dvou Petriho miskách byl rovnoměrně naočkován suspenzí vybraného bakteriálního kmenu ve fyziologickém roztoku, zákal suspenze činil 0,5 dle stupnice McFarlanda. Následně bylo v každé Petriho misce vyříznuto korkovrtem do agaru pět jamek pro rostlinné tinktury a jedna pro odpovídající kontrolní roztok – ethanol nebo lihoglycerol. Do každé jamky bylo napipetováno 100 μ L tinktury nebo kontrolního roztoku. Po kultivaci trvající 18 až 24 h v termostatu při 37 °C se měřila velikost (průměr) vzniklých inhibičních zón včetně jamky o průměru 9 mm. Za extrakty s antibakteriálním účinkem byly považovány tinktury s inhibiční zónou větší než oněch 9 mm. V této zóně žádné kolonie bakterií nerostly. V okolí jamek s kontrolními roztoky rostly kolonie bez omezení, čímž bylo možné vyloučit vliv 40% ethanolu i jeho směsi s glycerolem na růst a množení bakterií. Pro kultivaci streptokoků byl použit termostat s vyšší tenzí oxidu uhličitého (a to i u následujících testů MIC a MBC).

7.2 Zjištění minimální inhibiční koncentrace

Pro určení maximální koncentrace kontrolních roztoků ethanolu a lihoglycerolu, které nemají vliv na bakterie, byl vždy do první jamky ve sloupci v mikrotitrační destičce napipetován jeden z těchto roztoků po 100 μ L. Do první jamky v dalším sloupci se napipetovalo 100 μ L destilované vody. Do následujících řádků přišlo 100 μ L zmíněných látek naředěných bujonem v poměru 1:1, dále se snižovala koncentrace použitých roztoků dvojnásobným ředěním až do ředění 1:127. Jamky byly inokulovány suspenzí *S. epidermidis* a inkubovány do druhého dne v termostatu při 37 °C. V jamkách s ethanolem i destilovanou vodou rostly bakterie při stejném ředění (25 % látky, 75 % bujonu). Z toho bylo možné usoudit, že vliv měla především koncentrace bujonu potřebného pro růst bakterií. Roztok lihoglycerolu o koncentraci 25 % měl inhibiční vliv na bakterie. V následující jamce s 12,5% roztokem rostl *S. epidermidis* bez viditelného omezení růstu. Z toho důvodu byla následně pro MIC použita výchozí koncentrace 12 % testované látky (a 88 % bujonu).

Minimální inhibiční koncentrace se zjišťovala v mikrotitrační destičce s 96 jamkami rozdělenými do 12 sloupců a 8 řádků. Všechny jamky obsahovaly 100 μ L výsledného

roztoku, do sloupců 1 až 10 byly napipetovány tinktury s bujonem, 11. sloupec sloužil pro ethanol s bujonem a ve 12. byl lihoglycerol s bujonem. Všechny roztoky v prvním řádku obsahovaly 12 % tinktury nebo kontrolního roztoku a zbytek (88 %) byl doplněn bujonem. Koncentrace v následujících řádcích byly výsledkem dvojkového ředění. Následně byly jamky inokulovány suspenzí bakterií pomocí jehlového inokulátoru. Druhý den (po inkubaci 18 až 24 h v termostatu při 37 °C) byla vyhodnocena MIC jako poslední jamka ve sloupci s čirým médiem a bez sedimentu.

7.3 Zjištění minimální baktericidní koncentrace

Jamky, které byly vyhodnoceny jako hodnota MIC, a jim předcházející jamky, byly vyočkovány na tuhé médium v Petriho misce. Pro Gram-pozitivní koky byl použit krevní agar (dále jen KA), pro Gram-negativní tyčinky Endův agar (dále jen ENDO). Následovala inkubace 18 až 24 hodin v termostatu při 37 °C, po které se hodnotil nárůst kolonií.

7.4 Stanovení koncentrace polyfenolů v rostlinných extraktech

Stanovení koncentrací polyfenolů proběhlo z kapacitních důvodů a kvůli opakovanému měření v několika mikrotitračních destičkách. Ve dvou sloupcích byly různé koncentrace kyseliny gallové (SIGMA-ALDRICH, Německo) ve dvojkovém ředění, jakožto standardu pro stanovení kalibrační křivky. Výchozí roztok kyseliny gallové byl připraven o koncentraci 0,727 g/L. V následujících sloupcích byly vždy tři jamky pro blank (vzorek bez činidla) a tři jamky pro zkoumaný vzorek (s činidlem). Některé rostlinné tinktury musely být po prvním měření naředěny a znovu analyzovány z důvodu vysoké koncentrace polyfenolů. Za vzorky byly považovány tinktury, bylo k nim provedeno i shodné měření kontrolních roztoků (ethanolu, lihoglycerolu a jejich koncentrací odpovídajících koncentracím naředěných tinktur). Tím bylo možné zhodnotit a odečíst jejich vliv na zjištěnou koncentraci polyfenolů.

Podle rozložení standardu, vzorků a kontrolních roztoků bylo do každé jamky napipetováno 10 µL kyseliny gallové (v dubletu v odpovídajících koncentracích), tinktury, roztoku ethanolu nebo lihoglycerolu. Do jamek pro blank bylo přidáno 100 µL destilované vody, do ostatních jamek 100 µL Folin-Ciocalteuova fenolového činidla (SIGMA-ALDRICH, USA). Po pětiminutové inkubaci bylo do všech jamek přidáno 100 µL nasyceného roztoku uhličitanu sodného (PENTA, Česká republika). (ZLOCH, a kol., 2004). Tomu odpovídá roztok uhličitanu sodného o koncentraci 22 %. (PENTA, 2010). Během desetiminutové inkubace došlo v jamkách s přítomností polyfenolů k redukci molybdenu na

molybdenovou modř. Absorbance roztoků v mikrotitračních destičkách byla stanovena fotometricky při vlnové délce 620 nm na přístroji MRX II (DYNEX TECHNOLOGIES, Německo). (ZLOCH, a kol., 2004).

Následně podle koncentrace roztoků kyseliny gallové a jejich absorbancí byla vytvořena kalibrační křivka. Z ní se pomocí následujícího vzorce vypočetly koncentrace polyfenolů v rostlinných tinkturách.

$$c = \frac{A + 0,0127}{6,0741}$$

c - koncentrace, A - absorbance

7.5 Stanovení koncentrace flavonoidů v rostlinných extraktech

Koncentrace flavonoidů v rostlinných tinkturách se stanovovala obdobným způsobem (rozmístění standardu a vzorků v mikrotitračních destičkách) jako při měření polyfenolů. Jako standard byl použit katechin (SIGMA-ALDRICH, Německo), výchozí roztok byl o koncentraci 0,276 g/L. Do jamek mikrotitrační destičky bylo napipetováno 5 μ L standardu nebo vzorku. Do jamek pro blank bylo přidáno 40 μ L destilované vody, do ostatních 20 μ L 5% roztoku dusitanu sodného (PENTA, Česká republika). Po pětiminutové inkubaci bylo do jamek s dusitanem přidáno 20 μ L 10% roztoku síranu hlinitého (PENTA, Česká republika) a obsah jamek byl pipetou promíchán. Po dalších pěti minutách bylo do všech jamek napipetováno 150 μ L 1 M roztoku hydroxidu sodného (PENTA, Česká republika) a 100 μ L destilované vody, roztoky v jamkách byly opět promíchány. Po 15 minut trvající inkubaci se změřila absorbance na přístroji MRX II (DYNEX TECHNOLOGIES, Německo) při vlnové délce 490 nm s použitím referenčního filtru nastaveného na 620 nm. (ZLOCH, a kol., 2004).

Z absorbancí roztoků katechinu a jejich známých koncentrací byla sestrojena kalibrační křivka. Koncentrace flavonoidů v rostlinných tinkturách byly vypočteny podle následujícího vzorce.

$$c = \frac{A - 0,0096}{4,2001}$$

c - koncentrace, A - absorbance

8 ANALÝZA A INTERPRETACE VÝSLEDKŮ

8.1 Výsledky difuzních testů

V následujících tabulkách jsou uvedeny výsledky difuzních testů pro antibiotika a pro použité rostlinné tinktury. Kompletní tabulky s velikostí inhibičních zón kolem antibiotických disků jsou uvedeny v příloze č. 2. Čísla v tabulkách vedle názvů bakterií vyjadřují označení testovaných zástupců z daného druhu.

Tabulka č. 1. Výsledky difuzních testů u stafylokoků

Bakterie	Diskový difuzní test - ATB											Jamkový difuzní test [mm]										
	Cefoxitin	Erytromycin	Klindamycin	Tetracyklin	Kotrimoxazol	Gentamicin	Ciprofloxacín	Chloramfenikol	Tigecyklin	Linezolid	Rifampicin	Lichořeřišnice	Jitrocel kopinatý	Kakost luční	Tymián	Česnek setý	Medvědice	Bergerie	Grapefruit	Hřebíčkový ec	Zázvorovník	
<i>S. aureus</i>	1.	C	C	C	C	C	C	-	-	-	-	-	9	10	9	22	9	35	9	9	21	9
	2.	C	C	C	C	C	C	-	-	-	-	-	9	9	9	20	9	30	9	9	23	9
	3.	C	C	C	C	C	C	-	-	-	-	-	9	13	14	20	9	32	9	9	24	9
	4.	C	C	C	C	C	C	C	-	-	-	-	9	9	9	21	9	34	9	9	23	9
	5.	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	9	9	9	20	9	32	9	9	22	9
MRSA	1.	R	R	R	R	C	C	R	C	C	C	C	9	12	12	23	9	28	9	9	21	9
	2.	R	R	R	C	C	C	R	C	C	C	C	9	12	11	19	9	32	9	9	23	9
	3.	R	R	R	C	C	C	R	C	C	C	C	9	14	12	19	9	31	9	9	23	9
	4.	R	R	R	C	C	C	R	C	C	C	C	9	12	10	20	9	31	9	9	23	9
	5.	R	R	R	R	C	C	C	C	C	C	C	9	9	9	19	9	33	9	9	22	9
<i>S. epidermidis</i>	1.	R	R	R	C	R	R	R	C	C	C	C	9	22	22	29	9	40	15	9	33	9
	2.	R	R	R	C	R	R	-	-	-	-	-	9	22	24	26	9	43	21	9	36	9
	3.	R	R	R	C	R	R	R	C	C	C	C	9	25	23	25	9	42	18	9	31	9
	4.	R	C	C	R	C	R	R	C	C	C	C	9	21	18	23	9	36	9	9	28	9
	5.	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	9	26	24	28	9	47	15	9	35	9

C citlivý kmen

R rezistentní kmen

- netestováno

Zdroj: data z Laboratorního informačního systému Ústavu mikrobiologie FN Plzeň a vlastní naměřené hodnoty

Z tabulky č. 1 vyplývá, že testované kmeny *S. aureus* kromě MRSA byly citlivé (C) k cefoxitinu, erytromycinu a klindamycinu. Ke kotrimoxazolu a gentamicinu byly citlivé všechny kmeny zlatého stafylokoka. Ke chloramfenikolu, tigecyklinu, linezolidu a rifampicinu jevíly citlivost všechny testované kmeny stafylokoků. *S. epidermidis* byl ve většině testovaných případů rezistentní (R) k cefoxitinu, erytromycinu, klindamycinu, kotrimoxazolu, gentamicinu a ciprofloxacinu. Z rostlinných tinktur se projevil účinek u medvědice,

hřebíčkovce a tymiánu proti všem stafylokokům. Inhibiční zóny zaujímaly velikosti kolem jamek minimálně 19 mm. „Nejcitlivějším“ kmenem byl *S. epidermidis*, proti kterému působily i extrakty z jitrocele, kakostu a bergenie (kromě jednoho případu z pěti, kdy kolem jamky s bergenií došlo pouze ke snížení množství a velikosti kolonií). U žádného s testovaných druhů stafylokoků nebyl zaznamenán účinek při použití extraktů z lichořeřišnice, česneku, grapefruitu a zázvoru.

Tabulka č. 2. Výsledky difuzních testů u streptokoků

Bakterie	Diskový difuzní test - ATB							Jamkový difuzní test [mm]										
	Penicilin G	Oxacilin	Erytromycin	Klindamycin	Tetracyklin	Kotrimoxazol	Moxifloxacin	Lichořeřišnice	Jitrocel kopinatý	Kakost luční	Tymián	Česnek setý	Medvědice	Bergenie	Grapefruit	Hřebíčkovce	Zázvorovník	
<i>S. pyogenes</i>	1.	C	-	C	C	-	-	-	9	9	9	11	9	16	9	9	15	9
	2.	C	-	C	C	-	-	-	9	9	9	12	9	15	9	9	18	9
	3.	C	-	C	C	-	-	-	9	9	9	12	9	15	9	9	17	9
	4.	C	-	C	C	-	-	-	9	9	9	12	9	15	9	9	17	9
	5.	C	-	C	C	-	-	-	9	9	9	13	9	16	9	9	18	9
<i>S. agalactiae</i>	1.	C	-	C	C	-	-	-	9	9	9	9	9	18	9	9	13	9
	2.	C	-	C	C	-	-	-	9	9	9	9	9	13	9	9	14	9
	3.	C	-	R	R	-	-	-	9	9	9	9	9	13	9	9	11	9
	4.	C	-	C	C	-	-	-	9	9	9	9	9	14	9	9	12	9
	5.	C	-	R	R	C	-	-	9	9	9	9	9	13	9	9	12	9
	6.	I	-	C	C	-	-	-	9	9	9	9	9	13	9	9	12	9
	7.	C	-	R	C	-	-	-	9	9	9	9	9	15	9	9	16	9
<i>S. pneumoniae</i>	1.	C	C	R	R	R	C	C	9	13	15	17	11	16	12	9	22	9
	2.	C	C	C	C	C	C	C	10	13	16	17	11	17	12	9	22	9
	3.	C	C	C	C	C	C	C	10	13	14	18	11	19	13	9	25	9
	4.	C	C	C	C	-	-	-	9	11	11	15	10	17	9	9	21	9
	5.	C	C	C	C	C	R	C	9	10	11	13	10	14	9	9	21	9
	6.	C	C	C	C	-	-	-	9	11	11	15	10	18	9	9	22	9

C citlivý kmen

R rezistentní kmen

I intermediárně citlivý kmen

- netestováno

Zdroj: data z Laboratorního informačního systému Ústavu mikrobiologie FN Plzeň a vlastní naměřené hodnoty

Tabulka č. 2 znázorňuje citlivosti streptokoků zjištěné difuzní metodou. Všechny kmeny *S. pyogenes* byli citlivé k penicilinu G, erytromycinu i klindamycinu. S výjimkou jednoho intermediárně citlivého kmenu (I) *S. agalactiae* byly všechny další kmeny tohoto druhu citlivé k penicilinu G. Kmeny *S. pneumoniae* se vyznačovaly citlivostí k penicilinu G

a k oxacilinu, jeden kmen byl rezistentní vůči erytromycinu, klindamycinu a tetracyklinu. Jeden z testovaných kmenů pneumokoků vykazoval rezistenci ke kotrimoxazolu. Nejnižší účinnost rostlinných tinktur (jak v počtu působících extraktů, tak ve velikosti inhibičních zón) byla zaznamenána u *S. agalactiae*. Proti zmíněnému druhu působily jen medvědice a hřebíčkovce. Na růst *S. pyogenes* měly vliv tinktury z hřebíčkovce, medvědice a tymiánu. Nejvíce extraktů mělo účinek na *S. pneumoniae*, největší inhibiční zóny vznikly u hřebíčkovce, medvědice a tymiánu. Zóny inhibice se také vytvořily při použití kakostu a jitrocele u některých zástupců i kolem jamky s extraktem z bergenie. Všechny jamky s česnekovou tinkturou (při testování pneumokoků) byly lemovány úzkou, ale výraznou inhibiční zónou. U dvou ze šesti testovaných pneumokoků se projevil i nepatrný vliv lichořeřišnice.

Tabulka č. 3. Výsledky difuzních testů u enterokoků

Bakterie		Diskový difuzní test - ATB							Jamkový difuzní test [mm]									
		Ampicilin	Tetracyklin	Vankomycin	Teikoplanin	Linezolid	Tigecyklin	Gentamicin	Lichořeřišnice	Jitrocel kopinatý	Kakost luční	Tymián	Česnek setý	Medvědice	Bergenie	Grapefruit	Hřebíčkovce	Zázvorovník
<i>E. faecalis</i>	1.	C	R	C	C	C	C	-	9	9	9	13	9	20	9	9	15	9
	2.	C	C	C	C	C	C	-	9	9	9	15	9	19	9	9	15	9
	3.	C	R	C	C	C	C	C	9	9	9	11	9	20	9	9	15	9
	4.	C	R	C	C	C	C	R	9	9	9	12	9	18	9	9	15	9
	5.	C	R	C	C	C	C	C	9	9	9	10	9	19	9	9	15	9
<i>E. faecium</i>	1.	R	C	R	C	C	C	-	9	9	9	16	9	26	9	9	17	9
	2.	R	C	R	R	C	C	-	9	9	9	17	9	26	9	9	20	9
	3.	R	R	R	C	C	C	R	9	9	9	14	9	22	9	9	16	9
	4.	R	R	R	C	C	C	R	9	9	9	13	9	22	9	9	17	9
	5.	R	C	R	C	C	C	R	9	9	9	14	9	21	9	9	16	9

C citlivý kmen

R rezistentní kmen

- netestováno

Zdroj: data z Laboratorního informačního systému Ústavu mikrobiologie FN Plzeň a vlastní naměřené hodnoty

Tabulka č. 3 zachycuje citlivost enterokoků. *E. faecalis* byl citlivý k ampicilinu a vankomycinu, zatímco *E. faecium* byl vůči nim rezistentní. K tetracyklinu byla zaznamenána častá rezistence, zejména mezi kmeny *E. faecalis*. Zástupci obou druhů byly citlivý k teikoplaninu, linezolidu a tigecyklinu, pouze u jednoho kmene *E. faecium* byla zaznamenána rezistence vůči teikoplaninu. Proti oběma druhům měly účinek extrakty z medvědice, hřebíčkovce a tymiánu, přičemž větší inhibiční zóny byly většinou naměřeny u *E. faecium*.

Tabulka č. 4. Výsledky difuzních testů u čeledi *Enterobacteriaceae*

Bakterie	Diskový difuzní test - ATB														Jamkový difuzní test [mm]												
	Amoxicilin/Klavulanát	Ampicilin	Gentamicin	Ciprofloxacin	Piperacillin/Tazobaktam	Cefotaxim	Cefepim	Imipenem	Meropenem	Amikacin	Tigecyklin	Cefrazidim	Nitrofurantoin	Kotrimoxazol	Norfloxacin	Cefuroxim	Lichořeřšík	Jitrocel kopinatý	Kakost luční	Tymián	Česnek setý	Medvědice	Bergenie	Grapefruit	Hřebíček ec	Zázorovník	
<i>E. coli</i>	1.	R	R	C	C	C	C	C	C	C	C	C	-	-	-	-	9	9	9	9	9	18	9	9	17	9	
	2.	C	C	C	C	C	C	-	-	-	-	-	C	C	C	C	9	9	9	9	9	19	9	9	16	9	
	3.	C	C	C	C	C	C	-	-	-	-	-	C	C	C	C	9	9	9	9	9	18	9	9	17	9	
	4.	C	C	C	C	C	C	-	-	-	-	-	C	C	C	C	9	9	9	9	9	22	9	9	15	9	
	5.	C	C	C	C	C	C	-	-	-	-	-	C	C	C	C	9	9	9	9	9	23	9	9	19	9	
<i>K. pneumoniae</i>	1.	R	R	R	R	R	R	C	C	C	C	R	-	-	-	-	9	9	9	11	9	19	9	9	16	9	
	2.	C	R	C	C	C	C	-	-	-	-	-	C	C	C	C	9	9	9	9	9	17	9	9	14	9	
	3.	C	R	C	C	C	C	C	C	C	C	C	-	-	-	-	9	9	9	9	9	18	9	9	16	9	
	4.	R	R	R	R	R	R	R	C	C	C	C	R	-	-	-	-	9	9	9	9	9	17	9	9	15	9
	5.	C	R	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	-	-	-	-	9	9	9	9	9	16	9	9	14	9
<i>P. mirabilis</i>	1.	C	C	C	C	C	C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	9	9	9	9	9	22	9	9	17	9	
	2.	C	R	C	C	C	C	-	-	-	-	-	R	R	C	C	9	9	9	9	9	23	9	9	19	9	
	3.	C	C	C	C	C	C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	9	9	9	9	9	22	9	9	18	9	
	4.	C	R	R	R	R	R	R	C	C	C	C	R	R	R	R	9	9	9	9	9	22	9	9	17	9	
	5.	C	R	R	C	C	C	C	C	C	C	C	-	-	-	-	9	9	9	9	9	25	9	9	18	9	

C citlivý kmen

R rezistentní kmen

- netestováno

Zdroj: data z Laboratorního informačního systému Ústavu mikrobiologie FN Plzeň a vlastní naměřené hodnoty

Z tabulky č. 4 vyplývá, že všechny testované kmeny *E. coli* vykazovaly citlivost ke gentamicinu, ciprofloxacinu, cefotaximu a kombinaci antibiotik piperacillin/tazobaktam. Jeden z nich byl rezistentní k amoxicilin/klavulanátu a ampicilinu. Z klebsiel byly všechny testované kmeny rezistentní k ampicilinu. Čtyři byly testované a poté označené za citlivé k imipenemu, meropenemu, amikacinu a tigecyklinu. Různorodé výsledky citlivostí se vyskytovaly při použití amoxicilin/klavulanátu, gentamicinu, ciprofloxacinu, piperacillin/tazobaktamu, cefotaximu, cefepimu a ceftazidimu. První testovaná klebsiela produkovala ESBL. Z proteů vykazovaly všechny kmeny citlivost k amoxicilin/klavulanátu. Čtyři z testovaných kmenů byly citlivé k ciprofloxacinu, piperacillin/tazobaktamu a cefotaximu, u tří z kmenů byla zaznamenána citlivost vůči gentamicinu. Tři kmeny proteů projevovaly rezistenci

k ampicilinu. Čtvrtý testovaný kmen *P. mirabilis* byl producentem ESBL. Proti všem testovaným enterobakteriím působily tinktury z medvědice a hřebíčkovce. U ESBL pozitivní klebsiely vznikla malá inhibiční zóna kolem jamky s tymiánem. Zároveň byly u tohoto kmene naměřeny největší inhibiční zóny medvědice a hřebíčkovce mezi zástupci klebsiel. Při použití některých ethanolových tinktur (z jitrocele, kakostu a tymiánu) proti kmenům *P. mirabilis* vznikla dvojitá inhibiční zóna. Nejdříve vznikla vnější zóna, do které cca po 12 až 15 hodinách začal proteus přelézat svým plazivým růstem. Vytvářel tak „vnitřní“ inhibiční zónu, která se s kultivací v termostatu stále zmenšovala až zanikla při dosažení okraje jamky proteem.

Tabulka č. 5. Výsledky difuzních testů u pseudomonád

Bakterie	Diskový difuzní test - ATB								Jamkový difuzní test [mm]											
	Piperacilin/Tazobaktam	Cefrazidim	Gentamicin	Ciprofloxacín	Imipenem	Meropenem	Amikacin	Kolistin	Cefepim	Lichořeřnice	Jitrocel kopinatý	Kakost luční	Tymián	Česnek setý	Medvědice	Bergenie	Grapefruit	Hřebíčkovce	Zázvorovník	
<i>P. aeruginosa</i>	1.	C	C	C	C	C	C	-	-	-	9	9	9	9	9	23	9	9	17	9
	2.	R	R	R	R	R	R	R	C	R	9	9	9	9	9	21	9	9	17	9
	3.	C	C	C	C	C	C	C	C	C	9	9	9	9	9	19	9	9	14	9
	4.	C	C	C	C	C	C	C	C	C	9	9	9	9	9	18	9	9	14	9
	5.	C	C	C	C	C	C	C	C	C	9	9	9	9	9	19	9	9	14	9

C citlivý kmen

R rezistentní kmen

- netestováno

Zdroj: data z Laboratorního informačního systému Ústavu mikrobiologie FN Plzeň a vlastní naměřené hodnoty

V tabulce č. 5 je zaznamenána citlivost a rezistence pěti kmenů *P. aeruginosa*. Čtyři kmene vykazovaly dobrou citlivost k antibiotikům (k piperacilin/tazobaktamu, ceftazidimu, gentamycinu, ciprofloxacinu, imipenemu a meropenemu). Jeden kmen z pseudomonád byl rezistentní ke zmíněným antimikrobiálním látkám, z běžně testovaných antibiotik byl citlivý pouze ke kolistinu. Při testování rostlinných tinktur vznikly inhibiční zóny u všech testovaných pseudomonád kolem jamek medvědice a hřebíčkovce. Průměr inhibiční zóny kolem medvědicové tinktury činil 18 až 23 mm, kolem hřebíčkovce 14 až 17 mm.

8.2 Výsledky minimální inhibiční a minimální baktericidní koncentrace

V následujících tabulkách jsou uvedeny výsledky testů MIC a MBC při použití rostlinných extraktů proti bakteriím. Velká písmena označují jamky mikrotitrační destičky, ze kterých se odečítala hodnota. Tabulky s koncentracemi polyfenolů, flavonoidů a sušiny extraktů pro určení MIC a MBC těchto látek v každé tinktuře jsou uvedeny v příloze E. Určení MIC u medvědicové tinktury bylo obtížné, protože ve směsi extraktu s bujonem vznikaly sraženiny. Čísla v tabulkách u názvů bakterií opět udávají označení testovaných kmenů daného druhu. Pokud je podíl hodnot MIC ku MBC menší nebo roven 4, lze použitou látku považovat za baktericidní (viz. kapitola 2.4.3).

Tabulka č. 6. Výsledky MIC a MBC u stafylokoků

Bakterie	MIC										MBC										
	Lichořeřišnice	Jitrocel kopinatý	Kakost luční	Tymián	Česnek setý	Medvědice	Bergenie	Grapefruit	Hřebíčkový ec	Zázvy orovník	Lichořeřišnice	Jitrocel kopinatý	Kakost luční	Tymián	Česnek setý	Medvědice	Bergenie	Grapefruit	Hřebíčkový ec	Zázvy orovník	
<i>S. aureus</i>	1.	-	-	-	A	-	A	-	-	C	-	-	-	-	-	A	-	-	C	-	
	2.	-	-	-	A	-	B	-	-	D	-	-	-	-	-	A	-	-	C	-	
	3.	-	-	A	B	-	B	-	-	D	-	-	A	A	-	A	-	-	C	-	
	4.	-	-	-	A	-	B	-	-	D	-	-	-	-	-	A	-	-	C	-	
	5.	-	-	-	A	-	B	-	-	C	A	-	-	-	A	-	A	-	-	C	-
MRSA	1.	-	-	-	B	-	B	-	-	C	-	-	-	-	B	-	B	-	-	C	-
	2.	-	-	-	A	-	B	-	-	C	-	-	-	-	A	-	A	-	-	C	-
	3.	-	-	-	A	-	A	-	-	C	-	-	-	-	-	A	-	-	C	-	
	4.	-	-	-	A	-	A	-	-	C	-	-	-	-	A	-	A	-	-	B	-
	5.	-	-	-	A	-	B	-	-	C	-	-	-	-	-	A	-	-	C	-	
<i>S. epidermidis</i>	1.	-	-	-	B	-	C	-	-	C	-	-	-	-	B	-	B	-	-	C	-
	2.	-	A	A	C	-	F	B	-	F	-	-	A	-	A	-	D	-	-	C	-
	3.	-	-	-	A	-	C	-	-	C	-	-	-	-	A	-	B	-	-	C	-
	4.	-	-	-	A	-	B	-	-	C	-	-	-	-	-	B	-	-	C	-	
	5.	-	-	-	A	-	B	-	-	D	-	-	-	-	-	B	-	-	B	-	

- bez viditelného účinku
A - koncentrace 12 % tinktury
B - koncentrace 6 % tinktury
C - koncentrace 3 % tinktury
D - koncentrace 1,5 % tinktury
E - koncentrace 0,75 % tinktury
F - koncentrace 0,38 % tinktury
- méně než 5 narostlých kolonií u MBC při použití koncentrace 12 % tinktury

Zdroj: vlastní

Proti stafylokokům byl v testu MIC neúčinnější hřebíčkový ec (viz. tabulka č. 6), jeho vliv byl zaznamenán při koncentracích 1,5–3 % tinktury (s výjimkou jednoho kmene *S. epidermidis*). To odpovídá koncentraci 23,56 až 47,12 g/L sušiny extraktu. Jelikož je hodnota $MBC \geq 1/4 \text{ MIC}$, lze extrakt z hřebíčkovce považovat za baktericidní. Dále byla účinná medvědice s koncentrací 3–12 % tinktury (43,40–173,60 g/L sušiny extraktu) a tymián o koncentraci 6–12 % extraktu (113,04–226,08 g/L sušiny). Podle podílu MIC a MBC lze u obou tinktur rovněž předpokládat baktericidní účinky.

Tabulka č. 7. Výsledky MIC a MBC u streptokoků

Bakterie	MIC										MBC									
	Lichořeřišnice	Jitrocel kopinatý	Kakost luční	Tymián	Česnek setý	Medvědice	Bergenie	Grapefruit	Hřebíčkov ec	Zázvy orov ník	Lichořeřišnice	Jitrocel kopinatý	Kakost luční	Tymián	Česnek setý	Medvědice	Bergenie	Grapefruit	Hřebíčkov ec	Zázvy orov ník
<i>S. pyogenes</i>	1.	-	-	-	-	C	-	-	C	-	-	-	-	-	-	B	-	-	B	-
	2.	-	-	-	A	C	-	-	C	-	-	-	-	-	-	C	-	-	B	-
	3.	-	-	-	-	A	-	-	C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	B	-
	4.	-	-	-	-	A	-	-	C	-	-	-	-	-	-	A	-	-	B	-
	5.	-	-	-	-	A	-	-	B	-	-	-	-	-	-	A	-	-	B	-
<i>S. agalactiae</i>	1.	-	-	-	-	B	-	-	B	-	-	-	-	-	-	A	-	-	B	-
	2.	-	-	-	-	B	-	-	B	-	-	-	-	-	-	A	-	-	B	-
	3.	-	-	-	-	B	-	-	B	-	-	-	-	-	-	-	-	-	A	-
	4.	-	-	-	-	A	-	-	B	-	-	-	-	-	-	A	-	-	B	-
	5.	-	-	-	-	A	-	-	B	-	-	-	-	-	-	A	-	-	B	-
	6.	-	-	-	-	B	-	-	B	-	-	-	-	-	-	-	-	-	B	-
	7.	-	-	-	-	B	-	-	C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	B	-
<i>S. pneumoniae</i>	1.	-	-	-	-	A	-	-	D	-	-	-	-	-	-	-	-	-	C	-
	2.	-	-	-	-	A	-	-	C	-	-	-	-	-	-	A	-	-	C	-
	3.	-	-	-	-	A	-	-	C	-	-	-	-	-	-	A	-	-	C	-
	4.	-	-	-	-	B	A	-	C	-	-	-	-	-	-	A	-	-	B	-
	5.	-	-	-	-	A	A	-	C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	C	-
	6.	-	-	-	-	A	B	-	C	-	-	-	-	-	-	A	-	-	B	-

- bez viditelného účinku
A - koncentrace 12 % tinktury
B - koncentrace 6 % tinktury
C - koncentrace 3 % tinktury
D - koncentrace 1,5 % tinktury
- méně než 5 narostlých kolonií u MBC při použití koncentrace 12 % tinktury

Zdroj: vlastní

Tabulka č. 7 znázorňuje působení rostlinných tinktur proti streptokokům, účinnost byla zjištěna opět u hřebíčkovce a medvědice. Účinná koncentrace tinktury činila u hřebíčkovce 1,5 až 6 % (23,56–94,24 g/L sušiny extraktu), u medvědice 3 až 12 % (43,40–173,60 g/L sušiny). Z hodnot MIC a MBC lze odvodit, že oba extrakty působí baktericidně.

Tabulka č. 8. Výsledky MIC a MBC u enterokoků

Bakterie	MIC										MBC										
	Lichořeřnice	Jitrocel kopinatý	Kakost luční	Tymián	Česnek setý	Medvědice	Bergenie	Grapefruit	Hřebíčkov ec	Zázý orov ník	Lichořeřnice	Jitrocel kopinatý	Kakost luční	Tymián	Česnek setý	Medvědice	Bergenie	Grapefruit	Hřebíčkov ec	Zázý orov ník	
<i>E. faecalis</i>	1.	-	A	-	B	-	A	-	-	C	-	-	-	-	A	-	-	-	-	C	-
	2.	-	A	-	B	-	A	-	-	C	-	-	-	-	A	-	-	-	-	B	-
	3.	-	-	-	-	-	A	-	-	C	-	-	-	-	-	A	-	-	-	B	-
	4.	-	-	-	A	-	A	-	-	C	-	-	-	-	A	-	A	-	-	B	-
	5.	-	-	-	-	-	A	-	-	B	-	-	-	-	-	A	-	-	-	B	-
<i>E. faecium</i>	1.	-	-	-	B	-	B	-	-	C	-	-	-	-	B	-	A	-	-	C	-
	2.	-	-	-	B	-	B	-	-	D	-	-	-	-	B	-	B	-	-	D	-
	3.	-	-	-	A	-	A	-	-	C	-	-	-	-	A	-	A	-	-	C	-
	4.	-	-	-	A	-	A	-	-	C	-	-	-	-	A	-	A	-	-	C	-
	5.	-	-	-	B	-	A	-	-	C	-	-	-	-	A	-	A	-	-	C	-

- bez viditelného účinku
A - koncentrace 12 % tinktury
B - koncentrace 6 % tinktury
C - koncentrace 3 % tinktury
D - koncentrace 1,5 % tinktury
- méně než 5 narostlých kolonií u MBC při použití koncentrace 12 % tinktury

Zdroj: vlastní

V tabulce č. 8 jsou vypsané působící koncentrace rostlinných tinktur proti enterokokům. Hřebíčkov ec, medvědice a tymián vykazovaly účinek proti oběma testovaným druhům enterokoků, ale o něco větší vliv měly na *E. faecium*. Na dva z pěti testovaných kmenů *E. faecalis* neměla účinek tymiánová tinktura (v testu MIC), u dvou kmenů téhož druhu byla zaznamenána účinnost jitrocele. Z velikostí MIC a MBC je možné odvodit baktericidní efekt látek obsažených v hřebíčkovci, medvědici a tymiánu.

Tabulka č. 9. Výsledky MIC a MBC u *Enterobacteriaceae*

Bakterie	MIC										MBC										
	Lichořeřnice	Jitrocel kopinatý	Kakost luční	Tymián	Česnek setý	Medvědice	Bergenie	Grapefruit	Hřebíčkov ec	Zázv orov ník	Lichořeřnice	Jitrocel kopinatý	Kakost luční	Tymián	Česnek setý	Medvědice	Bergenie	Grapefruit	Hřebíčkov ec	Zázv orov ník	
<i>E. coli</i>	1.	-	-	-	-	A	-	-	C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	C	-
	2.	-	-	-	-	A	-	-	C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	C	-
	3.	-	-	-	-	A	-	-	C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	C	-
	4.	-	-	-	-	A	-	-	C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	C	-
	5.	-	-	-	-	A	-	-	C	-	-	-	-	-	-	A	-	-	-	C	-
<i>K. pneumoniae</i>	1.	-	-	-	-	-	-	-	C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	C	-
	2.	-	-	-	-	-	-	-	C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	C	-
	3.	-	-	-	-	-	-	-	C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	C	-
	4.	-	-	-	-	-	-	-	C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	C	-
	5.	-	-	-	-	-	-	-	C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	C	-
<i>P. mirabilis</i>	1.	-	-	-	-	B	-	-	C	-	-	-	-	-	B	-	-	-	-	C	-
	2.	-	-	-	-	C	-	-	C	-	-	-	-	-	A	-	-	-	-	C	-
	3.	-	-	-	-	B	-	-	C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	C	-
	4.	-	-	-	-	A	-	-	C	-	-	-	-	-	A	-	-	-	-	C	-
	5.	-	-	-	-	B	-	-	C	-	-	-	-	-	A	-	-	-	-	C	-

- bez viditelného účinku
A - koncentrace 12 % tinktury
B - koncentrace 6 % tinktury
C - koncentrace 3 % tinktury
- méně než 5 narostlých kolonií u MBC při použití koncentrace 12 % tinktury

Zdroj: vlastní

Proti testovaným Gram-negativním tyčinkám se projevila účinnost extraktů metodou MIC pouze při použití tinktur z hřebíčkovce a medvědice (viz. tabulky č. 9 a 10). Výjimkou byly klebsiely, proti kterým působil jen hřebíčkovec. U všech testovaných enterobakterií byl zaznamenán vliv extraktu z hřebíčkovce při koncentraci 3 % tinktury se shodnou hodnotou MBC (to odpovídá koncentraci 47,12 g/L sušiny extraktu). Účinky hřebíčkovce byly označeny za baktericidní. Medvědice působila na *E. coli* v koncentraci 12 % tinktury (173,60 g/L sušiny). Větší vliv měla na *P. mirabilis*, efekt byl zjištěn při koncentraci 3 až 12 % extraktu (43,40–173,60 g/L sušiny).

Tabulka č. 10. Výsledky MIC a MBC u pseudomonád

Bakterie	MIC										MBC										
	Lichořeřišnice	Jitrocel kopinatý	Kakost luční	Tymián	Česnek setý	Medvědice	Bergenie	Grapefruit	Hřebíčkov ec	Zázvy orov ník	Lichořeřišnice	Jitrocel kopinatý	Kakost luční	Tymián	Česnek setý	Medvědice	Bergenie	Grapefruit	Hřebíčkov ec	Zázvy orov ník	
<i>P. aeruginosa</i>	1.	-	-	-	-	-	A	-	-	B	-	-	-	-	-	-	A	-	-	B	-
	2.	-	-	-	-	-	A	-	-	B	-	-	-	-	-	-	A	-	-	A	-
	3.	-	-	-	-	-	A	-	-	B	-	-	-	-	-	-	A	-	-	A	-
	4.	-	-	-	-	-	A	-	-	B	-	-	-	-	-	-	A	-	-	A	-
	5.	-	-	-	-	-	A	-	-	A	-	-	-	-	-	-	A	-	-	A	-
- bez viditelného účinku																					
A - koncentrace 12 % tinktury																					
B - koncentrace 6 % tinktury																					
- méně než 5 narostlých kolonií u MBC při použití koncentrace 12 % tinktury																					

Zdroj: vlastní

Minimální inhibiční koncentrace medvědicové tinktury činila 12 % extraktu, v přepočtu 173,60 g/L jeho sušiny (viz. tabulka č. 10). U hřebíčkovce byla hodnota MIC ve většině případů rovna koncentraci 6 % tinktury (94,24 g/L sušiny). Z koncentrací MIC a MBC rovněž vyplývá, že obě zmíněné tinktury působí baktericidně.

8.3 Výsledky stanovení koncentrace polyfenolů v tinkturách

Následující tabulka (č. 11) shrnuje naměřené koncentrace polyfenolů v použitých rostlinných extraktech. Z výsledků vyplývá, že ve sledovaném souboru deseti neřaděných tinktur byly nejvyšší koncentrace polyfenolů zjištěny u tinktur z hřebíčkovce (17,7590 g/L) a medvědice (11,6127 g/L). Naopak nejnižší hodnoty koncentrací polyfenolů vykazovaly extrakty z oddenku zázvorovníku a cibule česneku.

Tabulka č. 11. Koncentrace polyfenolů v koncentrovaných tinkturách

Tinktura:	Koncentrace polyfenolů v neředěné tinktuře [g/L]
Hřebíčkovec	17,7590
Medvědice	11,6127
Tymián	2,4372
Kakost luční	1,0883
Jitrocel kopinatý	0,9357
Bergenie	0,8693
Lichořeřišnice (plod)	0,2149
Grapefruit (Grep)	0,1715
Zázvorovník (Zázvor)	0,0546
Česnek setý	0,0415

Zdroj: vlastní

Podrobnější výsledky a obrázky z měření jsou uvedeny v příloze F. Na obrázku 44 je vidět ve sloupcích 2x dvojkové ředění roztoku kyseliny gallové (standard), 3x blank a 3x vzorek pro každou látku (v ředění, které vyhovuje kalibrační křivce). Jelikož roztok lihoglycerolu stanovení mírně ovlivní, byl jejich vliv odečten od naměřených koncentrací. Graf s kalibrační křivkou a naměřené absorbance tinktur s výpočtem koncentrací polyfenolů jsou uvedeny v příloze F, obrázek 45 – graf 1 a tabulky F č. 22–24.

8.4 Výsledky stanovení koncentrace flavonoidů v tinkturách

V tabulce č. 12 jsou porovnány rostlinné tinktury na základě jejich celkové koncentrace flavonoidů. Jednoznačně nejvyšší koncentrace flavonoidů byla naměřena u extraktu z hřebíčkovce, u které hodnota činila 9,1045 g/L. Následovala pětikrát nižší koncentrace u tymiánu (1,7873 g/L) a medvědice s koncentrací flavonoidů 1,1603 g/L. Nejnižší koncentrace byly analyzovány u zázvorové, kakostové a česnekové tinktury.

Tabulka č. 12. Koncentrace flavonoidů v koncentrovaných tinkturách

Tinktura:	Koncentrace flavonoidů v neředěné tinktuře [g/L]
Hřebíčkovec	9,1045
Tymián	1,7873
Medvědice	1,1603
Jitrocel kopinatý	0,7613
Lichořeřišnice (plod)	0,1280
Bergenie	0,0836
Grapefruit (Grep)	0,0429
Zázvorovník (Zázvor)	0,0054
Kakost luční	0,0047
Česnek setý	0,0016

Zdroj: vlastní

Kompletní výsledky a obrázky stanovení koncentrací flavonoidů v rostlinných tinkturách jsou znázorněny v příloze G.

DISKUZE

Tato práce se zabývala antibakteriální aktivitou běžných antibiotik používaných v klinické praxi a vybraných přírodních látek obsažených v rostlinách. Účinnost látek byla testována v podmínkách *in vitro*. Potencionálně antibakteriální aktivita byla testována na Gram-pozitivních i Gram-negativních bakteriích (celkem 63 kmenů z 11 druhů). Antibakteriální aktivita byla hodnocena metodami difuzního testu, MIC a MBC. Aplikace antibiotik přinesla očekávanou antibakteriální účinnost. Hodnocení antibiotické účinnosti proti jednotlivým kmenům bakterií mělo v naší práci význam pro hodnocení odchylek v účinku rostlinných extraktů na růst a množení bakterií v rámci stejného druhu. Rostlinné extrakty z 10 druhů vyšších rostlin byly aplikovány v podobě tinktur. Z výsledků vyplývá, že některé extrakty měly schopnost zastavit růst a množení bakterií či je přímo zahubit. Nejúčinnější byly tinktury z listů medvědice lékařské, květu hřebíčkovce vonného a natě tymiánu obecného.

Stanovení celkového obsahu polyfenolů a flavonoidů v extraktech rostlinného materiálu v této práci ukazuje, že se tyto látky mohou podílet na antibakteriální účinnosti. Tinkture, které obsahovaly nejvyšší koncentraci polyfenolů, tj. hřebíčkovec (17,759 g/L), medvědice (11,613 g/L) a tymián (2,437 g/L), působily antibakteriálně. Nejvyšší koncentraci flavonoidů v testovaných tinkturách obsahuje hřebíčkovec (9,105 g/L), následovaný tymiánem (1,787 g/L) a medvědicí (1,160 g/L). Flavonoidy jsou jednou z podskupin polyfenolů (viz níže). Z daných hodnot se dá odvodit, že v testovaných extraktech u hřebíčkovce tvoří flavonoidy zhruba 1/2 polyfenolů a u tymiánu tvoří flavonoidy dokonce podstatnou část, tj. asi 73 % celkového obsahu polyfenolů. Naopak, u medvědice je zhruba jedna desetina flavonoidů z celkového množství polyfenolů v extraktu. Z toho se dá předpokládat, že antibakteriální účinek medvědice je dán přítomností jiných polyfenolů než s flavonoidní strukturou nebo jiných, chemicky odlišných látek. V případě hřebíčkovce a tymiánu se můžeme domnívat, že flavonoidy hrají v antibakteriálním účinku podstatnou úlohu. To je v souladu s prací Butnariu a Bostana (2010) i publikací Dittrich a Leitzmanna (1996), kteří taktéž připisují antibakteriální účinnost rostlin fenolickým látkám.

Největší antibakteriální účinek byl pozorován u extraktů z květů hřebíčkovce a listů medvědice, v difuzním testu se vytvořila inhibiční zóna u všech testovaných bakterií. Při testování citlivosti metodou MIC byl hřebíčkovec taktéž účinný proti všem testovaným bakteriím, ale medvědice nedokázala zabránit růstu klebsiel. Proti testovaným kokům (s výjimkou *S. agalactiae*) projevuje účinnost i tymián. Naopak žádný nebo jen minimální efekt byl

pozorován u tinktur ze semen grapefruitu, plodu lichořeřišnice, oddenku zázvorovníku a cibule česneku setého. To je v nesouladu s obecným názorem i názorem některých autorů (BUHNER, 2014; RITTEROVÁ, 2018) na česnek jako na „přírodní antibiotikum“. Pouze v difuzních testech na agaru inokulovaném *S. pneumoniae* byly jamky s česnekovým extraktem lemovány úzkou inhibiční zónou.

Je třeba zmínit, že i když se neprojeví účinnost extraktů proti bakteriím v použitých testech, neznamená to, že nemohou být účinné. A to hned z několika důvodů. Zkoumána byla pouze účinnost *in vitro*, tedy bez vazby na hostitele. Látky obsažené v rostlinách mohou stimulovat imunitní systém, a tím napomáhat v boji proti infekci. V makroorganismu může docházet k metabolizaci obsažených látek na jiné (účinné) látky, případně se tyto látky mohou koncentrovat v určitých tkáních nebo v moči. Vyšší účinnost by mohla nastat při použití suchého extraktu, kde se koncentrují působící látky, stavební složky rostlin a další. Některé látky nemusí projevit své působení samostatně, ale mohou mít vliv na bakterie v kombinaci s antibiotiky (BUHNER, 2014). Dále mohou například inhibovat efluxní pumpy (viz. kapitola 2.3).

Na druhou stranu je třeba poznamenat, že pro použité extrakty neexistují žádné breakpointy. Navíc u breakpointů pro diskové difuzní testy záleží nejen na velikosti inhibiční zóny, ale i na jeho okraji, zda je ostrý či nezřetelný (viz. kapitola 2.4.1). Zjištěný účinek extraktu nemusí proto být v přímé korelaci k citlivosti bakterie.

Zajímavé je, že u kmenů MRSA byl v difuzních testech častěji pozorován efekt extraktů z jitrocele kopinatého a kakostu lučního než při použití těchto tinktur proti methicilincitlivým kmenům *S. aureus*. Zkoumané kmeny MRSA, proti kterým se projevil vliv extraktů z jitrocele a kakostu, byly zároveň rezistentní vůči ciprofloxacinu. Jak již bylo zmíněno, rezistence bakterií může v určitém směru tyto bakterie znevýhodňovat oproti citlivým kmenům (viz. kapitola 2.3). Tento jev mohl nastat i u klebsiely (č. 1) produkující ESBL. Jako na jedinou z druhu na ni měl vliv tymián při použití jamkového difuzního testu.

Rezistence ke konkrétním antibiotikům by mohla souviset i s nižší účinností některých rostlinných látek. U kmene *S. epidermidis* (č. 4), u kterého byla zaznamenána rezistence k cefoxitinu, tetracyklinu, gentamicinu a ciprofloxacinu, byly současně naměřeny nejmenší inhibiční zóny (pro daný druh) kolem jamek s kakostem, tymiánem a medvědicí. Jako na jediného zástupce druhu na něj neměla vliv bergenie tučnolistá. *S. epidermidis* č. 4 byl citlivý ke všem testovaným antibiotikům a zároveň u něj vznikla největší inhibiční zóna při použití

medvědicové tinktury. Pokud by rezistence antibiotik skutečně souvisela s nižším působením rostlinných látek, bylo by to v rozporu s některými autory, podle nichž si bakterie k rostlinám nevytváří rezistenci (BUHNER, 2014; RITTEROVÁ, 2018).

Při testování extraktu hřebíčkovce proti *S. pneumoniae* vznikly u všech použitých kmenů dvojité inhibiční zóny. Odečtena byla velikost vnitřní zóny, kde žádné bakterie nerostly. Ve vnější inhibiční zóně byl pozorován výrazně snížený nárůst kolonií, které byly i menší než kolonie narostlé vně této zóny. Průměr vnitřní zóny se pohyboval v rozmezí 21 až 25 mm, průměr vnější zóny býval od 63 do 74 mm. Mezi velikostmi vnitřní a vnější zóny nebyla zjištěna přímá úměra. Izolací kolonií z vnější zóny a jejich dalším otestováním při působení hřebíčkovce bylo možné vyloučit přítomnost dvou subpopulací druhu, neboť vznikla shodná dvojitá inhibiční zóna jako při prvním testování. U dvou kmenů byla vnější zóna s viridací, tyto dva kmeny měly zároveň nejmenší vnitřní inhibiční zónu kolem hřebíčkovce z druhu. U zbývajících čtyř zástupců *S. pneumoniae* k viridaci nedošlo. Látky obsažené v hřebíčkovci by mohly mít vliv na produkci streptolyzinu či peroxidu vodíku, který narušují membrány buněk (jak erytrocytů, tak samotných pneumokoků, viz. kapitola 1.2.3). Následně by mohlo dojít k nižšímu výskytu kolonií ve vnější inhibiční zóně tím, bez lýzy erytrocytů mají streptokoky obtížnější přístup k živinám. Není však vyloučen ani opačný směr působení, kdy by látky z hřebíčkovce jiným způsobem tlumily růst zmíněného druhu. Menší množství kolonií by vytvořilo méně streptolyzinu a peroxidu vodíku. Výsledkem by byl i jejich snížený vliv na rozpad erytrocytů. Autoři zabývající se podobnou tematikou se buďto nevěnovali účinku hřebíčkovce na *S. pneumoniae* (NZEAKO, et al., 2006) nebo testovali účinnost pouze mikrodilučními metodami MIC a MBC (YADAV, et al., 2013).

Dvojitá inhibiční zóna vznikala i při použití ethanolových tinktur proti *P. mirabilis*. Konkrétně se jednalo o extrakty z jitrocele, kakostu a tymiánu. Po vzniku první inhibiční zóny docházelo k jejímu zarůstání z důvodu plazivého růstu proteů. Při použití lihoglycerolových tinktur (medvědice a hřebíčkovce) k tomuto jevu nedošlo. To naznačuje, že účinné látky mohou být stabilnější ve směsi ethanolu s glycerolem než ve 40% ethanolu, nebo mohou být působící látky obsažené v jitroceli, kakostu a tymiánu těkavé (nebo jinak méně stabilní či reagující za přítomnosti vzdušného kyslíku).

Ve většině difuzních testů (nepočítaje druh *S. pneumoniae*) byla naměřená větší inhibiční zóna kolem jamky s medvědicí než s hřebíčkovcem. Metodou MIC však vykazoval větší účinky hřebíčkovce. Může to být dáno různou difuzí látek v agaru (podle velikosti a

polarity). Zároveň rostliny mohou obsahovat více chemicky odlišných skupin látek působících proti bakteriím a tyto látky mohou vykazovat různé spektrum účinku. To bylo možné pozorovat i při vzniku dvojité inhibiční zóny kolem hřebíčkovce při testování *S. pneumoniae*, tvorbu vnější zóny mohla způsobit látka, která více difundovala do agaru. Na ostatní testované druhy však neměla žádný vliv.

Z výsledků vyplývá, že existuje rozdíl mezi působením extraktů na Gram-pozitivní a Gram-negativní bakterie může být pravděpodobně způsoben různými vlastnostmi účinných látek. Jedná se zejména o jejich velikost a polaritu. Méně extraktů působilo na Gram-negativní tyčinky. Aby látky měly vliv na Gram-negativní bakterie, musí prostoupit jejich vnější fosfolipidovou membránou. Hydrofobní membránou z fosfolipidů nemohou projít velké polární (hydrofilní) látky. Dá se předpokládat, že vnější semipermeabilní membrána Gram-negativních bakterií je určitou bariérou pro penetraci látek do bakterií. Na celkový účinek látek budou mít vliv morfologické a funkční odlišnosti jednotlivých bakteriálních kmenů a zároveň bude záviset na kompozici různých látek a jejich vlastnostech v daném extraktu. V našem případě známe pouze obsah polyfenolů a flavonoidů.

Polyfenoly jsou širokou skupinou přírodních látek. Obvykle jsou známy jako látky s významnou antioxidační aktivitou (COPPO et MARCHESE, 2014). V souvislosti s výzvou WHO (2018) v boji proti mnohačetné antibakteriální rezistenci dochází ke zvýšenému úsilí hledat nové antibakteriální látky. Polyfenoly se dělí na flavonoidy a na látky ne-flavonoidní povahy (deriváty kyseliny gallové a kyseliny skořicové). Flavonoidy jsou nízkomolekulární látky se základní chemickou strukturou odvozenou od difenylpropanu C6-C3-C6, u něhož jsou dvě benzenová jádra vzájemně propojena třemi atomy uhlíku vytvářejícími s atomem kyslíku heterocyklus (GRYCOVÁ, 2019). V posledních letech se studuje přímý mechanismus antibakteriální účinku, zejména u izolovaných flavonoidů. Byla nalezena schopnost inhibovat DNA gyrázu (CUSHNIE et LAMB, 2005), narušovat permeabilitu a funkci bakteriální membrány (XIE, et al., 2015), inhibovat energetický metabolismus (ALLISON, et al., 2017) včetně MRSA (CHAN, et al., 2011). U některých flavonoidů byla zjištěna přímá interakce s DNA helikázou, enzymem nezbytným pro replikaci a opravování genetické informace bakterií (HUANG, et al., 2015; LOHMAN, et al., 2008). V neposlední řadě mohou některé flavonoidy narušovat biofilm (LOPES, et al., 2017). Dobře dokumentovaná je inhibice efluxních proteinů polyfenoly pro zvýšení účinnosti antibiotik včetně rezistentních kmenů *S. aureus* (RANDHAWA, et al., 2016; WANG, et al., 2014). V předkládané práci byly studovány extrakty a měřen obsah celkových polyfenolů a flavonoidů. Výsledky

předkládané práce jsou ve shodě s literaturou, která prokazuje vliv polyfenolů na Gram-pozitivní i Gram-negativní bakterie. Testované extrakty jsou schopné v *in vitro* podmínkách ovlivňovat růst bakterií a působit i na rezistentní kmeny. Vzhledem k odlišnosti použitých rostlinných tinktur od extraktů testovaných jinými autory není možné zcela přesně práci porovnávat s dalšími studii.

Objektivně je třeba zhodnotit, že MIC antibiotik se pohybuje kolem (0.031–512 µg/mL, zatímco u fytofarmak jsou MIC jsou nalézány řádově vyšší hodnoty (100–5000 µg/mL) (BARBIERI, et al., 2017). Proto jsou do budoucna navrhovány kombinace antibiotika a fytofarmaka pro možný synergický účinek a zároveň snížení dávky antibiotika a jeho vedlejších účinků (WANG, et al., 2014). Mnohé z flavonoidů jsou velmi dobře farmakologicky popsány a mají minimum nežádoucích účinků, jako např. flavonol kvercetin (JAKUBCZYK, et al., 2018). Další možností je na základě znalosti o přírodních substancích vyvinout polosyntetické nebo syntetické deriváty, které by kvantitativně a kvalitativně zajistily spolehlivost aktivních látek a přispěly ke zvýšení celkového antibakteriálního účinku.

ZÁVĚR

Hlavním záměrem práce bylo zjistit, zda mají extrakty z deseti vybraných rostlin antibakteriální účinnost proti některým Gram-pozitivním a Gram-negativním bakteriím *in vitro*. V experimentální části byly na bakteriích provedeny diskové difuzní testy s využitím běžně používaných antibiotik a jamkové difuzní testy s využitím rostlinných tinktur. Rovněž byly stanoveny minimální inhibiční koncentrace (MIC) rostlinných tinktur mikrodiluční metodou s následným určením minimální baktericidní koncentrace (MBC). Pro konkrétnější interpretaci výsledků byly dále v rostlinných extraktech stanoveny celkové koncentrace polyfenolů a flavonoidů.

Zjistili jsme:

- testované extrakty vykazovaly antibakteriální aktivitu
- byl zjištěn rozdíl v účinnosti extraktů mezi Gram-pozitivními a Gram-negativními bakteriemi
- jako nejúčinnější extrakty se jevily tinktury z květů hřebíčkovce vonného, listů medvědice lékařské a natě tymiánu obecného
- z podílu hodnot MIC a MBC vyplývá, že tinktury z hřebíčkovce, medvědice a tymiánu působí baktericidně
- nejvyšší koncentrace polyfenolů byly stanoveny u extraktů z hřebíčkovce a medvědice
- nejvyšší koncentrace flavonoidů byla naměřena u extraktu z hřebíčkovce
- byla nalezena korelace mezi antibakteriální aktivitou a stanoveným množstvím polyfenolů a flavonoidů v extraktech
- extrakty z jitrocele a kakostu působily v difuzních testech častěji na kmeny MRSA než na methicilin-citlivé *S. aureus*

Výsledky mohou přispět k cílené farmaceutické přípravě rostlinných extraktů, k identifikaci mechanismu účinku jednotlivých polyfenolů a ostatních skupin látek a k hledání nových způsobů farmakoterapie infekčních chorob.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

ABULROB, Abedel-Nasser, et al. 2004. Identification and biological evaluation of grapefruit oil components as potential novel efflux pump modulators in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacterial strains. *Phytochemistry*. Listopad 2004, 65, stránky 3021-3027 [cit. 2020-04-08]. ISSN 0031-9422. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S003194220400425X?via%3Dihub>

AKDEMIR, Zeliha Ş., et al. 2001. Polyphenolic compounds from *Geranium pratense* and their free radical scavenging activities. *Phytochemistry*. Leden 2001, 56, stránky 189-193 [cit. 2020-04-13]. ISSN 0031-9422. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0031942200003678?via%3Dihub>

ALLISON, Brittany J., et al. 2017. Antibacterial activity of fractions from three Chumash medicinal plant extracts and *in vitro* inhibition of the enzyme enoyl reductase by the flavonoid jaceosidin. *Natural Product Research*. Květen 2017, 31(6), stránky 707-712 [cit. 2020-04-20]. DOI 10.1080/14786419.2016.1217201. Dostupné z: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/14786419.2016.1217201>

BARBIERI, Ramona, et al. 2017. Phytochemicals for human disease: An update on plant-derived compounds antibacterial activity. *Microbiological Research*. Květen 2017, 196, stránky 44-68 [cit. 2020-04-20]. ISSN 0944-5013. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S094450131630619X?via%3Dihub>

BARNES, J., L. A. ANDERSON and J. D. PHILLIPSON. 2002. *Herbal Medicines*. 2. ed. London: Pharmaceutical Press, 2002. ISBN 0-85369-474-5.

BEDNÁŘ, Marek, a kol. 1996. *Lékařská mikrobiologie*. Praha: Marvil, 1996. str. 558.

BENEŠ, Jiří. 2018. *Antibiotika: systematika, vlastnosti, použití*. Praha: Grada, 2018. str. 600. ISBN 978-80-271-0636-3.

BUHNER, Stephen Harrod. 2014. *Přírodní antibiotika*. Z angl. orig. *Herbal Antibiotics* přel. Stanislava KRÁLOVÁ. Praha: Euromedia, 2014. ISBN 978-80-242-4217-0.

BURAKOVA, M. A., et al. 2012. Antibacterial activity of *Geranium pratense* preparations. *Reviews on Clinical Pharmacology and Drug Therapy*. 2012, 10(2), str. 64 [cit. 2020-04-08]. ISSN 2542-1875. Dostupné z: <https://journals.eco-vector.com/RCF/article/view/875/480>

BUTNARIU, Monica and Cristian BOSTAN. 2010. Antimicrobial and anti-inflammatory activities of the volatile oil compounds from *Tropaeolum majus* L. (Nasturtium). *Journal of Biotechnology*. Duben 2010, 10(31), stránky 5900-5909 [cit. 2020-04-14]. ISSN 0168-1656. Dostupné z: https://www.researchgate.net/publication/236163561_Antimicrobial_and_anti-inflammatory_activities_of_the_volatile_oil_compounds_from_Tropaeolum_majus_L_Nasturtium

CARDELLINA, John H. II. 2012. The Adulteration of Commercial “Grapefruit Seed Extract” with Synthetic Antimicrobial and Disinfectant Compounds. *HerbalGram*. 2012, stránky 62-66 [cit. 2020-04-08]. ISSN 0899-5648. Dostupné z: http://cms.herbalgram.org/herbalgram/issue94/QUALCONTROL_gfse.html

COPPO, Erika and Anna MARCHESE. 2014. Antibacterial Activity of Polyphenols. *Current Pharmaceutical Biotechnology*. 2014, 15(4), stránky 380-390 [cit. 2020-04-20]. ISSN 1873-4316. Dostupné z: <https://doi.org/10.2174/138920101504140825121142>

CUSHNIE, T.P. Tim and Andrew J. LAMB. 2005. Antimicrobial activity of flavonoids. *International Journal of Antimicrobial Agents*. Listopad 2005, 26(5), stránky 343-356 [cit. 2020-04-20]. ISSN 0924-8579. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0924857905002554?via%3Dihub>

CVETNIĆ, Zdenka and Sanda VLADIMIR-KNEŽEVIĆ. 2004. Antimicrobial activity of grapefruit seed and pulp ethanolic extract. *Acta Pharmaceutica*. Zář 2004, 54, stránky 243-250 [cit. 2020-04-06]. ISSN 13300075. Dostupné z: <https://hrcak.srce.hr/file/26006>

DITTRICH, Kathi und Claus LEITZMANN. 1996. *Bioaktive Substanzen*. Stuttgart: Georg Thieme Verlag, 1996. ISBN 3-89373-358-2.

THE EUROPEAN COMMITTEE ON ANTIMICROBIAL SUSCEPTIBILITY TESTING. 2018. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 8.0. <http://www.eucast.org>. 2018 [cit. 2019-01-08]. Dostupné z: <http://www.szu.cz/klinicke-breakpointy?highlightWords=tabulky+breakpoint%C5%AF>

GOERING, Richard V., a kol. 2016. *Mimsova lékařská mikrobiologie. Z angl. orig. Mims' Medical Microbiology* přel. Jaroslav JULÁK, a kol. 5. vyd. Praha: Triton, 2016. str. 568. ISBN 978-80-7387-928-0.

GRYCOVÁ, Lenka. 2019. Flavonoidy – rozmanité struktury se širokým využitím. *Pharma News*. Leden-únor 2019, roč. XIX, č. 1-2, stránky 16-18 [cit. 2020-04-22]. ISSN 2336-7717. Dostupné z: <http://www.pharmanews.cz/clanek/flavonoidy-rozmanite-struktury-se-sirokym-vyuzitim/>

HENDRYCHOVÁ, Helena a Lenka TŮMOVÁ. 2012. Rod *Bergenia* – obsahové látky a biologická aktivita. *Česká a slovenská farmacie*. 2012, 61(5), stránky 203-209 [cit. 2020-03-05]. ISSN 1805-4439. Dostupné z: <https://www.prolekare.cz/casopisy/ceska-slovenska-farmacie/2012-5-4/rod-bergenia-obsahove-latky-a-biologicka-aktivita-39299>

HRABÁK, Jaroslav, a kol. 2009. Detekce širokospektrých β -laktamáz (ESBL), β -laktamáz AmpC, metalo- β -laktamáz (MBL) a karbapenemáz KPC u gramnegativních tyček. *Zprávy epidemiologie a mikrobiologie*. 2009, 18(3), stránky 100-106 [cit. 2020-01-03]. ISSN 1211-7358. Dostupné z: http://www.szu.cz/uploads/documents/CeM/Zpravy_EM/18_2009/3_brezen/100_bet.al.pdf

HUANG, Yen-Hua, et al. 2015. Inhibition of *Staphylococcus aureus* PriA Helicase by Flavonol Kaempferol. *The Protein Journal*. Červen 2015, 34(3), stránky 169-172 [cit. 2020-04-20]. ISSN 1875-8355. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7088215/>

CHAN, Ben Chung Lap, et al. 2011. Synergistic effects of baicalein with ciprofloxacin against NorA over-expressed methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and inhibition of MRSA pyruvate kinase. *Journal of Ethnopharmacology*. Zář 2011, 137(1), stránky 767-773 [cit. 2020-04-20]. ISSN 0378-8741. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378874111004673?via%3Dihub>

CHENG, H. S., S. H. TON and K. A. KADIR. 2016. Ellagitannin geraniin: a review of the natural sources, biosynthesis, pharmacokinetics and biological effects. *Phytochemistry Reviews*. Duben 2016, 16(1) [cit. 2020-04-14]. ISSN 1568-7767. Dostupné z: https://www.researchgate.net/publication/300002809_Ellagitannin_geraniin_a_review_of_the_natural_sources_biosynthesis_pharmacokinetics_and_biological_effects

JAHODÁŘ, Luděk. 2011. *Farmakobotanika*. 3. uprav. a dopl. vyd. Praha: Karolinum, 2011. ISBN 978-80-246-2015-2.

JAISWAL, L., S. SHANKAR and J.-W. RHIM., 2019. Carrageenan-based functional hydrogel film reinforced with sulfur nanoparticles and grapefruit seed extract for wound healing application. *Carbohydrate Polymers*. Listopad 2019, 224, article 115191 [cit. 2020-04-06]. ISSN 0144-8617. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0144861719308586?via%3Dihub>

JAKOBSEN, Tim Holm, et al. 2012. Ajoene, a Sulfur-Rich Molecule from Garlic, Inhibits Genes Controlled by Quorum Sensing. *Antimicrob Agents Chemother*. Květen 2012, 56(5), stránky 2314–2325 [cit. 2020-04-08]. PMID 22314537. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3346669/>

JAKUBCZYK, Karolina, et al. 2018. Garden nasturtium (*Tropaeolum majus* L.) - a source of mineral elements and bioactive compounds. *Roczniki Państwowego Zakładu Higieny*. 2018, 69(2), stránky 119-126 [cit. 2020-03-05]. ISSN 0035-7715. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29766690>

JULÁK, Jaroslav. 2006. *Úvod do lékařské bakteriologie*. Praha: Karolinum, 2006. str. 404. ISBN 80-246-1270-4.

JURCA, T., et al. 2018. The effect of *Tropaeolum majus* L. on bacterial infections and *in vitro* efficacy on apoptosis and DNA lesions in hyperosmotic stress. *Journal of physiology and pharmacology*. Červen 2018, 69(3), stránky 391-401 [cit. 2020-03-05]. ISSN 1899-1505. Dostupné z: http://www.jpp.krakow.pl/journal/archive/06_18/pdf/10.26402/jpp.2018.3.06.pdf

KANMANI, Paulraj and Jong-Whan RHIM. 2014. Antimicrobial and physical-mechanical properties of agar-based films incorporated with grapefruit seed extract. *Carbohydrate Polymers*. Únor 2014, 102, stránky 708-716 [cit. 2020-04-07]. ISSN 0144-8617. Dostupné z:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0144861713011296>

KOPECKÁ, Jana a Gabriela ROTKOVÁ. 2017. *Skripta ke cvičení z obecné mikrobiologie, cytologie a morfologie bakterií*. Brno: Elportál Masarykovy univerzity, 2017 [cit. 2020-03-03]. ISSN 1802-128X. Dostupné z: https://is.muni.cz/do/rect/el/estud/prif/js17/cviceni_mikrobiologie/web/docs/Mikrobiologie.pdf

KOVÁČ, Ivan, et al. 2015. *Plantago lanceolata* L. water extract induces transition of fibroblasts into myofibroblasts and increases tensile strength of healing skin wounds. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. Leden 2015, 67, stránky 117-125 [cit. 2020-04-13]. ISSN 2042-7158. Dostupné z: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/jphp.12316>

KÜPELI, Esra, et al. 2007. Estimation of antinociceptive and anti-inflammatory activity on *Geranium pratense* subsp. *finitimum* and its phenolic compounds. *Journal of Ethnopharmacology*. Listopad 2007, 114, stránky 234-240 [cit. 2020-04-13]. ISSN 0378-8741. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378874107003868?via%3Dihub>

LIS-BALCHIN, Maria. 2004. *Geranium and Pelargonium*. London: Taylor & Francis, 2004. stránky 134-135 [cit. 2020-04-13]. ISBN 0-203-21653-9. Dostupné z: <https://books.google.cz/books?id=-bR8GxQ6BU0C&pg=PA135&lpg=PA135&dq=geranium+pratense+antibacterial&source=bl&ots=4gN6qHxp5S&sig=ACfU3U1SH2KW7VueXCX4Bpvqrx6UgX4XA&hl=cs&sa=X&ved=2ahUKEwj15sKx4uboAhU0QhUIHcenDZ0Q6AEwA#v=onepage&q=geranium%20prate>

LOHMAN, T. M., E. J. TOMCO and C. G. WU. 2008. Non-hexameric DNA helicases and translocases: Mechanisms and regulation. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. Květen 2008, 9(5), stránky 391-401 [cit. 2020-04-20]. ISSN 1471-0080. Dostupné z: https://www.researchgate.net/publication/5439150_Non-hexameric_DNA_helicases_and_translocases_Mechanisms_and_regulation

LOPES, Laênia Angélica Andrade, et al. 2017. Inhibitory effects of flavonoids on biofilm formation by *Staphylococcus aureus* that overexpresses efflux protein genes. *Microbial Pathogenesis*. Červen 2017, 107, stránky 193-197 [cit. 2020-04-20]. ISSN 0882-4010. Dostupné z:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0882401016304119?via%3Dihub>

LOPEZ-ROMERO, Julio Cesar, et al. 2015. Antibacterial Effects and Mode of Action of Selected Essential Oils Components against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. Červen 2015, article ID 795435 [cit. 2020-04-14]. ISSN 1741-4288. Dostupné z: <https://www.hindawi.com/journals/ecam/2015/795435/>

LORENZI, Vannina, et al. 2009. Geraniol Restores Antibiotic Activities against Multidrug-Resistant Isolates from Gram-Negative Species. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. Květen 2009, 53(5), stránky 2209-2211 [cit. 2020-04-14]. ISSN 0066-4804. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2681508/>

NZEAKO, B. C., Z. S. N. AL-KHAROUSI and Z. AL-MAHROOQUI. 2006. Antimicrobial Activities of Clove and Thyme Extracts. *Sultan Qaboos University Medical Journal*. Červen 2006, 6(1), stránky 33-39 [cit. 2020-04-08]. ISSN 2075-0528, PMID PMC3074903. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3074903/>

PENTA. 2010. Uhličitan sodný bezvodý. *Bezpečnostní list podle Nařízení (ES) č. 1907/2006 (REACH)* [online]. Praha: Ing. Petr Švec - PENTA, 2010 [cit. 2020-03-12]. Dostupné z: <https://chemistry.ujep.cz/userfiles/files/Uhlicitan%20sodny.pdf>

PHARMA-REPORTS. 2012. *Klinicky významné bakterie*. Praha: Triton, 2012. ISBN 978-80-7387-588-6.

PŘÍBORSKÝ, Jan. 2004. *Peniciliny. Farmakologie a klinická farmakologie*. Praha: Maxdorf, 2004. ISBN 80-7345-026-7.

RANDHAWA, Harmandeep K., et al. 2016. Efflux pump inhibitory activity of flavonoids isolated from *Alpinia calcarata* (Haw.) Roscoe against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Biologia*. 2016, 71(5), stránky 484-493 [cit. 2020-04-20]. ISSN 1336-9563. Dostupné z:

https://www.researchgate.net/publication/301297753_Efflux_pump_inhibitory_activity_of_flavonoids_isolated_from_Alpinia_calcarata_Haw_Roscoe_against_methicillin-resistant_Staphylococcus_aureus

REAGOR, Lee, et al. 2002. The effectiveness of processed grapefruit-seed extract as an antibacterial agent: I. An *in vitro* agar assay. *Journal of Alternative and Complementary Medicine*. 2002, 8(3), stránky 325-332 [cit. 2020-04-07]. ISSN 10755535. Dostupné z: <https://pdfs.semanticscholar.org/0e24/1f183d5107ead8182f011938d616ab725439.pdf>

RITTEROVÁ, Claudia. 2018. *Rostlinná antibiotika si vyrobíme sami: Léčení a prevence kořením a bylinkami*. Z něm. orig. *Pflanzliche Antibiotika selbst gemacht: Heilen und vorbeugen mit Gewürzen und Kräutern* přel. Rudolf RADA. Praha: Mladá fronta, 2018. ISBN 987-80-204-4636-7.

SHIKOV, Alexander N., et al. 2014. *Bergenia crassifolia* (L.) Fritsch – Pharmacology and phytochemistry. *Phytomedicine*. Říjen 2014, 21, stránky 1534-1542 [cit. 2020-03-05]. ISSN 0944-7113. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S094471131400258X?via%3Dihub>

SONG, Ye Ji, et al. 2019. Anti-Biofilm Activity of Grapefruit Seed Extract against *Staphylococcus*. *Journal of Microbiology and Biotechnology*. Special Topic - Biofilm, Srpen 2019, 29(8), stránky 1177-1183 [cit. 2020-04-06]. ISSN 1738-8872. Dostupné z: http://www.jmb.or.kr/journal/list.html?mod=&book=Journal&tops=eng&scale=&Vol=&Num=&PG=&year1=&year2=&sort=publish_Date+desc&aut_box=Y&sos_box=&sub_box=Y&pub_box=Y&key_box=&abs_box=&key=all&oper=&key_word=Grapefruit+Seed

VOTAVA, Miroslav, a kol. 2003. *Lékařská mikrobiologie speciální*. Brno: Neptun, 2003. str. 495. ISBN 80-902896-6-5.

VOTAVA, Miroslav. 2005. *Lékařská mikrobiologie obecná*. 2. přepr. vyd. Brno: Neptun, 2005. str. 351. ISBN 80-86850-00-5.

VOTAVA, Miroslav, a kol. 2010. *Lékařská mikrobiologie vyšetřovací metody*. Brno: Neptun, 2010. str. 495. ISBN 978-80-86850-04-8.

WANG, Shuang-Ying, et al. 2014. Flavonoids from *Sophora moorcroftiana* and their Synergistic Antibacterial Effects on MRSA. *Phytotherapy Research*. Červen 2014, 28(7), stránky 1071-1076 [cit. 2020-04-20]. ISSN 1099-1573. Dostupné z: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/ptr.5098>

WHO. 2018. Antimicrobial resistance. *World Health Organization* [online]. 15. Únor 2018. [cit. 2020-04-20]. Dostupné z: <https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance>

XIE, Yixi, et al. 2015. Antibacterial Activities of Flavonoids: Structure-Activity Relationship and Mechanism. *Current Medicinal Chemistry*. Leden 2015, 22(1), stránky 132-149 [cit. 2020-04-20]. ISSN 1875-533X. Dostupné z: https://www.researchgate.net/publication/266029486_Antibacterial_Activities_of_Flavonoids_Structure-Activity_Relationship_and_Mechanism/link/54c315310cf2911c7a4ac5d1/download

YADAV, Mukesh Kumar, et al. 2013. Antimicrobial activities of *Eugenia caryophyllata* extract and its major chemical constituent eugenol against *Streptococcus pneumoniae*. *APMIS*. Prosinec 2013, 121(12), stránky 1198-1206 [cit. 2020-04-22]. ISSN 1600-0463. Dostupné z: <https://onlinelibrary.wiley.com/journal/16000463>

ZLOCH, Z., J. ČELAKOVSKÝ a A. AUJEZDSKÁ. 2004. Stanovení obsahu polyfenolů a celkové antioxidační kapacity v potravinách rostlinného původu: Závěrečná zpráva o plnění výzkumného projektu podpořeného finančně Nadačním fondem Institutu. Plzeň: Ústav hygieny Lékařské fakulty UK, Plzeň, 2004 [cit. 2020-03-12]. Dostupné z: <https://docplayer.cz/14474044-Stanoveni-obsahu-polyfenolu-a-celkove-antioxidacni-kapacity-v-potravinach-rostlinneho-puvodu-z-zloch-j-celakovsky-a.html>

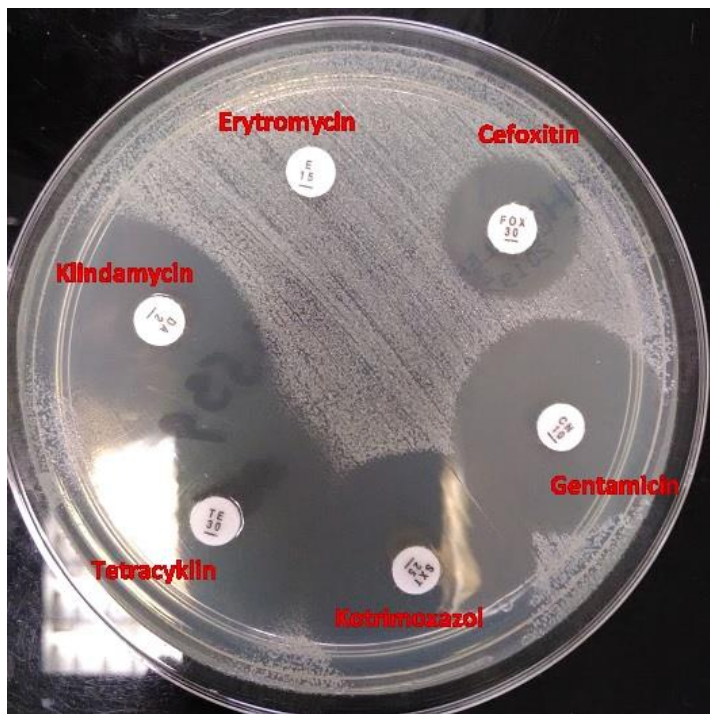
SEZNAM PŘÍLOH

- Příloha A – Difuzní testy
- Příloha B – Kompletní výsledky difuzních testů
- Příloha C – Minimální inhibiční a minimální baktericidní koncentrace
- Příloha D – Přepočítání koncentrace suchého extraktu
- Příloha E – Přepočítání koncentrací pro stanovení MIC a MBC
- Příloha F – Stanovení koncentrace polyfenolů v tinkturách
- Příloha G – Stanovení koncentrace flavonoidů v tinkturách
- Příloha H – Povolení sběru informací ve FN Plzeň

PŘÍLOHY

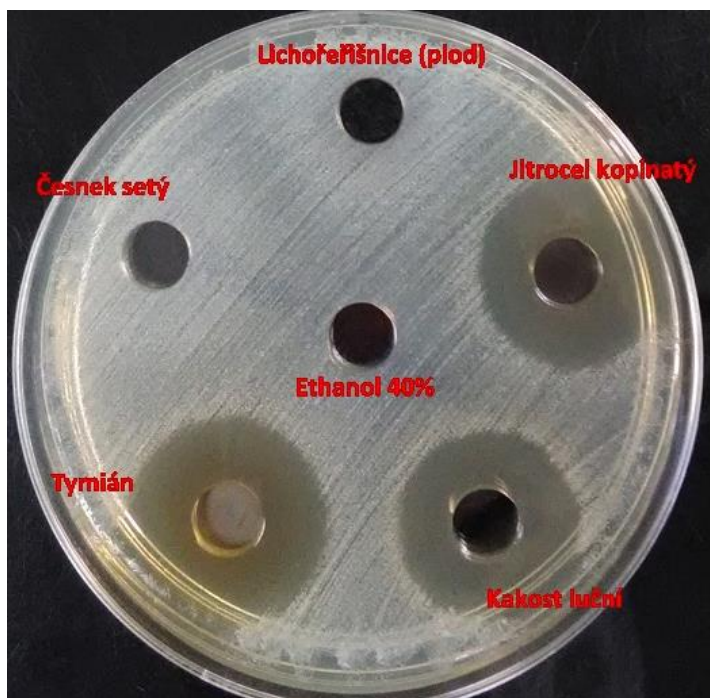
Příloha A – Difuzní testy

Obrázek 29 *S. epidermidis* a běžné ATB disky



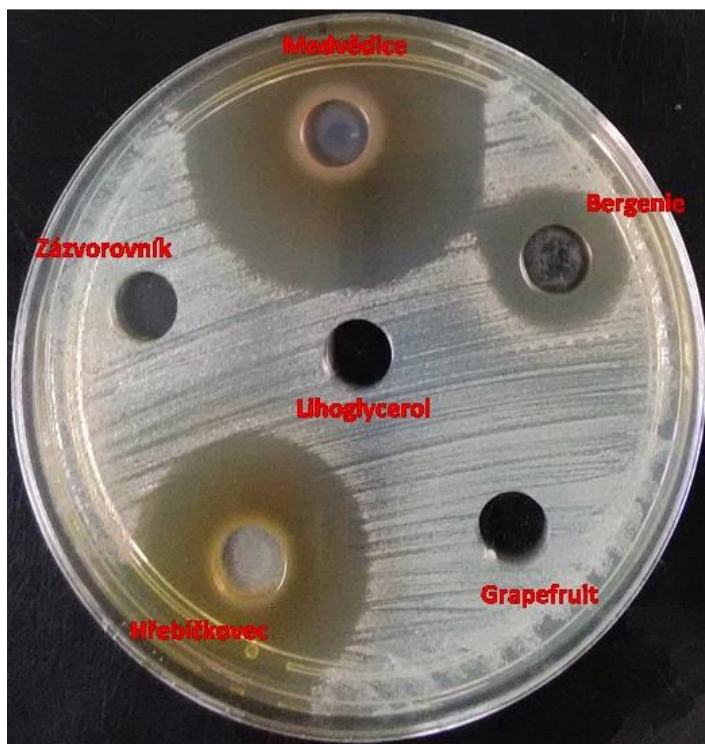
Zdroj: vlastní

Obrázek 30 *S. epidermidis* a ethanolové tinktury



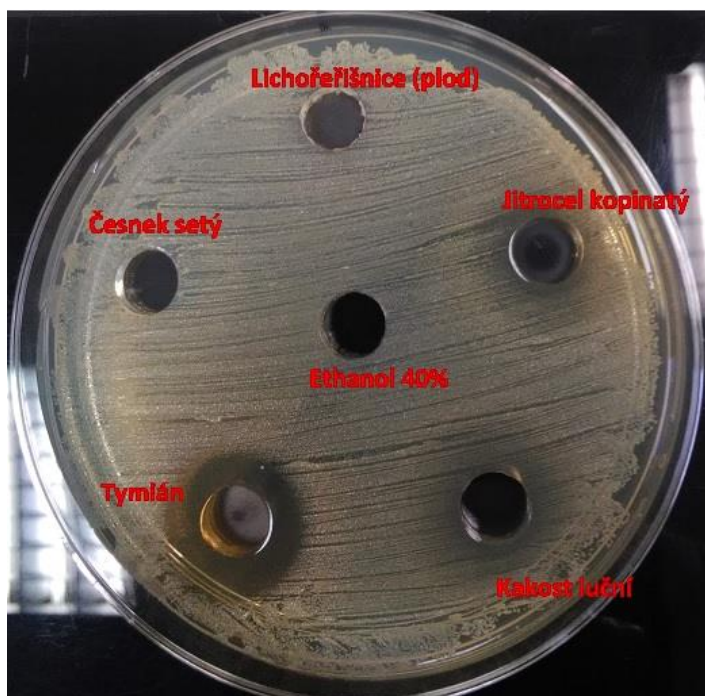
Zdroj: vlastní

Obrázek 31 *S. epidermidis* a lihoglycerolové tinktury



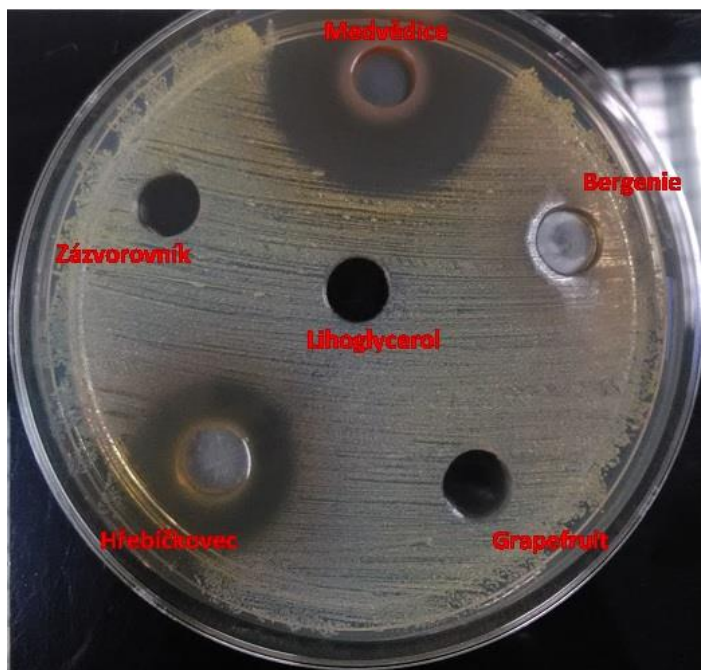
Zdroj: vlastní

Obrázek 32 MRSA a ethanolové tinktury



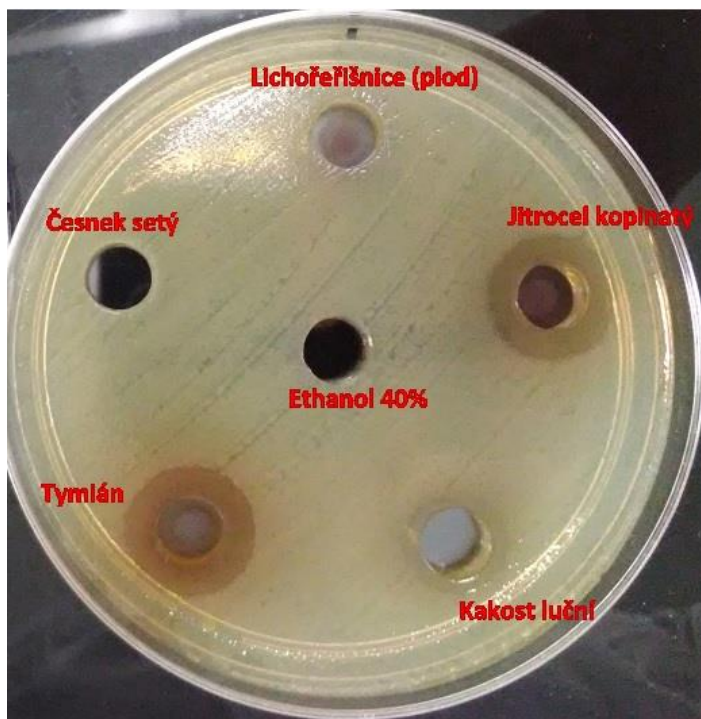
Zdroj: vlastní

Obrázek 33 MRSA a lihoglycerolové tinktury



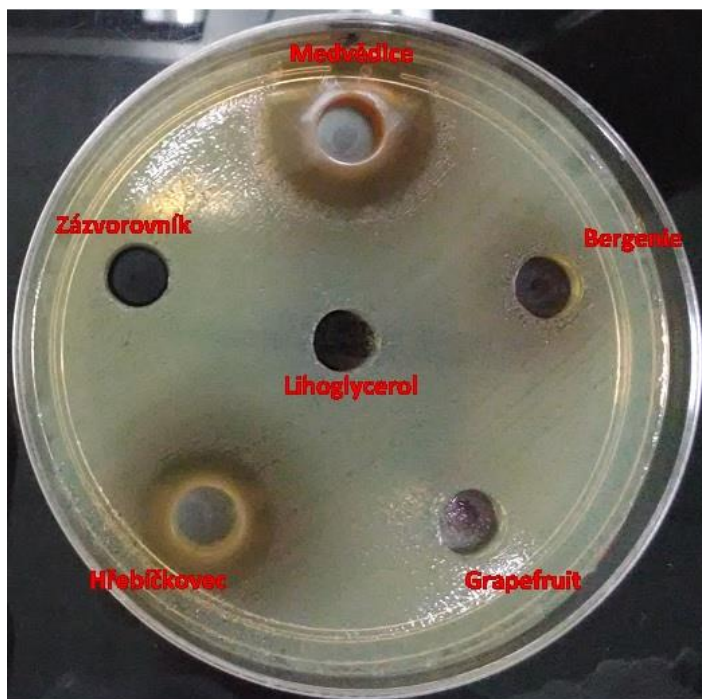
Zdroj: vlastní

Obrázek 34 *P. mirabilis* a ethanolové tinktury



Zdroj: vlastní

Obrázek 35 *P. mirabilis* a lihoglycerolové tinktury



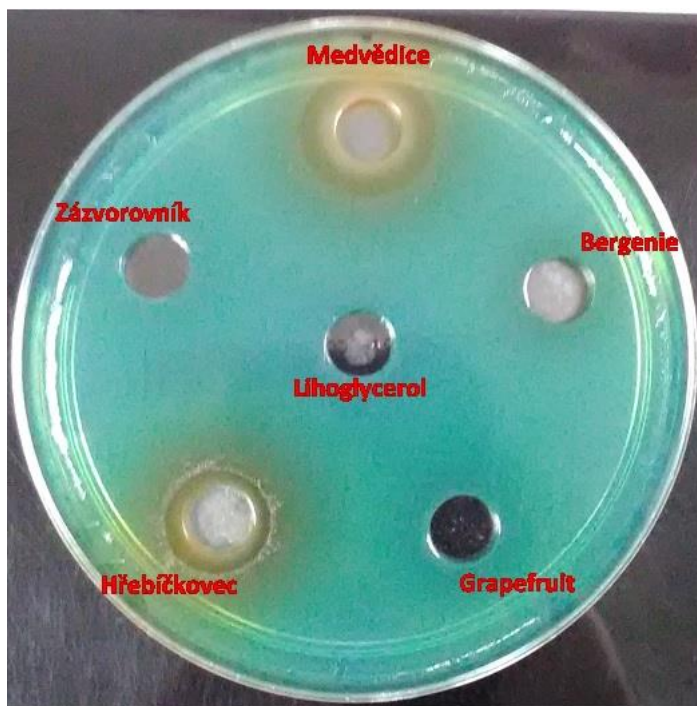
Zdroj: vlastní

Obrázek 36 *K. pneumoniae* a lihoglycerolové tinktury



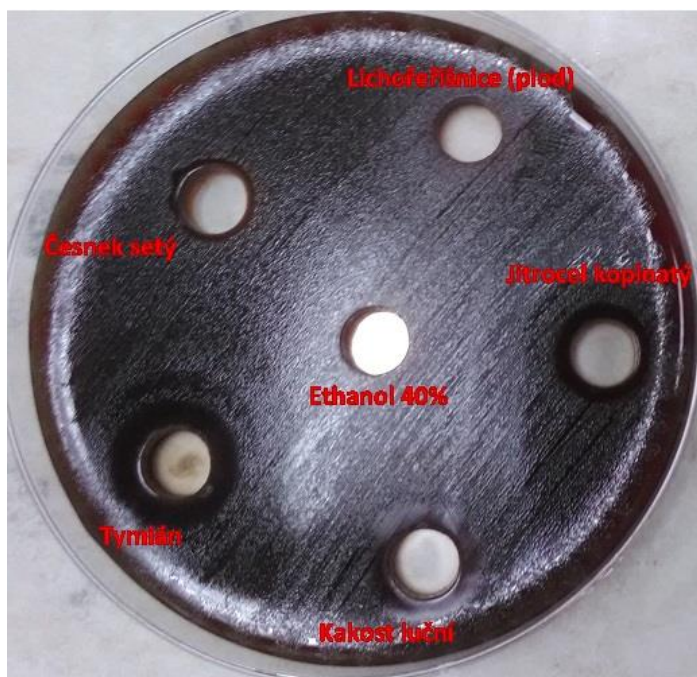
Zdroj: vlastní

Obrázek 37 *P. aeruginosa* a lihoglycerolové tinktury



Zdroj: vlastní

Obrázek 38 *S. pneumoniae* a ethanolové tinktury



Zdroj: vlastní

Obrázek 39 *S. pneumoniae* a lihoglycerolové tinktury



Zdroj: vlastní

Obrázek 40 *S. pneumoniae* a hřebíčková tinktura



Zdroj: vlastní

Příloha B – Kompletní výsledky difuzních testů

Tabulka B č. 13. Kompletní výsledky difuzních testů u stafylokoků

Bakterie	Diskový difuzní test - ATB [mm]											Jamkový difuzní test [mm]										
	Cefoxitin, 30 µg	Erytromycin, 15 µg	Klindamycin, 2 µg	Tetracyklin, 30 µg	Kotrimoxazol, 25 µg	Gentamicin, 10 µg	Ciprofloxacín, 5 µg	Chloramfenikol, 30 µg	Tigecyklin, 15 µg	Linezolid, 10 µg	Rifampicin, 5 µg	Lichořeřišnice (plod)	Jitrocel kopinatý	Kakost Inční	Tymián	Česnek setý	Medvědice	Bergenie	Grapefruit (Grep)	Hřebíčekovec	Zázorovník (Zázvor)	
<i>S. aureus</i>	1.	29 C	25 C	25 C	26 C	30 C	21 C	-	-	-	-	-	9	10	9	22	9	35	9	9	21	9
	2.	29 C	27 C	27 C	27 C	31 C	22 C	-	-	-	-	-	9	9	9	20	9	30	9	9	23	9
	3.	32 C	28 C	28 C	31 C	34 C	22 C	-	-	-	-	-	9	13	14	20	9	32	9	9	24	9
	4.	31 C	28 C	28 C	28 C	33 C	24 C	28 C	-	-	-	-	9	9	9	21	9	34	9	9	23	9
	5.	33 C	25 C	26 C	29 C	33 C	23 C	22 C	25 C	23 C	27 C	34 C	9	9	9	20	9	32	9	9	22	9
MRSA	1.	6 R	6 R	6 R	6 R	30 C	22 C	6 R	23 C	20 C	26 C	30 C	9	12	12	23	9	28	9	9	21	9
	2.	6 R	6 R	6 R	30 C	35 C	22 C	6 R	25 C	22 C	29 C	33 C	9	12	11	19	9	32	9	9	23	9
	3.	6 R	6 R	6 R	28 C	30 C	22 C	6 R	25 C	20 C	25 C	33 C	9	14	12	19	9	31	9	9	23	9
	4.	6 R	6 R	6 R	27 C	30 C	22 C	6 R	23 C	22 C	25 C	35 C	9	12	10	20	9	31	9	9	23	9
	5.	15 R	12 R	28 R	15 R	35 C	25 C	24 C	25 C	24 C	27 C	33 C	9	9	9	19	9	33	9	9	22	9
<i>S. epidermidis</i>	1.	12 R	6 R	6 R	26 C	6 R	6 R	15 R	14 C	25 C	25 C	35 C	9	22	22	29	9	40	15	9	33	9
	2.	12 R	6 R	6 R	25 C	6 R	6 R	-	-	-	-	-	9	22	24	26	9	43	21	9	36	9
	3.	19 R	6 R	6 R	30 C	6 R	6 R	13 R	26 C	24 C	28 C	36 C	9	25	23	25	9	42	18	9	31	9
	4.	6 R	30 C	30 C	6 R	33 C	6 R	6 R	30 C	27 C	28 C	39 C	9	21	18	23	9	36	9	9	28	9
	5.	30 C	28 C	28 C	30 C	30 C	29 C	30 C	23 C	25 C	27 C	32 C	9	26	24	28	9	47	15	9	35	9

C citlivý kmen

R rezistentní kmen

- netestováno

Poznámka: I větší inhibiční zóna, ale s deformovaným okrajem, může znamenat rezistenci

Zdroj: data z Laboratorního informačního systému Ústavu mikrobiologie FN Plzeň a vlastní naměřené hodnoty

Tabulka B č. 14. Kompletní výsledky difuzních testů u streptokoků

Bakterie	Diskový difuzní test - ATB [mm]							Jamkový difuzní test [mm]										
	Penicilin G, 1 unit	Oxacilin, 1 µg	Erytromycin, 15 µg	Klindamycin, 2 µg	Tetracyklin, 30 µg	Kotrimoxazol, 25 µg	Moxifloxacin, 5 µg	Lichořeřišnice (plod)	Jitrocel kopinatý	Kakost luční	Tymián	Česnek setý	Měď ředice	Bergenie	Grapefruit (Grep)	Hřebíčkový	Zázvorovník (Zázvor)	
<i>S. pyogenes</i>	1.	28 C	-	26 C	22 C	-	-	-	9	9	9	11	9	16	9	9	15	9
	2.	27 C	-	24 C	21 C	-	-	-	9	9	9	12	9	15	9	9	18	9
	3.	30 C	-	28 C	27 C	-	-	-	9	9	9	12	9	15	9	9	17	9
	4.	30 C	-	28 C	26 C	-	-	-	9	9	9	12	9	15	9	9	17	9
	5.	32 C	-	29 C	26 C	-	-	-	9	9	9	13	9	16	9	9	18	9
<i>S. agalactiae</i>	1.	23 C	-	22 C	21 C	-	-	-	9	9	9	9	9	18	9	9	13	9
	2.	23 C	-	23 C	21 C	-	-	-	9	9	9	9	9	13	9	9	14	9
	3.	24 C	-	6 R	6 R	-	-	-	9	9	9	9	9	13	9	9	11	9
	4.	23 C	-	27 C	23 C	-	-	-	9	9	9	9	9	14	9	9	12	9
	5.	25 C	-	14 R	6 R	25 C	-	-	9	9	9	9	9	13	9	9	12	9
	6.	18 I	-	23 C	19 C	-	-	-	9	9	9	9	9	13	9	9	12	9
	7.	20 C	-	13 R	20 C	-	-	-	9	9	9	9	9	15	9	9	16	9
<i>S. pneumoniae</i>	1.	23 C	24 C	6 R	6 R	12 R	27 C	28 C	9	13	15	17	11	16	12	9	22	9
	2.	27 C	27 C	28 C	22 C	29 C	24 C	24 C	10	13	16	17	11	17	12	9	22	9
	3.	32 C	30 C	28 C	27 C	30 C	30 C	29 C	10	13	14	18	11	19	13	9	25	9
	4.	30 C	26 C	32 C	24 C	-	-	-	9	11	11	15	10	17	9	9	21	9
	5.	26 C	27 C	29 C	25 C	32 C	6 R	26 C	9	10	11	13	10	14	9	9	21	9
	6.	23 C	23 C	25 C	24 C	-	-	-	9	11	11	15	10	18	9	9	22	9

C citlivý kmen

R rezistentní kmen

I intermediárně citlivý kmen

- netestováno

Zdroj: data z Laboratorního informačního systému Ústavu mikrobiologie FN Plzeň a vlastní naměřené hodnoty

Tabulka B č. 15. Kompletní výsledky difuzních testů u enterokoků

Bakterie	Diskový difuzní test - ATB [mm]							Jamkový difuzní test [mm]										
	Ampicilin, 2 µg	Tetracyklin, 30 µg	Vankomycin, 5 µg	Teikoplanin, 30 µg	Linezolid, 10 µg	Tigecyklin, 15 µg	Gentamicin, 30 µg	Lichořeřišnice (plod)	Jitrocel kopinatý	Kakost luční	Tymián	Česnek setý	Medvědice	Bergenie	Grapefruit (Grep)	Hřebíčekovec	Zázorovník (Zázor)	
<i>E. faecalis</i>	1.	18 C	6 R	15 C	20 C	22 C	24 C	-	9	9	9	13	9	20	9	9	15	9
	2.	15 C	30 C	14 C	21 C	28 C	23 C	-	9	9	9	15	9	19	9	9	15	9
	3.	19 C	10 R	13 C	17 C	20 C	20 C	15 C	9	9	9	11	9	20	9	9	15	9
	4.	8 C	10 R	12 C	16 C	21 C	20 C	6 R	9	9	9	12	9	18	9	9	15	9
	5.	17 C	8 R	14 C	18 C	22 C	21 C	15 C	9	9	9	10	9	19	9	9	15	9
<i>E. faecium</i>	1.	6 R	27 C	6 R	19 C	25 C	25 C	-	9	9	9	16	9	26	9	9	17	9
	2.	6 R	23 C	11 R	11 R	21 C	20 C	-	9	9	9	17	9	26	9	9	20	9
	3.	6 R	10 R	6 R	16 C	20 C	22 C	6 R	9	9	9	14	9	22	9	9	16	9
	4.	6 R	10 R	6 R	17 C	21 C	22 C	6 R	9	9	9	13	9	22	9	9	17	9
	5.	6 R	30 C	6 R	20 C	27 C	27 C	6 R	9	9	9	14	9	21	9	9	16	9

C citlivý kmen

R rezistentní kmen

- netestováno

Zdroj: data z Laboratorního informačního systému Ústavu mikrobiologie FN Plzeň a vlastní naměřené hodnoty

Tabulka B č. 16. Kompletní výsledky difuzních testů u *Enterobacteriaceae*

Bakterie	Diskový difuzní test - ATB [mm]														Jamkový difuzní test [mm]												
	Amoxicilin/Klav ulamát, 30 µg	Ampicilin, 10 µg	Gentamicin, 10 µg	Ciprofloxacín, 5 µg	Piperacilin/Tazobaktam, 36 µg	Cefotaxim, 5 µg	Cefepim, 30 µg	Imipenem, 10 µg	Meropenem, 10 µg	Amikacin, 30 µg	Tigecyklin, 15 µg	Cefrazidim, 10 µg	Furantoin, 100 µg	Kotrimoxazol, 25 µg	Norfloxacin, 10 µg	Cefuroxim, 30 µg	Lichořeršnice (plod)	Jitrocel kopinatý	Kalost luční	Tymián	Česnek setý	Mech edice	Bergenie	Grapefruit (Grep)	Hřebíčkovce	Zázorovník (Zázor)	
<i>E. coli</i>	1.	17 R	6 R	19 C	28 C	21 C	28 C	30 C	29 C	30 C	18 C	19 C	26 C	-	-	-	9	9	9	9	9	18	9	9	17	9	
	2.	21 C	18 C	20 C	30 C	26 C	28 C	-	-	-	-	-	20 C	28 C	31 C	25 C	9	9	9	9	9	19	9	9	16	9	
	3.	21 C	17 C	20 C	32 C	25 C	32 C	-	-	-	-	-	19 C	30 C	28 C	24 C	9	9	9	9	9	18	9	9	17	9	
	4.	22 C	18 C	19 C	30 C	22 C	29 C	-	-	-	-	-	17 C	28 C	29 C	24 C	9	9	9	9	9	22	9	9	15	9	
	5.	25 C	22 C	21 C	34 C	28 C	33 C	-	-	-	-	-	18 C	32 C	29 C	28 C	9	9	9	9	9	23	9	9	19	9	
<i>K. pneumoniae</i>	1.	16 R	6 R	6 R	17 R	18 R	6 R	18 R	29 C	29 C	20 C	19 C	12 R	-	-	-	9	9	9	11	9	19	9	9	16	9	
	2.	24 C	6 R	20 C	30 C	21 C	30 C	-	-	-	-	-	14 C	30 C	30 C	24 C	9	9	9	9	9	17	9	9	14	9	
	3.	23 C	6 R	18 C	25 C	20 C	24 C	29 C	27 C	30 C	20 C	18 C	23 C	-	-	-	9	9	9	9	9	18	9	9	16	9	
	4.	13 R	6 R	6 R	6 R	16 R	6 R	15 R	30 C	31 C	19 C	19 C	6 R	-	-	-	9	9	9	9	9	17	9	9	15	9	
	5.	22 C	6 R	19 C	29 C	23 C	27 C	30 C	29 C	30 C	20 C	30 C	27 C	-	-	-	9	9	9	9	9	16	9	9	14	9	
<i>P. mirabilis</i>	1.	27 C	27 C	21 C	35 C	30 C	34 C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	9	9	9	9	9	22	9	9	17	9	
	2.	22 C	6 R	20 C	32 C	29 C	33 C	-	-	-	-	-	6 R	6 R	30 C	25 C	9	9	9	9	9	23	9	9	19	9	
	3.	25 C	22 C	20 C	30 C	28 C	30 C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	9	9	9	9	9	22	9	9	18	9	
	4.	20 C	6 R	6 R	12 R	27 R	15 R	23 R	25 C	33 C	22 C	20 C	28 R	6 R	6 R	6 R	6 R	9	9	9	9	9	22	9	9	17	9
	5.	21 C	6 R	6 R	24 C	31 C	37 C	38 C	27 C	33 C	23 C	19 C	34 C	-	-	-	-	9	9	9	9	9	25	9	9	18	9

C citlivý kmen
R rezistentní kmen
- netestováno

Zdroj: data z Laboratorního informačního systému Ústavu mikrobiologie FN Plzeň a vlastní naměřené hodnoty

Tabulka B č. 17. Kompletní výsledky difuzních testů u pseudomonád

Bakterie	Diskový difuzní test - ATB [mm]										Jamkový difuzní test [mm]									
	Piperacilin/tazobactam, 36 µg	Cefazidim, 10 µg	Gentamicin, 10 µg	Ciprofloxacin, 5 µg	Imipenem, 10 µg	Meropenem, 10 µg	Amikacin, 30 µg	Kolistin, 10 µg	Cefepim, 30 µg		Lichořeřišnice (plod)	Jitrocel kopinatý	Kakost luční	Tymián	Česnek setý	Medvědice	Bergenie	Grapefruit (Grep)	Hřebíček ec	Zázorovník (Zázor)
<i>P. aeruginosa</i>	1.	26 C	25 C	20 C	30 C	25 C	30 C	-	-	-	9	9	9	9	9	23	9	9	17	9
	2.	6 R	6 R	12 R	6 R	12 R	13 R	10 R	15 C	13 R	9	9	9	9	9	21	9	9	17	9
	3.	26 C	27 C	20 C	30 C	30 C	35 C	25 C	15 C	30 C	9	9	9	9	9	19	9	9	14	9
	4.	24 C	25 C	18 C	32 C	25 C	30 C	25 C	18 C	30 C	9	9	9	9	9	18	9	9	14	9
	5.	24 C	26 C	22 C	30 C	25 C	30 C	25 C	17 C	30 C	9	9	9	9	9	19	9	9	14	9

C citlivý kmen

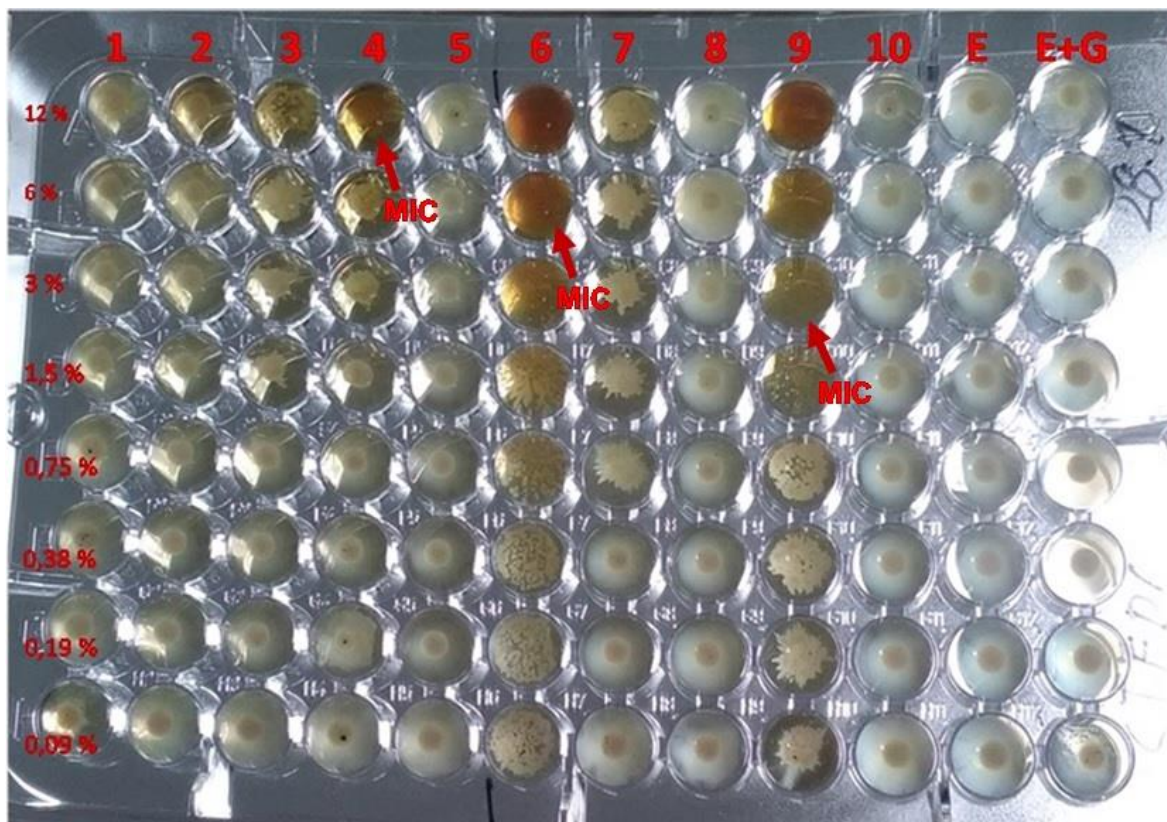
R rezistentní kmen

- netestováno

Zdroj: data z Laboratorního informačního systému Ústavu mikrobiologie FN Plzeň a vlastní naměřené hodnoty

Příloha C – Minimální inhibiční a minimální baktericidní koncentrace

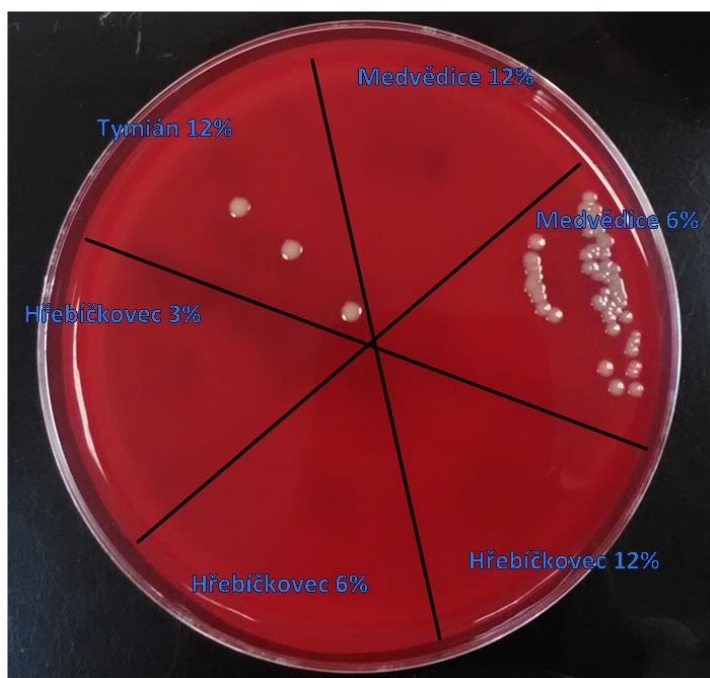
Obrázek 41 MIC rostlinných tinktur použitých proti *S. epidermidis*



Lichořeřišnice plod (1), Jitrocel kopinatý (2), Kakost luční (3), Tymián (4), Česnek setý (5), Medvědice (6), Bergenie (7), Grapefruit (8), Hřebíčkovce (9), Zázvorovník (10), ethanol (E), lihoglycerol (E+G)

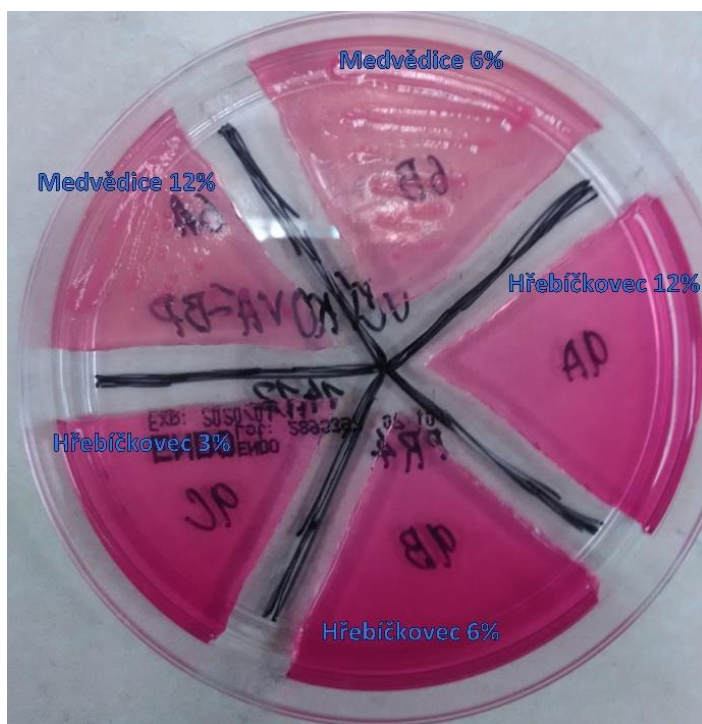
Zdroj: vlastní

Obrázek 42 MBC rostlinných tinktur použitých proti MRSA



Zdroj: vlastní

Obrázek 43 MBC rostlinných tinktur použitých proti P. mirabilis



Zdroj: vlastní

Příloha D – Přepočít koncentrace suchého extraktu

Tabulka D č. 18. Přepočít koncentrace sušiny extraktu na g/L

	Tinktura:	Lichořešnice (plod)	Jitrocel kopinatý	Kakost luční	Tymián	Česnek setý	Medvědice	Bergenie	Grapefruit	Hřebíčkovec	Zázvorovník
Hmotnost (100 µL tinktury) [g]	1. měření	0,0909	0,0915	0,0920	0,0933	0,0959	0,0965	0,0943	0,0998	0,1011	0,0924
	2. měření	0,0936	0,0943	0,0905	0,0907	0,0964	0,0962	0,0923	0,0993	0,1013	0,0922
	3. měření	0,0944	0,0936	0,0936	0,0911	0,0949	0,0977	0,0967	0,0985	0,0996	0,0935
	4. měření	0,0919	0,0909	0,0939	0,0914	0,0952	0,0957	0,0913	0,0995	0,1065	0,0929
	5. měření	0,0909	0,0931	0,0914	0,0919	0,0941	0,0941	0,0987	0,0992	0,1060	0,0927
	Průměr	0,0923	0,0927	0,0923	0,0917	0,0953	0,0960	0,0947	0,0993	0,1029	0,0927
Hustota [g/cm3]		9,2340E-03	9,2680E-03	9,2280E-03	9,1680E-03	9,5300E-03	9,6040E-03	9,4660E-03	9,9260E-03	1,0290E-02	9,2740E-03
Hmotnost 10 kapek [g]	1. měření	0,2309	0,2236	0,2435	0,2380	0,2521	0,2491	0,2440	0,2318	0,2366	0,2600
	2. měření	0,2281	0,2378	0,2289	0,2292	0,2501	0,2453	0,2536	0,2445	0,2404	0,2384
	3. měření	0,2361	0,2305	0,2293	0,2283	0,2516	0,2460	0,2502	0,2413	0,2337	0,2485
	4. měření	0,2317	0,2441	0,2264	0,2315	0,2483	0,2396	0,2408	0,2431	0,2391	0,2476
	5. měření	0,2417	0,2385	0,2436	0,2490	0,2480	0,2426	0,2446	0,2496	0,2404	0,2459
	Průměr	0,2337	0,2349	0,2343	0,2352	0,2500	0,2445	0,2466	0,2421	0,2380	0,2481
Hmotnost sušiny extraktu v 60 kapkách [mg]		37	195	62	290	333	221	54	133	218	11
Objem jedné kapky [µL]		2,5309	2,5345	2,5394	2,5654	2,6235	2,5460	2,6055	2,4386	2,3133	2,6750
Koncentrace sušiny extraktu [g/L]		243,659	1282,290	406,913	1884,014	2115,491	1446,701	345,418	908,974	1570,618	68,536

Zdroj: vlastní

Příloha E – Přepočítání koncentrací pro stanovení MIC a MBC

Tabulka E č. 19. Koncentrace sušiny extraktu v roztocích tinktur s bujonem pro stanovení MIC a MBC

Jamka	Koncentrace tinktury v roztoku	Koncentrace sušiny extraktu v roztocích rostlinných tinktur s bujonem [g/L]									
		Lichořeřišnice (plod)	Jitrocel kopinatý	Kakost luční	Tymián	Česnek setý	Medvědice	Bergenie	Grapefruit (Grep)	Hřebíčkový	Zázvorovník (Zázvor)
×	100,00 %	243,66	1282,29	406,91	1884,01	2115,49	1446,70	345,42	908,97	1570,62	68,54
A	12,00 %	29,24	153,87	48,83	226,08	253,86	173,60	41,45	109,08	188,47	8,22
B	6,00 %	14,62	76,94	24,41	113,04	126,93	86,80	20,73	54,54	94,24	4,11
C	3,00 %	7,31	38,47	12,21	56,52	63,46	43,40	10,36	27,27	47,12	2,06
D	1,50 %	3,65	19,23	6,10	28,26	31,73	21,70	5,18	13,63	23,56	1,03
E	0,75 %	1,83	9,62	3,05	14,13	15,87	10,85	2,59	6,82	11,78	0,51
F	0,38 %	0,91	4,81	1,53	7,07	7,93	5,43	1,30	3,41	5,89	0,26
G	0,19 %	0,46	2,40	0,76	3,53	3,97	2,71	0,65	1,70	2,94	0,13
H	0,09 %	0,23	1,20	0,38	1,77	1,98	1,36	0,32	0,85	1,47	0,06

Zdroj: vlastní

Tabulka E č. 20. Koncentrace polyfenolů v roztocích tinktur s bujonem pro stanovení MIC a MBC

Jamka	Koncentrace tinktury v roztoku	Koncentrace polyfenolů v roztocích rostlinných tinktur s bujonem [mg/L]									
		Lichořeřišnice (plod)	Jitrocel kopinatý	Kakost luční	Tymián	Česnek setý	Medvědice	Bergenie	Grapefruit (Grep)	Hřebíčkový	Zázvorovník (Zázvor)
×	100,00 %	214,9	935,7	1088,3	2437,2	41,5	11612,7	869,3	171,5	17759,0	54,6
A	12,00 %	25,8	112,3	130,6	292,5	5,0	1393,5	104,3	20,6	2131,1	6,6
B	6,00 %	12,9	56,1	65,3	146,2	2,5	696,8	52,2	10,3	1065,5	3,3
C	3,00 %	6,4	28,1	32,6	73,1	1,2	348,4	26,1	5,1	532,8	1,6
D	1,50 %	3,2	14,0	16,3	36,6	0,6	174,2	13,0	2,6	266,4	0,8
E	0,75 %	1,6	7,0	8,2	18,3	0,3	87,1	6,5	1,3	133,2	0,4
F	0,38 %	0,8	3,5	4,1	9,1	0,2	43,5	3,3	0,6	66,6	0,2
G	0,19 %	0,4	1,8	2,0	4,6	0,1	21,8	1,6	0,3	33,3	0,1
H	0,09 %	0,2	0,9	1,0	2,3	0,0	10,9	0,8	0,2	16,6	0,1

Zdroj: vlastní

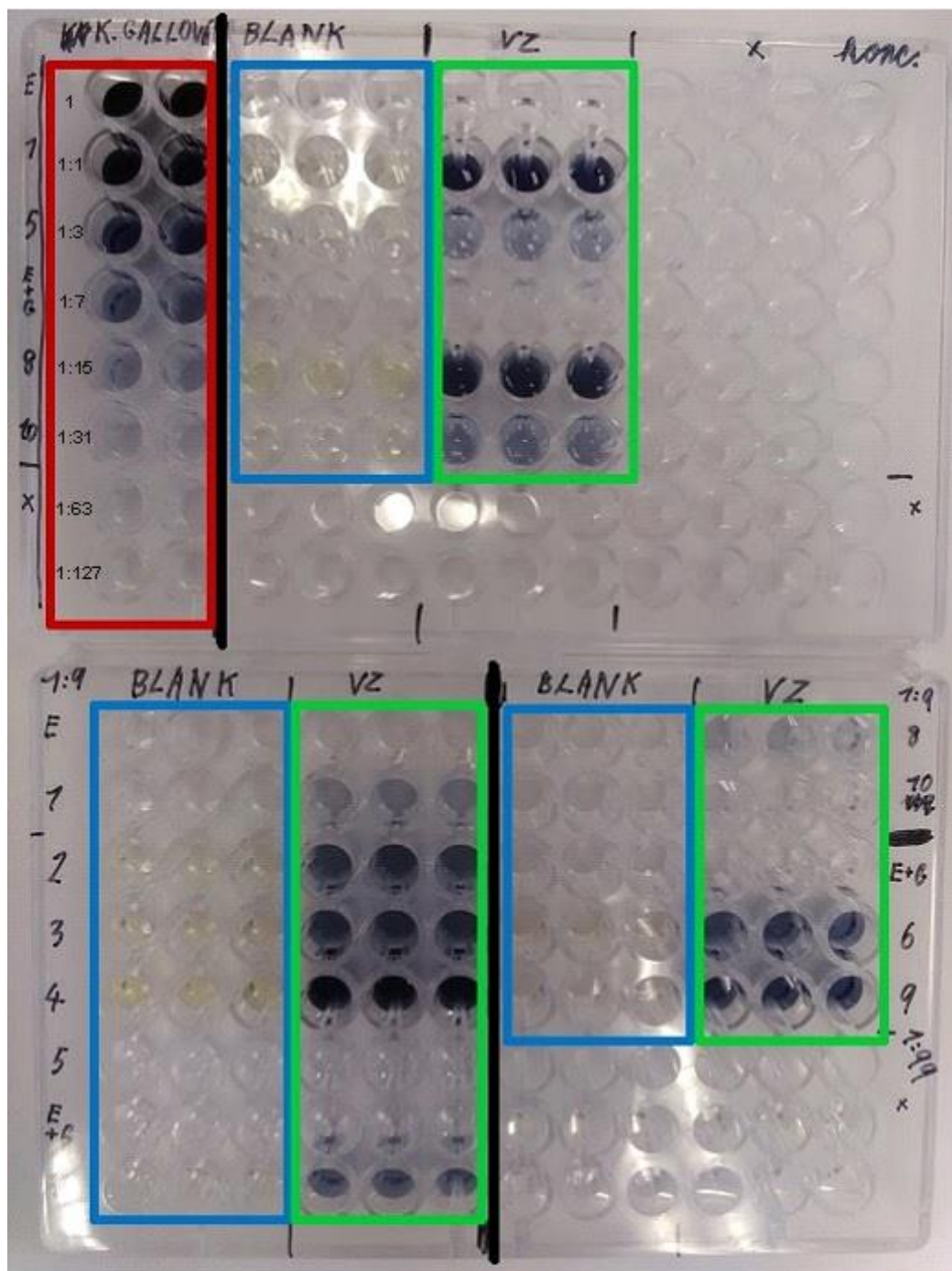
Tabulka E č. 21. Koncentrace flavonoidů v roztocích tinktur s bujonem pro stanovení MIC a MBC

Jablka	Koncentrace tinktury v roztoku	Koncentrace flavonoidů v roztocích rostlinných tinktur s bujonem [mg/L]									
		Lichořeřišnice (plod)	Jitrocel kopinatý	Kakost luční	Tymián	Česnek setý	Medvědice	Bergenie	Grapefruit (Grep)	Hřebíčkovce	Zázvorovník (Zázvor)
×	100,00 %	128,0	761,3	4,7	1787,3	1,6	1160,3	83,6	42,9	9104,5	5,4
A	12,00 %	15,4	91,4	0,6	214,5	0,2	139,2	10,0	5,1	1092,5	0,6
B	6,00 %	7,7	45,7	0,3	107,2	0,1	69,6	5,0	2,6	546,3	0,3
C	3,00 %	3,8	22,8	0,1	53,6	0,0	34,8	2,5	1,3	273,1	0,2
D	1,50 %	1,9	11,4	0,1	26,8	0,0	17,4	1,3	0,6	136,6	0,1
E	0,75 %	1,0	5,7	0,0	13,4	0,0	8,7	0,6	0,3	68,3	0,0
F	0,38 %	0,5	2,9	0,0	6,7	0,0	4,4	0,3	0,2	34,1	0,0
G	0,19 %	0,2	1,4	0,0	3,4	0,0	2,2	0,2	0,1	17,1	0,0
H	0,09 %	0,1	0,7	0,0	1,7	0,0	1,1	0,1	0,0	8,5	0,0

Zdroj: vlastní

Příloha F – Stanovení koncentrace polyfenolů v tinkturách

Obrázek 44 Stanovení koncentrace polyfenolů v tinkturách



Kyselina gallová, blank, VZ – zkoumaný vzorek

Ethanol (E), lihoglycerol (E+G), Lichořeřišnice plod (1), Jitrocel kopinatý (2), Kakost luční (3), Tymián (4), Česnek setý (5), Medvědice (6), Bergenie (7), Grapefruit (8), Hřebíčkovce (9), Zázvorovník (10)

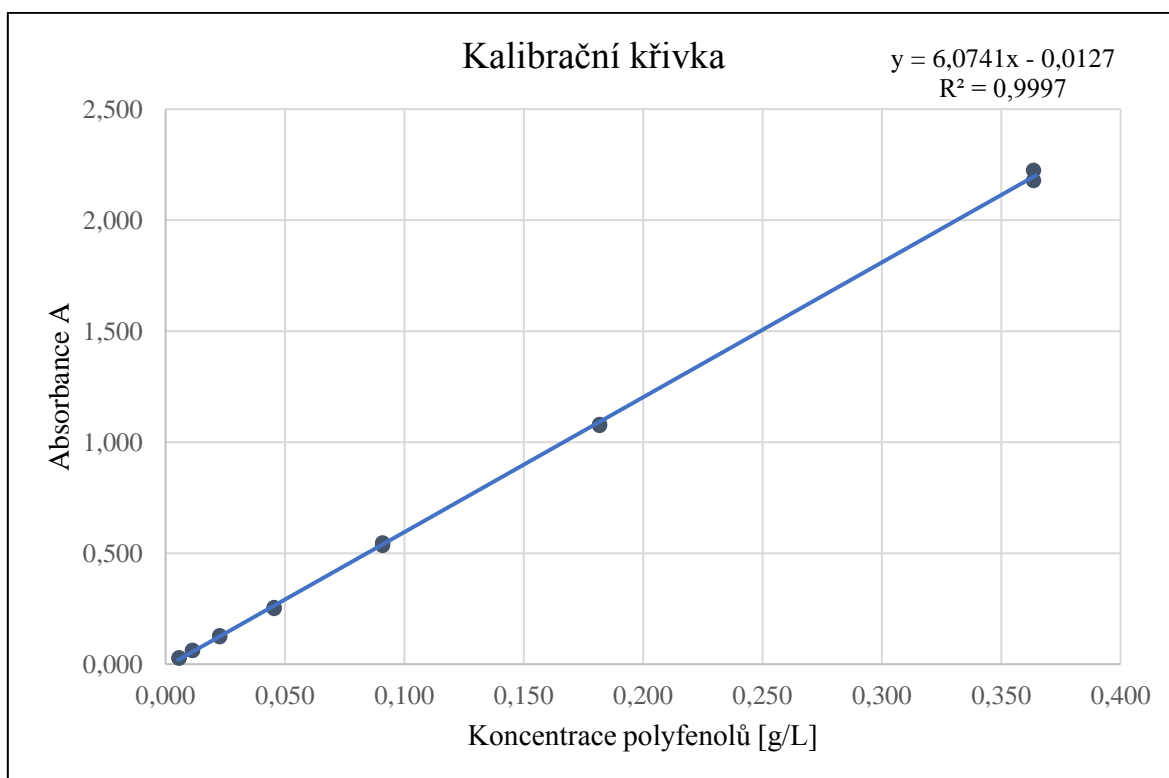
Zdroj: vlastní

Tabulka F č. 22. Absorbance roztoků kyseliny gallové

Ředění	Koncentrace [g/L]	Absorbance
1 (100 %)	0,7270	nad limitní hodnotu
	0,7270	nad limitní hodnotu
1:1 (50 %)	0,3635	2,225
	0,3635	2,179
1:3 (25 %)	0,1818	1,081
	0,1818	1,076
1:7 (12,5 %)	0,0909	0,536
	0,0909	0,547
1:15 (6,25 %)	0,0454	0,255
	0,0454	0,251
1:31 (3,125 %)	0,0227	0,129
	0,0227	0,124
1:63 (1,5625 %)	0,0114	0,062
	0,0114	0,062
1:127 (0,78125 %)	0,0057	0,030
	0,0057	0,028

Zdroj: vlastní

Obrázek 45 – graf 1: Kalibrační křivka kyseliny gallové pro stanovení koncentrace polyfenolů v rostlinných tinkturách



Zdroj: vlastní

Tabulka F č. 23. Výpočet koncentrace polyfenolů v ethanolových tinkturách

100% tinktura	Ethanol 40%		Lichořeřišnice (plod)		Česnek setý	
	BLANK	Vzorek	BLANK	Vzorek	BLANK	Vzorek
Absorbance	0,031	0,033	0,046	1,282	0,035	0,268
	0,034	0,032	0,044	1,397	0,037	0,293
	0,032	0,033	0,046	1,336	0,038	0,268
Průměrná A	0,032	0,033	0,045	1,338	0,037	0,276
A (VZ-BL)	0,000		1,293		0,239	
Koncentrace			0,214907		0,041493	
Koncentrace polyfenolů v neředěné tinktuře [g/L]			0,2149		0,0415	

Ředění 1:9	Ethanol 40%		Jitrocel kopinatý		Kakost luční		Tymián	
	BLANK	Vzorek	BLANK	Vzorek	BLANK	Vzorek	BLANK	Vzorek
Absorbance	0,030	0,041	0,038	0,591	0,040	0,696	0,051	1,578
	0,030	0,037	0,038	0,641	0,040	0,691	0,045	1,528
	0,031	0,034	0,038	0,563	0,038	0,690	0,049	1,456
Průměrná A	0,030	0,035	0,038	0,598	0,039	0,692	0,048	1,521
A (VZ-BL)	0,005		0,556		0,648		1,468	
Koncentrace			0,093572		0,108828		0,243718	
Koncentrace polyfenolů v neředěné tinktuře [g/L]			0,9357		1,0883		2,4372	

A - absorbance

A (VZ-BL) - rozdíl absorbance vzorku a blanku

Zdroj: vlastní

Tabulka F č. 24. Výpočet koncentrace polyfenolů v lihoglycerolových tinkturách

100% tinktura	Ethanol 40% + glycerol (2:1)		Grapefruit (Grep)		Zázvorovník (Zázvor)	
	BLANK	Vzorek	BLANK	Vzorek	BLANK	Vzorek
Absorbance	0,030	0,041	0,042	1,105	0,041	0,367
	0,030	0,045	0,039	1,100	0,040	0,375
	0,030	0,042	0,041	1,042	0,039	0,372
Průměrná A	0,030	0,043	0,041	1,082	0,040	0,371
A (VZ-BL)	0,013		1,029		0,319	
Koncentrace			0,171499		0,054554	
Koncentrace polyfenolů v neředěné tinktuře [g/L]			0,1715		0,0546	

Ředění 1:9	Ethanol 40% + glycerol (2:1)		Bergenie	
	BLANK	Vzorek	BLANK	Vzorek
Absorbance	0,030	0,034	0,039	0,547
	0,030	0,034	0,038	0,535
	0,030	0,033	0,037	0,589
Průměrná A	0,030	0,034	0,038	0,557
A (VZ-BL)	0,004		0,515	
Koncentrace			0,086932	
Koncentrace polyfenolů v neředěné tinktuře [g/L]			0,8693	

Ředění 1:99	Ethanol 40% + glycerol (2:1)		Medvědice		Hřebíčkovec	
	BLANK	Vzorek	BLANK	Vzorek	BLANK	Vzorek
Absorbance	0,030	0,033	0,040	0,651	0,036	1,136
	0,030	0,032	0,037	0,792	0,037	1,078
	0,031	0,032	0,037	0,755	0,037	1,100
Průměrná A	0,030	0,032	0,038	0,733	0,037	1,105
A (VZ-BL)	0,002		0,693		1,066	
Koncentrace			0,116127		0,177590	
Koncentrace polyfenolů v neředěné tinktuře [g/L]			11,6127		17,7590	

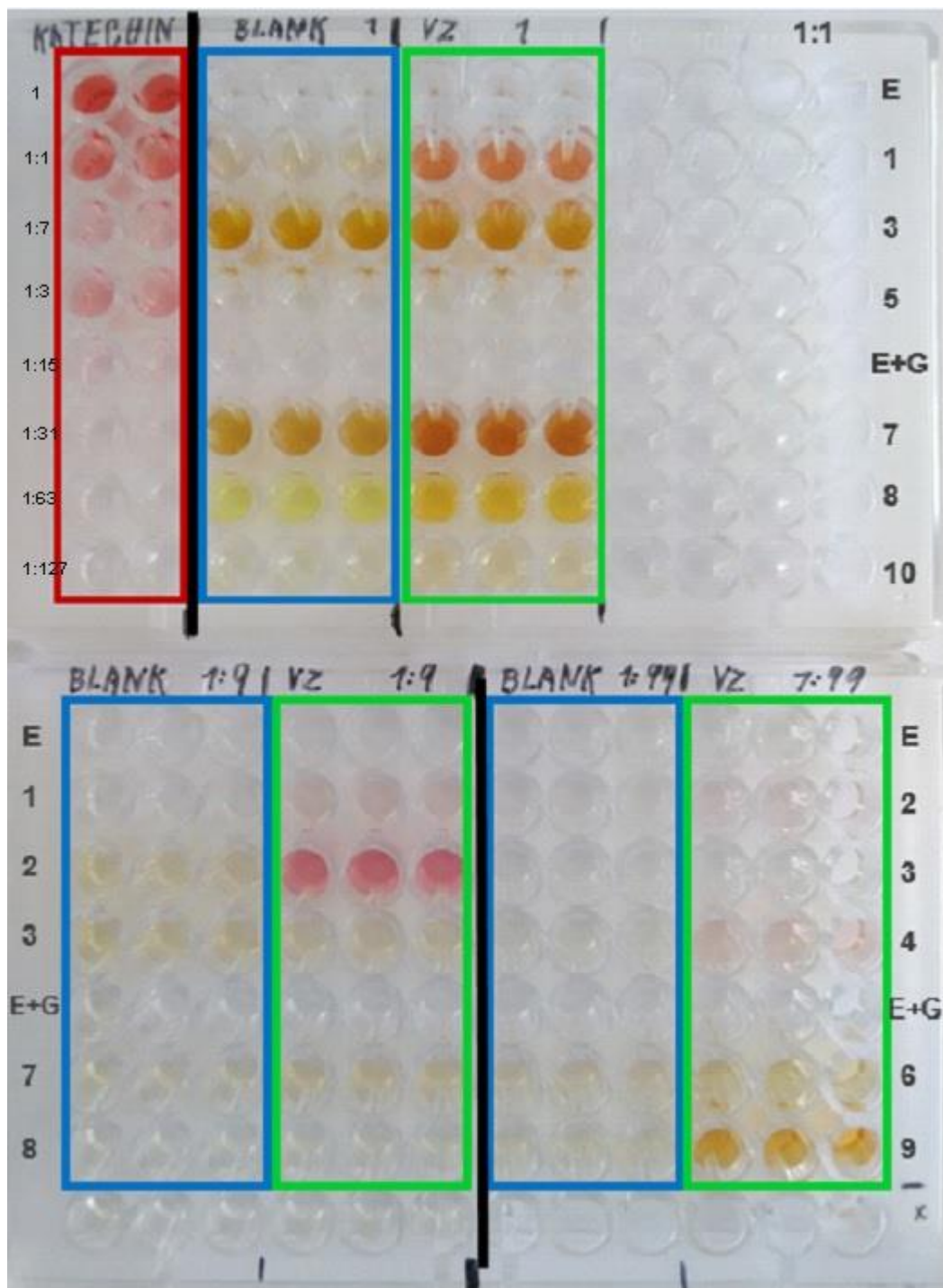
A - absorbance

A (VZ-BL) - rozdíl absorbance vzorku a blanku

Zdroj: vlastní

Příloha G – Stanovení koncentrace flavonoidů v tinkturách

Obrázek 46 Stanovení koncentrace flavonoidů v tinkturách



Kyselina gallová, blank, VZ – zkoumaný vzorek

Ethanol (E), lihoglycerol (E+G), Lichořeřišnice plod (1), Jitrocel kopinatý (2), Kakost luční (3), Tymián (4), Česnek setý (5), Medvědice (6), Bergenie (7), Grapefruit (8), Hřebíčkovce (9), Zázvorovník (10)

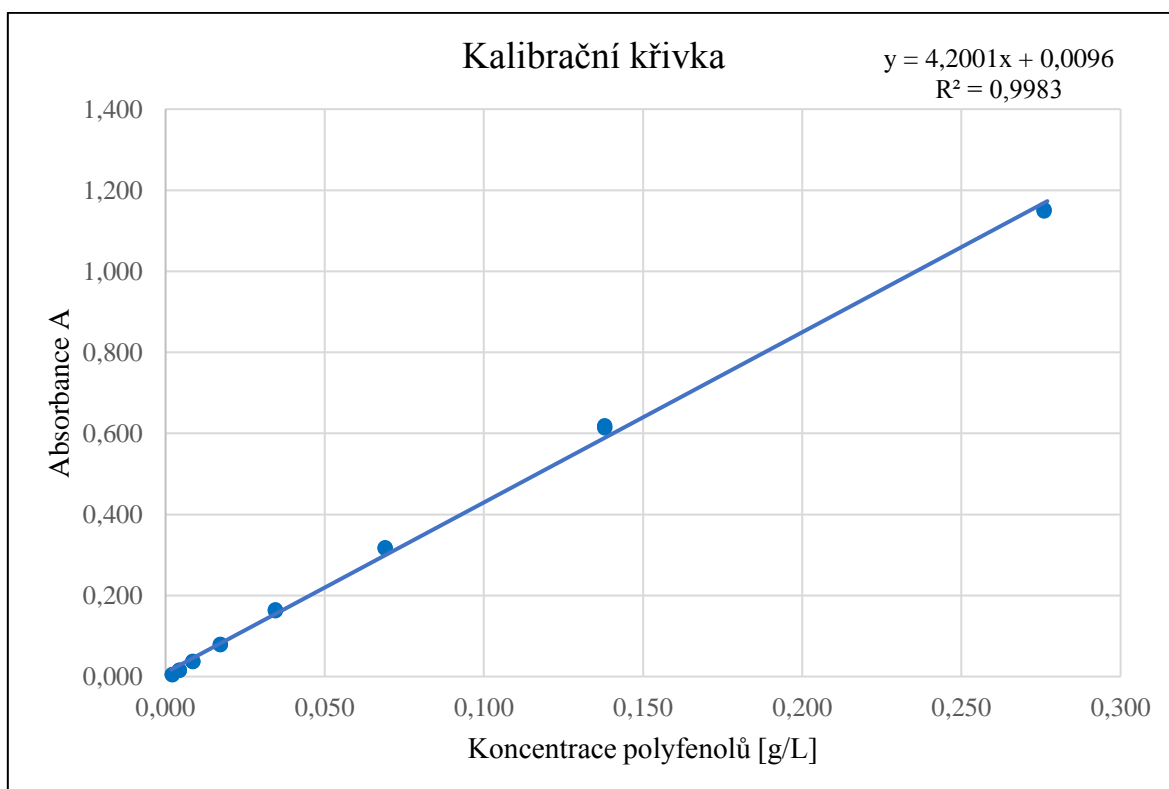
Zdroj: vlastní

Tabulka G č. 25. Absorbance roztoků katechinu

Ředění	Koncentrace [g/L]	Absorbance
1 (100 %)	0,2760	1,152
	0,2760	1,149
1:1 (50 %)	0,1380	0,619
	0,1380	0,613
1:3 (25 %)	0,0690	0,318
	0,0690	0,317
1:7 (12,5 %)	0,0345	0,163
	0,0345	0,165
1:15 (6,25 %)	0,0173	0,079
	0,0173	0,080
1:31 (3,125 %)	0,0086	0,037
	0,0086	0,038
1:63 (1,5625 %)	0,0043	0,016
	0,0043	0,016
1:127 (0,78125 %)	0,0022	0,005
	0,0022	0,006

Zdroj: vlastní

Obrázek 47 – graf 2: Kalibrační křivka katechinu pro stanovení koncentrace flavonoidů v rostlinných tinkturách



Zdroj: vlastní

Tabulka G č. 26. Výpočet koncentrace flavonoidů v ethanolových tinkturách

100% tinktury	Ethanol 40%		Lichořeřišnice (plod)		Kakost luční		Česnek setý	
	BLANK	Vzorek	BLANK	Vzorek	BLANK	Vzorek	BLANK	Vzorek
Absorbance	0,000	0,010	0,084	0,663	0,498	0,522	0,009	0,037
	0,000	0,009	0,085	0,633	0,486	0,538	0,009	0,036
	0,000	0,013	0,084	0,631	0,498	0,542	0,010	0,036
Průměrná A	0,000	0,011	0,084	0,642	0,494	0,534	0,009	0,036
A (VZ-BL)	0,011		0,547		0,029		0,016	
Koncentrace			0,12803		0,00470		0,00160	
Koncentrace flavonoidů v neředěné tinktuře [g/L]			0,1280		0,0047		0,0016	
Ředění 1:9	Ethanol 40%		Jitrocel kopinatý					
	BLANK	Vzorek	BLANK	Vzorek				
Absorbance	0,001	0,001	0,070	0,402				
	0,000	0,002	0,071	0,403				
	0,000	0,001	0,071	0,398				
Průměrná A	0,000	0,001	0,071	0,401				
A (VZ-BL)	0,001		0,329					
Koncentrace			0,07613					
Koncentrace flavonoidů v neředěné tinktuře [g/L]			0,7613					
Ředění 1:99	Ethanol 40%		Tymián					
	BLANK	Vzorek	BLANK	Vzorek				
Absorbance	0,000	0,001	0,021	0,107				
	0,000	0,001	0,022	0,107				
	0,000	0,001	0,022	0,108				
Průměrná A	0,000	0,001	0,022	0,107				
A (VZ-BL)	0,001		0,085					
Koncentrace			0,01787					
Koncentrace flavonoidů v neředěné tinktuře [g/L]			1,7873					

A - absorbance

A (VZ-BL) - rozdíl absorbance vzorku a blanku

Zdroj: vlastní

Tabulka G č. 27. Výpočet koncentrace flavonoidů v ethanolových tinkturách

100% tinktury	Ethanol 40% + glycerol (2:1)		Bergenie		Grapefruit (Grep)		Zázvorovník (Zázvor)	
	BLANK	Vzorek	BLANK	Vzorek	BLANK	Vzorek	BLANK	Vzorek
Absorbance	0,000	0,048	0,317	0,710	0,081	0,325	0,022	0,105
	0,000	0,050	0,317	0,754	0,084	0,320	0,023	0,104
	0,000	0,046	0,319	0,715	0,085	0,318	0,023	0,100
Průměrná A	0,000	0,048	0,318	0,726	0,083	0,321	0,023	0,103
A (VZ-BL)	0,048		0,361		0,190		0,032	
Koncentrace			0,08359		0,04287		0,00541	
Koncentrace flavonoidů v neředěné tinktuře [g/L]			0,0836		0,0429		0,0054	
Ředění 1:99	Ethanol 40% + glycerol (2:1)		Medvědice		Hřebíčkovec			
	BLANK	Vzorek	BLANK	Vzorek	BLANK	Vzorek		
Absorbance	0,000	0,002	0,068	0,126	0,048	0,439		
	0,000	0,000	0,069	0,129	0,048	0,439		
	0,000	0,000	0,068	0,128	0,048	0,445		
Průměrná A	0,000	0,001	0,068	0,128	0,048	0,441		
A (VZ-BL)	0,001		0,058		0,392			
Koncentrace			0,01160		0,09105			
Koncentrace flavonoidů v neředěné tinktuře [g/L]			1,1603		9,1045			

A - absorbance

A (VZ-BL) - rozdíl absorbance vzorku a blanku

Zdroj: vlastní

Příloha H – Povolení sběru informací ve FN Plzeň



FAKULTNÍ NEMOCNICE PLZEŇ
Útvar náměstka pro ošetrovatelskou péči
Edvarda Beneše 13, 305 99 Plzeň - Bory
alej Svobody 80, 304 60 Plzeň - Lochotín
IČO 00669806 tel.: 377 401 111, 377 103 111

Vážená paní

Barbora Učíková

Studentka oboru Zdravotní laborant

Fakulta zdravotnických studií, Katedra záchranářství, diagnostických oborů a veřejného zdravotnictví
Západočeská univerzita v Plzni

Povolení sběru informací ve FN Plzeň

Na základě Vaší žádosti Vám jménem Útvaru náměstkyně pro ošetrovatelskou péči FN Plzeň **uděluji souhlas** se sběrem a zpracováním anonymizovaných dat a výsledků laboratorních metod, používaných v *Ústavu mikrobiologie (MIKRO) FN Plzeň*. Tento souhlas je vydáván, při splnění níže uvedených podmínek, v souvislosti s vypracováním Vaší bakalářské práce s názvem „*Testování účinnosti antibiotik a přírodních látek proti bakteriím in vitro*“.

Podmínky, za kterých Vám bude umožněna realizace Vašeho šetření ve FN Plzeň:

- Vrchní zdravotní laborantka MIKRO souhlasí s Vaším postupem.
- Osobně povedete svoje šetření.
- Vaše šetření nenaruší chod pracoviště ve smyslu provozního zajištění dle platných směrnic FN Plzeň, ochrany dat pacientů a dodržování Hygienického plánu FN Plzeň. **Vaše šetření bude provedeno za dodržení všech legislativních norem, zejména s ohledem na platnost zákona č. 372/2011 Sb.,** o zdravotních službách a podmínkách jejich poskytování, v platném znění.
- Údaje ze zdravotnické dokumentace pacientů, pokud budou uvedeny ve Vaší bakalářské práci, musí být anonymizovány.
- Sběr informací budete provádět v době Vaší, školou schválené, odborné praxe a pod přímým vedením oprávněného zdravotnického pracovníka, kterým je **RNDr. Karel Fajfrlík Ph.D., přednost MIKRO FN Plzeň**.

Po zpracování Vámi zjištěných údajů poskytnete zdravotnickému oddělení / klinice či organizačnímu celku FN Plzeň závěry Vašeho šetření, pokud o ně projeví oprávněný pracovník ZOK / OC zájem a budete se aktivně podílet na případné prezentaci výsledků Vašeho šetření na vzdělávacích akcích pořádaných FN Plzeň.

Toto povolení nezakládá povinnost zdravotnických pracovníků s Vámi spolupracovat, pokud by spolupráce s Vámi narušovala plnění pracovních povinností zaměstnanců. Spolupráce zaměstnanců FN Plzeň na Vašem šetření je dobrovolná.

Přeji Vám hodně úspěchů při studiu.

Mgr. Bc. Světluše Chabrová
manažerka pro vzdělávání a výuku NELZP
zástupkyně náměstkyně pro oš. péči

Útvar náměstkyně pro oš. péči FN Plzeň
tel.. 377 103 204, 377 402 207
e-mail: chabrovas@fnplzen.cz

9. 1. 2020