

UNIVERZITA PARDUBICE
FAKULTA CHEMICKO - TECHNOLOGICKÁ
KATEDRA BIOLOGICKÝCH A BIOCHEMICKÝCH VĚD

**OVĚŘENÍ ANTIBAKTERIÁLNÍ AKTIVITY
BIOKOMPATIBILNÍCH MATERIÁLŮ NA BÁZI
MODIFIKOVANÉ CELULÓZY**

DIPLOMOVÁ PRÁCE

AUTOR PRÁCE: Bc. Dagmar Černá

VEDOUCÍ PRÁCE: doc. MVDr. Jaroslava Mazurová, CSc.

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2011/2012

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Dagmar Černá**
Osobní číslo: **C10905**
Studijní program: **N3912 Speciální chemicko-biologické obory**
Studijní obor: **Analýza biologických materiálů**
Název tématu: **Ověření antibakteriální aktivity biokompatibilních materiálů
na bázi modifikované celulózy**
Zadávací katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

1. Vypracujte literární rešerši zaměřenou na vybrané deriváty celulózy, jejich antibakteriální aktivitu a možnosti využití těchto materiálů k devitalizaci původců nosokomiálních nákaz a ranných infekcí.
2. Vhodnými metodami ověřte inhibiční účinky vybraných materiálů a desinfekčních prostředků na růst mikroorganismů rezistentních na antibiotika.
3. Výsledky zpracujte, porovnejte s publikovanými údaji a posuďte význam dosažených poznatků pro jejich využití v praxi.

Rozsah grafických prací:

Rozsah pracovní zprávy:

Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**

Seznam odborné literatury:

Podle pokynů vedoucího diplomové práce.

Vedoucí diplomové práce:

doc. MVDr. Jaroslava Mazurová, CSc.
Katedra biologických a biochemických věd

Datum zadání diplomové práce: **3. října 2011**

Termín odevzdání diplomové práce: **4. května 2012**



prof. Ing. Petr Lošťák, DrSc.

děkan

L.S.



doc. RNDr. Zuzana Bílková, Ph.D.

vedoucí katedry

V Pardubicích dne 23. února 2011

Prohlašuji:

Tuto práci jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu literatury.

Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci se vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č.121/2000 Sb., autorský zákon, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do její skutečné výše.

Souhlasím s prezenčním zpřístupněním své práce v Univerzitní knihovně Univerzity Pardubice

V Pardubicích dne 4. května 2012

Bc. Dagmar Černá

Na tomto místě bych ráda poděkovala doc. MVDr. Jaroslavě Mazurové, CSc. za odborné vedení mé diplomové práce. Zároveň děkuji za ochotu a trpělivost, se kterou se mi věnovala.

Děkuji pracovníkům mikrobiologického oddělení Krajské nemocnice Pardubice a.s. za poskytnutí bakteriálních kmenů a Mgr. Alexandře Jantovské za výsledky citlivosti na antibiotika, které stanovila.

SOUHRN:

Studie byla zaměřena na zjištění antibakteriální aktivity modifikované celulózy a jejich kombinací s betadinem, zinkem nebo mědí. Textilní a lintrované formy vzorků jsme testovali difúzní metodou na Müller-Hintově agaru, práškové formy a vzorky karmelózy suspenzní metodou v Müller-Hintově bujónu. Dále jsme dilučním testem zjišťovali MIC betadinu a tea tree oilu v Müller-Hintově a masopeptonovém bujónu s různou hustotou inokula. Inhibiční účinky jsme testovali kmeny *Ps. aeruginosa*, *S. aureus* a *K. pneumoniae* rezistentními na antibiotika.

HCMC v práškové formě byla účinná téměř na všechny kmeny. V kombinaci s 0,25% roztokem betadinu kmeny nerostly již po 3 hod inkubace. Synergické účinky betadinu a modifikované celulózy jsme potvrdili i u Hcel HT s betadinem, u které byly naměřené inhibiční zóny v porovnání s Hcel HT bez betadinu mnohem větší. Hcel ZnT s 1,5 %, 2,5 % a 5 % zinku vykazovala nejlepší účinnost na kmeny *S. aureus*, zatímco Hcel CuT s 1,22 % mědi byla nejúčinnější na kmeny *Ps. aeruginosa*. Také Traumacel a Okcel HL působily inhibičně zejména na kmeny *S. aureus*. Ze vzorků karmelózy byla nejúčinnější kombinace 3 % CMC a 0,19 % mědi. Betadin byl ve srovnání s tea tree oil účinnější zejména na kmeny *Ps. aeruginosa*.

Naše výsledky dokumentují, že materiály na bázi modifikované celulózy mají antimikrobiální účinky, ale mnohem účinnější jsou v kombinaci s betadinem, zinkem nebo mědí.

Klíčová slova: oxidovaná celulóza, karboxymethylcelulóza, karmelóza, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, nozokomiální nákazy, hojení ran

SUMMARY:

The study was focused on the detection of antibacterial activity of modified cellulose and their combinations with betadine, zinc or copper. Textile and linter forms of the samples we tested diffuse method on Müller-Hinton agar, powdered form and carmellose suspension method in Müller-Hinton broth. Dilute method in Müller-Hinton and nutritive broth we also find out the MIC betadine and tea tree oil with different inoculum density. Inhibitory effects tested we with strains of *Ps. aeruginosa*, *S. aureus* and *K. pneumoniae* resistant to antibiotics.

HCMC in powder form have been effective on almost all of the strains. In combination with 0.25% solution of betadine were the strains inhibited after 3 hours of incubation. Synergistic effects of betadine and modified cellulose we have confirmed at Hcel HT with betadine, which inhibitory zones were in compare with Hcel HT without betadine much more. Hcel ZnT with 1.5 %, 2.5 % and 5 % zinc showed the best efficiency to the strains of *S. aureus*, while Hcel CuT with a 1.22 % of the copper was most effective at strains of *Ps. aeruginosa*. Also Traumacel and Okcel HL acted inhibitory in particular strains of *S. aureus*. Of the samples carmellose was the most effective combination 3% of CMC and 0,19 % copper. Betadine was in compare with the tea tree oil more effective in particular to the strains of the *P. aeruginosa*.

Our results documented that materials based on modified cellulose have antimicrobial effects, but much more effective are in combination with betadine, zinc or copper.

Keywords: oxidised cellulose, carboxymethylcellulose, carmellose, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, nosocomial infection, healing

Seznam použitých zkratek:

ATB	Antibiotikum
bb.	bakteriální buňky
Cl.	Clostridium
CMC	karboxymethylcelulóza
CPM	celkový počet mikrobů
č. š.	číslo šarže
E.	Escherichia
En.	Enterococcus
H.	Haemophilus
HCMC	kyselá forma karboxymethylcelulózy
Kl.	Klebsiella
MBC	minimální baktericidní koncentrace
MHA	Müller – Hinton agar
MHB	Müller – Hinton bujón
MPB	masopeptonový bujón
MIC	minimální inhibiční koncentrace
N	nehodnoceno
NN	nozokomiální nákazy
NaCMC	sodná sůl karboxymethylcelulózy
nečit.	nečitelné

OC

oxidovaná celulóza

Ps.

Pseudomonas

S.

Staphylococcus

St.

Streptococcus

OBSAH:

1. ÚVOD	12
2. TEORETICKÁ ČÁST.....	13
2.1 Hojení ran a faktory ovlivňující tento proces.....	13
2.2 Nozokomiální nákazy a jejich původci.....	14
2.2.1 Definice nozokomiálních nákaz, jejich vznik, šíření, prevence a léčba antibiotiky	14
2.2.2 Původci nozokomiálních nákaz.....	15
2.2.3 Charakteristika vybraných mikroorganismů způsobujících nozokomiální nákazy	16
2.2.3.1 Stafylokoky.....	16
2.2.3.2 Pseudomonády	17
2.2.3.3 Klebsiely	18
2.3 Rezistence mikrobů na antibiotika.....	19
2.3.1 Mechanismy rezistence bakterií na antibiotika.....	19
2.3.1.1 Změny propustnosti buněčné stěny	20
2.3.1.2 Zneškodnění ATB bakteriálními enzymy.....	20
2.3.1.3 Aktivní vypuzování ATB (eflux).....	20
2.3.1.4 Změna zásahového místa ATB	20
2.4 Antimikrobiální přípravky používané k dekontaminaci	21
2.4.1 Přípravky používané k chemické dezinfekci	21
2.4.1.1 Oxidační činidla	21
2.4.1.2 Halogenidy.....	21
2.4.1.3 Další prostředky s dezinfekčními účinky	22
2.4.2 Charakteristika vybraných látek a iontů s antimikrobiálními účinky	23

2.4.2.1 Tea tree oil	23
2.4.2.2 Betadin.....	23
2.4.2.3 Měď	24
2.4.2.4 Zinek.....	25
2.5 Materiály na bázi oxidované celulózy a karboxymethylcelulózy	25
2.5.1 Oxidovaná celulóza (OC).....	25
2.5.2 Karboxymethylcelulóza (CMC).....	26
2.5.3 Další materiály používané dosud ve zdravotnictví jako moderní krycí obvazy	28
2.6 Metody vhodné ke zjišťování antimikrobiální aktivity	30
2.6.1 Kvalitativní metody	30
2.6.2 Kvantitativní metody	30
3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	32
3.1 Materiály a metody	32
3.1.1 Dezinfekční látky.....	32
3.1.2 Materiály na bázi oxidované celulózy (OC) a kyselá karboxymethylcelulózy (HCMC)	32
3.1.3 Bakteriální kmeny.....	33
3.1.4 Kultivační média a roztoky	35
3.1.5 Přístroje a pomůcky	35
3.2 Pracovní postup.....	36
3.2.1 Stanovení minimální inhibiční koncentrace betadinu a tea tree oilu zkumavkovou diluční metodou.....	36
3.2.2 Stanovení účinné koncentrace práškové formy HCMC a HCMC v kombinaci s betadinem suspenzní metodou	37

3.2.3 Stanovení účinnosti vzorků karmelózy obsahujících různý poměr CMC a mědi suspenzní metodou	37
3.2.4 Stanovení účinnosti textilních forem H Cel ZnT, H Cel HT, Traumacelu, OK Cel HL, H Cel CuT a H Cel HT s obsahem betadinu difúzní metodou.....	38
4. VÝSLEDKY A DISKUZE.....	39
4.1 Betadin.....	39
4.2 Tea tree oil	44
4.3 Materiály na bázi OC a CMC.....	47
4.3.1 HCMC v práškové formě a HCMC v práškové formě v kombinaci s betadinem	47
4.3.2 H cel HT a H cel HT s betadinem v textilní formě	49
4.3.3 H cel ZnT s 1,5%, 2,5% a 5% obsahem zinku a H cel CuT s 1,22% obsahem mědi v textilní formě	50
4.3.4 Traumacel a Ok cel HL.....	52
4.3.5 Karmelóza obsahující různý poměr CMC a mědi.....	53
5. ZÁVĚR	55
PŘÍLOHY	57
LITERATURA.....	60

1. ÚVOD

Vývojem nových materiálů splňujících nároky na použití ve zdravotnictví se zabývá řada pracovišť. Mezi vlastnosti patří i antimikrobiální účinky těchto látek. V současnosti je pozornost zaměřena na studium vlastností derivátů celulózy a možností využití k eliminaci původců nozokomiálních nákaz i mikrobů kontaminujících hojící se rány. Mezi nejvýznamnější patří *Ps. aeruginosa*, *S. aureus* a *K. pneumoniae* způsobující závažná onemocnění a často i nozokomiální nákazy. Léčba těchto infekcí je velmi náročná i vzhledem k rezistenci těchto nozokomiálních kmenů na antibiotika a dezinfekční přípravky. Právě stoupající rezistence na antibiotika patří k nejzávažnějším medicínským problémům současnosti a každá alternativa k antibiotikům je žádaná.

Materiály na bázi modifikované celulózy jsou používány při ošetřování různých ran, neboť vytvářejí ideální podmínky pro jejich hojení. Hojení je významně ovlivněno bakteriální kontaminací, a proto antimikrobiální efekt obvazových materiálů je nezbytný. Materiály na bázi oxidované celulózy spouští i koagulační kaskádu, podporují hemostázu, a jelikož jsou biokompatibilní a biodegradabilní, nezatěžují lidský organismus. Jejich výhodou je i možnost inkorporace jiných funkčních skupin, které dále zvyšují jejich účinky.

Tyto materiály nacházejí další uplatnění i ve farmaceutickém a potravinářském průmyslu.

Cílem diplomové práce bylo ověřit antimikrobiální účinky biokompatibilních materiálů na bázi modifikované celulózy na kmeny rezistentní na antibiotika.

2. TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Hojení ran a faktory ovlivňující tento proces

Hojení ran je fyziologický proces, při kterém dochází k obnovení narušené struktury a funkce daného místa či orgánu. Jedná se o proces reparační, kdy je poškozená tkáň nahrazena tkání vazivovou.

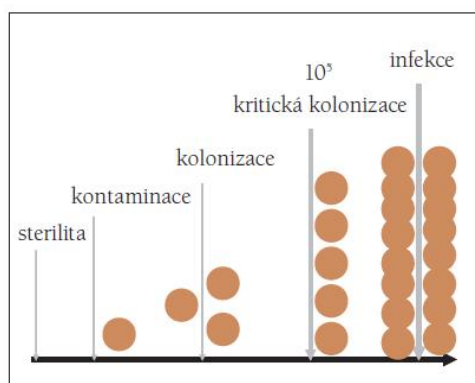
Faktory ovlivňující hojení ran rozdělujeme na systémové a místní. Systémové faktory zahrnují celkový stav organismu, vznik rány, přidružené choroby a jejich léčbu. Mezi místní faktory se řadí hlavně velikost a hloubka rány, její lokalizace, stav okrajů a stáří rány, hypoxie, teplota, přítomnost cizího tělesa a mikrobiální kontaminace [Karlová, Čížková, 2010].

Hojení ran probíhá nejlépe ve vlhkém prostředí. V ráně dochází k ideálním podmínkám pro buněčné a biochemické pochody směřující k tvorbě granulační tkáně a následně uzavření rány nově vytvořenou strukturou. Suché hojení není tak vhodné, protože zpomaluje tvorbu krycích buněk a textilie se na rány často lepí, což je pro pacienta bolestivé.

Na celkový proces hojení má velký vliv bakteriální kontaminace. Bakterie a jejich metabolity ovlivňují proliferaci a migraci fibroblastů, keratinocytů, lymfocytů a makrofágů. Negativní vliv na proces hojení má také $\text{TNF}\alpha$, jehož tvorba je stimulována bakteriálním endotoxinem uvolněným po rozpadu bakteriální buňky. Bakterie si vzájemně připravují podmínky pro přežití v ráně. Aerobní bakterie způsobí spotřebou kyslíku v ráně nedostatečné prokrvení a tím následnou hypoxii a také sníží redox potenciál v ráně, čímž vytvoří příznivé prostředí pro anaeroby.

Při hodnocení bakteriální kontaminace v ráně je významné, jaký mikrobiální druh a případně kolik se v ráně nachází. Rána zůstává sterilní pouze krátkou dobu, velmi rychle je kontaminována mikroby z okolí. Kontaminace (10^2 bb.), ani kolonizace ($10^3 - 10^4$ bb.) hojení rány neovlivňují, jedná se o fyziologický stav, ovšem kritická kolonizace (10^5 bb.) již hojení rány zpomaluje a hrozí vznik infekčního patologického procesu [Grofová, 2006].

Graf č. 1: Fyziologické a infekční kontinuum v ráně



Zdroj: [Grofová, 2006]

2.2 Nozokomiální nákazy a jejich původci

2.2.1 Definice nozokomiálních nákaz, jejich vznik, šíření, prevence a léčba antibiotiky

Jako nozokomiální nákazy (NN) jsou označovány infekční onemocnění postihující pacienty v době pobytu a ošetřování ve zdravotnickém zařízení. Jako NN je hodnoceno i infekční onemocnění, které se projeví krátce po propuštění do domácí péče [Čermáková, 2009]. Spencer roku 1993 definuje NN jako aktivní infekci nebo infekci aktuálně léčenou, jejíž příznaky nebyly zjevné, a nebyly ani ve stádiu inkubační doby při nástupu pacienta do nemocnice [Jedličková, 2005].

Pro vznik a šíření NN je nutná existence zdroje původce nákazy, možnosti jeho přenosu a přítomnost vnímavého jedince. Zdrojem nákazy mohou být pacienti, zdravotnický personál, návštěvníci či jiné osoby, příp. i zvíře. U jedince přenášejícího původce NN může probíhat onemocnění s klinickými příznaky nebo se může jednat o nosiče bez zjevných příznaků, ale vylučující infekční agens. Přímý přenos původce NN proběhne, pokud je současně přítomen zdroj nákazy a vnímavý jedinec. K přenesení infekčního agens dochází nejčastěji kontaktem (polibek, dotyk), kapénkovou infekcí (přes ústní a nosní sliznici či spojivkou), nebo alimentární cestou. Nepřímý přenos probíhá nejčastěji kontaminovanými předměty a diagnostickými přístroji sloužícími při léčbě pacientů [Jedličková, 2005].

Prevence NN je náročný a odpovědný proces, který spočívá v izolaci zdrojů infekce a likvidaci jejich původců v rezervoárech i na potencionálně infikovaných předmětech. Největší význam z celé řady preventivních opatření mají jednoznačně důsledné dodržování zásad asepse a antisepte na všech odděleních zdravotnického zařízení, striktní zařazování pacientů s bakteriologicky negativním nálezem při invazivních zákrocích před pacienty s pozitivním kultivačním vyšetřením a omezení preventivního podávání antimikrobiálních látek s výjimkou rizikových stavů [Maďar a kol. 2006].

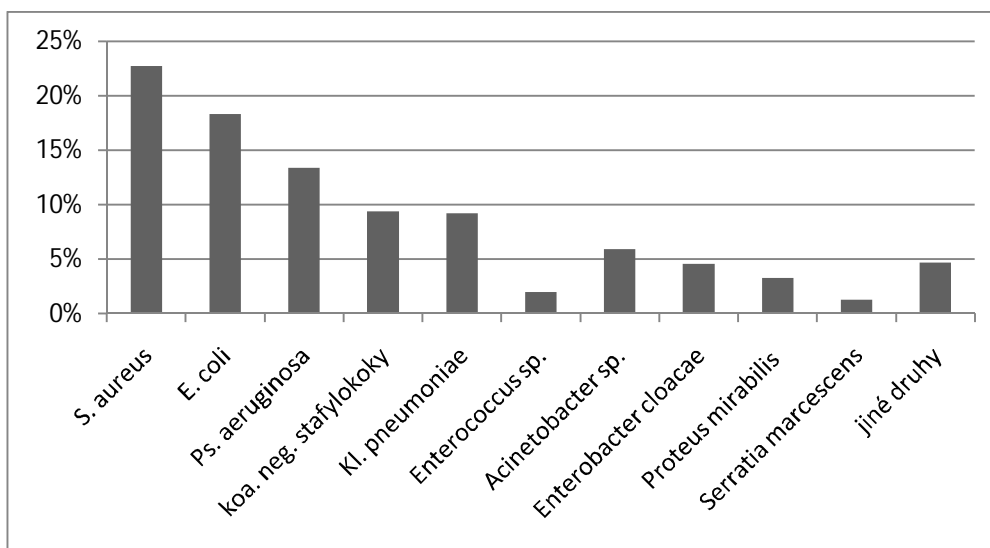
U pacientů s NN je důležité zahájit léčbu co nejdříve, a proto aplikace antimikrobiálních preparátů bývá zpočátku necílená, bez znalosti etiologického agens a jeho citlivosti na ATB. [Čermáková, 2009] Volba léčiva je však velmi významná nejen z hlediska účinné terapie, ale také z hlediska nebezpečí vzniku a selekce rezistentních kmenů. Tzv. nozokomiální kmeny bývají často rezistentní k řadě antibiotik. [Beneš, 2011]

2.2.2 Původci nozokomiálních nákaz

Jako původci NN se uplatňují bakterie, viry, houby i parazité. Nejčastějšími bakteriálními původci NN jsou z grampozitivních bakterií *S. aureus* včetně MRSA, *St. pyogenes*, *St. agalactiae*, *St. pneumoniae*, *Cl. perfringens* a *Cl. tetani*. Z gramnegativních bakterií mají největší zastoupení *E. coli*, *H. influenzae*, *Ps. aeruginosa*, *En. faecalis* a *Kl. pneumoniae*. Významný podíl na NN mají kvasinky, zejména *Candida albicans* [Jedličková, 2005], [Čermáková, 2009], [Stádníková, 2010].

V Argentině provedli Bantar a kol. [2000] v letech 1996 - 1998 studii s 5603 hospitalizovanými pacienty, v níž sledovali procentuální zastoupení jednotlivých původců NN. Výsledky jejich studie jsou uvedeny v grafu č. 2.

Graf č. 2: Procentuální zastoupení původců NN v nemocnici v Argentíně



Zdroj:[Bantar a kol., 2000]

2.2.3 Charakteristika vybraných mikroorganismů způsobujících nozokomiální nákazy

2.2.3.1 Stafylokoky

Obecná charakteristika

Do rodu *Staphylococcus* patří fakultativně anaerobní grampozitivní koky, které jsou seskupeny nejčastěji do shluků. Druhy tohoto rodu jsou podle produkce enzymu plasmakoagulázy, srážejícího krevní plasmu, rozděleny na koaguláza-pozitivní a koaguláza-negativní. Jedním z nejvýznamnějších patogenů, zejména člověka, je koaguláza-pozitivní *Staphylococcus* (*S.*) *aureus*, který způsobuje různá i velmi závažná infekční onemocnění různých systémů, případně až septický šok. Tato bakterie se může vyskytovat na kůži a sliznicích i zdravých jedinců. Vzhledem ke své odolnosti je nalézán v potravinách a také v zevním prostředí, zejména ve zdravotnických zařízeních, kde patří k obávaným původcům nozokomiálních nákaz. Závažnost infekcí vyvolaných *S. aureus* zvyšuje také jeho narůstající rezistence na antibiotika, což přináší řadu problémů v léčbě stafylokokových infekcí.

Citlivost na antibiotika

S. aureus i ostatní stafylokoky byly původně velmi dobře citlivé k řadě antibiotik, zejména k β -laktámovým. Nejúčinnější byl benzylpenicilin, ale většina kmenů od pacientů a nosičů mimo nemocnici a 90 % nemocničních kmenů je v dnešní době rezistentní. Rezistence k penicilinům je způsobena produkcí β -laktamázy, která otvírá β -laktámový kruh v molekule penicilinu, a tím je činí neúčinnými. Později byla připravena léčiva vůči penicilináze odolná, mezi něž patří methicilin, oxacilin, cefalosporiny a další. I na tato antibiotika se stávají rezistentními následkem mutace bílkoviny vázající penicilin v buněčné stěně. Tyto multirezistentní kmeny jsou označovány MRSA a v současnosti jsou celosvětovým problémem [Greenwood a kol., 1999].

2.2.3.2 Pseudomonády

Obecná charakteristika

Rod *Pseudomonas* zahrnuje mnoho saprofytických druhů přítomných v půdě, vodě a vlhkém prostředí, které jsou patogeny lidí, zvířat, hmyzu i rostlin. Hlavním patogenem člověka je *Pseudomonas (Ps.) aeruginosa*. Jedná se o striktně aerobní, gramnegativní, nesporulující tyčinku, která je díky bičíkům pohyblivá. *Ps. aeruginosa* je přirozeně rezistentní k dezinfekčním přípravkům i k antibiotikům a je proto hlavním patogenem způsobujícím nozokomiální infekce. Velmi často také způsobuje nepříjemné kontaminace farmaceutických preparátů, roztoků, katétrů i čoček. Pseudomonádovými infekcemi jsou nejvíce ohroženi pacienti s určitým typem oslabení, jako jsou např. imunodeficity, leukémie a celkově staří lidé. V těchto případech se infekce snadno generalizuje a způsobuje sepsi nebo nekrotizující pneumonii, které mají vysokou mortalitu.

Citlivost na antibiotika

Přirozená rezistence *Ps. aeruginosa* k většině běžně používaných antibiotik a dezinfekčních přípravků je způsobena širokým spektrem mechanismů rezistence, zejména pak efluxem. Z tohoto důvodu jsou možnosti léčby pseudomonádových infekcí velmi omezené. Nejčastěji se používají cefalosporiny, karbapenemy, fluorochinolony a antipseudomonádové peniciliny [Greenwood a kol., 1999].

Právě z důvodů omezené volby antimikrobiálních přípravků u infekcí způsobených *Ps. aeruginosa* testovali Lipový a kol. [2010] ve fakultní nemocnici v Brně, zda je téměř zapomenuté antibiotikum kolistin (polymyxiny) vhodné k léčbě multirezistentních kmenů *Ps. aeruginosa* u těžce popálených pacientů. Kolistin použili k léčbě 22 pacientů a u 14 z nich byla monoterapie kolistinem zcela dostačující. U 5 pacientů byla zvolena kombinace s jiným antibiotikem pro nedostačující efekt samotného kolistinu. Upozornili tak na to, že i když se jedná o antibiotikum velmi staré, je mnohdy jedinou a relativně bezpečnou léčebnou alternativou u zmíněných chorob.

Carmeli a kol. [1999] porovnávali riziko vzniku rezistence u čtyř nejpoužívanějších antipseudomonádových antibiotik. Testovali ciprofloxacin, ceftazidim, imipenem a piperacilin. Zjistili, že nejnižší riziko vzniku rezistence je u ceftazidinu a naopak nejvyšší riziko je u imipenemu.

2.2.3.3 Klebsiely

Obecná charakteristika

Rod *Klebsiella* zahrnuje aerobní až fakultativně aerobní, gramnegativní, koliformní tyčinky. Nejdůležitějším zástupcem a původcem nozokomiálních nákaz u člověka je *Klebsiella (K.) pneumoniae*. *K. pneumoniae* je podmíněný patogen, nejčastější původce nozokomiálních onemocnění dýchacího traktu a druhý nejčastější původce bakteriemií močového traktu. Stejně jako pseudomonádové infekce, ohrožují klebsielové bakteriémie převážně oslabené pacienty, u kterých dosahuje úmrtnost až 50 % [Ahmad a kol. 2011]. Na patogenitě *K. pneumoniae* se podílejí hlavně kapsulární a somatické antigeny, které zajišťují ochranu bakterie před baktericidními účinky séra.

Citlivost na antibiotika

K. pneumoniae je přirozeně rezistentní k amino – penicilinům (ampicilinu a amoxicilinu) a cefalosporinům první generace díky produkci chromozomální β – laktamázy s cefalosporinovou aktivitou (penicilináza SHV – 1). Rezistence k chloramfenikolu a tetracyklinu je závislá na individuálních vlastnostech kmene. Klebsiely jsou primárně citlivé ke gentamicinu, ale pro nemocniční kmeny to kvůli přenosné enzymové rezistenci

neplatí. Největší citlivost klebsiely vykazují na cefalosporiny nové generace, jako jsou cefuroxim a cefotaxim [Greenwood a kol., 1999].

2.3 Rezistence mikrobů na antibiotika

Antibiotika (ATB) jsou léčiva používaná k terapii i profylaxi infekčních onemocnění. Mnohé z nich jsou produkty metabolismu mikroorganismů, případně vyšších rostlin, či živočichů. Cílem antimikrobiální terapie je zamezit patogennímu působení mikroorganismů, čehož lze docílit buď jejich usmrcením, nebo zamezením dalšího množení.

Rezistence mikrobů na ATB je schopnost bakteriální populace přežít v přítomnosti takové koncentrace těchto látek, která běžně nepoškozuje makroorganismus, ale potlačuje růst citlivých kmenů. Rezistenci mikrobů na ATB rozdělujeme na primární a sekundární. Přirozená (primární) rezistence je poměrně vzácná a je dána druhem bakterie a jejími přirozenými vlastnostmi. Získaná (sekundární) rezistence na ATB znamená, že kmeny mikrobiálních druhů na určité ATB primárně citlivé se stanou rezistentními. Sekundární bakteriální rezistence patří v současné době k nejzávažnějším problémům v medicíně. Rezistence bakteriálních kmenů lékařsky významných bakterií vůči ATB stále stoupá. Jedním z důvodů je zneužívání ATB k léčbě banálních onemocnění hlavně dýchacích cest, které by se daly léčit mnohem efektivněji. Dalším a velmi významným důvodem zvyšování rezistence je používání ATB k různým účelům v zemědělství.

Toxicita ATB je pro člověka minimální, což je způsobeno rozdíly ve stavbě eukaryotních buněk a buněk prokaryotních – bakteriálních. Rozdíly ve složení umožňují ATB přesně zacílit na esenciální komponenty bakteriálních buněk, jako jsou peptidoglykan buněčné stěny, proteosyntéza, syntéza nukleových kyselin a další [Urbášková a kol., 2012], [Votava, 2001].

2.3.1 Mechanismy rezistence bakterií na antibiotika

Způsobů, kterými bakterie nabývají rezistence vůči ATB, je několik. Prvním je změna zásahového místa ATB, dalším je schopnost mikroba zabránit jeho průchodu do buňky, případně jej rychle z bakteriální buňky vyloučit. Posledním způsobem je schopnost produkovat látky enzymatického charakteru, které dané ATB inaktivují.

2.3.1.1 Změny propustnosti buněčné stěny

Povrch bakteriální buňky tvoří buněčná stěna, která ji chrání před zevními vlivy a udržuje její tvar. Buněčná stěna je první bariérou a snížením její propustnosti nemůže ATB pronikat ke svým cílovým místům. Vstup většiny ATB do buňky gramnegativních bakterií zajišťují pasivní přenašeče – poriny. Strukturální změnou porinů, případně jejich sníženou expresí, nepronikne ATB do buňky a ta pak získá určitý stupeň rezistence.

2.3.1.2 Zneškodnění ATB bakteriálními enzymy

Bakterie může být rezistentní k ATB v důsledku produkce enzymů, které ATB inaktivují. Nejčastějšími typy enzymatické rezistence je inaktivace beta-laktamových ATB beta-laktamázami. Podobné mechanismy byly nalezeny i u bakterií rezistentních vůči aminoglykosidům. Specifické enzymy zde modifikují aminoskupiny nebo hydroxylové skupiny ATB a takto modifikované molekuly ATB již nejsou schopny se vázat na cílové ribozomální bílkoviny [Urbášková a kol., 2012], [Spíšek, 1999].

2.3.1.3 Aktivní vypuzování ATB (eflux)

Další příčinou rezistence u bakterií je aktivní vypuzení ATB z buňky systémem tzv. efluxních pump. Ty jsou schopny selektivně vychytávat pro buňku toxické látky z cytoplazmy a periplazmového prostoru a opět tak dochází ke snížení koncentrace ATB v buňce [Urbášková a kol., 2012]. Eflux je v současné době považován za nejdůležitější mechanismus rezistence, neboť stejný mechanismus byl prokázán i při odolnosti na různé chemické dezinfekční prostředky.

2.3.1.4 Změna zásahového místa ATB

Mutace v cílových místech ATB, např. mutace v genech kódujících ribozomální RNA, jsou zodpovědné za rezistenci ATB zacílených na inhibici proteosyntézy (tetracykliny, makrolidy, atd.). Zároveň mutace v genech, jejichž produkty se podílejí na syntéze vazebných bílkovin pro penicilin (PBP proteiny), jsou příčinou rezistence k beta-laktamům [Urbášková a kol., 2012].

2.4 Antimikrobiální přípravky používané k dekontaminaci

Mikrobiální dekontaminace je proces, jehož cílem je zničení a odstranění mikrobů z prostředí nebo různých předmětů, včetně biologických materiálů. Podle výsledného stupně čistoty se dělí na mechanickou očistu, dezinfekci a sterilizaci. Při dezinfekci jsou ničeny pouze choroboplodné nebo jinak škodlivé mikroorganismy, kdežto při sterilizaci jsou odstraňovány mikroorganismy všechny [Šlitrová, 2010].

Volba dezinfekčního postupu vychází ze znalostí cest a mechanismů přenosu infekce, možností ovlivnění účinnosti dezinfekce faktory vnějšího prostředí a z odolnosti mikroorganismů. Dezinfekce může být fyzikální, chemická nebo fyzikálně chemická.

2.4.1 Přípravky používané k chemické dezinfekci

2.4.1.1 Oxidační činidla

Kyselina peroctová

Kyselina peroctová je vysoce účinná látka a u nás je vyráběna jako 30 % roztok pod označením Persteril. Je široce účinná proti mikroorganismům, které ničí oxidací – hydroxylovým radikálem, což má za následek rozpad buněčných membrán mikroorganismů. Ve zdravotnictví je používána v promilových koncentracích k povrchovým dezinfekcím pacientů i ošetřujícího personálu. Vzhledem k tomu, že se v těle rozpadá na kyselinu octovou a peroxid vodíku, což jsou látky tělu běžné, lze ji aplikovat ve velmi nízkých koncentracích přímo do některých ložisek, zvláště v kostech.

Peroxid vodíku

Peroxid vodíku je světle modrá kapalina, která se jeví ve zředěných roztocích jako bezbarvá. V lékařství a v domácnostech se využívá jeho 3 % roztok na ošetření povrchových ran a zástavě drobného krvácení.

2.4.1.2 Halogenidy

Chlor

Savo a Chloramin jsou dezinfekční přípravky na bázi chlóru, které se ve zdravotnictví běžně používají k dezinfekci podlah, předmětů, hygienického náčiní a pitné vody.

V koncentracích přeepsaných výrobcem jsou tyto přípravky účinné proti široké škále bakterií, mikroskopických vláknitých hub, řas i lišejníků.

Jód

Jód má vysoký baktericidní účinek na téměř všechny mikroorganismy, ale nevýhodou je jeho malá rozpustnost a dráždivé, alergenní účinky. Ve zdravotnictví se jód používá v přípravcích Jodisol, Jodonal a Betadin.

2.4.1.3 Další prostředky s dezinfekčními účinky

Fenol

Fenol je velmi silné antiseptikum, ale samotný se v dnešní době kvůli své lokální dráždivosti nepoužívá. K dezinfekci podlah a stěn v nemocničních zařízeních, jako antiseptikum operačního pole a k mytí rukou se používají jeho deriváty pod názvy Orthosan a Kreosan. Z důvodů zvýšeného rizika vzniku rezistence se deriváty fenolu nesmějí používat jako jediné dezinfekční prostředky na pracovištích se zvýšeným rizikem pseudomonádových infekcí.

Etylenoxid

Etylenoxid je snadno se vypařující kapalina, která se ve směsi s dusíkem nebo oxidem uhličitým využívá ve zdravotnictví ke sterilizaci oblečení, plastových výrobků, chirurgických nástrojů a dalšího lékařského vybavení (obvazy). Tento způsob sterilizace je velmi účinný, bezpečný a hlavně šetrný.

Glutaraldehyd

Glutaraldehyd se ve formě 0,1 – 1 % roztoku používá k systémové dezinfekci, protože spolehlivě ničí bakterie a viry a při prodloužené expozici ničí i spóry.

Sloučeniny těžkých kovů

Dezinfekční účinky mají přípravky obsahující sloučeniny mědi, stříbra a rtuti. Na trhu jsou dostupné např. pod názvem Targesin (organické koloidní sloučeniny stříbra).

Kvartérní amoniové sloučeniny (Ajatin, Septonex)

Ajatin a Septonex se v koncentracích 0,5 – 1 % používají k dezinfekci kůže, sliznic a chirurgických nástrojů. Působí hlavně na grampozitivní bakterie, na gramnegativní bakterie působí méně. Na viry a mykobakterie jsou tyto přípravky neúčinné [Šlitrová 2010], [Podstatová, Mařar, 2009], převzato z: <http://ose.zshk.cz/vyuka/terapie.aspx?tid=87>

2.4.2 Charakteristika vybraných látek a iontů s antimikrobiálními účinky

2.4.2.1 Tea tree oil

Tea tree oil je přírodní olej s antimikrobiálními účinky, který je získáván z listů australského stromu *Malaleuca alternifolia*. Obsahuje přibližně 100 různých komponent, jejichž zastoupení ovlivňuje jeho biologické účinky i charakteristickou vůni. Tea tree oil má silné antibakteriální, antivirové a antimykotické účinky, proto je využíván ve zdravotnictví k dezinfekci drobných poranění, kožních změn i zánětů v dutině ústní.

Carson a Riley [1995] ověřovali antimikrobiální účinnost některých složek tea tree oilu. Diskovou difúzní metodou testovali: 1,8 – cineol, 1 – terpinen – 4 – ol, p – cymen, linalool, alfa – terpinen, gama terpinen, alfa – terpineol a terpinolen. Autoři zjistili, že nejúčinnějším na všechny mikroorganismy zařazené do testu byl terpinen – 4 – ol, zatímco p – cymen nepůsobil na žádný z testovaných mikroorganismů. Linalool a alfa – terpineol inhibovaly růst všech mikrobů s výjimkou *Pseudomonas aeruginosa*.

Účinnost tea tree oilu na MRSA testovali Carson a kol. [1995]. Vycházeli z doporučení Kauffmana a kol. [1993] hledat alternativy k běžně používanému protistafylokokovému antibiotiku mupirocin. Autoři testovali 66 rezistentních kmenů *St. aureus* a u 64 prokázali rezistenci na methicilin a u 33 na mupirocin. U všech kmenů však prokázali citlivost na tea tree oil. MIC a MBC pro methicilin rezistentní kmeny byla 0,25 % účinné látky v médiu a pro mupirocin rezistentní kmeny 0,5 %. Výsledky dokumentují, že tea tree oil je vhodný k eliminaci rezistentních kmenů *St. aureus* z nemocničních zařízení.

2.4.2.2 Betadin

Betadin neboli Povidon – jód je dezinfekční přípravek běžně používaný ve zdravotnictví zejména k dezinfekci kůže, sliznic i otevřených ran. Obsahuje polyvinylpyrrolidon jód, což je ve vodě rozpustný komplex s elementárně vázaným jódem do systematického polymeru.

Baktericidní je zejména volný jód, který se postupně uvolňuje z komplexu. Tmavě hnědě zbarvený roztok betadinu je aktivní v rozmezí pH 1,5 - 6. Pokud dochází k jeho odbarvení vlivem světla nebo teploty nad 40 °C, je snižována jeho účinnost. Betadin je jedním z nejsilnějších antiseptik, avšak jeho použití není vždy možné pro vedlejší účinky spočívající především v dráždivých účincích na kůži. Betadin je účinný na bakterie, plísňe, viry i prvoky [Kramer, 1999].

Uygur a kol. [2008] testovali dezinfekční prostředky Octenisept (dihydrochlorid), Prontosan (polyhexanid) a Betadin (povidon – jód) a porovnávali jejich účinky na kmeny *Ps. aeruginosa* vykultivované z popálenin. Přípravky autoři testovali na krysách s experimentálně provedenými popáleninami a každou ránu infikovali 0,5 ml bujónové kultury o hustotě 10^8 bakteriálních buněk. Autoři prokázali u všech testovaných přípravků dobrou účinnost. Rozdíl v počtu narostlých kolonií vykultivovaných z krve usmrcených infikovaných krys a z krys neinfikovaných, které sloužily jako kontrola, byl statisticky významný. Nejlepší výsledky vykazoval Octenisept a byl doporučen k ošetřování ran kontaminovaných *Ps. aeruginosa*.

2.4.2.3 Měď

Antimikrobiálních účinků mědi bylo v léčitelství využíváno již 3 tisíce let před Kristem. Již tehdy se měď používala k ošetření poranění i čištění vody k pití. Měď je v různých oborech včetně zdravotnictví používána dodnes. Její účinky byly prokázány jak na suchých površích, tak i ve vodním prostředí. Právě pro antimikrobiální aktivitu se sloučeniny mědi používají k výrobě vodovodního potrubí, neboť zde prokazatelně inhibují růst *Legionell* a zpomalují tvorbu biofilmu. Sloučeniny mědi jsou používány k povrchové úpravě předmětů nejen v nemocnicích, ale i domácnostech a dalších zařízeních.

Výsledky studie prezentovaná v roce 2011 v Ženevě na konferenci Prevence a zvládnutí infekce potvrdily, že používáním měděných povrchů v nemocnicích se snižuje četnost sekundárních infekcí až o 40 %. Autoři uvádějí, že tento kov účinně ničí 97 % bakterií a s nimi i mnoho virových a plísňových patogenů [agentura Reuters 2011]. Způsob, jakým měď inaktivuje patogenní mikroorganismy, je ve stádiu výzkumu. Dosud bylo zjištěno, že viry jsou ničeny následkem interakce mědi s proteiny viru. Dochází k oxidativní inaktivaci bílkovinných složek virového fága.

2.4.2.4 Zinek

Zinek, který spolu s mědí patří mezi stopové prvky, se v našem těle účastní mnoha biologických pochodů. Byly pozorovány také jeho stimulační účinky na hojení ran a na různé patologické procesy v kůži (akné, ekzémy, psoriáza aj.). Při nedostatku zinku je velmi zpomalena re - epitelizace tkání [Standstead a kol., 1970]. Hallmanns [1977] zjistil, že regeneraci epitelů i tkání lze ovlivnit použitím krycího materiálu obsahující zinek.

Krycí materiál obsahující zinek testovali Hughes a McLean [1988] u 40 pacientů s různým poškozením kůže (řezné či tržné rány, změny kůže po kousnutí hmyzem, popáleniny i menší chirurgické rány). Ve všech případech se jednalo o rány velmi obtížně a pomalu se hojící. Při použití krycího materiálu se zinkem se všechny rány vyléčily bez komplikací.

Atmaca a kol. [1977] ověřovali vliv zinku na růst mikroorganismů v MHB spektrofotometricky. Testovali zinek acetát v rozmezí koncentrací 2,8 - 22 mmol/l. Antibakteriální aktivitu sledovali s kmeny *S. aureus*, *S. epidermidis* a *Ps. aeruginosa*. Autoři zjistili, že testovaná sloučenina nejlépe inhibovala růst *St. aureus* a *S. epidermidis* v koncentraci 11 mmol/l. U *Ps. aeruginosa* zaznamenali ve srovnání s kontrolou bez účinné látky určité potlačení růstu, avšak výsledky nebyly statisticky významné

2.5 Materiály na bázi oxidované celulózy a karboxymethylcelulózy

Celulóza spolu s chitinem patří do skupiny stavebních polysacharidů a je primární stavební složkou stěny rostlinných buněk. Jedná se o lineární polymer obsahující až 1500 D – glukosových zbytků spojených $\beta(1\rightarrow4)$ – glykosidovými vazbami. Tato velmi soudržná struktura, vázaná vodíkovými můstky, dává celulózovým vláknům výjimečnou pevnost a je odpovědná za jejich nerozpustnost ve vodě [Voet, Voetová, 1955].

2.5.1 Oxidovaná celulóza (OC)

OC (6 - karboxycelulóza) byla dříve získávána jako 100 % přírodní produkt (čistá bavlna), dnes jsou již zaregistrovány patenty, jak OC vyrobit průmyslově.

OC obsahuje 3 – 25 % karboxylových skupin, je bioresorbilní, biokompatibilní, v lidském organismu má schopnost biodegradace a byly u ní prokázány hemostatické a antimikrobiální účinky na širokou škálu patogenních mikroorganismů. Antimikrobiální

efekt závisí na počtu karboxylových skupin. Čím více jich OC obsahuje, tím více H^+ a OH^- iontů může antimikrobiálně působit. Mimo to u ní byly pozorovány i účinky imunostimulační a protinádorové. Struktura OC umožňuje snadnou inkorporaci jiných funkčních skupin, které potom slouží jako vazebné centrum např. pro farmaka, peptidy nebo kovy a tím je efektivní využití OC velmi rozšířeno. PH materiálů na bázi OC bývá nejčastěji 2,9. Tato hodnota pH spouští koagulační kaskádu, podporuje hemostázu a již sama o sobě má antimikrobiální efekt [Vytřasová J. a kol., 2008],[<http://www.synthesia.eu/>].

OC je využívána v mnoha aplikacích v lékařství, v potravinářském a v kosmetickém průmyslu. Produkty vyrobené z OC se používají jako hemostatické prostředky a prostředky na hojení ran, lékové nosiče, superabsorbenty, deodoranty v absorpčních polštářích, pomůcky v prevenci srůstů a k dalším účelům. OC může být připravena v různých formách: prášek, spray, textilie, papír i vlákno.

V organismu probíhá rozklad OC hydrolyticky a nebo enzymaticky. V podkožní tkáni se vstřebává v během několika dnů až tří týdnů. V zažívacím traktu se rozkládá pouze částečně, protože celulóza je pro lidský organismus nestravitelná [<http://www.synthesia.eu/>].

Nevýhodou OC pro některé aplikace je její nedostatečná pevnost.

Světovým producentem OC pro biomedicínské a technické použití je Synthesia, a.s., která prodává své produkty určené k ošetření pod označením OKCEL. Další firmou prodávající své produkty na bázi oxidované celulózy pod názvem Traumacel je Bioster, a.s.

2.5.2 Karboxymethylcelulóza (CMC)

CMC je jeden z nejpoužívanějších derivátů celulózy, který se připravuje etherifikací kyseliny chloroctové s celulózou v alkalickém prostředí. CMC je obvykle používána ve formě sodné soli (NaCMC) jako farmaceutický nebo potravinářský ingredient nebo jako biokompatibilní materiál v ošetřování ran. [Informace o produktech Hcel od firmy Holzbecher, spol. s.r.o.]V menší míře se též používá kyselá forma karboxymethylcelulózy (HCMC), která se získává vysrážením a okyselením NaCMC na pH 2.

Holzbecher, spol. s.r.o. je jednou z nejdůležitějších firem u nás zabývajících se karboxymethylcelulózou. Tato firma prodává své produkty pod ochranným názvem Hcel. Její produkty se liší volbou celulóзовého materiálu, stupněm substituce a neutralizace a jsou určeny pro hojení ran nebo jako chirurgické materiály. Pro využití v chirurgii nebo jako materiál v prevenci chirurgických infekcí jsou zajímavé zejména materiály v kyselé formě, kdy je CMC při nižším stupni substituce téměř nerozpustná a předpokládají se inhibiční vlastnosti vůči mikroorganismům.

Na trhu dostupné produkty firmy Holzbecher, spol. s.r.o. a jejich detailnější popis jsou:

- Hcel NaT – krytí z modifikované celulózy se zvýšenou nasákavostí vytvářející optimální prostředí pro hojení rány. Výrobek je určen k odsávání krve a sekretů v chirurgii a jako primární krytí pro ošetřování ran.
- Hcel HT – krytí z modifikované celulózy v textilní formě pro odsávání krve a sekretů při chirurgických zákrocích. Vytváří vlhké prostředí a má inhibiční účinek vůči bakteriím.
- Hcel ZnT – textilní kyselá forma CMC s obsahem zinku
- Hcel CuT – textilní kyselá forma CMC s obsahem mědi
- HCMC – prášková forma CMC, která byly připravena vykyselením komerčně dostupné CMC

K výhodám Hcel HT patří:

- rychlý čas zastavení krvácení
- biokompatibilní materiál bez dráždivých účinků na kůži
- stabilita materiálu a možnost skladování v rozmezí teplot od 5 do 25 °C
- žádné chemické přísady nebo konzervanty
- radiační sterilizace
- sací mohutnost 5 -12 g/g (voda)
- inhibiční účinky na *P. aeruginosa*, *E. coli*, *S. aureus* a *K. pneumoniae*

Převzato z: [Informace o produktech Hcel od firmy Holzbecher, spol. s.r.o.]

2.5.3 Další materiály používané dosud ve zdravotnictví jako moderní krycí obvazy

a) bez antimikrobiálního účinku

➤ Hydrokoloidní krytí

Patří historicky k nejstarším obvazům vytvářejících vlhké prostředí. Hydrokoloidní partikule reagují se sekretem rány a vytvoří tak gelovou hmotu, která zajišťuje vhodné prostředí pro hojení rány.

➤ Hydrogely

Skládají se z polymerů s vysokým obsahem vody. Jedná se o hydrofilní materiál, který je na jedné straně schopen rehydratovat suchou tkáň a na druhé straně absorbovat sekret, který vytvoří exudující rána.

b) s antimikrobiálním účinkem

➤ Pěnová polyuretanová a hydropolymerová krytí

Jedná se o materiály s různou velikostí a hustotu pórů a různou drenážní a absorpční kapacitou, které jsou propustné pro vodní páry. Absorpce a redukce přebytečného sekretu udržují v ráně přiměřenou vlhkost. Společně s exsudátem jsou absorbovány i bakterie, čímž se tato krytí podílejí na čištění rány.

➤ Alginátová krytí

Alginátová krytí jsou vyráběna z mořských řas a vyznačují se značnou savostí. Vlákná alginátu spolu se sekretem rány vytvoří nepřilnavý gel, který účinkuje jako vlhký obvaz. Velmi důležitý je i čistící efekt rány. [Karlová, Čížková 2010]

➤ Obvazy s aktivním uhlím

Sorpční obvazy z aktivní uhlíkové tkaniny vyrobené z hydrát celulózoového vlákna jsou hydrofilní, propustné a prodyšné. Z rány absorbují organické látky, sekret, zápach i mikroorganismy a významně tak urychlují hojení a zabraňují sekundární infekci.

Antimikrobiální účinky uhlíkového obvazu Tecasorb zkoumaly Zelenková a Stracenská diskovou difúzní metodou. Zjistily, že obvaz eliminuje do 24 hod *Ps. aeruginosa*, *E. coli*, *S. aureus* a jiné bakterie, což je patrné z obrázku č. 1.

Převzato z: [<http://kompres.sk/teca.pdf>].

Obr. č. 1: Antimikrobiální účinky uhlíkového obvazu Tecasorb



Zdroj: [<http://kompres.sk/teca.pdf>]

2.6 Metody vhodné ke zjišťování antimikrobiální aktivity

Účinnost antimikrobiálních látek se zjišťuje kvalitativními a kvantitativními metodami stanovení. Tyto techniky určování citlivosti rozlišujeme na difúzní a diluční.

Kvalitativními metodami pouze zjišťujeme, zda je růst mikroorganismu inhibován léčebnou koncentrací ATB, či nikoliv.

Kvantitativní metody jsou používány ke stanovení účinného množství ATB, které inhibuje růst nebo usmrcuje mikroorganismus [Vytrásová, Mazurová, 1994], [Vytrásová, Bílková, 1998].

2.6.1 Kvalitativní metody

Disková difúzní metoda

Suspenze testovaného kmene o určité hustotě bakteriálních buněk (bb.) se naočkuje na agarovou půdu v Petriho misce. Poté se na povrch přiloží disky obsahující různá ATB v určité koncentraci. Účinná látka difunduje z disků do okolí a vytváří na půdě různě velké kruhové zóny, v nichž je působením ATB potlačen růst mikroorganismu (tzv. inhibiční zóny). Zbývající plocha naočkovaného média je porostlá koloniemi testovaného mikroorganismu [Vytrásová, Bílková, 1998].

Agarová difúzní metoda

Tato metoda je založena na stejném principu jako disková difúzní metoda. Rozdíl spočívá v přípravě a nanášení antimikrobiální látky, která se pipetuje do jamek v agarové vrstvě.

2.6.2 Kvantitativní metody

Zkumavková diluční metoda

Principem metody je příprava řady zkumavek s tekutým kultivačním médiem obsahující snižující se koncentraci testovaného ATB (ředění se provádí dvojkovou řadou), do kterých se očkuje inokulum testovaného kmene. Po určené době inkubace se určí zkumavka, ve které nedošlo k viditelnému růstu kmene. Nejnižší koncentrace antibiotika, ve které nedošlo k nárůstu, se označí jako minimální inhibiční koncentrace (MIC). Pro většinu kmenů slouží jako kultivační médium Müller – Hinton bujón.

Mikrodiluční metoda

Princip této metody je stejný jako u zkumavkové diluční metody, jen ke stanovení MIC se používají plastové mikrotitrační destičky s 96 jamkami, přičemž jedna destička slouží k testování jednoho mikroorganismu. V každém sloupci destičky je dvojkovou řadou nařazené antibiotikum, čímž se dosáhne 8 různých koncentrací ATB. [Votava a kol., 2010]

Agarová diluční metoda

MIC se hodnotí na agarových médiích obsahujících v Petriho miskách sestupnou koncentraci ATB. Na agarová média se očkují testované kmeny a po určité inkubační době se sleduje růst. Nejnižší koncentrace antibiotika v agarovém médiu, kde nedošlo k nárůstu kmene, je považována za MIC. [Bednář a kol., 2009]

E – test

Na inokulované agarové médium se přiloží kalibrovaný plastový proužek napuštěný kontinuálním gradientem ATB na jedné straně a s vyznačenými hodnotami MIC na straně druhé. Po určené době inkubace se okolo pružku vytvoří kapkovitá inhibiční zóna, kde špička kapky označuje MIC ATB [Citron a kol., 1991].

Galani a kol. [2008] zjišťovali MIC kolistinu na 778 patogenních bakteriích metodou E – testu. Zjistili, že nejlépe kolistin účinkoval na *Enterobacter* spp., *Kl. pneumoniae*, *Ac. baumannii* a *E. coli*. Hodnoty MIC_{50,90} pro všechny jmenované mikroorganismy byly 0,5 a 16 mg/l.

Hodnoty získané diskovou difúzní metodou a mikrodiluční metodou mezi sebou porovnávali Sokovic a kol. [2007]. Zjistili, že výsledky obou metod mezi sebou korelují. Tam, kde disková difúzní metoda poskytovala největší zóny inhibice, poskytovala mikrodiluční metoda nejnižší MIC.

3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Materiály a metody

3.1.1 Dezinfekční látky

Testovali jsme Betadin firmy Pharmaceuticals v koncentračním rozmezí 0,78 – 50 mg/ml.

Dále jsme ke studii použili Tea tree oil firmy Australien Bodycare v koncentračním rozmezí 300 – 19200 µg/ml.

3.1.2 Materiály na bázi oxidované celulózy (OC) a kyselá karboxymethylcelulózy (HCMC)

Testovali jsme HCMC v práškové formě a HCMC v práškové formě v kombinaci s betadinem od firmy Holzbecher, spol. s.r.o.

Dále jsme od firmy Holzbecher, spol. s.r.o. testovali bezbarvou textilií Hcel HT a hnědou textilií Hcel HT s betadinem.

Ve studii jsme ověřovali antibakteriální aktivitu textilií Hcel ZnT s 1,5 %, 2,5 % a 5 % zinku a Hcel CuT s 1,22 % mědi taktéž od firmy Holzbecher, spol. s.r.o.

Od společnosti Synthesia, a.s. jsme testovali produkt Okcel HL v lintrované formě.

Od firmy Bioster, a.s. jsme testovali výrobek Traumacel v textilní formě.

Dále jsme ověřovali antibakteriální aktivitu vzorků karmelózy s různým poměrem karboxymethylcelulózy (CMC) a mědi, jejichž dodavatelem bylo VFU Brno.

3.1.3 Bakteriální kmeny

Ke zjišťování účinků dezinfekčních přípravků a materiálů na bázi OC a HCMC jsme používali kmeny uvedené v tab. I, které jsme získali z mikrobiologické laboratoře Pardubické krajské nemocnice, a.s.

Tab. I: Bakteriální kmeny používané k testování dezinfekčních látek a materiálů na bázi oxidované celulózy a karboxymethylcelulózy

Označení kmene	Kmen	Rezistence na antibiotika	Původ kmene
S1	Staphylococcus aureus ssp. aureus	Citlivý	Nosní výtěr - (směs s H. influenzae)
S3	Staphylococcus aureus ssp. aureus	Citlivý	Kožní stěr
S4	Staphylococcus aureus ssp. aureus	MRSA	Sputum
S5	Staphylococcus aureus ssp. aureus	MRSA	Hnis
S6	Staphylococcus aureus ssp. aureus	MRSA	Ušní výtěr
S7	Staphylococcus aureus ssp. aureus	MRSA	Stěr z rány
S8	Staphylococcus aureus ssp. aureus	MRSA	Nosní výtěr
K1	Klebsiella pneumoniae	ESBL +	Nosní výtěr
K2	Klebsiella pneumoniae	ESBL +	Nosní výtěr
K4	Klebsiella pneumoniae	ESBL +	Moč
K6	Klebsiella pneumoniae	ESBL +	Přítěl
K7	Klebsiella pneumoniae	ESBL +	Sputum
K8	Klebsiella pneumoniae	ESBL +	Moč
P1	Pseudomonas aeruginosa	Polyrezistentní	Stěr z rány
P2	Pseudomonas aeruginosa	Polyrezistentní	Sputum
P3	Pseudomonas aeruginosa	Polyrezistentní	Hnis
P4	Pseudomonas aeruginosa	Polyrezistentní	Sputum
P11	Pseudomonas aeruginosa	Polyrezistentní	Moč
P12	Pseudomonas aeruginosa	Polyrezistentní	Sekret z jazyka

Vysv.: MRSA – meticilín rezistentní S. aureus, produkce ESBL+ - širokospektré β -laktamázy

Informace o citlivosti kmenů S. aureus a K. pneumoniae na antibiotika jsou uvedeny v tab. II a III. (Údaje poskytla Mgr. Jantovská, KBBV/UPa.)

Tab. II: Výsledky citlivosti kmenů *S. aureus* na antibiotika zjištěné mikrodiluční metodou

S. aureus																								
kmen	Antibiotikum [mg/l]																							
	PNC 0,031- 4		OXA 16- 0,125		AMS 32-0,25		CMP 32-0,25		TET 16- 0,125		COT 128-1		ERY 8-0,063		CLI 4-0,031		CIP 8-0,063		GEN 32-0,25		TEI 64-0,5		VAN 64-0,5	
S1	>4	R	0,25	C	4	C	4	C	0,25	C	2	C	0,25	C	0,06	C	0,5	C	<0,25	C	<0,5	C	1	C
S3	1	R	<0,125	C	2	C	8	C	<0,125	C	2	C	>8	R	0,125	C	0,25	C	0,5	C	>64	R	>64	R
S4	>4	R	>16	R	>32	R	>32	R	>16	R	>128	R	>8	R	>4	R	>8	R	0,25	C	>64	R	>64	R
S5	>4	R	>16	R	>32	R	>32	R	>16	R	>128	R	>8	R	>4	R	>8	R	0,25	C	>64	R	>64	R
S6	>4	R	0,5	C	8	C	4	C	>16	R	8	C	>8	R	>4	R	0,5	C	<0,25	C	1	C	1	C
S7	>4	R	0,25	C	4	C	4	C	0,25	C	2	C	>8	R	0,06	C	0,25	C	0,5	C	1	C	1	C
S8	>4	R	>16	R	>32	R	8	R	>16	R	>128	R	>8	R	>4	R	>8	R	0,5	C	>64	R	>64	R

Vysv.: R-rezistentní, C-citlivý, PEN-penicilín, OXA-oxacilín, AMS-ampicilín+sublaktam, CPM-chloramfenikol, TET-tetracyklín, COT-sulfamethoxazol+trimethoprim, ERY-erytromicín, CLI-klindamicín, CIP-ciprofloxacín, GEN-gentamycín, TEI-teikoplanín, VAN-vankomycín

Tab. III: Výsledky citlivosti kmenů *K. pneumoniae* na antibiotika zjištěné mikrodiluční metodou

K. pneumoniae																								
kmen	Antibiotikum [mg/l]																							
	AMP 64-0,5		AMS 64-0,5		CZL 64- 0,5		CRX 64-0,5		CXT 64-0,5		GEN 32- 0,25		COT 128-1		COL 32-0,25		OXO 32-0,25		OFL 32- 0,25		TET 32-0,25		AZT 128-1	
K1	>64	R	64	R	>64	R	>64	R	4	C	<0,25	C	>128	R	0,5	C	8	C	1	C	>32	R	>128	R
K2	>64	R	>64	R	>64	R	>64	R	16	R	>32	R	>128	R	1	C	>32	R	>32	R	>32	R	>128	R
K4	>64	R	64	R	>64	R	>64	R	>64	R	>32	R	>128	R	0,5	C	>32	R	>32	R	>32	R	>128	R
K6	>64	R	64	R	>64	R	>64	R	>64	R	>32	R	>128	R	0,5	C	>32	R	>32	R	>32	R	>128	R
K7	>64	R	>64	R	>64	R	>64	R	64	R	0,5	C	>128	R	1	C	>32	R	8	R	>32	R	>128	R
K8	>64	R	>64	R	>64	R	>64	R	32	R	>32	R	>128	R	0,5	C	>32	R	>32	R	>32	R	>128	R

Vysv.: R-rezistentní, C-citlivý, PEN-penicilín, OXA-oxacilín, AMS-ampicilín+sublaktam, CPM-chloramfenikol, TET-tetracyklín, COT-sulfamethoxazol+trimethoprim, ERY-erytromicín, CLI-klindamicín, CIP-ciprofloxacín, GEN-gentamycín, TEI-teikoplanín, VAN-vankomycín

3.1.4 Kultivační média a roztoky

Pro kultivaci bakteriálních kmenů jsme používali:

K testování antimikrobiální aktivity tea tree oilu, betadinu a vzorků karmelózy s obsahem mědi jsme používali Müller-Hinton (MHB) a masopeptonový (MPB) bujón. Antimikrobiální aktivitu textilií na bázi OC a HCMC jsme testovali na Müller-Hinton agaru (MHA).

Inokulum jsme připravili suspendováním bakteriálního kmene ve fyziologickém roztoku.

Krevní agar (KA) jsme připravili rozpuštěním 4 g Blood Agar Base No. 2 Oxoid (č. š. 1037003) ve 100 ml destilované vody. Tento základ jsme sterilizovali v autoklávu při teplotě 121 °C a tlaku 0,1 MPa. Po schlazení přibližně na 60 °C jsme do média přidali 5 ml defibrilované beranní krve. Nebo jsme používali KA připravený rozpuštěním Columbia agar base, Oxoid (č. š. 361095)

MHA jsme připravili rozpuštěním 3,8 g Müller-Hinton agar, Oxoid (č.š.19260) ve 100 ml destilované vody a takto připravené agar. médium jsme sterilizovali v autoklávu při teplotě 121 °C a tlaku 0,1 MPa.

MHB jsme připravili rozpuštěním 2,1 g Müller-Hinton broth, Oxoid (č. š. 395796) ve 100 ml destilované vody a sterilizovali v autoklávu při teplotě 121 °C a tlaku 0,1 MPa.

MPB jsme připravili rozpuštěním 1,5 g Nutrient Broth No. 2, Oxoid (č. š. 0000042958) ve 100 ml destilované vody a sterilizovali v autoklávu při teplotě 121 °C a tlaku 0,1 MPa.

Sterilní fyziologický roztok jsme získali rozpuštěním 0,85 g NaCl (č. š. 180203) ve 100 ml destilované vody a následnou sterilizací v autoklávu při teplotě 121 °C a tlaku 0,1 MPa.

3.1.5 Přístroje a pomůcky

- autokláv, horkovzdušný sterilizátor, biologický termostat, vodní lázeň, chladnička, vortex, předvážky, analytické váhy, plynový kahan
- Sterilní Petriho misky, zkumavky, Erlenmayerovy baňky, odměrné válce, špičky, bakteriologické kličky, gumové zátky, kádinky a dále tmavá podložka, stojánky na zkumavky, mikropipety, pinzety a nůžky a McFarlandova zákalová stupnice

3.2 Pracovní postup

3.2.1 Stanovení minimální inhibiční koncentrace betadinu a tea tree oilu zkumavkovou diluční metodou

Příprava zásobního roztoku betadinu:

Betadin jsme zakoupili jako 10% roztok a ve studii jsme ho dále ředili dvojkovou řadou MHB nebo MPB.

Příprava zásobního roztoku tea tree oilu:

Tea tree oil jsme zakoupili jako 100% roztok a pro účely testování jsme ho 23 krát naředili MHB na 4,3% roztok. Ve studii jsme ho dále ředili MHB dvojkovou řadou.

Příprava inokula:

Z 24 hod bakter. kultury narostlé na KA jsme připravili suspenzi ve fyziologickém roztoku o hustotě 0,5 stupeň McFarlandovy stupnice, což odpovídá počtu $1,5 \cdot 10^8$ bakteriálních buněk (bb.) v 1 ml. Poté jsme suspenzi naředili MHB nebo MPB v poměru 1:20 (výsledná koncentrace $7,5 \cdot 10^6$ bb/ml).

Při používání inokula s poloviční koncentrací bb. jsme připravené inokulum ředili bujonem až na výslednou koncentraci $7,5 \cdot 10^3$ bb/ml.

Postup ředění a inkubace:

Do 8 sterilních zkumavek jsme napipetovali po 1 ml bujónu. Do 1. zkumavky s 1 ml bujónu jsme přidali 1 ml zásobního roztoku testované látky a obsah zkumavky jsme dále ředili dvojkovou řadou až do zkumavky č. 7. Osmá zkumavka sloužila jako kontrola. Poté jsme do každé zkumavky včetně kontroly napipetovali po 100 μ l inokula. Následovala 24 až 48 hod inkubace při 37 °C.

Hodnocení:

První hodnocení jsme prováděli po 24 hod. Růst bakteriálního kmene se projevil zakalením obsahu zkumavky nebo vytvořením sedimentu. Pro kontrolu jsme obsahy zkumavek bez viditelného růstu vyočkovali na KA včetně obsahu první zkumavky, v níž jsme zjišťovali zákal či sediment z důvodu kontroly čistoty inokula. Naočkovaná agar. média jsme inkubovali při 37 °C 24 až 48 hod a vyhodnotili nárůst bakter. kmene.

3.2.2 Stanovení účinné koncentrace práškové formy HCMC a HCMC v kombinaci s betadinem suspenzní metodou

Příprava inokula:

Postup přípravy inokula byl totožný jako při zjišťování minimální inhibiční koncentrace betadinu a tea tree oilu zkumavkovou metodou.

Postup ředění a inkubace:

Do sterilní zkumavky jsme navážili 0,25 g HCMC a zalili 4,5 ml MHB. Při testování kombinace jsme do zkumavky s HCMC přidali navíc 125 µl betadinu (odpovídá 0,25% roztoku betadinu). Poté jsme přidali 0,5 ml inokula a zkumavku s obsahem jsme inkubovali při 37 °C. Po 3, 6 a 24 hod inkubaci jsme vyočkovali 100 µl obsahu zkumavky vždy na dva MHA a sterilní hokejkou jsme inokulum rozprostřeli po celé ploše agarového média. Naočkovaná agarová média jsme inkubovali 24 hod při 37 °C.

Hodnocení:

Po uvedené době inkubace jsme vizuálně zhodnotili počet kolonií na obou miskách a poté vypočítali průměr.

3.2.3 Stanovení účinnosti vzorků karmelózy obsahujících různý poměr CMC a mědi suspenzní metodou

Příprava inokula:

Postup přípravy inokula byl totožný jako při stanovení minimální inhibiční koncentrace betadinu a tea tree oilu zkumavkovou metodou.

Postup ředění a inkubace:

Vzorky o různé hmotnosti a s různým obsahem účinné látky byly dodány v igelitových obalech. Obsah obalu jsme po zvážení přenesli do sterilní zkumavky s 1 ml MHB a rozpuštěný vzorek jsme dále naředili MHB 1:2, 1:5 a 1:10. Do všech ředění jsme přidali 100 µl inokula. Poté jsme z každého ředění přenesli 100 µl vždy na 2 KA a tento objem jsme sterilní hokejkou rozetřeli po celé ploše agar. média. Vyočkování jsme provedli ihned po naředění a dále po 6 a 24 hod inkubaci při 37 °C. Naočkovaná agar. média jsme inkubovali při 37 °C 24 hod.

Hodnocení:

Po uvedené době inkubace jsme vizuálně zhodnotili počet kolonií na obou miskách a poté vypočítali průměr.

3.2.4 Stanovení účinnosti textilních forem H Cel ZnT, H Cel HT, Traumacelu, OK Cel HL, H Cel CuT a H Cel HT s obsahem betadinu difúzní metodou

Příprava inokula:

Postup přípravy inokula byl totožný jako při stanovení minimální inhibiční koncentrace betadinu a tea tree oilu zkumavkovou metodou.

Postup a inkubace:

Na povrch dvou MHA jsme rozprostřeli 100 µl inokula. Poté jsme doprostřed obou misek přiložili čtverec testované textilie o rozměrech 2 x 2 cm. Média s textíliemi jsme inkubovali 24 hod při 37 °C.

Hodnocení:

Po uvedené době inkubace jsme změřili zóny inhibice na obou miskách a poté vypočítali průměr. Kontrolu baktericidního účinku jsme prováděli odstraněním textilie z povrchu média jedné ze dvou misek, kdy jsme hodnotili, zda v zóně inhibice nedošlo k nárůstu bakteriálního kmene po následné inkubaci při laboratorní teplotě.

4. VÝSLEDKY A DISKUZE

4.1 Betadin

Nejnižší účinné koncentrace betadinu jsme zjišťovali zkumavkovou diluční metodou v MHB a v MPB s kmeny *S. aureus*, *Ps. aeruginosa* a *K. pneumoniae* rezistentních na ATB. Dosažené výsledky jsme uvedli v tabulkách IV, V, VI, a VII.

Tab.IV: Výsledky účinnosti různých koncentrací betadinu zjištěné zkumavkovou diluční metodou v Müller-Hinton bujónu v různých časových intervalech (hustota inokula $7,5 \cdot 10^6$ bb/ml)

kmen	inkubace	č. zkumavky						
		1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.
		obsah betadinu - %						
		5%	2,5%	1,25%	0,625%	0,31%	0,156%	0,078%
		obsah betadinu - mg/ml						
50	25	12,5	6,25	3,125	1,56	0,78		
P12	3 hod	0	0	0	0	x	xxx	xxx
	6 hod	0	0	0	0	xxx	xxx	xxx
	24 hod	0	0	0	0	xxx	xxx	xxx
	48 hod	0	0	0	0	xxx	xxx	xxx
P2	3 hod	0	0	0	0	0	xxx	xxx
	6 hod	0	0	0	0	0	xxx	xxx
	24 hod	0	0	0	0	0	xxx	xxx
	48 hod	0	0	0	0	xxx	xxx	xxx
K4	3 hod	0	0	0	0	xxx	xxx	xxx
	6 hod	0	0	0	0	xxx	xxx	xxx
	24 hod	0	0	0	0	0	xxx	xxx
	48 hod	0	0	0	0	xxx	xxx	xxx
K1	3 hod	0	0	0	0	xx	xx	xxx
	6 hod	0	0	0	0	xx	xxx	xxx
	24 hod	0	0	0	0	0	xxx	xxx
	48 hod	0	0	0	0	0	xxx	xxx
S6	3 hod	0	0	0	x	xxx	xxx	xxx
	6 hod	0	0	0	0	xx	xxx	xxx
	24 hod	0	0	0	0	0	xxx	xxx
	48 hod	0	0	0	0	0	xxx	xxx
S1	3 hod	0	0	0	0	xxx	xxx	xxx
	6 hod	0	0	0	0	xx	xxx	xxx
	24 hod	0	0	0	0	0	xx	xxx
	48 hod	0	0	0	0	0	xxx	xxx

Vysv.: S - Staphylococcus aureus, P - Pseudomonas aeruginosa, K - Klebsiella pneumoniae, intenzita růstu: x - slabá, xx - střední, xxx - silná, 0- žádný nárůst

Tab.V: Výsledky účinnosti různých koncentrací betadinu zjištěné zkumavkovou diluční metodou v Müller-Hinton bujónu v různých časových intervalech (hustota inokula $7,5 \cdot 10^3$ bb/ml)

kmen	inkubace	č. zkumavky						
		1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.
		obsah betadinu - %						
		5%	2,5%	1,25%	0,625%	0,31%	0,156%	0,078%
		obsah betadinu - mg/ml						
50	25	12,5	6,25	3,125	1,56	0,78		
P12	3 hod	0	0	0	0	xx	xx	xxx
	6 hod	0	0	0	0	x	xxx	xxx
	24 hod	0	0	0	0	0	xxx	xxx
	48 hod	0	0	0	0	xxx	xxx	xxx
P2	3 hod	0	0	0	0	x	x	xxx
	6 hod	0	0	0	0	0	xxx	xxx
	24 hod	0	0	0	0	0	xxx	xxx
	48 hod	0	0	0	0	0	xxx	xxx
K4	3 hod	0	0	0	0	xx	xxx	xxx
	6 hod	0	0	0	0	xxx	xxx	xxx
	24 hod	0	0	0	0	xx	xxx	xxx
	48 hod	0	0	0	0	0	xxx	xxx
K1	3 hod	0	0	0	0	xx	xx	xxx
	6 hod	0	0	0	x	xxx	xx	xxx
	24 hod	0	0	0	0	xx	xxx	xxx
	48 hod	0	0	0	0	x	xxx	xxx
S6	3 hod	0	0	0	0	xx	xxx	xxx
	6 hod	0	0	0	0	xx	xxx	xxx
	24 hod	0	0	0	0	0	xxx	xxx
	48 hod	0	0	0	0	xxx	xxx	xxx
S1	3 hod	0	0	0	0	xxx	xxx	xxx
	6 hod	0	0	0	0	xx	xx	xxx
	24 hod	0	0	0	0	0	0	xxx
	48 hod	0	0	0	0	0	0	xxx

Vysv.: S - Staphylococcus aureus, P - Pseudomonas aeruginosa, K - Klebsiella pneumoniae, intenzita růstu: x - slabá, xx - střední, xxx - silná, 0- žádný nárůst

Tab. VI: Výsledky účinnosti různých koncentrací betadinu zjištěné zkumavkovou diluční metodou v masopentonovém bujónu v různých časových intervalech (hustota inokula $7,5 \cdot 10^6$ bb/ml)

kmen	inkubace	č. zkumavky						
		1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.
		obsah betadinu - %						
		5%	2,5%	1, 25%	0,625%	0,31%	0,156%	0,078%
		obsah betadinu - mg/g						
50	25	12,5	6,25	3,125	1,56	0,78		
P12	3 hod	0	0	0	x	x	xxx	xxx
	6 hod	0	0	0	0	xxx	xxx	xxx
	24 hod	0	0	0	0	xxx	xxx	xxx
	48 hod	0	0	0	0	xxx	xxx	xxx
P2	3 hod	0	0	0	0	0	xxx	xxx
	6 hod	0	0	0	0	xxx	xxx	xxx
	24 hod	0	0	0	0	xxx	xxx	xxx
	48 hod	0	0	0	0	xxx	xxx	xxx
K4	3 hod	0	0	0	xx	xx	xxx	xxx
	6 hod	0	0	0	x	xxx	xxx	xxx
	24 hod	0	0	0	0	xxx	xxx	xxx
	48 hod	0	0	0	0	xxx	xxx	xxx
K1	3 hod	0	0	0	xx	xx	xxx	xxx
	6 hod	0	0	0	0	xx	xxx	xxx
	24 hod	0	0	0	0	0	xx	xxx
	48 hod	0	0	0	0	0	xxx	xxx
S6	3 hod	0	0	0	0	xxx	xxx	xxx
	6 hod	0	0	0	0	xx	xxx	xxx
	24 hod	0	0	0	0	xx	xxx	xxx
	48 hod	0	0	0	0	xx	xxx	xxx
S1	3 hod	0	0	0	xx	xxx	xxx	xxx
	6 hod	0	0	0	0	xxx	xxx	xxx
	24 hod	0	0	0	0	0	xxx	xxx
	48 hod	0	0	0	0	0	xxx	xxx

Vysv.: S - Staphylococcus aureus, P - Pseudomonas aeruginosa, K - Klebsiella pneumoniae, intenzita růstu: x - slabá, xx - střední, xxx - silná, 0- žádný nárůst

Tab. VII: Výsledky účinnosti různých koncentrací betadinu zjištěné zkumavkovou diluční metodou v masopeptonovém bujónu v různých časových intervalech (hustota inokula $7,5 \cdot 10^3$ bb/ml)

kmen	inkubace	č. zkumavky						
		1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.
		obsah betadinu - %						
		5%	2,5%	1, 25%	0,625%	0,31%	0,156%	0,078%
		obsah betadinu - mg/ml						
50	25	12,5	6,25	3,125	1,56	0,78		
P12	3 hod	0	0	0	0	xx	xxx	xxx
	6 hod	0	0	0	0	x	xxx	xxx
	24 hod	0	0	0	0	xxx	xxx	xxx
	48 hod	0	0	0	0	xxx	xxx	xxx
P2	3 hod	0	0	0	0	xxx	xxx	xxx
	6 hod	0	0	0	0	x	xxx	xxx
	24 hod	0	0	0	0	xxx	xxx	xxx
	48 hod	0	0	0	0	xxx	xxx	xxx
K4	3 hod	0	0	0	0	x	xxx	xxx
	6 hod	0	0	0	0	x	xxx	xxx
	24 hod	0	0	0	0	x	xxx	xxx
	48 hod	0	0	0	0	xxx	xxx	xxx
K1	3 hod	0	0	0	0	xx	xxx	xxx
	6 hod	0	0	0	0	0	xxx	xxx
	24 hod	0	0	0	0	xxx	xxx	xxx
	48 hod	0	0	0	0	xxx	xxx	xxx
S6	3 hod	0	0	0	0	xx	xxx	xxx
	6 hod	0	0	0	0	xx	xxx	xxx
	24 hod	0	0	0	0	0	xxx	xxx
	48 hod	0	0	0	0	0	xxx	xxx
S1	3 hod	0	0	0	0	xx	xxx	xxx
	6 hod	0	0	0	0	xxx	xxx	xxx
	24 hod	0	0	0	0	0	xxx	xxx
	48 hod	0	0	0	0	0	xxx	xxx

Vysv.: S - Staphylococcus aureus, P - Pseudomonas aeruginosa, K - Klebsiella pneumoniae, intenzita růstu: x - slabá, xx - střední, xxx - silná, 0- žádný nárůst

Z výsledků je patrné, že růst všech kmenů *S. aureus*, *K. pneumoniae* i *Ps. aeruginosa* o hustotě inokula $7,5 \cdot 10^6$ bb/ml byl inhibován již po 3 hod koncentrací betadinu 12,5 mg/ml jak v MHB, tak v MPB. Betadin v koncentraci 6,25 mg/ml nebyl na některé kmeny zcela účinný po 3 hodinové expozici, což jsme zjistili při vyočkování bujónů na KA. Z bujónů vyočkových po 24 a 48 hod jsme růst neprokázali.

Jak bylo uvedeno, antibakteriální účinky betadinu jsme testovali ve dvou tekutých médiích odlišného složení. Důvodem bylo ověření, zda odbarvování betadinu v MHB má vliv na jeho antibakteriální účinnost. Druhým médiem byl MPB, v němž rovněž docházelo k odbarvování, i když pomaleji ve srovnání s MHB. Jelikož nedošlo k ovlivnění antibakteriální aktivity betadinu v obou bujónech, vysvětlujeme si proces odbarvování vlivem jejich odlišného složení (kasein v MHB) a světla.

Při ověřování účinků betadinu jsme použili inokula s různou koncentrací bb. Testy s neobvyklou poloviční koncentrací jsme zvolili z důvodů simulování podmínek ve skutečné ráně, kde nemusí být bakteriální kontaminace vždy tak vysoká.

Výsledky citlivosti kmenů *S. aureus*, *K. pneumoniae* a *Ps. aeruginosa* o hustotě inokula $7,5 \cdot 10^3$ bb/ml byly v jednotlivých bujonech odlišné. V MHB byl růst kmenů P12, K1 a S6 do 48hod potlačen koncentrací betadinu 6,25 mg/ml a kmeny P2, K4 a S1 koncentrací 3,125 mg/ml. V MPB jsme zaznamenali inhibici kmenů P12, P2, K4 a K1 koncentrací 6,25 mg/ml a kmenů S6 a S1 koncentrací 3,125 mg/ml.

Naše výsledky se neshodují s údaji Hedberga a Millera [1969], kteří uvádějí, že na *Ps. aeruginosa* je dostačující betadin v koncentraci 0,1 %.

Zeelie a McCarthy [1998] zjišťovali MIC_{30/40} betadinu (minimální koncentrace betadinu, která zabíjí mikroorganismus po 40 min, ne však po 30 min inkubace). Zjistili, že MIC_{30/40} betadinu pro *Ps. aeruginosa* je 3,484 % a pro *S. aureus* 5,032 %. Uvedené výsledky nemůžeme srovnávat, neboť jsme MIC_{30/40} nezjišťovali u žádného bakteriálního kmene.

Ferguson a kol. [2003] zjišťovali, zda je lepší pro předoperační dezinfekci při operaci šedého zákalu používat 5% nebo 1% roztok betadinu. I přes existenci důkazů, že in vitro má betadin větší baktericidní efekt v nižších koncentracích, prokázali, že in vivo pro snižování počtu bakterií ve spojivkovém vaku člověka je efektivnější využívat betadin koncentrovanější, tedy 5%.

4.2 Tea tree oil

Nejnižší účinné koncentrace tea tree oilu jsme zjišťovali zkumavkovou diluční metodou v MHB s kmeny *S. aureus*, *Ps. aeruginosa* a *K. pneumoniae* rezistentních na ATB. Dosažené výsledky jsme uvedli v tabulkách VIII a IX.

Tab.VIII: Výsledky účinnosti různých koncentrací tea tree oilu zjištěné zkumavkovou diluční metodou v Müller-Hinton bujónu v různých časových intervalech (hustota inokula $7,5 \cdot 10^6$ bb/ml)

kmen	inkubace	č. zkumavky						
		1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.
		obsah tea tree oilu - %						
		2,15%	1,075%	0,54%	0,27%	0,13%	0,07%	0,03%
		obsah tea tree oilu - µg/ml						
		19 200	9600	4800	2400	1200	600	300
P12	3 hod	Xxx	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx
	6 hod	Xxx	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx
	24 hod	Xxx	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx
	48 hod	Xxx	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx
P2	3 hod	Xx	xx	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx
	6 hod	Xxx	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx
	24 hod	Xxx	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx
	48 hod	Xxx	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx
K4	3 hod	0	0	0	0	0	0	xxx
	6 hod	0	0	0	0	0	0	xxx
	24 hod	0	0	0	0	xxx	xxx	xxx
	48 hod	0	0	0	0	xxx	xxx	xxx
K1	3 hod	0	0	0	0	0	xx	xxx
	6 hod	0	0	0	0	xxx	xxx	xxx
	24 hod	0	0	0	x	xxx	xxx	xxx
	48 hod	0	0	0	xxx	xxx	xxx	xxx
S6	3 hod	0	0	x	xx	xxx	xxx	xxx
	6 hod	0	x	x	xx	xx	xxx	xxx
	24 hod	0	0	0	xxx	xxx	xxx	xxx
	48 hod	0	xx	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx
S1	3 hod	0	0	0	x	xx	xxx	xxx
	6 hod	0	0	0	0	x	xx	xxx
	24 hod	0	0	0	xx	xx	xxx	xxx
	48 hod	0	0	0	xxx	xxx	xxx	xxx

Vysv.: S - *Staphylococcus aureus*, P - *Pseudomonas aeruginosa*, K - *Klebsiella pneumoniae*, intenzita růstu: x - slabá, xx - střední, xxx - silná, 0- žádný nárůst

Tab.IX: Výsledky účinnosti různých koncentrací tea tree oilu zjištěné zkumavkovou diluční metodou v Miller-Hinton bujónu v různých časových intervalech (hustota inokula $7,5 \cdot 10^3$ bb/ml)

kmen	inkubace	č. zkumavky						
		1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.
		obsah tea tree oilu - %						
		2,15%	1,075%	0,54%	0,27%	0,13%	0,07%	0,03%
		obsah tea tree oilu - µg/ml						
		19 200	9600	4800	2400	1200	600	300
P12	3 hod	Xxx	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx
	6 hod	Xxx	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx
	24 hod	Xxx	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx
	48 hod	Xxx	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx
P2	3 hod	Xx	xx	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx
	6 hod	Xx	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx
	24 hod	Xxx	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx
	48 hod	Xxx	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx
K4	3 hod	0	0	0	0	0	xx	xxx
	6 hod	0	0	0	0	0	xxx	xxx
	24 hod	0	0	0	0	x	xxx	xxx
	48 hod	0	0	0	xxx	xxx	xxx	xxx
K1	3 hod	0	0	0	0	0	0	xxx
	6 hod	0	0	0	0	0	0	xxx
	24 hod	0	0	0	0	0	xxx	xxx
	48 hod	0	0	0	0	0	xxx	xxx
S6	3 hod	0	0	0	0	xx	xxx	xxx
	6 hod	0	0	0	0	xx	xxx	xxx
	24 hod	0	0	0	0	xxx	xxx	xxx
	48 hod	0	0	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx
S1	3 hod	0	0	0	x	x	x	xxx
	6 hod	0	0	0	0	x	x	x
	24 hod	0	0	0	0	xx	x	x
	48 hod	0	0	0	0	xxx	xxx	xxx

Vysv.: S - Staphylococcus aureus, P - Pseudomonas aeruginosa, K - Klebsiella pneumoniae, intenzita růstu: x - slabá, xx - střední, xxx - silná, 0- žádný nárůst

K ověření účinků tea tree oilu jsme použili kmeny *S. aureus*, *K. pneumoniae* a *Ps. aeruginosa* rezistentní na antibiotika ve dvou koncentracích inokula stejně jako v pokusech s betadinem z obdobných důvodů.

Údaje uvedené v tabulce dokumentují, že testované koncentrační rozmezí tea tree oilu (300-19200 $\mu\text{g/ml}$) bylo neúčinné na všechny kmeny *Ps. aeruginosa* v obou koncentracích bb. v inokulu. Tea tree oil jako dezinfekční prostředek není vhodný pro kmeny *Ps. aeruginosa* v těchto koncentracích.

MIC tea tree oilu pro kmeny *S. aureus* a *K. pneumoniae* o hustotě inokula $7,5 \cdot 10^6$ bb/ml byly rozdílné. Kmeny *K. pneumoniae* byly inhibovány koncentrací v rozmezí 2400-4800 $\mu\text{g/ml}$. MIC kmenů *S. aureus* se pohybovala v rozmezí 4800-19200 $\mu\text{g/ml}$.

Rozdíly v hodnotách MIC jsme zaznamenali i v pokusech s poloviční koncentrací bb. v inokulu. MIC pro kmeny *K. pneumoniae* byly 1200-4800 $\mu\text{g/ml}$. Kmeny *S. aureus* byly devitalizovány v koncentracích 2400-9600 $\mu\text{g/ml}$. Tato zjištění potvrzují korelaci množství mikroba k účinnosti antibakteriálních látek (koncentrace dezinfekčního roztoku či množství ATB).

MIC a MBC tea tree oilu pro kmeny *E. coli* a *S. aureus* zjišťovali Cox a kol. [1999]. Autoři prokázali, že MIC odpovídala 0,25% a MBC 0,5% koncentraci účinné látky. Jejich výsledky však nemůžeme porovnávat s našimi, neboť autoři používali inokulum o hustotě 10^8 bb/ml.

Hada T. a kol. [2001] testovali antibakteriální efekt tea tree oilu na 14 meticilín citlivých (MSSA) a 20 meticilín rezistentních (MRSA) kmenech *S. aureus* mikrodiluční metodou. Žádný z MSSA ani MRSA kmenů *S. aureus* nebyl inhibován koncentrací tea tree oilu do 40 $\mu\text{g/ml}$.

4.3 Materiály na bázi OC a CMC

4.3.1 HCMC v práškové formě a HCMC v práškové formě v kombinaci s betadinem

Antibakteriální účinky HCMC a HCMC v kombinaci s betadinem na kmeny *Ps. aeruginosa*, *S. aureus* a *K. pneumoniae* získané suspenzní metodou jsme uvedli v tabulkách X a XI.

Tab.X: Výsledky účinnosti kyselé karboxymethylcelulózy v práškové formě zjištěné suspenzní metodou v různých časových intervalech (hustota inokula $7,5 \cdot 10^6$ bb/ml)

kmen	CPM/1ml		
	doba inkubace - hod		
	3	6	24
P1	$1 \cdot 10^3$	0	0
P2	$1,9 \cdot 10^3$	0	0
P3	$2 \cdot 10^2$	0	0
P4	0	0	0
P5	$3 \cdot 10^2$	0	0
S4	$2,672 \cdot 10^5$	$8,9 \cdot 10^3$	0
S5	$1,146 \cdot 10^5$	0	0
S6	nečit.	$8,1 \cdot 10^3$	0
S7	$6,32 \cdot 10^4$	$1,13 \cdot 10^4$	0
S8	N	$1,62 \cdot 10^4$	0
K1	nečit.	$6,8 \cdot 10^3$	nečit.
K2	nečit.	$7 \cdot 10^2$	nečit.
K4	nečit.	$3,7 \cdot 10^3$	0
K6	nečit.	$1 \cdot 10^3$	0
K7	nečit.	$3,9 \cdot 10^3$	nečit.

Vysv.:P – *Pseudomonas aeruginosa*, S – *Staphylococcus aureus*, K – *Klebsiella pneumoniae*, CPM – celkový počet mikrobů, 0 – žádný nárůst, nečit. - nečitelné, N – nehodnoceno

Z výsledků uvedených v tabulce je patrné, že růst všech kmenů *Ps. aeruginosa* a *S. aureus* byl HCMC v práškové formě inhibován do 24 hod. Z kmenů *K. pneumoniae* byly do 24 hod inhibovány pouze kmeny K4 a K6. Nejlepší výsledky HCMC v práškové formě jsme zaznamenali na kmeny *Ps. aeruginosa*, jejichž růst byl potlačen již po 6 hod inkubace. Naše výsledky potvrzují, že HCMC má antimikrobiální účinky a její použití k ošetření ran je vhodné.

Tab.XI: Výsledky účinnosti kyselá karboxymethylcelulózy v práškové formě v kombinaci s betadinem(0,25% roztok betadinu) zjištěné suspenzní metodou v různých časových intervalech (hustota inokula $7,5 \cdot 10^6$ bb/ml)

kmen	CPM/1ml		
	doba inkubace – hod		
	3	6	24
P1	0	0	0
P2	0	0	0
P3	0	0	0
P4	0	0	0
P5	0	0	0
S4	0	0	0
S5	0	0	0
S6	N	0	0
S7	0	0	0
S8	0	0	0
K1	N	0	N
K2	0	0	0
K4	0	0	0
K6	0	0	0
K7	0	0	0

Vysv.:P – Pseudomonas aeruginosa, S – Staphylococcus aureus, K – Klebsiella pneumoniae, CMP – celkový počet mikrobů, 0 – žádný nárůst, N – nehodnoceno

Získané výsledky dokumentují velmi dobrou účinnost HCMC v práškové formě v kombinaci s betadinem, která inhibovala všechny kmeny již po 3 hod inkubace. Z výsledků uvedených v tabulkách IV a VI je zřejmé, že betadin ve směsi s HCMC má synergické účinky, neboť samotný betadin ani v koncentraci 0,31 % dostatečně neinhiboval růst kmenů Ps.aeruginosa, S. aureus ani K. pneumoniae.

4.3.2 Hcel HT a Hcel HT s betadinem v textilní formě

Velikosti inhibičních zón v okolí vzorků Hcel HT a Hcel HT s betadinem získané difúzní metodou jsme uvedli v tabulce XII.

Tab.XII: Inhibiční zóny naměřené u modifikované celulózy v textilní formě (Hcel HT) a u modifikované celulózy v textilní formě s betadinem zjištěné difúzní metodou (hustota inokula $7,5 \cdot 10^6$ bb/ml)

kmen	Hcel HT	Hcel HT s betadinem
	velikost inhibiční zóny - mm	
P1	2	5
P2	2	5
P4	2	4
P11	2	4
P12	2	5
S1	2	6
S3	1,5	8
S4	0	7
S6	1	12
S7	1	9
S8	2	9
K1	0	4
K2	0	5
K4	0	4
K6	0	3
K7	0	5
K8	1	4

Vysv.: P – Pseudomonas aeruginosa, S – Staphylococcus aureus, K – Klebsiella pneumoniae

Uvedené hodnoty inhibičních zón potvrzují, že Hcel HT bez betadinu nejlépe inhibovala růst kmenů Ps. aeruginosa.

Hcel HT s obsahem betadinu potlačovala růst všech kmenů, z nichž nejlépe kmeny S. aureus. Zjištěné výsledky opět potvrzují potencující inhibiční účinky obsaženého betadinu.

U kmenů S6 a S7 a u všech kmenů K. pneumoniae jsme v okolí textilie Hcel HT s obsahem betadinu zaznamenali vedle klasické inhibiční zóny ještě další „částečnou

inhibiční zónu“ s nárůstem ojedinelých kolonií. U kmenů *K. pneumoniae* K2 a K6 jsme v „částečné zóně inhibice“ pozorovali 2 typy kolonií odlišné velikosti (viz příloha 1). Po vyočkování obou typů kolonií na KA byla velikost i morfologie shodná. U obou typů kolonií jsme opakovaně testovali antibakteriální aktivitu, přičemž výsledky byly s malými odchylkami identické.

Jelikož „částečná inhibiční zóna“ byla patrná u všech kmenů *K. pneumoniae*, domnívali jsme se, že se jedná o počínající rezistenci k betadinu. Výsledky získanými opakovaným vyšetřením suspektních klonů se naše domněnka nepotvrdila.

4.3.3 Hcel ZnT s 1,5%, 2,5% a 5% obsahem zinku a Hcel CuT s 1,22% obsahem mědi v textilní formě

Hodnoty inhibičních zón Hcel ZnT s 1,5%, 2,5% a 5% obsahem zinku a Hcel CuT s 1,22% obsahem mědi získané difúzní metodou jsme zaznamenali v tabulce XIII.

Tab. XIII: Inhibiční zóny naměřené u modifikované celulózy (Hcel ZnT) s 1,5%, 2,5% a 5% obsahem zinku a u modifikované celulózy (Hcel CuT) s 1,22% obsahem mědi v textilní formě zjištěné difúzní metodou (hustota inokula $7,5 \cdot 10^6$ bb/ml)

kmen	Hcel ZnT			Hcel CuT
	obsah zinku - %			obsah mědi - %
	1,5	2,5	5	1,22
	zóna inhibice - mm			
P1	1,5	2,25	4,5	3
P2	2,5	3	5	1,75
P4	2,5	1,5	2,5	3
P11	2	2,5	4	3,25
P12	1,5	1,5	8	3
S1	1	4	N	2,75
S3	1,5	4	N	2,5
S4	1	3,5	9	3,5
S6	1	1,5	7	2
S7	2	5	10	2
S8	2	3,5	10	1,75
K1	1,5	2	5,5	2
K2	1	1,5	5	2
K4	0,75	1,5	5	0
K6	1	1,5	10	0,5
K7	1	0,5	7	0,5
K8	1,5	2	N	2

Vysv.: P – *Pseudomonas aeruginosa*, S – *Staphylococcus aureus*, K – *Klebsiella pneumoniae*, N - nehodnoceno

Z průměrů hodnot naměřených zón je zřejmý antimikrobiální efekt kyselé celulózy ve vztahu s množstvím zinku. Všechny testované vzorky se zinkem vykazovaly největší účinnost na kmeny *S. aureus* (viz příloha 2).

Z hodnot uvedených v tabulce je zřejmé, že vzorek s mědí nejlépe inhiboval růst kmenů *Ps. aeruginosa* (viz příloha 3).

Na základě našich výsledků můžeme konstatovat, že přítomnost měďnatých a zinečnatých iontů zvyšovala antibakteriální účinky modifikované celulózy.

Vytřasová a kol., [2008] ověřovali antimikrobiální účinky oxidované celulózy a jejích solí v textilní formě. Testovali OKCEL Zn-T (s 2,92% obsahem zinku) diluční metodou. Autoři uvádějí, že testovaný materiál byl nejúčinnější na kmeny *Ps. aeruginosa* a *S. epidermidis*. Uvedené poznatky se shodují s našimi, i když jsou získané jinou metodou.

4.3.4 Traumacel a Okcel HL

Velikosti inhibičních zón naměřené u vzorků Traumacel a Okcel HL získané difúzní metodou jsme uvedli v tabulce XIV.

Tab. XIV: Inhibiční zóny naměřené u vzorků oxidované celulózy Traumacel v textilní formě a Okcel HL v lintrované formě zjištěné difúzní metodou (hustota inokula $7,5 \cdot 10^6$ bb/ml)

kmen	Traumacel	Okcel HL
	zóna inhibice - mm	
P1	2	2
P2	2	2
P3	3	N
P4	5	2
P5	N	N
P11	N	3
P12	N	3
S1	N	4
S3	N	3
S4	3	1
S5	N	N
S6	N	1
S7	4	2
S8	10	3
K1	5	0
K2	2	0
K4	5	0
K6	N	0
K7	N	0
K8	2	0

Vysv.: P – *Pseudomonas aeruginosa*, S – *Staphylococcus aureus*, K – *Klebsiella pneumoniae*, N - nehodnoceno

Z výsledků je patrné, že Traumacel i Okcel HL vykazovaly inhibiční účinky zejména na kmeny *S. aureus*.

Při testování účinků Okcel HL jsme u kmenů *K. pneumoniae* nezjistili žádné zóny inhibice (viz příloha 4).

Traumacel ve formě obvazu v porovnání s výrobkem Okcel HL v lintrované formě vykazoval větší antimikrobiální efekt. Testování jeho antimikrobiální aktivity bylo

problematické vzhledem ke změnám tvarů připraveného vzorku po přiložení na povrch agarových médií (viz příloha 5).

4.3.5 Karmelóza obsahující různý poměr CMC a mědi

Antibakteriální účinky vzorků karmelóz obsahujících různý poměr CMC a mědi získané suspenzní metodou jsme uvedli v tabulce XV.

Tab.XV: Výsledky účinnosti vzorků karmelóz s různým poměrem karboxymethylcelulózy a mědi zjištěné suspenzní metodou v různých časových intervalech (hustota inokula $7,5 \cdot 10^6$ bb/ml)

kmen	inkubace - hod	karmelóza 2 % CMC			karmelóza 3 % CMC			karmelóza 3,5 % CMC		
		obsah mědi - %			obsah mědi - %			obsah mědi - %		
		0,065	0,13	0,32	0,09	0,19	0,46	0,08	0,17	0,42
		obsah mědi - mg/ml			obsah mědi - mg/ml			obsah mědi - mg/ml		
		0,646	1,292	3,23	0,935	1,87	4,675	0,836	1,672	4,182
CPM/ml			CPM/ml			CPM/ml				
P12	0	nečit.	nečit.	$3,12 \cdot 10^2$	nečit.	nečit.	1	nečit.	nečit.	$6,32 \cdot 10^2$
	6	nečit.	nečit.	0	nečit.	1	0	nečit.	nečit.	0
	24	nečit.	nečit.	$0,8 \cdot 10^2$	nečit.	nečit.	0	nečit.	nečit.	$2,64 \cdot 10^2$
S6	0	nečit.	nečit.	nečit.	nečit.	nečit.	nečit.	nečit.	nečit.	nečit.
	6	nečit.	nečit.	0	nečit.	0	0	nečit.	nečit.	0
	24	nečit.	nečit.	0	nečit.	0	0	nečit.	nečit.	$0,23 \cdot 10^2$

Vysv.: P – Pseudomonas aeruginosa, S – Staphylococcus aureus, CMC – karboxymethylcelulóza, CPM – celkový počet mikrobů, nečit. - nečitelné

Zjistili jsme, že do 24 hod zcela inhibovala růst kmene S. aureus karmelóza obsahující 2 % CMC a 0,32 % (3,23 mg/ml) mědi, stejně tak i karmelóza obsahující 3 % CMC a 0,19 % (1,87 mg/ml) mědi.

Kmen Ps. aeruginosa byl již po 6 hod inkubace inhibován všemi vzorky karmelózy, ale po 24 hod inkubace došlo opět k nárůstu kolonií s výjimkou vzorku obsahujícího 3 % CMC a 0,46 % (4,675 mg/ml) mědi.

Z výsledků uvedených v tabulce je zřejmé, že nejúčinnější byla karmelóza se 3 % CMC a 0,19 % (1,87 mg/ml) mědi. Z toho vyplývá, že karmelóza s menším obsahem mědi a větším obsahem CMC může být účinnější, než karmelóza s větším obsahem mědi a menším obsahem CMC. Uvedené hodnoty svědčí o tom, že inhibiční účinky byly ovlivněny nejen obsahem mědi, ale také množstvím CMC ve vzorku.

Naše výsledky jsou v rozporu s Zeelie a McCarthy [1998], kteří uvádějí baktericidní koncentraci Cu^{2+} iontů na kmeny *Ps. aeruginosa* 0,036 mg/ml a na kmeny *S. aureus* je 0,008 mg/ml.

5. ZÁVĚR

Ověřovali jsme antibakteriální účinky biokompatibilních materiálů na bázi modifikované celulózy v textilní, lintrované a práškové formě. Dále jsme zjišťovali nejnižší účinné koncentrace betadinu a tea tree oilu. Antibakteriální účinky uvedených látek jsme testovali mikroorganismy *Ps. aeruginosa*, *S. aureus* a *K. pneumoniae*. Kmeny vykultivované z různých klinických materiálů byly rezistentní na antibiotika.

Nejnižší účinnou koncentraci betadinu jsme zjišťovali zkumavkovou diluční metodou v MHB a MPB. MIC při hustotě inokula $7,5 \cdot 10^6$ bb/ml byla v obou mediích pro všechny kmeny *Ps. aeruginosa*, *S. aureus* i *K. pneumoniae* 12,5 mg/ml. MIC betadinu při hustotě inokula $7,5 \cdot 10^3$ bb/ml byly v jednotlivých bujónech odlišné. Jejich hodnoty se pohybovaly od 3,125 do 6,25 mg/ml.

Při testování tea tree oilu jsme používali obdobné koncentrace inokula jako u betadinu. Zvolené koncentrační rozmezí 300 – 19200 $\mu\text{g/ml}$ bylo neúčinné na všechny kmeny *Ps. aeruginosa* v obou koncentracích inokula použitých ve studii. MIC tea tree oilu pro kmeny *K. pneumoniae* o hustotě inokula $7,5 \cdot 10^6$ bb/ml se pohybovala v rozmezí 2400-4800 $\mu\text{g/ml}$ a pro kmeny *S. aureus* byla 4800-19200 $\mu\text{g/ml}$. Pro kmeny *K. pneumoniae* o hustotě inokula $7,5 \cdot 10^3$ bb/ml byla hodnota MIC 1200-4800 $\mu\text{g/ml}$ a pro kmeny *S. aureus* se pohybovala v rozmezí 2400-9600 $\mu\text{g/ml}$. Výsledky potvrzují korelaci mezi koncentrací mikroorganismu a antibakteriálních látek.

HCMC v práškové formě inhibovala růst všech kmenů *Ps. aeruginosa* i *S. aureus* v koncentraci 0,06 g/ml. Z 5 kmenů *K. pneumoniae* byly do 24 hod inhibovány pouze 2 kmeny. Dobré inhibiční účinky jsme zaznamenali u HCMC v práškové formě v kombinaci s 0,25% roztokem betadinu. Tato směs potlačila růst všech kmenů již po 3 hod inkubace. Výsledky dokumentují synergické účinky HCMC a betadinu, neboť samotný betadin dostatečně neinhiboval růst kmenů ani v koncentraci 0,31 %.

Výsledky Hcel HT v textilní formě zjištěné difúzním testem prokázaly nejlepší účinky na *Ps. aeruginosa*. Hcel HT v textilní formě s betadinem byla účinná na všechny kmeny, zejména na kmeny *S. aureus*.

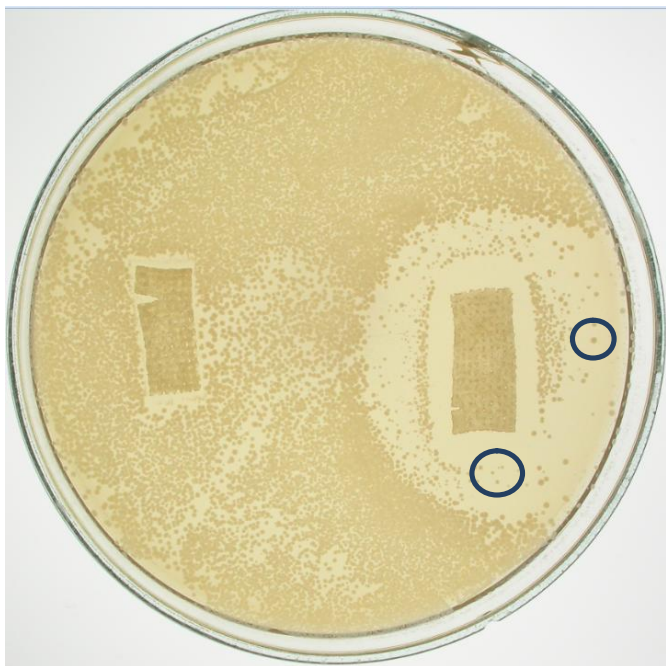
Difúzní metodou jsme prokázali, že Hcel ZnT s 1,5 %, 2,5 % a 5 % zinku nejlépe účinkovala na kmeny *S. aureus* a Hcel CuT s 1,22 % mědi na kmeny *Ps. aeruginosa*.

U Traumacelu a Okcelu HL jsme difúzním testem zjistili nejlepší účinky na kmeny *S. aureus*, přičemž Traumacel byl ve srovnání s Okcel HL efektivnější.

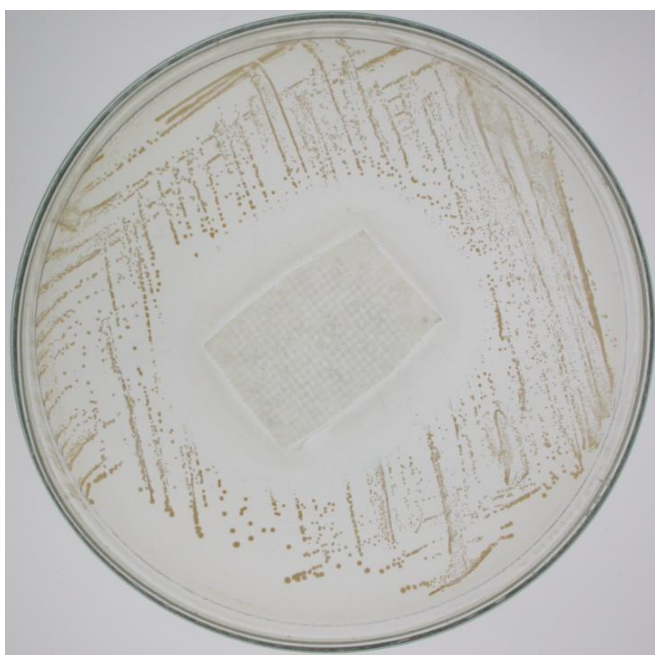
Výsledky suspenzní metody potvrdily, že kmen *S. aureus* byl do 24 hod inhibován karmelózou obsahující 2 % CMC a 0,32 % mědi i karmelózou s 3 % CMC a 0,19 % mědi. Růst kmene *Ps. aeruginosa* byl do 24 hod inhibován vzorkem karmelózy s 3 % CMC a 0,46 % mědi.

PŘÍLOHY

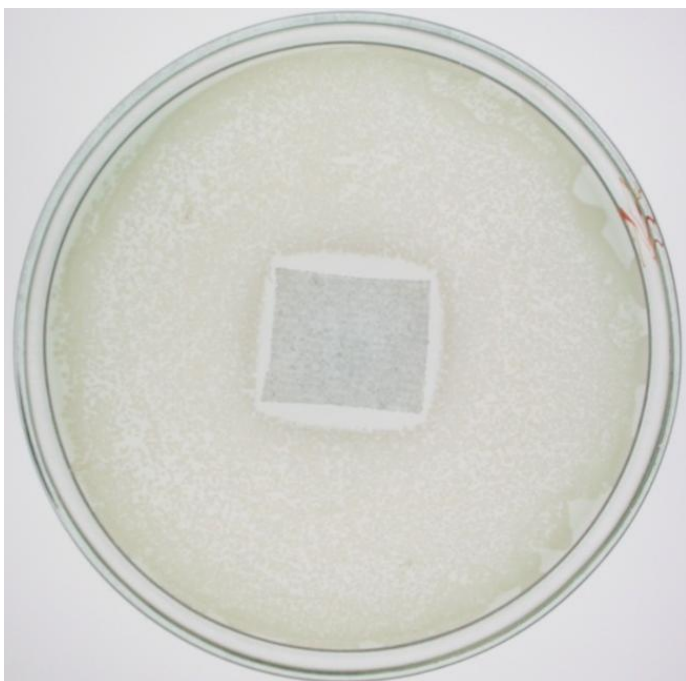
Příloha 1: Hcel HT s obsahem betadinu – 2 odlišné typy kolonií v „částečné zóně inhibice“, kmen K2



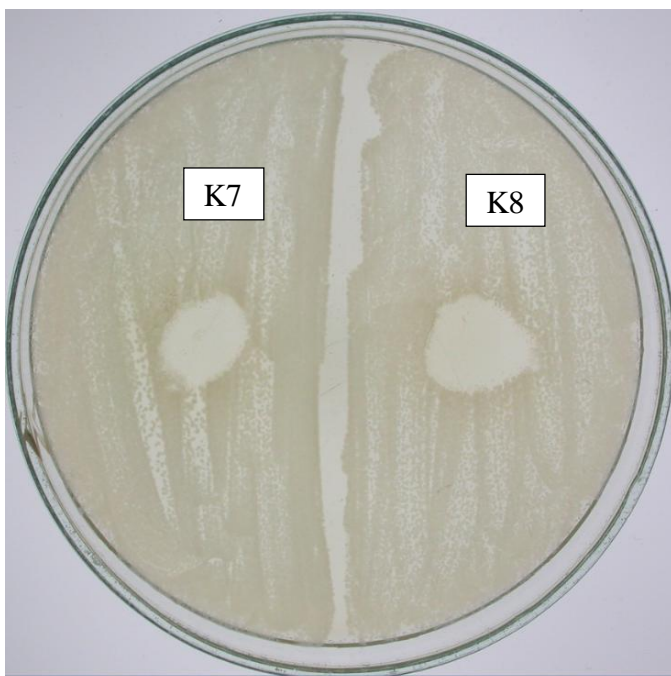
Příloha 2: Hcel ZnT s 5% obsahem zinku, kmen S8



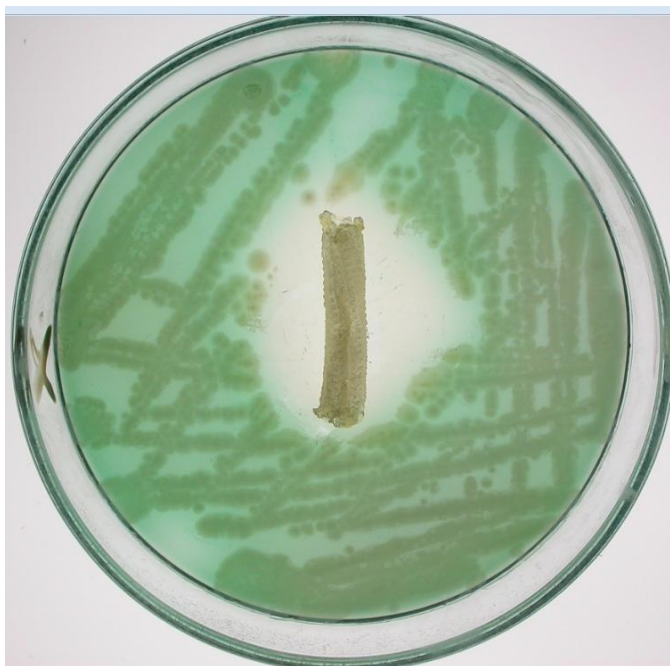
Příloha 3: Hcel CuT s 1,22% obsahem mědi, kmen P4



Příloha 4: Okcel HL v lintrované formě, kmeny K7, K8



Příloha 5: Traumacel, kmen P2



LITERATURA

AHMAD T. A., EL-SAYED L. H., HAROUN M. A., HUSSEIN A. A., ASHRY H.; Development of imunization trials against Klebsiella pneumoniae; *Vaccine*; 2011, vol. 30, no. 14; s. 2411-2420

ATMACA S., GÜL K., CÍCEK R.; The Effects of Zinc in Microbia Growth; *Journal of Medical Scinences*; 1977; vol. 28; s. 595-597.

BENEŠ J.; Taktika ATB léčby k omezení bakteriální rezistence v nemocnicích; *Sborník přednášek: Epidemiologie nozokomiálních infekcí*; 2011; s. 53-54.

BANTAR C., FAMIGLIETTI A., GOLBERG M.; Three-Year surveillance study of nosocomial bacterial resistance in Argentina; *International Journal of Infectious Diseases*; 200; vol. 4; no. 2; s. 85-90.

BEDNÁŘ M. a kol.; *Lékařská mikrobiologie*; 2009.

CARMELI Y., TROILLET N., ELIPOULOS G. M., SAMORE M. H.; Emergence of Antibiotics – Resistant Pseudomonas aeruginosa: Comparison of Risks Associated with Different Antipseudomonal Agents; *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*; 1999; vol. 43; s. 1379-1382.

CARSON C. F., COOKSON B D., FARRELLY H. D., RILEY T. V.; Citlivost metililín rezistentního Staphylococcus aureus na siličný olej z Melaleuca alternifolia; *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*; 1995; vol. 35; s. 421-424.

CARSON C. F., RILEY T. V.; Antimicrobial activity of the major components of the Essentials oil of Melaleuca alternifolia; ; *Journal of applied bakteriology*; 1995; vol. 78; no. 3; s. 264-269.

COX S. D., MANN C. M. MARHAM J. L., BELL H. C. a kol.; The mode of antimicrobial action of Essentials oil of Malaleuca alternifolia (tea tree oil); *Journal of Applied Microbiology*; 2000; vol. 88; s. 170-175.

CITRONE D. M., OSTROVARI M. I., KARLSSON A., ELLIE J. C., GOLDSTEIN R. M.; Evaluation of the E Test for Susceptibility Testing of Anaerobic Bacteria; *Journal of Clinical Microbiology*; 1991; vol. 29; no. 10; s. 2197-2203.

ČERMÁKOVÁ J.; Nozokomiální nákazy; *ZDN*; říjen 2009.

FERGUSON A. W., SCOTT J. A., McGAVIGAN J., ELTON R. A. a kol.; Comparison of 5 % povidle-iodine solution against 1 % povidle-iodine solution in preoperative cataract surgery antisepsis: a prospective randomised double blind study; *Br J Ophthalmol*; 2003; vol. 87; s. 163-167.

GALANI I., KONTOPIDOU F., SOULI M., REKATSINA P. D. a kol.; Colistin susceptibility testing by E test and disk diffusion methods; *International Journal of antimicrobial agents*; 2008; vol. 31; no. 5; s. 434-439.

GREENWOOD D., SLACK R. C. B., PENTHERER J. F.; *Lékařská mikrobiologie, Přehled infekčních onemocnění*; 1999.

GROFOVÁ Z.; Biologie rány; *ČES GER REV*; 2006; vol. 4; s. 157-162.

HADA T., FURUSE S., MATSUMOTO Y., HAMASHIMA M. a kol.; Comparison of the effects in vitro of tea tree oil and plaunotol on methicillin-susceptible and methicillin-resistant strains of *Staphylococcus aureus*; *Microbios*; 2001; vol. 106; no. 2; s. 133-141.

HALLMANN G.; Treatment of burns with zinc tape; *Scandinavian Journal of Plastic and Reconstructive Surgery*; 1977; vol. 11; s. 155-161.

HEDBERG M., MILLER J. K.; Effectiveness of Acetic acid, Betadine, Amphyll, Polymyxin B, kolistin a nd Gentamycin against *Ps. aeruginosa*; *American Society for Microbiology*; 1969; vol. 18; no. 5; s. 854-855.

JEDLIČKOVÁ A.; Nozokomiální infekce ve stáří; *ČES GER REV*; 2005; s. 44-50.

KARLOVÁ J., ČÍŽKOVÁ B.; Moderní hojení ran v 21. století; *Lékařské listy* 18; 2010.

KAUFFMAN C. A., TERPENNING M. S., XIAOGONG HE, ZARINS T. a kol.; Attempts to eradicate methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from a long-term-care facility with the use of mupirocin ointment; *American journal of Medicine*; 1993; vol. 94; s. 371-378.

KRAMER A.; Effekt of povidone – iodine on wound healing; *Journal of Vascular Nursing*; 1999; vol. 17; s. 17-23.

- LIPOVÝ B., ŘÍHOVÁ H., HANSLIANOVÁ M., GREGOROVÁ N. a kol.; Kolistin v léčbě multirezistentních kmenů *Ps. aeruginosa* u těžce popálených pacientů; *Epidemiologie, mikrobiologie, imunologie*; 2010; vol. 59; s. 183-188.
- MAĐAR R., PODSTATOVÁ, ŘEHOŘOVÁ J.; *Prevence nozokomiálních nákaz v klinické praxi*; 2006; Grada; s. 66.
- PODSTATOVÁ R., MAĐAR R.; Jak sestavit dezinfekční program; *ZDN – Sestra*; 2009.
- SPÍŠEK; Rezistence na antibiotika – Je třeba hledat nové látky a nové postupy; *Vesmír* 78; 1999
- SANDSTEAD H. H., LANIER V. C., SHEPHARD G. H., GILLESPIE D. D. a kol.; Zinc and wound healing: effects of zinc deficiency and zinc supplementation; *American Journal of Clinical Nutrition*; 1970; vol. 32; s. 514-519.
- SOKOVIC M.; Chemical composition and antibacterial activity of Essentials oils of ten aromatic plants against human pathogenic bacteria; *Food*; 2007. Dostupný z: http://www.baltikjunior.com/origano_doc/sinisa_stankovic_1.pdf.
- STÁDNÍKOVÁ M.; Nozokomiální nákazy na OCHRIP; *ZD*; červenec 2010.
- ŠLITROVÁ B.; *Srovnání biocidní účinnosti dezinfekčních přípravků proti biofilmu*, Vysoké učení technické v Brně; 2010
- UYGUR F., ÖZYURT M., EVINC R., HOSBUL T. a kol.; Comparison of octenidine dihydrochloride (Octenisept®), polihexanide (Prontosan®) and povidon iodine (Betadine®) for topical antibacterial effects in *Pseudomonas aeruginosa*-contaminated, full-skin thickness burn wounds in rats; *Central European Journal of Medicin*; 2008; vol. 3; s. 417-421.
- URBÁŠKOVÁ P., HRABÁK J., ŽEMLIČKOVÁ H.; Antibiotická rezistence bakterií - Hrozba selhání léčby neustále sílí; *Medical Tribune*; 2012; vol. 2.
- VOET D., VOETOVÁ J.; *Biochemie*; Victoria Publishing; 1995.
- VOTAVA M.; *Lékařská mikrobiologie obecná*; 2011; Neptun.
- VOTAVA M. a kol.; *Lékařská mikrobiologie: Vyšetřovací metody*; 2010.

VYTRÁSOVÁ J., BÍLKOVÁ Z.; *Laboratorní cvičení z obecné mikrobiologie*; Univerzita Pardubice; 1998.

VYTRÁSOVÁ J., MAZUROVÁ J.; *Mikrobiologická kontrola v klinické a technické praxi*, Univerzita Pardubice, 1994, s. 163

VYTRÁSOVÁ J., TYLŠOVÁ A., BROŽKOVÁ I., ČERVENKA L., PEJCHALOVÁ M., HAVELKA P.; Antimicrobial effect of oxidized cellulose salts; *J Ind Microbiol Biotechnol*; 2008; vol. 35; s. 1247-1252.

ZEELIE J., McCARTHY T. J.; Effect of copper and zinc ions on the germicidal properties of two popular pharmaceutical antiseptic agents cetylpyridinium chloride and povidone iodine; *Analyst*; 1998; vol. 123; s. 503-507.

Dostupné z:

<http://www.reuters.com/article/2011/07/01/copper-antimicrobial-idUSN1E7600JD20110701>

<http://ose.zshk.cz/vyuka/terapie.aspx?tid=87>

<http://www.synthesia.eu/>

<http://kompres.sk/teca.pdf>

Převzato z:

[Informace o produktech Hcel od firmy Holzbecher, spol. s.r.o.]