

Univerzita Pardubice

Fakulta chemicko-technologická

Suplementy pro pozitivní ovlivnění lidského mikrobiomu

Bc. Nikola Voltnerová

Diplomová práce

2018

Univerzita Pardubice  
Fakulta chemicko-technologická  
Akademický rok: 2017/2018

## ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Nikola Voltnerová**  
Osobní číslo: **C16468**  
Studijní program: **N3912 Speciální chemicko-biologické obory**  
Studijní obor: **Bioanalytik**  
Název tématu: **Suplementy pro pozitivní ovlivnění lidského mikrobiomu**  
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 :

#### Teoretická část:

Vypracujte literární rešerši na téma lidský mikrobiom.

Charakterizujte látky na bázi kyseliny monolaurové a jejích derivátů ve vztahu k jejich biologické aktivitě.

Popište mikrobiologické metody hodnocení kosmetických výrobků, zejména ČSN EN ISO 11930 - Hodnocení antimikrobiální ochrany kosmetického výrobku.

#### Experimentální část:

U testovaných látek proveďte mikrobiologické hodnocení účinků, dosažené kriticky zhodnoťte v diskusi.

Rozsah grafických prací: **dle potřeby**

Rozsah pracovní zprávy:

Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**

Seznam odborné literatury:

**Podle pokynů vedoucího diplomové práce.**

Vedoucí diplomové práce:

**Ing. Marcela Pejchalová, Ph.D.**

Katedra biologických a biochemických věd

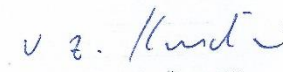
Datum zadání diplomové práce: **18. prosince 2017**

Termín odevzdání diplomové práce: **11. května 2018**



prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.  
děkan

L.S.



prof. Ing. Alexander Čegan, CSc.  
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 28. února 2018

## **Prohlášení**

Prohlašuji:

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

Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na 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 jejich skutečné výše.

Souhlasím s prezenčním zpřístupněním své práce v Univerzitní knihovně.

V Pardubicích dne: 30. 4. 2018

.....

Nikola Voltnerová

## **Poděkování**

Tímto bych chtěla poděkovat za cenné rady, věnovaný čas, trpělivost a vstřícnost vedoucí mé diplomové práce, paní Ing. Marcele Pejchalové, Ph.D. a všem pracovníkům, kteří se podílejí na chodu mikrobiologických laboratoří. V neposlední řadě bych chtěla poděkovat firmě K2 Pharm s. r. o. za poskytnuté vzorky a spolupráci.

Dále bych chtěla poděkovat mé rodině a blízkým, kteří mě po celou dobu studia podporovali a měli se mnou drahocennou trpělivost.

## **ANOTACE**

Diplomová práce se zabývá testováním suplementů na bázi kyseliny laurové a jejich derivátů, u kterých se předpokládá potencionální pozitivní vliv na lidský mikrobiom. Nejvýznamnějším derivátem kyseliny laurové je glycerol monolaurát. Teoretická část je zaměřena na poznatky týkající se mikrobiomu člověka, dále na charakterizaci a využití glycerol monolaurátu a představení metod, které byly využity k mikrobiologickým stanovením. Praktická část diplomové práce je zaměřena na jednotlivé metody mikrobiologických zkoušek. Náplní práce bylo jednak hodnocení antimikrobiální ochrany kosmetických výrobků dle normy ČSN EN ISO 11930 a také stanovení minimální inhibiční koncentrace látek na bázi kyseliny laurové a jejich derivátů na vybrané skupiny mikroorganismů.

## **KLÍČOVÁ SLOVA**

lidský mikrobiom, patogenní mikroorganismy, glycerol monolaurát, antimikrobiální ochrana, minimální inhibiční koncentrace

## **TITLE**

Supplements for positive effects on the human microbiome

## **ANNOTATION**

This diploma thesis deals with the testing of lauric acid supplements and their derivatives, which are expected to have a positive effect on the human microbiome. The most important derivative of lauric acid is glycerol monolaurate. The theoretical part concentrates on the knowledge about human microbiome, characterization and utilization of glycerol monolaurate and introduction of methods used for microbiological determination. The practical part of the diploma thesis is focused on individual methods of microbiological testing. The aim of work was to evaluate the antimicrobial protection of cosmetic products according to ČSN EN ISO 11930 as well as to determine the minimum inhibitory concentration of lauric acid substances and their derivatives on selected groups of microorganisms.

## **KEY WORDS**

human microbiome, pathogenic microorganisms, glycerole monolaurate, antimicrobial protection, minimum inhibitory concentration

# OBSAH

ÚVOD .....	14
<b>1 TEORETICKÁ ČÁST.....</b>	<b>15</b>
<b>1.1 Lidský mikrobiom.....</b>	<b>15</b>
1.1.1 Mikrobiom úst.....	16
1.1.2 Mikrobiom střeva.....	17
1.1.3 Mikrobiom ženské vagíny .....	18
1.1.4 Mikrobiom kůže.....	19
<b>1.2 Testované mikroorganismy a jejich patogenita pro člověka .....</b>	<b>21</b>
1.2.1 <i>Staphylococcus aureus</i> .....	22
1.2.1.1 Onemocnění kůže a měkkých tkání .....	22
1.2.1.2 Onemocnění srdce.....	23
1.2.1.3 Onemocnění kostí .....	23
1.2.1.4 Onemocnění dýchacího traktu .....	23
1.2.1.5 Ostatní onemocnění způsobené bakterií <i>S. aureus</i> .....	24
1.2.2 MRSA .....	24
1.2.2.1 Onemocnění způsobené bakterií MRSA.....	25
1.2.3 <i>Micrococcus luteus</i> .....	25
1.2.3.1 Onemocnění způsobené bakterií <i>M. luteus</i> .....	25
1.2.4 VRE .....	26
1.2.4.1 Onemocnění způsobené bakterií VRE .....	26
1.2.5 <i>Bacillus subtilis</i> .....	27
1.2.6 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	27
1.2.6.1 Onemocnění způsobené bakterií <i>P. aeruginosa</i> .....	28
1.2.7 <i>Escherichia coli</i> .....	28
1.2.7.1 Střevní onemocnění způsobené bakterií <i>E. coli</i> .....	29
1.2.7.2 Extraintestinální infekce způsobené bakterií <i>E. coli</i> .....	31
1.2.8 <i>Candida albicans</i> .....	31
1.2.8.1 Onemocnění způsobené kvasinkou <i>C. albicans</i> .....	32

<b>1.3</b>	<b>Suplementy na bázi glycerol monolaurátu .....</b>	<b>32</b>
1.3.1	Charakteristika monoacylglycerolů .....	33
1.3.2	Struktura glycerol monolaurátu .....	34
1.3.2.1	Kyselina laurová .....	34
1.3.2.2	Glycerol.....	35
1.3.3	Syntéza glycerol monolaurátu .....	36
1.3.3.1	Esterifikace .....	37
1.3.3.2	Transesterifikace .....	37
1.3.3.3	Glycerolýza .....	38
1.3.4	Vlastnosti a využití glycerol monolaurátu .....	38
1.3.4.1	Antimikrobiální účinky .....	39
<b>1.4</b>	<b>Mikrobiologické stanovení .....</b>	<b>41</b>
1.4.1	Hodnocení antimikrobiální ochrany kosmetického výrobku podle normy ČSN EN ISO 11930 .....	43
1.4.2	Testování citlivosti mikroorganismů .....	44
1.4.2.1	Bujónová mikrodiluční metoda.....	46
<b>2</b>	<b>EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....</b>	<b>48</b>
<b>2.1</b>	<b>Přístroje .....</b>	<b>48</b>
<b>2.2</b>	<b>Laboratorní pomůcky.....</b>	<b>49</b>
<b>2.3</b>	<b>Chemikálie.....</b>	<b>49</b>
<b>2.4</b>	<b>Kultivační média a pracovní roztoky .....</b>	<b>49</b>
<b>2.5</b>	<b>Reagencie k biochemickým a morfologickým testům .....</b>	<b>53</b>
<b>2.6</b>	<b>Použité mikroorganismy .....</b>	<b>54</b>
<b>2.7</b>	<b>Hodnocení antimikrobiální ochrany kosmetického výrobku .....</b>	<b>54</b>
2.7.1	Testované vzorky .....	54
2.7.2	Použité živné půdy, roztoky a chemikálie .....	55
2.7.3	Testované mikroorganismy.....	55
2.7.4	Pracovní postup.....	55



<b>2.8 Stanovení minimální inhibiční koncentrace testovaných látek .....</b>	<b>59</b>
2.8.1 Testované vzorky .....	59
2.8.2 Použité živné půdy, roztoky a chemikálie .....	59
2.8.3 Testované mikroorganismy.....	59
2.8.4 Pracovní postup.....	60
<b>2.9 Dodatečné morfologické a biochemické testy.....</b>	<b>63</b>
<b>3 VÝSLEDKY A DISKUSE .....</b>	<b>65</b>
<b>3.1 Hodnocení antimikrobiální ochrany kosmetického výrobku .....</b>	<b>66</b>
3.1.1 Identifikace původce kontaminace .....	73
<b>3.2 Stanovení minimální inhibiční koncentrace .....</b>	<b>76</b>
<b>4 ZÁVĚR .....</b>	<b>81</b>
<b>5 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....</b>	<b>82</b>
<b>6 PŘÍLOHY.....</b>	<b>92</b>

## SEZNAM ILUSTACÍ A TABULEK

<b>Obrázek 1</b> Diverzita lidského mikrobiomu .....	16
<b>Obrázek 2</b> Cyklus kontaminace STEC .....	31
<b>Obrázek 3</b> Chemická struktura 1-monoacylglycerolu .....	33
<b>Obrázek 4</b> Strukturní vzorec glycerol monolaurátu .....	34
<b>Obrázek 5</b> Obecná rovnice esterifikace .....	37
<b>Obrázek 6</b> Obecná rovnice transesterifikace .....	37
<b>Obrázek 7</b> Obecná rovnice glycerolýzy .....	38
<b>Obrázek 8</b> Počítadlo kolonií. ....	44
<b>Obrázek 9</b> Bujónová makrodiluční metoda .....	45
<b>Obrázek 10</b> Mikrotitrační destička .....	46
<b>Obrázek 11</b> Schéma mikrotitrační destičky .....	47
<b>Obrázek 12</b> Schéma zátěžového testu .....	57
<b>Obrázek 13</b> Podrobné schéma mikrotitrační destičky .....	62
<b>Obrázek 14</b> Kontaminace vzorků s inokulem <i>E. coli</i> 7. den odečtu.....	69
<b>Obrázek 15</b> Kontaminace vzorků s inokulem <i>E. coli</i> 14. den odečtu.....	69
<b>Obrázek 16</b> Kontaminace vzorků s inokulem <i>E. coli</i> 28. den odečtu.....	70
<b>Obrázek 17</b> Kontaminace vzorku s inokulem <i>C. albicans</i> 7. den odečtu.....	71
<b>Obrázek 18</b> Kontaminace na Sabouradově půdách (30 °C, 48 h) s odlišným charakterem základu .....	72
<b>Obrázek 19</b> Izolát 1 z kontaminovaných vzorků na půdě MPA (37 °C, 24h).....	74
<b>Obrázek 20</b> Izolát 2 z kontaminovaných vzorků na půdě MPA (37 °C, 24h).....	75
<b>Obrázek 21</b> Izolát 3 z kontaminovaných vzorků na půdě MPA (37 °C, 24h).....	75
<b>Tabulka 1</b> Přehled testovaných mikroorganismů .....	21
<b>Tabulka 2</b> Hodnotící kritéria pro bakterie dle ČSN EN ISO 11930.....	58
<b>Tabulka 3</b> Hodnotící kritéria pro <i>C. albicans</i> dle ČSN EN ISO 11930 .....	58
<b>Tabulka 4</b> Ředění zásobních roztoků .....	60

## SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK

- AMP** – antimikrobiální peptidy
- ATP** – adenosintrifosfát
- BHI** – mozko-srdcová infúze
- CAP** – komunitní pneumonie
- CCM**– Česká sbírka mikroorganismů
- CFU** – jednotky tvořící kolonie
- CLSI** – Institut pro klinické a laboratorní standardy
- DAEC** – difúzně agregativní *Escherichia coli*
- DHA** – dokosahexaenová kyselina
- DNA** – deoxyribonukleová kyselina
- EAEC** – enteroadherující *Escherichia coli*
- EDTA** – ethylendiamintetraoctová kyselina
- EUCAST** – Evropský výbor pro testování antimikrobiální citlivosti
- EIEC** – enteroinvazivní *Escherichia coli*
- ELISA** – enzymově spojený imunosorbentní test
- EPA** – eikosapentaenová kyselina
- EPEC** – enteropatogenní *Escherichia coli*
- ETEC** – enterotoxigenní *Escherichia coli*
- FDA** – Úřad pro kontrolu potravin a léčiv
- FID** – Mezinárodní farmaceutická federace
- FNHK** – Fakultní nemocnice Hradec Králové
- GLP-1** – glukagon-like peptid-1
- GML** – glycerol monolaurát
- GMP** – Správná výrobní praxe
- GRAS** – Všeobecně považovaný za bezpečný
- HAP** – nosokomiální pneumonie
- HCAP** – pneumonie vázané na zdravotnickou péči
- HIV** – virus lidské imunitní nedostatečnosti
- HMP** – Projekt lidského mikrobiomu
- ITS** – vnitřní transkribovaný spacer
- MAG** – monoacylglycerol
- mecA** – gen zodpovědný za rezistenci *S. aureus* vůči meticilinu

**MetaHIC** – Metagenomika lidského střevního traktu  
**MIC** – minimální inhibiční koncentrace  
**MO** – mikroorganismus  
**MPA** – masopeptonový agar  
**MRSA** – meticilin rezistentní *Staphylococcus aureus*  
**NIH** – Národní institut zdraví  
**NK** – negativní kontrola  
**PBP2a** – penicilin-vázající protein  
**PCR** – polymerázová řetězcová reakce  
**PK** – pozitivní kontrola  
**QIDP** – Kvantifikovaný produkt infekční nemoci  
**RNA** – ribonukleová kyselina  
**rRNA** – ribozomální ribonukleová kyselina  
**ŘR** – ředící roztok  
**SMEDS** – samo-emulgující systém  
**SSCmec** – stafylokoková chromozomová kazeta *mec*  
**STEC** – shigatoxigenní *Escherichia coli*  
**TLC** – chromatografie na tenké vrstvě  
**TLR** – receptor podobný genu Toll  
**TSS** – syndrom toxického šoku  
**TSST-1** – toxin syndromu toxického šoku  
**UPEC** – uropatogenní *Escherichia coli*  
**vanA** – gen pro vankomycin A rezistentní protein  
**VAP** – ventilátorové pneumonie  
**VRE** – vankomycin rezistentní *Enterococcus*  
**VRSA** – vankomycin rezistentní *Staphylococcus aureus*  
**VTEC** – verotoxigenní *Escherichia coli*  
**WHO** – Světová zdravotnická organizace

## TERMINOLOGIE

**Celulitida** – zánět podkožního vaziva (*Velký lékařský slovník*, 2018).

**Dysurie** – močení doprovázené bolestí (*Slovník cizích slov*, 2000).

**Endokarditida** – zánět chlopní a nitroblány srdeční (*Velký lékařský slovník*, 2018).

**Epididymoorchitida** – zánět varlete a nadvarlete zároveň (*Slovník cizích slov*, 2000).

**Epidurální** – uložený mezi tvrdou plenou a kostí člověka (*Slovník cizích slov*, 2000).

**Halotolerantní** – organismy, které jsou schopny snášet prostředí s vyšší koncentrací soli (*Velký lékařský slovník*, 2018).

**Impetigo** – hnisavé kožní onemocnění pyodermie, za které zodpovídají stafylokoky nebo streptokoky; nejčastěji postihuje děti (*Velký lékařský slovník*, 2018).

**Intrakraniální** – nitrolební (*Slovník cizích slov*, 2000).

**Komenzalismus** – soužití dvou nebo více druhů organismů, z nichž jeden žije na těle nebo ve společenstvu hostitele, nicméně mu neškodí (*Slovník cizích slov*, 2000).

**Langerhansovy buňky** – buňky, které na svém povrchu prezentují antigen APC při imunitních dějích v organismu (*Velký lékařský slovník*, 2018).

**Mutualismus** – způsob soužití dvou odlišných druhů organismů, které jsou na sobě plně závislí a mají ze společného soužití oba prospěch (*Slovník cizích slov*, 2000).

**Nefropatie** – obecně onemocnění ledvin (*Slovník cizích slov*, 2000).

**Nekrotizující fasciitida** – závažná forma zánětu podkožních tkání, která vede k rozpadu tkání (*Velký lékařský slovník*, 2018).

**Porfyrin** – cyklická tetrapyrrolová sloučenina, která obsahuje konjugovaný systém vazeb (*Velký lékařský slovník*, 2018).

**Pyomyozitida** – hnisavý zánět svalstva (*Velký lékařský slovník*, 2018).

**Pyonefritida** – hnisavý zánět ledvin (*Slovník cizích slov*, 2000).

**Sfingosin** – aminoalkohol s dlouhým řetězcem bez aromatického cyklu (*Velký lékařský slovník*, 2018).

**Spinální** – páteřní, míšní (*Velký lékařský slovník*, 2018).

**Toll-like receptory** – buněčné receptory, které jsou schopny rozeznávat charakteristické bakteriální antigeny (*Velký lékařský slovník*, 2018).

## ÚVOD

Mikrobiom člověka je tvořen markantním množstvím patogenních a nepatogenních mikroorganismů, jejichž počet, variabilita a lokalizace se během našeho života dynamicky mění. Mezi faktory ovlivňující míru zastoupení jednotlivých mikroorganismů na povrchu či uvnitř lidského těla, bezpochyby patří zdravotní stav jedince, věk, rasa a samozřejmě podmínky vnějšího prostředí. Hlavní úkol organismu tak spočívá v udržování všech obranných mechanismů našeho těla v rovnováze, a vyhnout se tak nežádoucí dysbióze, která může mít za následek propuknutí mikrobiálních onemocnění. Dojde-li k selhání imunitního dozoru člověka a lidské tělo není schopno si s patogenem samo poradit, tak je v takových případech potřeba přistoupit k medikamentózní léčbě.

Nejčastějším léčebným preparátem proti bakteriálním a mykotickým onemocněním se od 20. století stala nejrůznější antibiotika. Z prvopočátku způsobil objev antibiotik nadšení, neboť jeho užívání dokázalo snížit v populaci mortalitu. Postupem času a se zvýšením jejich užívání se u množství bakterií a hub vůči těmto preparátům vyvinula rezistence, a v některých případech dokonce multirezistence. Z tohoto důvodu se dostala do popředí snaha vymyslet a následně vyprodukovat nové medikamenty, které by dokázaly plně zastoupit antibiotika a jejich účinek v počátcích objevu. Právě takovými potencionálními látkami, u nichž byl prokázán antimikrobiální účinek, se jeví glycerol monolauráty. Jedná se o látky ze skupiny monoacylglycerolů, které mají přírodní charakter, a proto jsou pro naše tělo dobrou volbou. Glycerol monolauráty mají široké uplatnění v potravinářském, farmaceutickém a kosmetickém průmyslu. Využívají se jako konzervační látky, emulgátory, surfaktanty, popřípadě jako doplňky stravy.

Podstata diplomové práce spočívala v otestování jednotlivých vzorků s potencionálním nebo prokázaným antimikrobiálním účinkem, tak aby na základě dosažených výsledků mohly být upraveny fyzikální, chemické či biologické vlastnosti těchto látek a docílilo se tak většího účinku. Pro samotné mikrobiologické stanovení byly vybrány dvě metody. Hodnocení antimikrobiální ochrany kosmetického výrobku dle normy ČSN EN ISO 11930 z roku 2012, je zátěžový test a slouží k testování účinnosti konzervace daných látek. Druhá metoda, která byla aplikována pro jednotlivé vzorky, je zaměřena na testování citlivosti mikroorganismů, neboli stanovení minimální inhibiční koncentrace.

# 1 TEORETICKÁ ČÁST

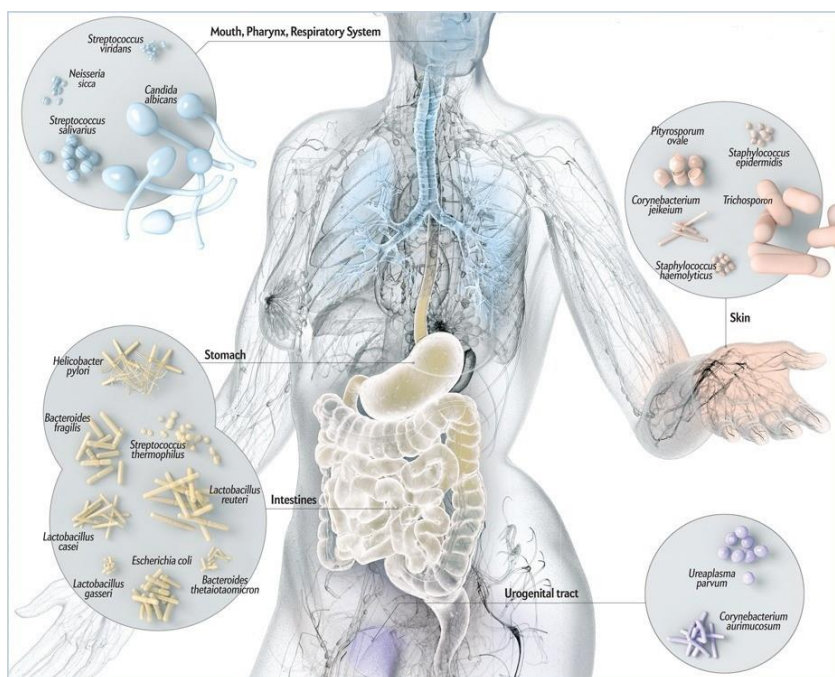
## 1.1 Lidský mikrobiom

Tělo člověka je osídleno řadou mikroorganismů (nepatogenních i patogenních), které dohromady tvoří celek zvaný mikrobiom (Li *et al.*, 2012). Původ mikrobiot, jenž toto společenství tvoří, je rozmanitý a kromě bakterií sem řadíme prvoky, *Archea*, houby a viry (Vogtmann, Goedert, 2016).

Během tohoto století vzrostla snaha tyto cizorodé buňky identifikovat, zjistit jejich počet a vliv na kvalitu života člověka (Relman, 2010). Úkolem charakterizace lidského mikrobiomu si v minulé dekádě 21. století vzaly na starost programy zvané Human Microbiome Project (HMP) a Metagenomics of the Human Intestinal Tract (MetaHIC) (Kilian *et al.*, 2016). HMP vznikl jako výzkum iniciovaný National Institute of Health (NIH) ve Spojených státech amerických a projekt MetaHIC započal studii pod záštitou Evropské komise. Mapování mikrobiomu bylo uskutečněno na základě techniky sekvenování (Belizário, Napolitano, 2015). Pro bakterie byla analyzována variabilní oblast 16S rRNA a u hub proběhla analýza konzervativní oblasti genu pro 18S rRNA (diferenciace na úrovni kmenů), případně oblasti ITS (Internal Transcribed Spacer), která se pyšní velkou vnitrodruhovou variabilitou (Shukla *et al.*, 2017). Získané informace byly důkladně zpracovány a zpřístupněny prostřednictvím počítačových databází (Belizário, Napolitano, 2015).

Bylo zjištěno, že počet mikroorganismů, které se v rozmanitém množství nacházejí na povrchu či uvnitř našeho těla, značně převyšuje počet buněk vlastních, tvořících lidský genom (Li *et al.*, 2012). Udává se, že celkový počet mikrobiot je až 150krát větší než kompletní lidský genom (Qin *et al.*, 2010). Dále bylo zjištěno, že lidský mikrobiom zastává důležité a rozsáhlé funkce, jako je například rozvoj imunity, obrana proti patogenům, vstřebávání živin, či syntéza vitamínů a tuků (Amon, Sanderson 2017). Z toho vyplývá, že lidský genom lze chápat jako součást kolektivního genomu, ve kterém nalézáme symbiotickou, komenzální a patogenní mikrobiální komunitu kolonizující naše tělo. Na základě výzkumu můžeme lidský mikrobiom definovat jako dynamický komplex, který se během života jedince vyvíjí a mění. Změna nastává zejména v různorodosti, počtu a v distribuci jednotlivých mikrobiot. Zmíněná rozmanitost je nejmenší u narozeného dítěte a postupně se s věkem zvyšuje. Vrcholu dosahuje během rané dospělosti a po překročení této věkem vymezené hranice lineárně klesá.

Kromě zmíněného věku je různorodost, počet a distribuce mikrobiot ovlivňována stravou, životním prostředím a řadou dalších faktorů (Belizario, Napolitano, 2015). Distribuce jednotlivých bakterií a dalších mikroorganismů, kteří pozitivně či negativně ovlivňují chod organismu, se vlivem různého prostředí uvnitř či na povrchu našeho těla diferencuje. Z tohoto důvodu můžeme mikrobiom rozdělit na jednotlivé menší celky, ve kterých lze diverzitu pozorovat. Patří sem například mikrobiom úst, střeva, vagíny či kůže (Li *et al.*, 2012).



**Obrázek 1 Diverzita lidského mikrobiomu.** Rozdílná mikrobiota v ústech, faryngu, respiračním ústrojí, žaludku, střevěch, urogenitálním traktu a na kůži. Převzato a upraveno z: <http://multiple-sclerosis-research.blogspot.com/2013/09/the-next-science-fad-microbiome.html>.

### 1.1.1 Mikrobiom úst

Dutina ústní je tvořena bohatou a rozmanitou mikroflórou zahrnující již zmíněné mikroorganismy, tedy bakterie, viry, protozoa a řasy. Různorodost mikrobiot je dána díky rozmanitému prostředí, které zde nalzáme. V ústech byly první bakterie popsány již v 18. století. Za jejich objevitele je považován otec mikrobiologie Antoni van Leeuwenhoek. Mikroskopické pozorování prokázalo bohaté zastoupení různých druhů bakterií lokalizovaných na lidských zubech, společenství je nám dnes známo jako zubní plak (patogenní biofilm). S tímto objevem neodmyslitelně souvisela snaha tyto bakterie identifikovat (Scannapieco, 2013). V dnešní době se udává, že mikrobiom dutiny ústní je složen z více jak 700 různých druhů bakterií (Frias-Lopez, 2015). Patogeny zde vytvářejí společenství zvané biofilm, a to je nežádoucí. Vznik biofilmu spočívá v počáteční adhezi mikroorganismů na povrch hostitele a posléze v jejich množení a tvorbě scaffoldu (lešení) pro následující rozvoj mikrokolonií.



Prostředí ve zdravé dutině ústní se vyznačuje přítomností komenzálů, kterým dominuje *Phylum* Firmicutes, jenž je nadřazen rodu *Streptococcus* (Scannapieco, 2013). Kromě některých zástupců rodu *Streptococcus* se ve zdravé mikroflóře úst nacházejí i nepatogenní ústní neisserie (Liu *et al.*, 2012). Zmíněné bakterie prospívají homeostáze ústní mikroflóry takovým způsobem, že inhibují adhezi patogenů nebo produkují toxické produkty, které mají za úkol inhibovat samotný růst těchto patogenů (Scannapieco, 2013). Dále bylo prokázáno, že zdravá dutina ústní obsahuje větší množství druhů hub, než se v minulosti očekávalo. Uvádí se přítomnost více jak 75 druhů hub, a to včetně kvasinky rodu *Candida*, dále například rodu *Aspergillus* nebo rodu *Cladosporium* (Baker *et al.*, 2017).

### 1.1.2 Mikrobiom střeva

Další orgán, který se pyšní velikou mikrobiální hojností a rozličností je střevo. Mikrobiota nacházející se ve střevě mají zásadní úlohu ve fyziologickém fungování metabolismu a imunity člověka (Ong *et al.*, 2018). Jestliže se u člověka zaznamená snížená rozmanitost mikrobiot ve střevě, může to souviset s nežádoucí dysbiózou, která může mít za následek vznik nebo průběh různých onemocnění. Dysbióza označuje nerovnovážený stav mikrobiomu, kdy jsou přítomny patogenní a komenzální mikroorganismy v abnormálním zastoupení, než je tomu za fyziologického fungování daného orgánu. Jako příklad si můžeme uvést bakterii *Faecalibacterium prausnitzii* z rodu *Clostridium* (*Phylum* Firmicutes). Jedná se o komenzální bakterii, která ve střevě plní ochrannou a protizánětlivou funkci. Její snížený výskyt byl objeven u pacientů postižených Crohnovou chorobou.

Podobně jako v ostatních částech lidského těla je střevní mikrobiom ovlivňován řadou faktorů. Patří sem například genetické predispozice, dále věk, geografický původ, stravování nebo medikamentózní léčba (Belizário, Napolitano, 2015). Dále byl prokázán vliv střevních mikrobiot na centrální nervový systém a funkci mozku člověka. Propojení je spojeno s dysbalancí střevní mikroflóry, neboli počtem a složením mikroorganismů (Ong *et al.*, 2018).

Je nutné si uvědomit, že prostředí ve střevě je anaerobní, proto není možné osídlení tohoto místa aerobními patogeny. Nalezneme zde přítomny zejména dva bakteriální kmeny (*Phylum*), mající majoritní převahu. *Phylum* Firmicutes patří mezi gram-pozitivní bakterie, a dále tu byly identifikovány gram-negativní bakterie, *Phylum* Bacteroidetes. V minoritním zastoupení se ve střevě nacházejí další bakterie, jejichž výskyt je mezi jedinci variabilní. (*Phylum* Actinobacteria, Fusobacteria nebo Verrucomicrobia) (Belizário, Napolitano, 2015).

Nepatogenní střevní mikrobiota se účastní významných metabolických procesů, které by bez jejich pomoci naše tělo nedokázalo samo regulovat, popřípadě zastávají signalizační funkci. Neodmyslitelně sem patří syntéza všech vitamínů B (B<sub>1</sub> – B<sub>12</sub>) a vitamínu K (produkovan bakterií *Escherichia coli*), zpracování potravy, rozklad nestravitelných polysacharidů (škrobu, celulózy a gumy), syntéza esenciálních aminokyselin, účast na metabolismu glukózy a cholesterolu, anebo výroba metabolitů mastných kyselin s krátkým řetězcem (kyselina octová, propionová, máselná). Zmíněné esenciální aminokyseliny slouží jako zdroj energie pro bakterie vyskytující se v tlustém střevě a mohou zabezpečovat protizánětlivé účinky. (Sidhu, van der Poorten, 2017). Produkce aminokyselin s krátkým řetězcem je v anaerobních podmínkách zabezpečena bakteriemi čeledi *Lactobacillaceae* a *Clostridiaceae*. Aminokyseliny s krátkým řetězcem indikují vylučování GLP-1. (Belizário, Napolitano, 2015). Pro zabezpečení lepšího chodu střevní mikroflóry se běžně podávají probiotika. Pojmem probiotika se dle WHO rozumí živé bakterie či kvasinky, které při užívání v dostatečném množství zaručují zdraví spotřebitele. Důkazy pro účinnost těchto preparátů jsou smíšené. Nejčastěji používanými bakteriemi pro přípravu probiotik je rod *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* a *Lactococcus*, a z kvasinek to je *Saccharomyces boulardii* (Sidhu, van der Poorten, 2017).

### 1.1.3 Mikrobiom ženské vagíny

Studie prokázala, že mikrobiom vagíny se skládá z více jak 200 kmenů bakterií a dominantnost v zastoupení mají *Phylum* Firmicutes, Bacteroidetes, Actinobacteria anebo Fusobacteria. Prostředí v ženském reprodukčním orgánu má nízké pH, a to z důvodu sekrece kyseliny mléčné a peroxidu vodíku bakteriemi rodu *Lactobacillus*, které ve zdravém mikrobiomu vagíny značně převládají (Belizário, Napolitano, 2015). Role rodu *Lactobacillus* spočívá v ochraně reprodukčního ústrojí ženského pohlaví (Braundmeier *et al.*, 2015).

V roce 2002 byla od několika zdravých žen z pochvy izolována stejná bakterie *Lactobacillus iners*. Posléze byla vyřčena hypotéza, že právě tato bakterie utváří fyziologické prostředí ženské vagíny. Celkový počet identifikovaných laktobacilů se pohybuje kolem 120 druhů, ale pouhých 20 druhů se nachází ve vagíně. Kromě již zmíněného druhu *L. iners* byly u žen izolovány druhy *L. crispatus*, *L. gasseri* a *L. jensenii*. Bylo objeveno, že dominantnost zastoupení určitého druhu laktobacila souvisí s etnickým původem žen (Lamont *et al.*, 2011). Snížení počtu laktobacilů a zvýšení výskytu jiných bakterií jako je například rodu *Gardenella*, svědčí o probíhajícím patologickém procesu ve vaginálním prostředí (Macintyre *et al.*, 2017).

#### 1.1.4 Mikrobiom kůže

Kůže je největším orgánem lidského těla a je kolonizována markantním množstvím mikroorganismů. Většina mikrobiot, jež se tu vyskytují, je pro naše tělo neškodná, anebo v ideálním případě dokonce prospěšná (Belizário, Napolitano, 2015). Symbiotické spojení mezi některými mikroorganismy a tělem člověka bylo docíleno prostřednictvím dlouhého evolučního procesu (Scharschmidt, Fischbach, 2013). Primární role kůže spočívá ve vytvoření funkční fyzické bariéry, která chrání člověka před potencionálními patogeny a toxickými látkami (Grice, Segre, 2011). Mikrobiota pokožky jsou pod správou lokálního kožního imunitního systému, a proto jsou nezávislá na systémové imunitní odpovědi, která je modulována střevní mikroflórou (Belizário, Napolitano, 2015). Kůže je vyzbrojena nesčítelným množstvím mechanismů, které sledují a zabezpečují správný chod této bariéry. Nachází se tu řada buněk, které mají imunologickou funkci, patří sem Langerhansovy buňky, toll-like receptors (TLR), antimikrobiální peptidy (AMP) nebo T-lymfocyty. Úkolem těchto buněk je udržování rovnováhy mezi komenzály, s nimiž jsme v symbióze, anebo patogeny, které mohou způsobit dysbiózu systému, a tudíž zapříčinit zrod patologických dějů (Scharschmidt, Fischbach, 2013).

Rozmanitost a výskyt jednotlivých mikrobiot opět limitují faktory jako je rasa, barva pleti nebo geografický původ (Belizário, Napolitano, 2015). Uvádí se, že na každý centimetr čtverečný naší kůže spadá  $10^6$  bakterií, což odpovídá tvrzení v úvodu, že lidský genom obsahuje daleko méně buněk vlastních než cizorodých. Vzhledem k hojnému a druhově bohatému osídlení našeho povrchu těla mikroorganismy by se dalo očekávat, že je to způsobeno pro život příznivými podmínkami, které tu panují. Opak je pravdou, neboť na kůži pro bakterie převládá nehostinné prostředí, a to kvůli kyselému pH, tvorbě potu, přítomností antimikrobiálních molekul jako jsou volné mastné kyseliny, sfingosiny, oxid dusnatý, imunoglobuliny a AMP. Navzdory této skutečnosti se bakterie přizpůsobily a naučily se na kůži přežít (Scharschmidt, Fischbach, 2013). Většina mikroorganismů, vyskytujících se na pokožce, patří mezi bakterie *Phylum* Actinobacteria, Firmicutes, Bacteroidetes a Proteobacteria. Uvedené kmeny bakterií byly objeveny taktéž v dutině ústní nebo v gastrointestinálním traktu člověka. Poměr výskytu jednotlivých kmenů se se změnou lokalizace liší. Na kůži jsou hojněji zastoupeny Actinobacteria a v gastrointestinálním traktu jsou to Firmicutes a Bacteroidetes. Z Firmicutes se na kůži hojně vyskytuje rod *Staphylococcus* a z Actinobacteria rody *Corynebacterium* a *Propionibacterium*. Jednotlivé rody se liší svou lokalizací na povrchu lidského těla, neboť jim pro produktivní život vyhovují rozdílné podmínky (Grice, Segre 2011).

## **Rod *Staphylococcus***

Stafylokoky jsou gram-pozitivní halotolerantní bakterie (*Phylum Firmicutes*). Majoritně zastoupený druh z tohoto rodu je *S. epidermidis*, oproti tomu v minoritním množství zde najdeme další zástupce rodu *Staphylococcus* jako je *S. hominis*, *S. capitis* a *S. saprophyticus*. Stafylokoky jsou velice adaptabilní, o čemž svědčí jejich rozličná lokalizace. Jsou přítomny v místech s relativně vysokou vlhkostí, teplotou a pH jako je podpaží, slabiny nebo prostory mezi prsty. Též je nalezneme i v suchých částech pokožky jako jsou dlaně nebo předloktí. Z důvodu, že se jedná o bakterie s aerobním nebo fakultativně anaerobním stylem života, kolonizují povrch těla, ale i vlasové folikuly, kde je snížené množství kyslíku. Ke kolonizaci pokožky využívají řadu různých adhezínů. (Scharschmidt, Fischbach, 2013). Zdrojem dusíku je pro ně močovina přítomná v potu (Grice, Segre, 2011).

## **Rod *Corynebacterium***

Jedná se o gram-pozitivní aerobní nebo fakultativně anaerobní bakterie (*Phylum Actinobacteria*). Lokalizujeme na kůži několik zástupců tohoto rodu jako jsou *C. accolens*, *C. jeikeium*, *C. urealyticum*, *C. amycolatum*, *C. minutissimum* nebo *C. striatum*. Korynebakterie hojně kolonizují vlhká místa pokožky a také místa, kde se utváří maz, a to z důvodu, že se jedná o lipofilní bakterie. To znamená, že si nejsou schopny lipidy samy vyrobit a potřebují je přijímat z okolí, neboť je využívají jako výživu. Stejně jako stafylokoky je většina korynebakterií halotolerantní (Scharschmidt, Fischbach, 2013). Bakterie z rodu *Corynebacterium* jsou velice náročné a pomalu rostoucí mikroorganismy, proto byla jejich přítomnost na povrchu těla člověka po dlouhou dobu podhodnocena (Grice, Segre, 2011).

## **Rod *Propionibacterium***

Nejznámějším zástupcem z tohoto rodu je gram-pozitivní anaerobní bacil *P. acnes* (*Phylum Actinobacteria*). *P. acnes* společně s *P. granulosum* upřednostňuje oblasti bohaté na mazové sekrety. Afinita k místům bohatých na maz je vysvětlena větším množstvím lipáz v genomu *P. acnes*. Kožní maz je pokládán za zdroj živin. *P. avidum* se vyskytuje v blízkosti ekkrinních potních žláz (Scharschmidt, Fischbach, 2013). *P. acnes* kolonizuje zdravé póry a produkuje aminokyselin s krátkým řetězcem a thiopeptidy, které inhibují růst bakterie *Staphylococcus aureus* a *Streptococcus pyogenes* (Belizário, Napolitano, 2015). Dále je známo, že *P. acnes* produkuje velké množství porfyrinů, které se někdy využívají při léčbě akné (Scharschmidt, Fischbach, 2013).

## 1.2 Testované mikroorganismy a jejich patogenita pro člověka

Termín patogen se začal používat koncem 19. století. Definice tohoto pojmu zahrnovala všechny mikroorganismy způsobující infekce (Casadevall, Pirofski, 2014). Hlavním úkolem se tak stala snaha porozumět jejich faktorům virulence, které jednotlivé patogenní mikroorganismy využívají. A také porozumění principu, za jakých okolností se daný patogen stává nebezpečným vůči člověku. Vztah mezi hostitelem a mikroorganismem nemusí být striktně parazitismus. Kromě parazitismu rozeznáváme ještě komenzalismus, popřípadě mutualismus. Oba dva zmíněné případy by neměly u lidí způsobovat infekce, ale negativním vlivem (vliv prostředí, věk, snížení imunity) se tato rovnováha může destabilizovat a vyvolat tak propuknutí nemoci. Během uplynulých staletí byl svět zasažen několika epidemiemi nebo dokonce pandemiemi, které měly pro lidstvo fatální následky. Bylo důležité snížit počet nakažených v populaci, a to na základě podání léků nemocným, popřípadě samotné choroby eradikovat (vakcinace) (Méthot, Alizon, 2014). Řada výzkumů zaměřených na objevení efektivního způsobu vakcinace se soustředila na identifikaci a neutralizaci unikátních faktorů virulence (Casadevall, Pirofski, 2014). V dnešní době se potýkáme se závažným problémem, a tím je získaná rezistence patogenů vůči některým antibiotikům. Dokonce jsme zaznamenali rozmach tzv. multirezistence jednotlivých patogenů vůči antibiotikům. Proto je nad míru nutné věnovat se výzkumu, který by objevil nové terapeutické preparáty (Méthot, Alizon, 2014).

Tabulka 1 Přehled testovaných mikroorganismů

Mikroorganismus	Gram	Metabolismus	Patogenita vůči člověku
<i>S. aureus</i>	pozitivní	fakultativně anaerobní	ano
<b>MRSA</b>	pozitivní	fakultativně anaerobní	ano
<i>M. luteus</i>	pozitivní	aerobní	ano
<b>VRE</b>	pozitivní	fakultativně anaerobní	ano
<i>B. subtilis</i>	pozitivní	aerobní	ne
<i>P. aeruginosa</i>	negativní	aerobní	ano
<i>E. coli</i>	negativní	fakultativně anaerobní	ano
<i>C. albicans</i>	pozitivní	aerobní	ano

### 1.2.1 *Staphylococcus aureus*

*Staphylococcus aureus* (dále jen *S. aureus*) je gram-pozitivní fakultativně anaerobní kok (Swarupa *et al.*, 2018). Jedná se o jednu z nejčastějších patogenních bakterií osídlující lidské tělo. Mezi lidmi zapříčiňuje vznik běžně se vyskytujících komunitních infekčních onemocněních, a také je častým původcem nosokomiálních nákaz. Je nutné si uvědomit, že *S. aureus* nemusí být striktně jen původcem infekcí, ale můžeme ho taktéž najít na kůži nebo na povrchu sliznice, kde působí pouze jako komenzál. Nejčastějším místem pro kolonizaci je dutina nosní. Promořenost v populaci má kořeny v četném množství faktorů virulence. Jedním z nejdůležitějších faktorů virulence *S. aureus* je enzym kataláza. Peroxid vodíku je vyráběn během probíhající infekce fagocyty. Produkce katalázového enzymu je charakteristická téměř pro všechny stafylokoky s výjimkou *S. saccharolyticus* a *S. aureus subsp. anaerobius* (Laub *et al.*, 2017).

Během minulého století se stala velkým problémem získaná rezistence vůči antibiotiku zvaném penicilin. První rezistence bakterie *S. aureus* vůči penicilinu byla objevena v 40. letech 20. století, konkrétně v roce 1942. Odolnost vůči penicilinu způsobil enzym penicilináza ( $\beta$ -laktamáza). Penicilináza štěpí  $\beta$ -laktamový kruh, který je charakteristický pro  $\beta$ -laktamová antibiotika, jako je penicilin a jeho deriváty. Tato zmíněná rezistence vůči penicilinu již v 50. letech 20. století způsobila v nemocničním prostředí a v komunitách pandemie. V důsledku toho je většina bakterií druhu *S. aureus* odolná vůči penicilinu (Otto, 2012).

#### 1.2.1.1 Onemocnění kůže a měkkých tkání

Obecně patří *S. aureus* mezi časté původce infekcí kůže. U dětí způsobuje hnisavé bakteriální infekční onemocnění zvané impetigo. Projevuje se vznikem hnisavých puchýřků obvykle v oblasti kolem úst nebo na končetinách dítěte. Další možnou nemocí kůže způsobenou tímto patogenem je celulitida, která postihuje hlavně dolní končetiny, dále pak i horní končetiny, oblast břicha nebo obličeje. *S. aureus* může dále způsobovat nemoci zvané nekrotizující fasciitida nebo pyomyozitida.

Pyomyozitida se méně vyskytuje v oblastech s mírným podnebným pásmem než v pásmech tropických. V mírném podnebí primárně postihuje děti, popřípadě mladé dospělé s onemocněním HIV. Léčba infekcí kůže, které jsou způsobeny právě „zlatým“ stafylokokem, je rozličná. Léčba závisí na druhu onemocnění, jež postihnuo pokožku člověka (Tong *et al.*, 2015).

### 1.2.1.2 Onemocnění srdce

Mezi onemocnění způsobené *S. aureus* patří také infekční endokarditida (Mootz *et al.*, 2015). V industrializovaných částech světa bývá *S. aureus* považován za nejčastějšího původce tohoto onemocnění. Ohnisko pro kolonizaci a posléze infekci začíná poškozených endotelu srdce, buď řízeným zákrokem (zavedení intravaskulárního katetru nebo elektrod), anebo zánětem (degenerativní onemocnění chlopní). Léčba spočívá v podávání antibiotik po dobu nezbytně nutnou, popřípadě se přistupuje k provedení chirurgického zákroku (Tong *et al.*, 2015). Endokarditida může vstoupit i do tzv. chronické fáze (Mootz *et al.*, 2015).

### 1.2.1.3 Onemocnění kostí

*S. aureus* bývá nejčastějším původcem osteoartikulárních infekcí jako jsou osteomyelitida, infekční artritida kloubů a infekce kloubních náhrad. Osteomyelitida je charakterizována jako infekce kostí, která vede k zánětlivé destrukci kosti, nekróze kosti a k novému uspořádání kosti. Osteoartikulární infekce postihují i děti. Prevalence u pacientů dětského věku se v Evropě pohybuje mezi 7 – 22 na 100 000 osob a postihuje častěji chlapce než dívky (Tong *et al.*, 2015).

### 1.2.1.4 Onemocnění dýchacího traktu

Bakterie *S. aureus* stojí za vznikem akutní sinusitidy. Tento patogen spolu s dalšími mikroorganismy včetně *Streptococcus* spp. byl nalezen v prostředí nosohltanu a přilehlých dutinách pacientů (Pandak *et al.*, 2011). Mezi další onemocnění, které „zlatý“ stafylokok způsobuje, patří pneumonie. Rozeznáváme několik podskupin pneumonií, a to konkrétně: komunitní pneumonie (CAP), nosokomiální pneumonie (HAP), ventilátorové pneumonie (VAP). V některých zdrojích se uvádí další podskupina: pneumonie vázaná na zdravotnickou péči (HCAP). Z těchto uvedených podskupin je „zlatý“ stafylokok častou příčinou vzniku komunitních pneumonií a nosokomiálních pneumonií. Celkově *S. aureus* představoval 40 % případů spojených s pneumoniemi vázaných na zdravotnickou péči (Tong *et al.*, 2015). *S. aureus* se dále vyskytuje jako častý patogen u pacientů s cystickou fibrózou. Při diagnostikování onemocnění bývá jedním z prvních bakterií zjištěných u kojenců a dětí s touto chorobou (Goss, Muhlebach, 2011).

### 1.2.1.5 Ostatní onemocnění způsobené bakterií *S. aureus*

Epidurální abscesy patří mezi závažná onemocnění a ve spojení s bakterií *S. aureus* rozlišujeme abscesy intrakraniální a spinální. Intrakraniální epidurální absces je méně častý oproti spinálnímu epidurálnímu abscesu a bývá spojován s prodělanou operací nebo traumatem.

*S. aureus* patří mezi neobvyklé původce bakteriální meningitidy, celkově zodpovídá za 4,9 – 6,4 % z celkových případů nemoci. Onemocnění se vytvoří v důsledku hematogenního šíření z ohniska vzniklého mimo centrální imunitní systém nebo sekundárně po provedení neurochirurgického zákroku. Syndrom toxického šoku (TSS) způsobený tímto patogenem bývá často spojován s používáním vaginálních tampónů během menstruace. Za vznik infekce zodpovídá produkce exotoxinu TSST-1, jedná se o tzv. superantigen. V některých případech může TSS skončit až fatálně, tedy smrtí pacientky.

*S. aureus* ve vzácných případech způsobuje infekci močových cest. Častěji byl izolován u pacientů se zavedeným močovým katetrem. Mezi běžné příznaky infekce patří horečka, hematurie, dysurie, suprapubická bolest a psychické napětí pacienta (Tong *et al.*, 2015).

### 1.2.2 MRSA

Meticilin rezistentní *Staphylococcus aureus* (MRSA) se vlivem evoluce vyvinul z již zmíněné bakterie *S. aureus*. To znamená, že mají totožnou morfologii. Jediným, ale zásadním, rozdílem mezi nimi je získaná rezistence vůči antibiotiku zvaném meticilin.

Z genetického hlediska za rezistenci zodpovídá získání mobilních genetických elementů zvaných stafyloková chromozomová kazeta *mec* (SSC*mec*). Všechny typy SSC*mec* zahrnují gen *mecA*, kódující penicilin-vázající protein (PBP2a).

Meticilin byl vyvinut jako prostředek k léčbě infekcí způsobených *S. aureus*, jelikož byl rezistentní vůči  $\beta$ -laktamáze. Meticilin je semisyntetické antibiotikum, derivát penicilinu. Meticilin je oproti penicilinu odolný vůči  $\beta$ -laktamáze. V roce 1959 byl meticilin představen Beechamem, a už o rok později se ve Velké Británii vyskytly první případy, které evidovaly vzniklou rezistenci vůči tomuto antibiotiku. Oproti obvyklejší rezistenci na penicilin, tato rezistence zahrnuje odolnost proti celé skupině  $\beta$ -laktamovým antibiotik (cefalosporiny, karbapenemy). Od 80. let minulého století započala celosvětová pandemie, která přetrvává až do dnes. Také se v dnešní době často setkáváme s multirezistentní MRSA.



Je odolná i proti dalším antibiotikům jako jsou erythromycin, clindamycin, ciprofloxacin, tetracyclin a další. Ve vzácných případech se vyvinula rezistence i na vankomycin (Otto, 2012).

### **1.2.2.1 Onemocnění způsobené bakterií MRSA**

MRSA způsobuje řadu podobných onemocnění, které byly již zmíněny v předcházející podkapitole *S. aureus*. Rozdíl spočívá v závažnosti infekce a samotném průběhu léčby, a to kvůli zmíněné rezistenci proti některým antibiotikům. MRSA způsobuje stejně jako *S. aureus* onemocnění srdce (infekční endokarditidu) a různá onemocnění kůže (nekrotizující fasciitida, celulitida, pyomyozitida a další nemoci).

Dále je MRSA zodpovědná za onemocnění kostí (osteomyelitida, infekční artritida, infekce kloubních náhrad), onemocnění dýchacího traktu (pneumonie), epidurální abscesy, meningitidy a infekce močového ústrojí (Tong *et al.*, 2015).

Nejběžněji se MRSA spojuje s nosokomiálními onemocněními. V nemocnicích nalezneme zejména její multirezistentní zástupce. Zdrojem infekce bývají špatně sterilizované zdravotnické pomůcky, sám pacient nebo jiní pacienti, popřípadě nemocniční personál. Prioritou číslo jedna je eradikace (Otto, 2012).

### **1.2.3 *Micrococcus luteus***

*Micrococcus lutes* (*M. luteus*) je stejně jako *S. aureus* gram-pozitivní kok a je též pozitivní na produkci katalázy. Na rozdíl od „zlatého“ stafylokokka se jedná o bakterii se striktně aerobním metabolismem. Uvádí se, že existuje 10 druhů mikrokoků, přičemž v kontextu s lokalizací na lidském těle je pro nás *M. luteus* nejdůležitější. Izolace *M. luteus* z mikrobiomu člověka nemusí bezprostředně souviset se vznikajícím nebo už probíhajícím onemocněním. Neboť u zdravého jedince tvoří součást normální mikroflóry.

Dále ho můžeme objevit v přírodě, ve vzduchu, půdě, vodě nebo v potravinách (Dib *et al.*, 2013).

#### **1.2.3.1 Onemocnění způsobené bakterií *M. luteus***

Jak už bylo zmíněno *M. luteus* zřídka způsobuje infekční onemocnění. Mezi nemoci spojené s bakterií *M. luteus* patří septická artritida, meningitida, endokarditidy (Miltiados, Elisaf, 2011).

Dále může způsobovat choroby jako jsou folikulitidy, pneumonie, popřípadě bakteriémie. U imunokompromitovaných pacientů s HIV nebo jinou chorobou, která též souvisí s poklesem imunity, může *M. luteus*, jakožto nosokomiální patogen, zapříčinit dokonce smrt těchto jedinců. Kromě zmíněných infekcí byl *M. luteus* izolován z kůže pacienta trpícím kosmetickou vadou, neboli akné. Stejně jako u předchozích bakterií byla u této bakterie zjištěna rezistence vzhledem k antibiotikům, v některých případech dokonce multirezistence (Dib *et al.*, 2013).

#### **1.2.4 VRE**

Vankomycin rezistentní *Enterococcus* (VRE) patří do rodu *Enterococcus*, jedná se o gram-pozitivní fakultativně anaerobního koka (Arias, Murray, 2012). Jak už název napovídá, tento druh byl pojmenován na základě získané rezistence vůči antibiotiku zvaném vankomycin. Skupinu rezistentních enterokoků tvoří dva druhy, které pro nás mají klinický význam. Konkrétně to jsou vankomycin rezistentní *Enterococcus faecalis* a vankomycin rezistentní *Enterococcus faecium*. Doposud bylo popsáno osm fenotypových variant získané rezistence vůči glykopeptidům, kam patří právě vankomycin. Celosvětově se velice často rezistence vyskytuje u druhu *E. faecium*, kde je za získanou rezistenci zodpovědný gen *vanA*.

Jako u MRSA se jedná o celosvětový problém, který má svoje kořeny již v minulém století. V roce 2002 se hrozba infekcí zvýšila, neboť byl zjištěn první případ přenesení genu rezistence (*vanA*) na bakterii MRSA, a tak vznikl nový druh zvaný VRSA (vankomycin rezistentní *S. aureus*) (O'Driscoll, Crank, 2015).

##### **1.2.4.1 Onemocnění způsobené bakterií VRE**

VRE řadíme mezi další významné nosokomiální patogeny. V nemocničním prostředí se dokonce vyskytují a šíří jako multirezistentní bakterie (Arias, Murray, 2012). Infekce se většinou objevuje u imunosuprimovaných pacientů, kteří například v minulosti užívali větší množství antibiotik. Další případy kolonizace VRE byly zaznamenány při hematologických malignitách, po transplantacích orgánů nebo u hospitalizovaných osob v nemocnicích.

Výskyt nálezů je konkrétně vyšší u pacientů umístěných na jednotce intenzivní péče. Dále se nákaza může šířit v léčebnách pro dlouhodobě nemocné, u diabetiků nebo u pacientů s renálním selháním.

Variabilita onemocnění, za jejichž vznikem stojí VRE, je ohromná. Mezi choroby způsobené tímto rezistentním enterokokem patří bakteriémie, endokarditidy, infekce pánve, infekce kůže a ústní dutiny, infekce centrálního nervové systému, gastrointestinální infekce a urogenitální infekce.

Hlavním patogenem gastrointestinálních infekcí je rezistentní *E. faecalis*. Jakmile dojde k jeho kolonizaci v gastrointestinálního traktu, tak jeho eliminace může trvat měsíce nebo dokonce až roky. V některých případech se dekolonizace podaří pouze na přechodnou dobu (O'Driscoll, Crank, 2015). Míra úmrtí způsobené VRE je enormní a odhaduje se, že postihne kolem 70% postižených touto infekcí (Lowden *et al.*, 2014).

### **1.2.5 *Bacillus subtilis***

Poslední zmíněnou gram-pozitivní bakterií je *Bacillus subtilis* (*B. subtilis*). Jedná se o aerobní sporulující tyčinku. Význam z hlediska infekčnosti vůči člověku nemá, a proto je *B. subtilis* řazen mezi lidské nepatogenní mikroorganismy. Je považován za půdní bakterii (Giatsis *et al.*, 2016). Bacily mají uplatnění hlavně v biotechnologiích (rekombinantní proteiny), zemědělství (aktivní obrana proti patogenním houbám) a farmacii (Shafi *et al.*, 2017). Z farmakologického hlediska může být *B. subtilis* využit pro tvorbu probiotik. Po podání takto vytvořených probiotik byl prokázán zvýšený nárůst a životaschopnost prospěšných bakterií mléčného kvašení ve střevě člověka a zvířat (Earl *et al.*, 2008).

### **1.2.6 *Pseudomonas aeruginosa***

*Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) se z morfologického hlediska řadí mezi gram-negativní tyčinky a metabolismus využívá striktně aerobní. Jedná se o ubiquitární bakterii, kterou můžeme nalézt všude v životním prostředí (Moradali *et al.*, 2017). V přírodě tuto bakterie objevíme v půdě nebo ve vodním prostředí. Ve vztahu k člověku je označována jako oportunní patogen.

Je přizpůsobivá k podmínkám vnějšího prostředí, a tím se zvýšila odolnost *P. aeruginosa* proti antibiotikům (Gellatly, Hancock, 2013). Vzhledem k této zmíněné vlastnosti se ve zdravotnictví stala celosvětovým problémem, a je řazena mezi nosokomiální patogeny, u kterých se dokonce vyvinula odolnost proti širokému spektru antibiotik. Na základě této schopnosti je v dnešní době zodpovědná za zvýšené množství chronických infekcí (Moradali *et al.*, 2017).

### 1.2.6.1 Onemocnění způsobené bakterií *P. aeruginosa*

Jedná se o patogeny vyskytující se v nemocničním prostředí, a s tímto faktem souvisí i vznik většiny závažných onemocnění, za kterými stojí právě *P. aeruginosa*. Téměř všechny případy infekcí jsou spojeny s narušenou imunitní obranou. Postihuje pacienty, u kterých je identifikována neutropenie, dále jedince s těžkými popáleninami nebo cystickou fibrózou. Terapeutické možnosti nejsou postačující a z tohoto důvodu jsou bakteriální infekce spojeny s vysokou morbiditou a mortalitou.

*P. aeruginosa* je z jedním z nejznámějších patogenů způsobující respirační infekce u hospitalizovaných osob a vzácněji stojí za vznikem respiračních infekcí šířících se v rámci komunity (souvislost se sníženou imunitou).

Rozeznáváme dva typy infekcí dýchacích cest, a to akutní a chronické. Akutním nosokomiálním pneumoniím předchází určité trauma, které je spojeno s porušením epiteliální výstelky plic v důsledku intubace nebo inhalace kouře. Chronicita postihuje osoby s nízkou imunitní odpovědí, mohou to být starší osoby nebo jedinci s cystickou fibrózou (Gellatly, Hancock, 2013). Cystická fibróza je geneticky dědičné onemocnění spojené s defektem transportního proteinu, což má za důsledek zahlenění pacienta a náchylnost k chronickým respiračním onemocněním – pneumonie způsobené *P. aeruginosa* (Winstanley *et al.*, 2016). Bakterie *P. aeruginosa* je také zodpovědná za infekci očí. Co se týče množství případů, nachází se v roli původce na předních příčkách. U novorozenců může stát za vznikem sepse (Foca *et al.*, 2000).

### 1.2.7 *Escherichia coli*

*Escherichia coli* (*E. coli*) je klasifikována jako gram-negativní, fakultativně anaerobní tyčinka z čeledi *Enterobacteriaceae* (Jang *et al.*, 2017). *E. coli* je pokládána za nejlépe studovaný mikroorganismus. Velký zájem o tuto bakterii představuje několik hlavních důvodů týkající se zdraví člověka. Prvním důvodem je jeho, již zmíněná prospěšná činnost v gastrointestinálním traktu člověka, kde působí jako komenzál. Ve druhém případě se jedná o jednoho z nejdůležitějších patogenů lidí (Vila *et al.*, 2016). Patogenita *E. coli* je podpořena rychlým množením za příznivých podmínek. Uvádí se, že generační doba u této bakterie trvá kolem 20 minut.

*E. coli* se také využívá při klonování v molekulární genetice, jako hostitelská bakterie (krátká generační doba). První sekvenace genomu *E. coli* byla provedena v roce 1997 a od té doby bylo osekvenováno více jak 4 800 genomů tohoto mikroorganismu.

Další významnou roli hraje v ekologii, kde nám jeho přítomnost ve vodním prostředí naznačuje fekální znečištění, které by v důsledku mohlo mít nepříznivý dopad na zdraví člověka (Jang *et al.*, 2017).

Stejně jako u většiny výše zmíněných gram-pozitivních bakterií se u *E. coli* vyvinula rezistence na některá antibiotika. Je odolná vůči ampicilinu a v za poslední dvě desetiletí se u této bakterie vyvinula i schopnost multirezistence. Odolnost se projevuje i vůči nově objeveným antibiotikům, mezi něž patří například fluorochinolony a cefalosporiny (rozšířené antimikrobiální spektrum) (Vila *et al.*, 2016). *E. coli* se pyšní velkým množstvím virulentních faktorů. Dle zastoupení jednotlivých faktorů virulence rozřazujeme tyto bakterie do jednotlivých skupin. Další možné rozdělení může být dle choroby, kterou zapříčinila. Rozeznáváme jednak skupiny *E. coli* způsobující průjemová onemocnění (střevní infekce) a druhou skupinu, která stojí za vznikem extraintestinálních infekcí (Jafari *et al.*, 2012).

### **1.2.7.1 Střevní onemocnění způsobené bakterií *E. coli***

*E. coli*, které zapříčiňují střevní infekce u lidí, rozdělujeme do několika následujících skupin. Patří sem enterotoxigenní *E. coli* (ETEC), enteroadherující *E. coli* (EAEC), enteropatogenní *E. coli* (EPEC), enteroinvazivní *E. coli* (EIEC), difúzně agregativní *E. coli* (DAEC). Nejvíce nebezpečná ze všech je verotoxigenní *E. coli* (VTEC). Synonymem pro VTEC je pojmenování shigatoxigenní *E. coli* (STEC), a to na základě produkce verotoxinu, neboli shiga-like toxinu (Lupindu, 2018).

ETEC je hlavním původcem cestovatelské průjmy v oblastech s nízkým hygienickým standardem a znečištěnou vodou. Předpokládá se, že několik miliard lidí, kteří navštíví chudé země, se nakazí právě cestovatelskými průjmy, uvádí se rozmezí mezi 20 – 60 %. Z tohoto procentuálního rozmezí 30 – 70 % cestovatelských průjmů vzniká v důsledku ETEC. Udává se, že projevy infekce jsou podobné jako u cholery. Za touto podobností stojí produkce termolabilního enterotoxinu ETEC, který je podobný enterotoxinu cholery (Jafari *et al.*, 2012).

EAEC způsobuje cestovatelské průjmy, je dále spojena s výskytem přetrvávajících průjmů u dětí a dospělých lidí nakažených HIV žijících ve vyspělých a rozvojových zemích světa. Rozeznáváme akutní nebo chronický průběh (trvá déle jak 14 dní).

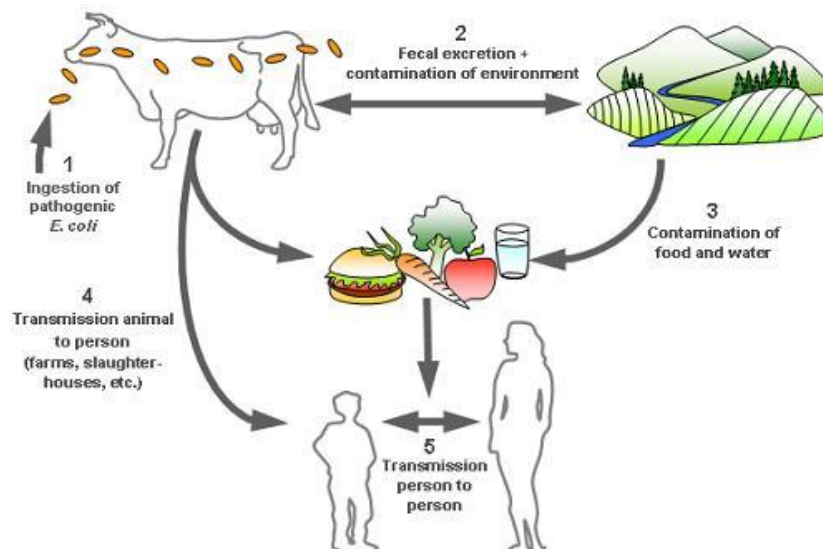
U akutního průběhu infekce se projevují příznaky jako vodnaté průjmy s/bez příměsí krve a hlenu, bolest břicha, nevolnost, zvracení a zvýšená teplota. U dětí z rozvojových zemí se často zaznamenává chronický průběh, který způsobuje jejich následnou podvýživu (Huang *et al.*, 2006).

EPEC se vyskytuje v několika sérotypech (O26, O111 a další) a způsobuje vodnaté průjmy. Rizikovou skupinou jsou děti do 2. roku života, a to hlavně v rozvojových zemích světa. Nasbírané údaje z rozvojových zemích stanovily, že u malých dětí jsou nejčastějšími původci perzistentních průjmových onemocnění (30 – 40 %) právě výše uvedené skupiny EPEC, ETEC, EAEC.

EIEC způsobuje vodnaté průjmy s výskytem krve, popřípadě hlenu. Dalším projevem je urputné nucení na stolicí. S onemocněním se setkáváme v chudých zemích s nízkým hygienickým standardem (Pasqua *et al.*, 2017).

DAEC je dalším původcem cestovatelských průjmů, a to jak v rozvinutých, tak v rozvojových zemích. Charakteristický je opět vodnatý průjem a ten může být s příměsí krve a hlenu. Nedávno bylo prokázáno, že také stojí za vznikem akutního průjmového onemocnění u novorozenců a dětí ve vyspělých částech světa.

STEC (VTEC), související se sérotypem O157:H7, je běžně označována jako enterohemoragická *E. coli* (EHEC) (Jafari *et al.*, 2012). STEC je celosvětově zodpovědná za 2 801 000 akutních onemocnění, a to v rámci jednoho roku. Incidence činí 43,1 případů na 100 000 osob/ročně. STEC O157:H7 je střevní patogen a přenos na lidi je umožněn požitím špatně opracovaného masa, hlavně hovězího. Rezervoárem nákazy je tedy zvíře a člověk se tak může nakazit skrze mléko, vodu a další živočišné produkty. Osobní kontakt může způsobit přenos nákazy orálně-fekální cestou. Infekční dávka je nízká a ke vzniku infekce stačí 4 – 24 buněk. Bakterie STEC O157:H7 způsobuje střevní i extraintestinální infekce. Příznaky jsou variabilní a patří mezi ně hemoragický průjem, hemoragická kolitida nebo hemolyticko-uremický syndrom, který je charakterizován trombocytopenií, nefropatií a hemolytickou anémií. Léčba u všech zmíněných skupin je symptomatická (rehydratace, dieta) (Lupindu, 2018).



**Obrázek 2** Cyklus kontaminace STEC. Přezvýkavec se nakazí STEC a dále může přenést kontaminaci prostřednictvím výtrusu do životního prostředí, prostřednictvím živočišných produktů z něho vyrobených, popřípadě rovnou na člověka, který o něho pečuje. Z potravin a životního prostředí se kontaminace šíří na lidi, kde může docházet k samotnému šíření infekce mezi nimi. Dostupné z: <http://www.ecl-lab.ca/en/ecoli/pathogenesis.asp>.

### 1.2.7.2 Extraintestinální infekce způsobené bakterií *E. coli*

Uropatogenní *E. coli* (UPEC) patří k nejčastějším původcům zánětu močových cest. Udává se, že je zodpovědná za 80 % těchto případů. U žen způsobuje cystitidu popřípadě pyelonefritidu, která může vést až k urosepsi (Jafari *et al.*, 2012). Nákaza UPEC může mít i asymptomatický průběh, který se pouze projeví jako bakteriurie. U mužů může UPEC stát za vznikem prostatitidy. Samotná léčba spočívá v užívání antibiotik a jako prevence se doporučuje užití preparátu na bázi laktobacilů.

Mezi další nemoci způsobené *E. coli* řadíme meningitidu, infekce kůže, myositidu, osteomyelitidu, epididymoorchitidu nebo infekci krevního řečiště, která může přejít v sepsi (Vila *et al.*, 2016). *E. coli* může být označována za původce nosokomiálních nákaz (Jafari *et al.*, 2012).

### 1.2.8 *Candida albicans*

Kvasinka *Candida albicans* (*C. albicans*) je významným lidským patogenem z říše hub, řadí se mezi askomycety. Z hlediska patogeneze má pro nás klinický význam a dále se používá jako experimentální model pro vědecký výzkum (využívá se v molekulární genetice stejně jako *E. coli*). Kvasinka může být vůči člověku úplně neškodná, a tvoří pouze součást naší běžné mikroflóry (Sellam, Whiteway, 2016). Jako komenzál se typicky vyskytuje v dutině ústní nebo gastrointestinálním traktu člověka (Costa *et al.*, 2015).

V opačném případě může být u lidí se sníženým imunologickým dohledem zodpovědná za vznik život ohrožujících infekcí. Na základě těchto informací je charakterizována jako oportunní patogen. Se zvýšeným výskytem imunokompromitovaných jedinců (HIV, chemoterapie, transplantace orgánů, vyšší užívání antibiotik) narůstá i počet případů (včetně nemocničního prostředí) spojených s infekcí způsobených kvasinkou *C. albicans*. (Sellam, Whiteway, 2016).

### **1.2.8.1 Onemocnění způsobené kvasinkou *C. albicans***

Obecné označení pro nemoci způsobené rodem *Candida*, nazýváme kandidózy (Sardi *et al.*, 2013). V majoritním množství případů kandidózy nalezneme u jedinců se sníženou imunitou. Jednak postihuje kůži lidského těla a také způsobuje vznik mukózních infekcí (orální kandidóza). Povrchy jsou kryty charakteristickým bílým povlakem a tento úkaz označujeme jako moučnivku. Dále je původcem vaginálních kvasinkových infekcí u žen, a u dětí způsobuje plenkové kandidové dermatitidy. V nejhorších případech se může situace zvrhnout a dojít tak k hematogennímu šíření infekci. Úmrtnost se pohybuje kolem 40 % (Nobile, Johnson, 2015).

## **1.3 Suplementy na bázi glycerol monolaurátu**

Glycerol monolaurát, neboli 2,3-dihydroxypropyl dodekanoát (dále jen GML) je též znám pod názvem monolaurin (Setianto *et al.*, 2017). GML lze charakterizovat jako neiontovou povrchově aktivní látku (surfaktant) ze skupiny monoacylglycerolů obsahující hydrofilní a hydrofobní skupinu současně. Jedná se o látku, která má antibakteriální, antimykotickou a antivirovou aktivitu (Nitbani *et al.*, 2015). Antimikrobiální podstata GML byla objevena v roce 1966, a velká část výzkumu byla připsána profesorovi J. J. Kabarovi, jehož první průkopnická práce se soustředila na virucidní účinky GML vůči obaleným RNA a DNA virům (Lieberman *et al.*, 2006).

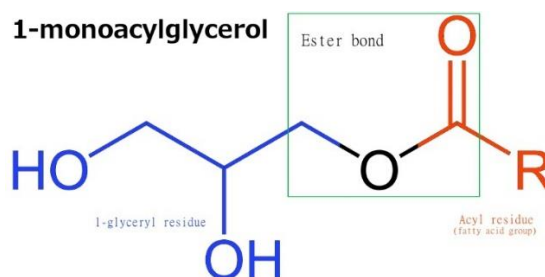
Využití GML je rozmanité a látka se běžně používá v potravinářském, farmaceutickém a kosmetickém průmyslu. Úřad pro kontrolu potravin a léčiv (FDA) tuto látku označil za všeobecně bezpečnou (GRAS). Bezpečná je pouze za předpokladu, že je užívána v doporučeném množství (dávka do 100 mg/ml) (Lin *et al.*, 2009).

Další významnou látkou ze skupiny monolaurátů, avšak v rámci diplomové práce nedůležitou, je sorbitan monolaurát. Jedná se též o neiontový surfaktant. V praxi se obvykle využívá jako emulgátor a na trhu ho nalezneme pod obchodním názvem Tween 20 (polyoxyethylen 20 sorbitan monolaurát) (Pinyaphong *et al.*, 2012).



### 1.3.1 Charakteristika monoacylglycerolů

Monoacylglyceroly (monoacylglyceridy) řadíme do skupiny lipidů obsahující jednu esterovou skupinu (-COOR) vznikající mezi mastnou kyselinou s dlouhým řetězcem a dvěma připojenými hydroxylovými skupinami (-OH) na propanovém řetězci. Jestliže je esterová skupina navázána k C1 a hydroxylové skupiny jsou navázány k C2 a C3 propanu, sloučenina se nazývá 1-monoacylglycerol. Naopak, pokud je esterová skupina připojena k C2 a dvě hydroxylové skupiny jsou navázány na C1 a C3, sloučenina se nazývá 2-monoacylglycerol.



**Obrázek 3 Chemická struktura 1-monoacylglycerolu.** Červeně je znázorněn acylový zbytek (C1), černě esterová vazba vzniklá po reakci glycerolu a mastné kyseliny a modře je znázorněn zbytek glycerolu (C2, C3). Dostupné z: <https://en.wikipedia.org/wiki/Monoglyceride>.

Je obecně známo, že hydrofilní vlastnosti monoacylglycerolů jsou dány přítomností dvou hydroxylových skupin, zatímco hydrofobocita je určena nepolární acylovou skupinou. Obě vlastnosti přispěly k širokému uplatnění monoacylglycerolů na trhu. Jelikož GML patří mezi skupinu monoacylglycerolů, je nad míru jasné, že samotné monoacylglyceroly jsou neiontové povrchově aktivní látky. Dalším charakteristickým rysem je jejich jednoduchá syntéza, neboť mohou být snadno získávány z přírodních zdrojů, a to konkrétně z rostlinných olejů nebo tuků.

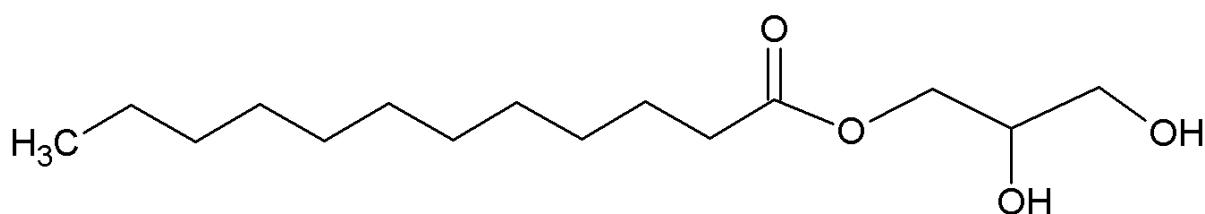
Využívají se například jako emulgátory ve farmaceutickém, potravinářském nebo kosmetickém průmyslu. Dále můžou být využity jako neiontové surfaktanty, prekurzory při syntéze lipidů (triglyceridy, diglyceridy, fosfolipidy, glykolipidy a lipoproteiny), popřípadě mohou být využity jako plastifikátory, prostředky na mazání nebo jako přísady, využívající se v textilním průmyslu.

Významnou skupinu monoacylglycerolů tvoří látky se specifickou aktivitou, jako je například monoolein. Monoolein má pro člověka blahodárné účinky a je znám jako antioxidant. Dále rozeznáváme monoacylglyceroly, jenž jsou získávány z polynenasycených mastných kyselin. Jedná se o kyselinu eikosapentaenovou (EPA) a kyselinu dokosaheptaenovou (DHA), které lze využívat jako doplňky stravy.

Další významnou látkou a pro tuto práci důležitou, je již zmíněný monolaurin. Jeho strukturu, syntézu a jednotlivé vlastnosti spojené s jeho využitím si probereme podrobněji v nadcházejících podkapitolách (Nitbani *et al.*, 2015).

### 1.3.2 Struktura glycerol monolaurátu

Z chemického hlediska je GML monoester, tvořený kyselinou laurovou (mastná kyselina) a glycerolem (alkohol). Pro laurovou kyselinu je charakteristická karboxylová skupina (-COOH) a pro glycerol, který je alkoholem, to jsou tři hydroxylové skupiny (-OH). Mezi těmito látkami vzniká esterová vazba (-COO) (viz **Obr. 4**) (Lieberman *et al.*, 2006).



Obrázek 4 Strukturální vzorec glycerol monolaurátu.

#### 1.3.2.1 Kyselina laurová

Kyselina laurová (dodekanová kyselina) patří do skupiny mastných kyselin, které lze charakterizovat jako acyklické karboxylové kyseliny (-COOH) s alifatickými řetězci různé délky. Na základě délky uhlíkového řetězce jsou mastné kyseliny děleny do třech skupin: mastné kyseliny s krátkým řetězcem (délka řetězce do 6 uhlíků), mastné kyseliny se středním řetězcem (délka řetězce od 6 do 12 uhlíků) a mastné kyseliny s dlouhým řetězcem (délka řetězce >12 uhlíků).

Bohatým zdrojem mastných kyselin jsou rostlinné oleje, patří sem kokosový, olivový a palmový olej, ořechy, semínka a oleje z nich připravené, dále kakaové máslo a živočišné tuky jako je sádlo, lůj a máslo. Mastné kyseliny jsou důležitými složkami buněčných membrán a základním zdrojem energie. Některé studie prokázaly, že mastné kyseliny se podílejí na různých signálních cestách transdukce (přenosu). Tento jev byl zaznamenán u genové transkripce, buněčného metabolismu (zánět, apoptóza) a u produkce bioaktivních lipidových mediátorů (zvýšení patofyziologické odpovědi) (Lappano *et al.*, 2017).

Kyselinu laurovou řadíme mezi nasycené mastné kyseliny se středně dlouhým řetězcem, neboť její řetězec obsahuje celkem 12 uhlíků (Boateng *et al.*, 2016). Kyselina se vyskytuje v rostlinných olejích (kokosový a palmový plej), ovoci, semínkách a mateřském mléce (Lappano *et al.*, 2017).

Udává se, že kokosový olej obsahuje velké množství mastných kyselin se středně dlouhým řetězcem (Boateng *et al.*, 2016). Majoritní zastoupení v oleji má právě kyselina laurová, která společně s dalšími látkami v něm obsažených, zodpovídá za blahodárné zdravotní účinky, které se při užívání kokosového oleje uvádějí (Lappano *et al.*, 2017). Kvůli velkému množství mastných kyselin se středním řetězcem je umožněno rychlé vstřebání těchto látek ze střeva a následný transport přímo do jater, kde se rychle využijí pro výrobu energie. Díky tomuto mechanismu se mastné kyseliny se středně dlouhým řetězcem neúčastní biosyntézy a transportu cholesterolu, což může značně přispět ke snížení počtu srdečních onemocnění a redukci obezity (Boateng *et al.*, 2016).

Mezi další pozitivní vlastnosti kyseliny, kromě již zmíněným příznivých vlivů na kardiovaskulární systém člověka, jsou její velice významné antimikrobiální vlastnosti (destrukce membrán gram-pozitivních bakterií a virů krytých lipidovou vrstvou).

Studie pod vedením Rosamaria Lappana jako první v roce 2017 publikovala vědecký článek, ve kterém zmiňují tezi, že kyselina laurová má dokonce antiproliferační a pro-apoptické účinky v boji proti rakovinným buňkám prsu a endometria. Tento výzkum a jeho poznatky by mohly značně přispět pro nový komplexnější terapeutický postup při léčbě rakoviny prsu a endometria (Lappano *et al.*, 2017).

### **1.3.2.2 Glycerol**

Glycerol je organická sloučenina se stechiometrickým vzorcem  $C_3H_8O_3$ . V literatuře se můžeme setkat i s jiným označením této chemické látky jako je glycerin, propan-1,2,3-triol, 1,2,3-propantriol, 1,2,3-trihydroxypropan anebo glycyl alkohol. Glycerol je alkohol s nízkou toxicitou, jenž se skládá z řetězce složeného ze třech uhlíků (C1, C2, C3), což odpovídá chemické sloučenině propanu a třech hydroxylových skupin navázaných v poloze 1, 2 a 3, jak nám naznačují uvedené systematické názvy. Glycerol je prakticky netoxický jak pro člověka, tak pro životní prostředí. Z hlediska fyzikálních vlastností se jedná o jasnou, bezbarvou, bez zápachu, hygroskopickou a chuťově sladkou kapalinu. Za optimálních podmínek skladování a zacházení je glycerol chemicky stabilní.

Nicméně při kontaktu se silnými oxidačními činidly jako je chlorečnan draselný ( $\text{KClO}_3$ ), se může stát explozivním (výroba výbušnin) (Tan *et al.*, 2013). Glycerol se přirozeně vyskytuje ve struktuře triacylglycerolů, které vznikají esterifikací glycerolu a třemi mastnými kyselinami. Dále glycerol vzniká jako vedlejší produkt při výrobě mýdla nebo při výrobě bionafty (García *et al.*, 2010).

Jedná se o velice významný vedlejší produkt, který našel široké uplatnění v průmyslovém odvětví (Tan *et al.*, 2013). V současné době se uvádí, že má okolo 2 000 možných aplikací (García *et al.*, 2010). Široké uplatnění glycerolu na trhu je možné díky již zmíněné netoxicitě, dále požitelnosti, a také z toho důvodu, že se jedná o biologicky odbouratelnou sloučeninu (Tan *et al.*, 2013). Využívá se především v kosmetice, farmaceutickém a potravinářském průmyslu (García *et al.*, 2010).

Je široce používán v medicíně a při výrobě léků za účelem dosažení lepšího rozpouštění léčiv ve formě tvrdých pilulek anebo zvýšení viskozity kapalných léků. Konkrétně se tohoto účinku využívá u sirupů proti kašli a k léčbě ušních infekcí. Oproti tomu funkce u pevných pilulek spočívá v dopravě účinných látek v antibiotikách (antiseptikách) na místo působení a zde k jejich vstřebávání. Dále se používá jako součást kosmetických přípravků, kde je zvlhčení žádoucí. Je součástí přípravků poskytující péči o pokožku těla a vlasy. Glycerol je také hlavní součástí zubních past, kde zabraňuje vysychání a zatuhnutí pasty v tubě. V potravinářském a nápojovém průmyslu se používá jako rozpouštědlo, sladidlo a konzervační činidlo. Při výrobě chleba, koláčů, masa, sýrů a bonbonů slouží jako změkčovadlo. V tabákovém průmyslu se využívá k zachování svěžesti tabáku a odstraňuje dráždivost chuti při kouření. Při výrobě papíru opět zastává roli změkčovadla a také maziva, v textilním průmyslu se využívá k změkčení příze a tkaniny (Tan *et al.*, 2013), popřípadě bývá součástí nemrznoucí směsi (García *et al.*, 2010).

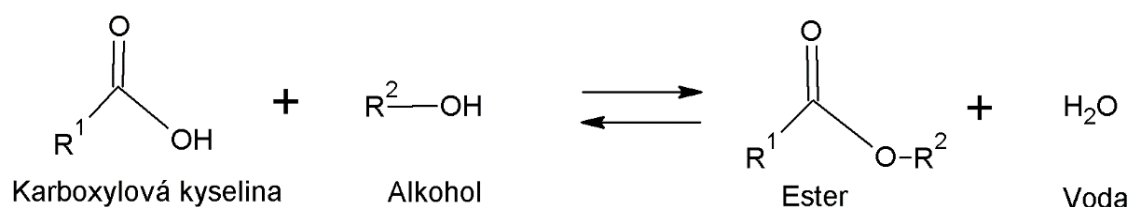
### **1.3.3 Syntéza glycerol monolaurátu**

Syntéza GML může probíhat na základě průběhu několika chemických reakcí. Konkrétně v tomto ohledu rozeznáváme esterifikaci, transesterifikaci a glycerolýzu. Jednotlivé reakce lze provádět za přítomnosti anorganického katalyzátoru nebo biokatalyzátoru (Nitbani *et al.*, 2015). Chemické reakce za využití enzymu jako katalyzátoru jsou v dnešní době hojně využívány, neboť nepředstavují rizika spojené s toxicitou některých chemikálií (Jamlus *et al.*, 2015).

### 1.3.3.1 Esterifikace

GML lze syntetizovat prostřednictvím esterifikace (viz **Obr. 5**) kyseliny laurové (karboxylová kyselina) a glycerolu (alkohol), za použití kyseliny jako katalyzátoru a v kombinaci s vhodným teplotním optimem. Volba katalyzátoru a teploty značně ovlivňuje průběh celé reakce, a tím samozřejmě výsledný produkt (Setianto *et al.*, 2017). GML lze syntetizovat i za použití biokatalyzátoru, kterým je enzym lipáza.

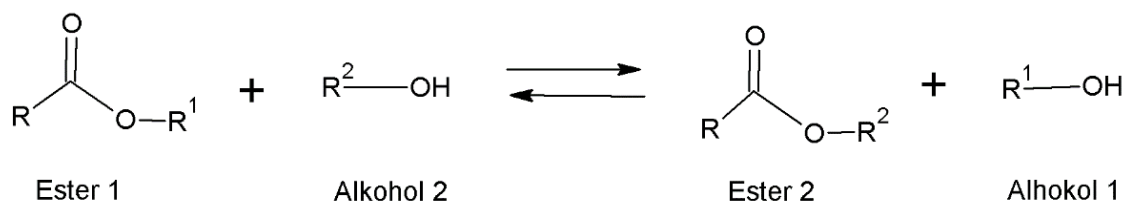
Můžeme se setkat i s optimalizací syntézy GML z kyseliny laurové a glycerolu za použití enzymatického katalyzátoru Lipozym IM-20. Při této reakci vzniká jako produkt pouze ester, nikoliv voda. Reakce přinesla uspokojivé výsledky, neboť byla prokázána vyšší výtěžnost vznikajícího produktu (Nitbani *et al.*, 2015).



**Obrázek 5** Obecná rovnice esterifikace. Karboxylová kyselina reaguje s alkoholem, za vzniku esteru a vody.

### 1.3.3.2 Transesterifikace

Další možností výroby GML je transesterifikace palmového nebo kokosového oleje (Setianto *et al.*, 2017). Transesterifikace spočívá v převedení oleje na methyl ester za přítomnosti bazického katalyzátoru, neboli převedení již existujícího esteru na jiný (viz **Obr. 6**). Lze využít i enzymaticky katalyzovanou transesterifikace, kde může být stejně jako u esterifikace použit enzym lipáza (Math, Chandrashekhara, 2016).



**Obrázek 6** Obecná rovnice transesterifikace. Reakce mezi esterem a alkoholem za vzniku jiného esteru a alkoholu.

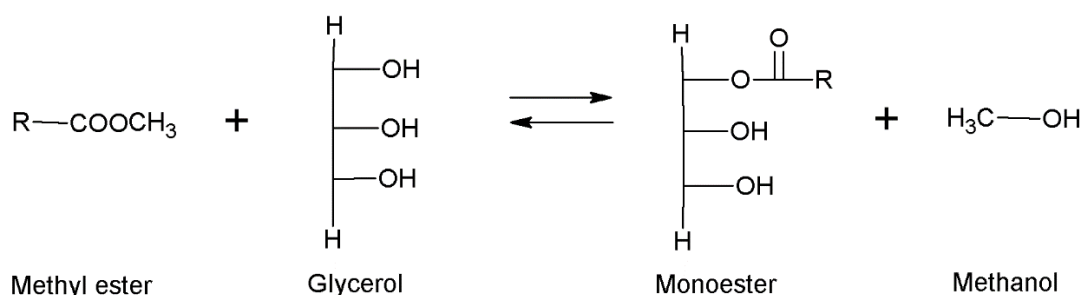
V průmyslovém měřítku se běžně využívá proces esterifikace nebo transesterifikace, za přítomnosti homogenního katalyzátoru jako je hydroxid draselný (KOH), hydrogenuhličitan sodný (NaHCO<sub>3</sub>) nebo hydroxid vápenatý (Ca(OH)<sub>2</sub>) (Setianto *et al.*, 2017).

### 1.3.3.3 Glycerolýza

Třetí metodu, kterou lze využít pro syntézu GML, je proces zvaný glycerolýza (viz **Obr. 7**). Konkrétně se jedná o glycerolýzu methyl laurátu a glycerolu za použití bazického katalyzátoru (Setianto *et al.*, 2017).

Obecně se glycerolýza monoacylglycerolů provádí za přítomnosti anorganického alkalického katalyzátoru, vysoké teploty (220 – 250 °C) a v atmosféře dusíku. Tento proces je ovšem nedostačující, neboť poskytuje výtěžnost monoacylglycerolů pouze okolo 30 – 40 % a po vizuální stránce je výsledný produkt tmavšího zabarvení. Z těchto důvodů se místo anorganických katalyzátorů používají vhodnější biokatalyzátory s vysokým katalytickým účinkem. Biokatalyzátorem může být stejně jako v předešlých případech enzym lipáza.

Prvním krokem je příprava samotných komponent, jenž se mají účastnit reakce. Patří sem purifikace surového glycerolu, který se získá z bionafty a také příprava kokosového oleje lisovaného za studena. Další potřebnou složkou k samotnému proběhnutí reakce je přítomnost biokatalyzátoru lipázy (*C. papaya*). Posledním krokem, jako už všech uvedených metod, je ověření výsledného produktu, a to například tenkovrstvou chromatografií (TLC) (Pinyaphong *et al.*, 2012).



**Obrázek 7** Obecná rovnice glycerolýzy. Methyl ester reaguje s glycerolem, za vzniku methanolu a monoesteru (monoacylglycerolu).

### 1.3.4 Vlastnosti a využití glycerol monolaurátu

Jak už předešlé kapitoly napovídají, GML má široké uplatnění na trhu, a kromě jeho antimikrobiálních vlastností, má mnoho dalších aplikací. GML je součástí deodorantů, pleťových vod a různých dalších kosmetických produktů (Zhang *et al.*, 2016). Je nutné si uvědomit základní rozdíl mezi kosmetickými přípravky a léčivy. Kosmetické produkty nemají žádné terapeutické a diagnostické účinky a slouží pouze pro udržování a změnu vzhledu, popřípadě čištění (Goossens, 2011).

Další významné využití kromě farmaceutického a kosmetického průmyslu má tato látka v potravinářském průmyslu. Používá se zde jako konzervační činidlo či emulgátor. Jedna z prvních zpráv komerčního využití GML v potravinářském průmyslu jako emulgátoru (pod obchodním názvem Lauricidin®) byla v kontextu řešení problému spojeného s kritickým výskytem plísní v margarínu (Davidson *et al.*, 2005). Dále se GML užívá jako výživový doplněk (Lieberman *et al.*, 2006).

Prostřednictvím studie GML a jeho mechanismu účinku bylo prokázáno, že potlačuje lidský imunitní systém, a proto se debatuje nad možným využitím GML jako silného imunosupresiva (Zhang *et al.*, 2016). V jiné studii byl prokázán vliv GML na stabilizaci slizničních povrchů bez redukce epitelálních buněk. Tato vlastnost by mohla mít vliv při zábraně přenosu HIV infekce u žen prostřednictvím pohlavního styku (Schlievert, Peterson, 2012).

#### **1.3.4.1 Antimikrobiální účinky**

Nejvýznamnější vlastností GML jsou právě jeho antimikrobiální účinky (Jackman *et al.*, 2016). Předpokládá se, že glycerol, jenž je součástí GML, slouží jako hydrofilní přenašeč kyseliny laurové přes bakteriální membránu, kde má kyselina antimikrobiální účinky (Hanczakowska, 2017). Významný je z důvodu vzniku již zmíněné rezistence mnoha mikroorganismů na doposud používaná antibiotika. Toto téma se stalo jedním z nejzávažnějších, co se týče lidského zdraví, neboť vývoj nových léčiv je pomalý a rozvoj rezistence velice rychlý. Částečnou zodpovědnost za vznik rezistencí proti běžným antibiotikům má jejich nadměrné užívání v lékařství, ale i v zemědělství. Dále se u řady mikroorganismů vyskytuje dokonce multirezistence, což velice zatěžuje zdravotnickou infrastrukturu. Na základě těchto faktů si musíme klást otázku, zda v budoucnu lidstvu nehrozí post-antibiotická éra. Odhaduje se, že rezistence postihuje ročně 2 miliony lidí žijících na území členských států Evropské unie.

Antibiotika jsou klíčovými sektorem farmaceutického průmyslu, o čemž svědčí vysoké roční výdaje pro jejich produkci (řádově miliardy). Aktivním vývojem a výzkumem nových léčiv se zabývá jen hrstka velkých farmaceutických společností. Kromě potíží s vědeckým výzkumem nových antibiotik souvisí i obava nízkého potenciálního zisku v důsledku konkurence nížkonákladových a nepatentovaných generických léků a také z důvodu, že se nejedná o léčiva s dlouhodobým užíváním.

Dalším faktorem, odrazujícím od vývoje nových antibiotik, jsou předpisy, za kterými stojí vládní agentury jako je Úřad pro kontrolu potravin a léčiv (FDA) Spojených států amerických. FDA si je tohoto problému vědoma, a proto vytvořila novou kategorii označenou QIDP (Qualified Infectious Disease Product). Léky s tímto označením mají kratší proces schvalování a zaručuje jim delší marketingovou exkluzivitu. Tyto benefity jsou důležité, neboť zabezpečují rychlejší dostupnost nových antibiotik pro pacienty a také přináší podstatnou finanční motivaci. Díky tomuto ústupku ze strany FDA došlo k pozitivnímu schválení několika nových antibiotik. Problém nastal v tom, že ve většině případů se pouze jednalo o deriváty již existujících antibiotik, tudíž se mechanismy účinku v mnoha případech překrývaly. Tudíž je opravdu důležité vytvořit zcela nové preparáty s odlišným mechanismus působení. V tomto ohledu se zdají perspektivní mastné kyseliny i monoacylglyceroly včetně GML (Jackman *et al.*, 2016).

### **Antibakteriální účinky**

Na základě několika výzkumů bylo prokázáno, že monoacylglyceroly prokazují větší antibakteriální aktivitu vůči některým gram-pozitivním bakteriím než samostatné mastné kyseliny. Nejvyšší účinnost látek ze skupiny monoacylglycerolů byla zaznamenána právě u GML (Hanczakowska 2017). Antibakteriální účinek GML byl konkrétně viditelný u gram-pozitivních koků (Schlievert, Peterson, 2012). Inhibiční účinek byl také zaregistrován i u několika gram-negativních bakterií (Hess *et al.*, 2014). Zvýšení aktivity GML proti gram-negativním bakteriím může být uskutečněno v kombinaci s EDTA (ethylendiamintetraoctová kyselina), v prostředí nízkého pH a/nebo vysoké hladiny NaCl (Davidson *et al.*, 2005).

GML blokuje produkci různých exogenních enzymů a faktorů virulence, včetně proteinu A,  $\alpha$ -hemolyzinu ( $\alpha$ -toxin),  $\beta$ -laktamázy a toxinu vyvolávajícího syndrom toxického šoku (TSST-1), jenž produkuje *S. aureus* (Ruzin, Novick, 2000). Tento poznatek, že GML blokuje produkci TSST-1 a  $\alpha$ -toxinu, vedl vědce k myšlence využití GML při výrobě vaginálních tampónů (Schlievert, Peterson, 2012).

Účinnost GML není omezena pouze na faktory virulence a enzymy bakterie *S. aureus*, ale má antibakteriální účinky i na jiné bakterie. Předpokládá se, že mechanismus inhibičního účinku s největší pravděpodobností působí prostřednictvím inhibice signální transdukce (Ruzin, Novick 2000).



## **Antimykotické účinky**

Existuje řada výzkumů, které potvrdily antimykotický účinek GML na některé druhy hub jako jsou kvasinky. Mezi takové případy, kde byl prokázán pozitivní vliv na usmrcení testovaných hub, patří kvasinka *Candida albicans* (Lieberman *et al.*, 2006). Imunitní obrana hostitele hraje zásadní roli při fagocytóze patogenních kvasinek z rodu *Candida*. Obecně se patogenní kandidózy projevují zvýšením prozánětlivé odezvy a následně nárůstem protizánětlivých cytokinů (Seleem *et al.*, 2016).

## **Antivirové účinky**

Bylo prokázáno, že některé viry po setkání s GML do jisté míry vykazovaly inaktivaci. Tento jev se projevil u viru HIV, viru spalniček, Herpes simplex-1 viru, visna viru, Epstein-Baarové viru, cytomegaloviru a dalších virů, které mají povrch obalený lipidovou vrstvou (tento jev byl pozorován i při studii samotné kyseliny laurové) (Lieberman *et al.*, 2006). Antivirový účinek GML spočívá v rozpustnosti lipidů a fosfolipidů obsažených v obalech patogenních virů, což má za následek rozpad jejich vnější membrány (Arora *et al.*, 2011).

Významnou úlohu má GML zejména při studii zabývající se onemocněním HIV, a to z toho důvodu, že počet nemocných se stále zvyšuje a doposud se nenašla účinná léčba způsobující eradikaci této nemoci, nebo alespoň zabránění dalšího šíření skrze sexuální styk. Zkoumá se, zda by GML nemohl společně s kombinovanou antiretrovirovou terapií, působit mikrobicidně. GML je pro výzkum atraktivní ze dvou důvodů. Za prvé se jedná o monoester mastné kyseliny, který je schopen jednak stabilizovat buněčnou membránu, blokovat bakteriální toxiny tvořící póry a způsobuje aktivaci T buněk. V druhém případě GML blokuje expresi prozánětlivých chemokinů a cytokinů. Všechny zmíněné mechanismy by měly hypoteticky ovlivnit imunitní odpověď. Testování bylo aplikováno na primátech *Macaca mulatta* (makak resus) (Haase *et al.*, 2015).

## **1.4 Mikrobiologické stanovení**

Tradiční mikrobiologické metody mají tendenci být časově a pracovně náročné, proto bylo ve snaze vynalézt metody, které tyto negativa eliminují. Nové metody jsou rychlejší, snadno reprodukovatelné a citlivější a nám poskytují nám přesnější výsledky (Nemati *et al.*, 2016). Mikrobiologické postupy mají dvě důležitá kritéria: citlivost a specifčnost postupu. Citlivost je definována jako úroveň, ve které může být cílový organismus spolehlivě zjištěn.

Analýza přítomnosti nebo absence specifického organismu je založena na schopnosti postupu testování detekovat velmi malé množství cílového organismu v definovaném množství vzorku (Jarvis, 2007).

Z oblasti biotechnologie sem řadíme PCR, ELISA, ATP bioluminiscence a další metody. Využití těchto rychlých a automatizovaných metod při detekci a charakterizaci mikroorganismů a jejich produktů, je v dnešní době oblíbené a hojně rozšířené. Využití lze aplikovat v potravinářském, kosmetickém a farmaceutickém průmyslu, při monitorování životního prostředí a při klinické diagnostice v mikrobiologických laboratořích.

Vzhledem k nízké ceně a jednoduchosti tradičních technik jsou stále hojně využívány v menších laboratořích. Tyto metody zahrnují inkubaci a až po uplynutí potřebně dlouhé inkubační doby, může být až stanoven finální výsledek (Nemati *et al.*, 2016).

Z mikrobiologického hlediska mohou být farmaceutické výrobky rozděleny do dvou skupin, sterilní a nesterilní (tablety, kapsule). Nesterilní výrobky musí splňovat určitá kritéria mikrobiologické čistoty, která jsou uvedena v lékopisech. Farmakologické studie jsou připravovány specificky, farmakologické přípravky musí splňovat dvě hlavní podmínky. Daný přípravek by měl mít terapeutický účinek a zároveň nesmí být toxický pro jeho uživatele.

Evropský lékopis slouží jako užitečný nástroj pro hodnocení kvality. Stanovuje mikrobiologická kritéria a metody pro testování přípravků. Mikrobiologické hodnocení nesterilních výrobků je zvláště důležité, neboť mikrobiální kontaminace může snížit nebo dokonce eliminovat terapeutický účinek. Popřípadě léky mohou způsobit vznik infekce, protože jsou mikroorganismy schopny převést léky na toxické produkty.

V důsledku evidovaných případů vzniku infekce po podání farmakologických přípravků, byl v druhé polovině 20. století založen zvláštní výbor zvaný Mezinárodní farmaceutická federace (FID). Jeho úkolem bylo zavedení směrnic upravující výrobu přípravků. Vyvrcholením bylo zavedení systému Správné výrobní praxe (GMP). Cíl spočíval v zajištění vysoce kvalitních farmaceutických výrobků, které neohrožují život a zdraví uživatele (Ratajczak *et al.*, 2015).

### 1.4.1 Hodnocení antimikrobiální ochrany kosmetického výrobku podle normy ČSN EN ISO 11930

Mezinárodní norma ČSN EN ISO 11930 z roku 2012 nám jasně definuje kroky, na jejichž základě můžeme s jistotou určit, zda jednotlivé kosmetické výrobky splňují daná kritéria antimikrobiální ochrany. Referenční metodou je zkouška účinnosti konzervace. Jedná se o zátěžový test, dle kterého se vyhodnotí, zda jednotlivé vzorky poskytují optimální ochranu konzervace. Pojem konzervace nám říká, zda je testovaný kosmetický přípravek schopen znemožnit mikrobiální množení, a to za pomoci účinných látek, které obsahuje. Testování je určeno pro kosmetické výrobky, u kterých bylo stanoveno nízké mikrobiologické riziko.

Testování účinnosti konzervace se provádí na normou předepsaných kmenech bakterií a hub. Všechny zkoušky se běžně provádějí na třech bakteriích, konkrétně *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* a *Escherichia coli*. Dalším testovacím mikroorganismem je z řádu hub kvasinka *Candida albicans* a plíseň *Aspergillus brasiliensis*.

Testování účinnosti konzervace spočívá v přípravě jednotlivých zákalů dle McFarlandovi zákalové stupnice z pracovních kultur a jejich následnou inokulaci do sterilní uzavíratelné nádoby s naředěným vzorkem. Takto zhotovený vzorek se uchovává ve tmě při laboratorní teplotě a odečty se provádějí v intervalech určených normou, tj. 7. den, 14. den a 28. den od inokulace vzorků.

V těchto dnech se provádí odpipetování daného množství roztoku vzorků do zkumavek s připravenými roztoky neutralizátoru a fyziologických roztoků, vzniká tak ředící řada ( $10^1$  –  $10^5$ ). Z každé zkumavky se vyočkuje definované množství jednotlivých roztoků na odpovídající živné půdy v Petriho miskách a následně se provedou roztěry L-hokejkami. Naočkované Petriho misky se nechají inkubovat v termostatu.

Po inkubaci se provádí vyhodnocení účinnosti konzervace prostřednictvím metody počítání kolonií. Na všech Petriho miskách se počítá množství kolonií a vyberou se ty plotny, kde počet kolonií odpovídá daným rozmezím.



Obrázek 8 Počítadlo kolonií. Dostupné z: <https://www.pol-eko.com.pl/colony-counter/>.

U misek splňující zmíněné kritérium se vypočítá logaritmické snížení a hodnoty se porovnají s hodnotícími kritérii. Na závěr se rozhodne, zda vzorky splňují či nesplňují zkoušku účinnosti konzervace vůči jednotlivým mikroorganismům.

### 1.4.2 Testování citlivosti mikroorganismů

Jak už bylo v několika předešlých kapitolách uvedeno, v posledních letech se dostal do popředí výzkum, zaměřující se na vývoj nových antimikrobiálních látek z důvodu nárůstu získané rezistence mikroorganismů vůči dostupným preparátům. V mikrobiologické praxi se využívá několika metod, na jejichž základě se hodnotí antimikrobiální aktivita *in vitro*. Metody můžeme rozdělit do několika skupin. První skupinu tvoří difúzní metody, do kterých řadíme diskovou difúzní metodu a gradientovou difúzní metodu (E-test). Dále lze získat potřebná data o citlivosti mikroorganismů pomocí chromatografie na tenké vrstvě (TLC) – metoda bioautografie. Pro testování můžeme využít i méně známou metodu zvanou time-kill test, jejichž principem je sledování interakce mezi antimikrobiální látkou a mikrobiálním kmenem v čase. Testování lze provést prostřednictvím ATP-bioluminiscenční metody, podstata spočívá v měření adenosintrifosfátu (ATP) produkovaným bakteriemi, popřípadě houbami.

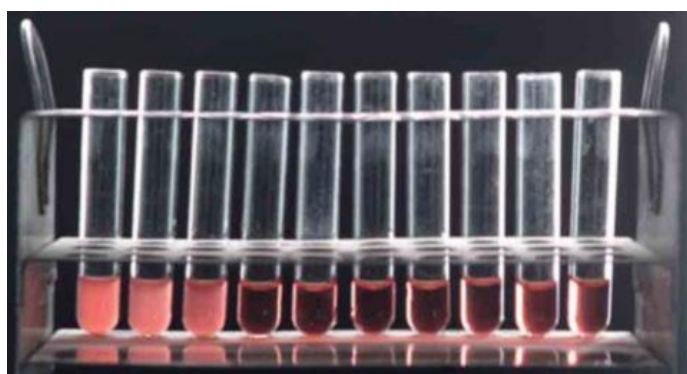
Před několika lety byla vynalezena instrumentální technika zvaná průtoková cytometrie, kterou taktéž možno aplikovat na testování citlivosti jednotlivých mikroorganismů. Mezi vědci dosahuje velké obliby z důvodu rychlé detekce a automatizace.

Poslední skupinu, avšak pro tuto diplomovou práci nejvýznamnější, tvoří diluční metody, mezi které patří bujónová diluční metoda a bujónová mikrodiluční metoda. Diluční metody jsou pokládány za nejvhodnější pro určení parametru zvaném minimální inhibiční koncentrace (MIC) (Balouiri *et al.*, 2016).

MIC je definována jako nejnižší koncentrace antimikrobiální látky, která po inkubaci zabrání růstu a množení mikroorganismů (Leigue *et al.*, 2016). Určení MIC se používá v diagnostických laboratořích v důsledku vyvrácení či potvrzení rezistence mikroorganismů na jednotlivé antimikrobiální látky. Nejčastější aplikace spočívá v objevení nových účinných látek a určení MIC hraničních hodnot, neboli break-points (Andrews, 2001).

Pro diluční metody existuje řada schválených směrnic, podle kterých lze provádět testování antimikrobiální citlivosti bakterií, kvasinek anebo plísní. Nejvíce uznávané standardy jsou poskytovány CLSI (Institut pro klinické a laboratorní standardy) a EUCAST (Evropský výbor pro testování antimikrobiální citlivosti). Směrnice poskytují jednotný postup pro testování, což je velice praktické pro všechny klinické mikrobiologické laboratoře, a to z toho důvodu, že je zde velmi důležité provést veškeré testování klinického materiálu efektivně a se stejným postupem. I minimální změna postupu při testování by mohla zkreslit výsledky a tím ohrozit jejich interpretaci. V těch nejhorších případech by mohla špatná diagnostika dokonce ohrozit život pacienta.

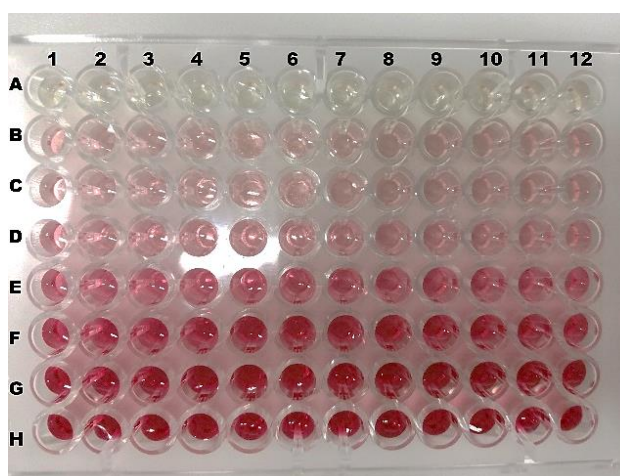
Bujónové makrodiluční a mikrodiluční metody patří mezi nejzákladnější metody pro testování citlivosti antimikrobiálních látek. Jediný rozdíl mezi uvedenými technikami, je objem se kterým se pracuje. Makrodiluce (viz **Obr. 9**) se provádí ve sterilních zkumavkách, kdy minimální pracovní objem každé zkumavky činí 2 ml. Oproti tomu při mikrodiluci se používají znatelně menší objemy, řádově  $\mu\text{l}$  a pracovní plochou je nám plastová mikrotitrační destička (Balouiri *et al.*, 2016).



**Obrázek 9 Bujónová makrodiluční metoda.** Ředící řada. Dostupné z: [http://intranet.tdmu.edu.ua/data/kafedra/internal/micbio/classes\\_stud/en/nurse/Associate%20Degree%20Nursing/ptn/Microbiology/1/17%20Laboratory%20diagnosis%20of%20staphylococcal%20and%20streptococcal%20infection..htm](http://intranet.tdmu.edu.ua/data/kafedra/internal/micbio/classes_stud/en/nurse/Associate%20Degree%20Nursing/ptn/Microbiology/1/17%20Laboratory%20diagnosis%20of%20staphylococcal%20and%20streptococcal%20infection..htm).

### 1.4.2.1 Bujónová mikrodiluční metoda

Miniaturizace a mechanizace zkumavkové diluční metody prostřednictvím malé plastové a mikrotitrační destičky, se stala v praxi populárním a často využívaným postupem. Standardně miska obsahuje 96 jamek, které jsou všechny naprosto identické. Teoreticky v ní jde testovat 12 druhů antimikrobiálních látek, neboť se skládá z 12 sloupců a 8 řádků (viz **Obr. 10**). Jednotlivé sloupce obsahují testované antimikrobiální látky v potřebném koncentračním rozmezí. Stejně jako u zkumavkové metody, lze potřebné hodnoty koncentrace účinné látky získat pomocí dvojkového ředění.



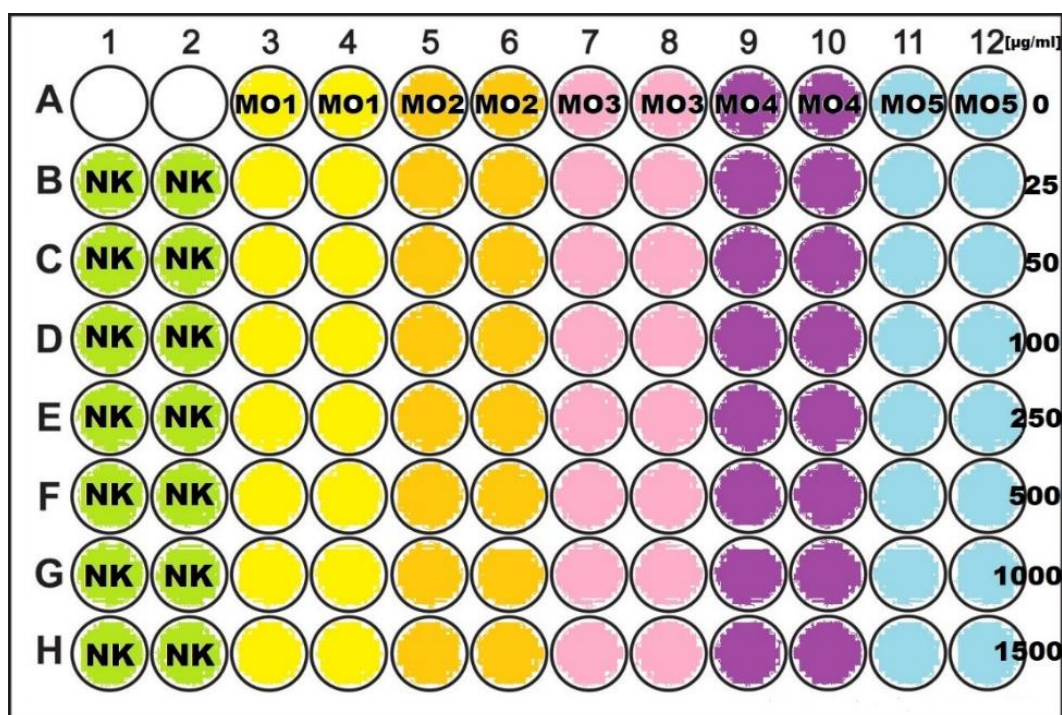
**Obrázek 10** Mikrotitrační destička. Sloupce jsou označeny čísly (1-12), řádky písmeny (A-H). (foto: N. Voltnerová).

Výhody miniaturizace spočívají v menší spotřebě potřebných reagensů, reprodukovatelnosti a pohodlnou manipulací. Na trhu se můžeme setkat s komerčně dodávanými destičkami, které mají již zabudované antimikrobiální látky v určitém koncentračním rozmezí (Balouiri *et al.*, 2016).

Samotné stanovení MIC prostřednictvím bujónové mikrotitrační metody vyžaduje referenční kmeny, ze kterých se připravují odpovídající zákalové stupnice.

Mezitím se ve zkumavkách připraví ředící řady ze zásobního roztoku testované látky a Mueller Hinton bujónu. Vzniklá řada obsahuje předem vypočtené hodnoty koncentrace látky s potenciálním antimikrobiálním účinkem. Z takto připravených zkumavek se jednotlivé roztoky dle daného množství a schématu pipetují do jamek mikrotitračních destiček.

Každá řada mikrotitrační destičky obsahuje 200  $\mu\text{l}$  testované látky o stejné koncentraci. Poté se do sloupců, kromě 1. a 2. (negativní kontroly), v dubletech napipetuje 5  $\mu\text{l}$  bakteriálních suspenzí (viz **Obr. 11**) a roztoky se řádně homogenizují. Řádek A (pozice 3 – 12) slouží jako pozitivní kontrola, neboť koncentrace testované látky je zde nulová. Tyto jamky obsahují pouze Mueller Hinton bujón a bakteriální suspenze. Jamka A1 a A2 obsahují pouze ředící bujón. Připravená mikrotitrační destičky se nechají inkubovat do druhého dne v termostatu při 37 °C.



**Obrázek 11** Schéma mikrotitrační destičky. NK - negativní kontrola, MO - mikroorganismus. Dostupno a upraveno z: <http://www.cellsgnet.com/media/plates/96.jpg>.

Po inkubaci se z každé jamky provede vyočkování suspenzí na odpovídající živné půdy a následuje inkubace Petriho misek v termostatu při vhodné teplotě. Další den se na základě vizuálního zhodnocení určí minimální inhibiční koncentrace, neboli MIC (Janečková, 2009).

## 2 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 2.1 Přístroje

analytické váhy KERN 444 a 445	Kern, Německo
autokláv PS 20 A	BMT, ČR
BACMED 6iG2	Aspiag, s. r.o., ČR
biologický termostat BT 120M	Laboratorní přístroje Praha, ČR
centrifuga Hermle Z 300 K LaborTechnik	Hermle, Německo
denzitometr DEM-1	Biosan, Litva
digitální kamera (Nikon DS-Qi1 MC 12 bit)	Nikon, Japonsko
horko-vzdušný sterilizátor STERIMAT 5104	BMT, ČR
chladnička HS 3966	Gorenje, Slovinsko
chladnička ZRB 36 ND	Zanussi ČR
laboratorní váhy KERN 440-4	Kern, Německo
laboratorní mikroskop Nikon ECLIPSE E200	Nikon, Japonsko
otočný inokulační stůl – schuett petriturn-E	Helago, ČR
počítadlo kolonií LKB 2002	POL-EKO APARATURA, Polsko
sterilizátor STERILAB	BMT, ČR
termostat BT 120 MR	Laboratorní přístroje Praha, ČR
UV lampa MD 118	Biosan, Litva
vodní lázeň s termostatem Julabo ED-5M/B	Julabo, Německo
vortex V-1 plus	Biosan, Litva



## 2.2 Laboratorní pomůcky

automatické pipety Eppendorf (Eppendorf, Německo); automatické pipety WITOPET professional (Witeg, Německo); běžné laboratorní sklo; jednorázové sterilní plastové inokulační kličky (VWR International, USA); jednorázové sterilní plastové L-hokejky (BIOLOGIX, Čína); mikroskopická podložní a krycí sklíčka; mikrozkušavky (Eppendorf, Německo); plastové a hliníkové stojany na zkumavky (VWR International, USA); plastové špičky (Eppendorf, Německo); plastové špičky FINNTIP® 10 ml (Thermo Scientific, USA); skleněné zkumavky 15 ml; sterilní centrifugační zkumavky 15 ml (JET BIOFIL, Čína); sterilní plastové zkumavky 50 ml (VWR International, USA); sterilní mikrotitrační destičky typ P a sterilní plastová víčka (GAMA GROUP a. s., ČR); sterilní plastové Petriho misky (VERKON, ČR)

## 2.3 Chemikálie

Ethanol 96 %	Penta, ČR
Chlorid sodný p.a.	lach:ner, ČR
Tween 80	HiMedia Laboratories, Indie

## 2.4 Kultivační média a pracovní roztoky

### BHI bujón (Brain Heart Infusion Broth), HiMedia Laboratories (Indie)

<u>Složení:</u>	infúze z telecího mozku	200,0 g/l
	infúze z hovězího srdce	250,0 g/l
	proteázový pepton	10,0 g/l
	glukóza	2,0 g/l
	chlorid sodný	5,0 g/l
	hydrogenfosforečnan sodný	2,5 g/l

Příprava: 37 g základní směsi bylo rozmícháno v 1 000 ml destilované vody a poté sterilizováno v autoklávu při teplotě 121 °C po dobu 15 minut. Sterilizovaná půda byla dále ochlazená na teplotu 45 – 50 °C a za aseptických podmínek rozlita do připravených Petriho misek. Konečné pH půdy při 25 °C bylo  $7,4 \pm 0,2$ . Půdy byly uchovávány při chladničkové teplotě.

### **Fyziologický roztok, lach:ner (ČR)**

Složení: chlorid sodný 8,5 g

Příprava: 4,25 g chloridu sodného bylo rozpuštěno v 500 ml destilované vody a dále autoklávováno při 121 °C po dobu 15 minut. Roztok byl skladován při chladničkové teplotě.

### **Krevní agar (Blood agar base No. 2), HiMedia Laboratories (Indie)**

Složení: proteázový pepton 15,0 g/l  
játrový extrakt 2,5 g/l  
kvasničný extrakt 5,0 g/l  
chlorid sodný 5,0 g/l  
agar 15,0 g/l

Suplementy: sterilní defibrinovaná beraní krev 50,0 ml/l základu

Příprava: 21,25 g prášku bylo rozmícháno v 500 ml destilované vody. Směs byla poté autoklávována při 121 °C po dobu 15 minut. Po sterilizaci a ochlazení základu na teplotní optimum mezi 45 – 50 °C bylo k půdě asepticky přidáno 25 ml sterilní defibrinované beraní krve a důsledně promícháno. Připravená půda byla rozlévaná do Petriho misek. Konečné pH půdy má být při 25 °C  $7,4 \pm 0,2$ . Půdy byly skladovány při chladničkové teplotě.

### **MALT agar, HiMedia Laboratories (Indie)**

Složení: sladinový extrakt 30,0 g/l  
agar 15,0 g/l

Příprava: 45 g prášku bylo rozmícháno v 1 000 ml destilované vody a následně autoklávováno při teplotě blízké 118 °C po dobu 15 minut. Sterilizovaná půda byla ochlazená na optimální teplotu a rozlita do Petriho misek. Konečné pH půdy při 25 °C bylo  $5,5 \pm 0,2$ . Půdy byly skladovány při chladničkové teplotě.

### **Masopeptonový agar (Nutrient agar No. 2), HiMedia Laboratories (Indie)**

Složení: peptická trávenina živočišné tkáně 10,0 g/l  
masový extrakt 10,0 g/l  
chlorid sodný 5,0 g/l  
agar 15,0 g/l

Příprava: 40 g základu bylo rozmícháno v 1 000 ml destilované vody a následně sterilizováno v autoklávu při 121 °C po dobu 15 minut. Sterilizovaný základ byl ochlazen na 45 – 50 °C a rozléván do připravených Petriho misek. Konečné pH půdy při 25 °C bylo  $7,2 \pm 0,2$ . Takto připravené Petriho misky byly skladovány při chladničkové teplotě.

#### **Mueller Hinton agar, HiMedia Laboratories (Indie)**

<u>Složení:</u>	masová infúze	2,0 g/l
	kaseinový hydrolyzát	17,5 g/l
	škrob	1,5 g/l
	agar	17,0 g/l

Příprava: 38 g základu bylo rozmícháno v 1 000 ml destilované vody a poté sterilizováno při 121 °C po dobu 15 minut v autoklávu. Po sterilizaci byl základ ochlazen na 45 – 50 °C a asepticky rozlit do Petriho misek. Konečné pH připravené půdy bylo při 25 °C  $7,3 \pm 0,1$ . Půdy byly skladovány při chladničkové teplotě.

#### **Mueller Hinton bujón, HiMedia Laboratories (Indie)**

<u>Složení:</u>	hovězí infúze	300,0 g/l
	kaseinový hydrolyzát	17,5 g/l
	škrob	1,5 g/l

Příprava: 21 g základu bylo rozmícháno v 1 000 ml destilované vody. Směs byla následně sterilizována v autoklávu při 121 °C po dobu 15 minut. Roztok byl vychlazen a jeho konečné pH při 25 °C bylo  $7,3 \pm 0,1$ . Roztok byl uchováván při chladničkové teplotě.

#### **Neutralizátor (Eugon LT 100 Broth Base w/o Tween 80), HiMedia Laboratories (Indie)**

<u>Složení:</u>	trypton*	15,0 g/l
	sójový pepton	5,0 g/l
	chlorid sodný	4,0 g/l
	L-cystin	0,7 g/l
	siřičitan sodný	0,2 g/l
	glukóza	5,5 g/l
	vaječný lecitin	1,0 g/l
	triton X-100	1,0 g/l

\*pankreaticky natrávený kasein

Příprava: 32,4 g základu bylo rozmícháno v 1 000 destilované vody spolu s 5 g polysorbátu 80 (Tween 80). Směs byla poté sterilizována v autoklávu při teplotě 121 °C po dobu 15 minut. Konečné pH neutralizátoru při 25 °C bylo  $7,0 \pm 0,2$ . Roztok byl uchováván při chladničkové teplotě.

#### **Sabouradův agar (Sabouraud Dextrose agar), HiMedia Laboratories (Indie)**

<u>Složení:</u>	glukóza	40,0 g/l
	mykologický pepton*	10,0 g/l
	agar	15,0 g/l

\*pepticky natrávená živočišná tkáň a pankreaticky natrávený kasein

Příprava: 65 g základu bylo rozmícháno v 1 000 ml destilované vody a dále autoklávováno při teplotě 121 °C po dobu 15 minut. Následně byla směs vychlazena na vhodnou teplotu s rozmezím mezi 45 – 50 °C a poté byla postupně rozlita do Petriho misek. Konečné pH připravených půd při 25 °C bylo  $5,6 \pm 0,2$ . Všechny kultivační půdy byly uchovávány při chladničkové teplotě.

#### **Tryptone Soya agar (Soyabean Casein Digest agar), HiMedia Laboratories (Indie)**

<u>Složení:</u>	trypton*	15,0 g/l
	sójový pepton	5,0 g/l
	chlorid sodný	5,0 g/l
	agar	15,0 g/l

\*pankreaticky natrávený kasein

Příprava: 40 g prášku základu bylo rozmícháno v 1 000 ml destilované vody a poté sterilizováno v autoklávu při 121 °C a po dobu 15 minut. Sterilizovaná směs byla vychlazena na 45 – 50 °C a poté asepticky rozlita do připravených Petriho misek. Konečné pH půdy při teplotě 25 °C bylo  $7,3 \pm 0,2$ . Půdy byly uchovávány při chladničkové teplotě.

## 2.5 Reagencie k biochemickým a morfologickým testům

### Gramovo barvení – kit, HiMedia Laboratories (Indie)

#### Dekolorizér

<u>Složení:</u>	ethanol 95 %	50,0 ml
	aceton	50,0 ml

Příprava: 95 % ethanol byl výrobcem smíchán s acetonem v poměru 1:1.

#### Krystalová violet'

<u>Složení:</u>	roztok A: krystalová violet'	2,0 g
	ethanol 95 %	20,0 ml
	roztok B: oxalacetát amonný	0,8 g
	destilovaná voda	80,0 ml

Příprava: Roztoky A a B byly výrobcem smíchány. Výsledné barvivo bylo stabilní.

#### Lugolův roztok

<u>Složení:</u>	jód	1,0 g
	jodid draselný	2,0 g
	destilovaná voda	300,0 ml

Příprava: Jód a jodid draselný byly výrobcem rozpuštěny v destilované vodě.

#### Safranin, 0,5 % w/v

<u>Složení:</u>	safranin O	0,5 g
	destilovaná voda	100,0 ml

Příprava: Safranin O byl výrobcem rozpuštěn v destilované vodě.

#### Peroxid vodíku 30 % – naředěn na 3 % (Iach.ner, ČR); Tuš černá (Koh-i-noor, ČR)

## 2.6 Použité mikroorganismy

Níže uvedené testované mikroorganismy byly poskytnuty z České sbírky mikroorganismů, Masarykova Univerzita Brno, Česká republika.

<i>Bacillus subtilis</i>	CCM 2215
<i>Candida albicans</i>	CCM 8186
<i>Escherichia coli</i>	CCM 4517
<i>Micrococcus luteus</i>	CCM 735
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	CCM 3955
<i>Staphylococcus aureus</i>	CCM 2022

Klinické izoláty bakteriálních kmenů MRSA a VRE byly poskytnuty Fakultní nemocnicí v Hradci Králové.

MRSA	FNHK
VRE	FNHK

## 2.7 Hodnocení antimikrobiální ochrany kosmetického výrobku

Všecké kroky, které byly prováděny během testování antimikrobiální ochrany kosmetického výrobku, byly v souladu s přesně definovaným postupem uvedeném v České technické normě 11930.

### 2.7.1 Testované vzorky

Všechny vzorky, na nichž se prováděly zátěžové testy účinnosti konzervace, byly poskytnuty firmou K2 Pharm s. r. o. se sídlem v Opavě.

LAUROCIDS (3,5 % LA) external SMEDS koncentrát č. š. 25 0817

Vzorek byl testován při dvou různých koncentracích, a to konkrétně jako 10 % (ředění 1:9) a 1 % (ředění 1:99) roztok. K naředění vzorku byla použita sterilní destilovaná voda a dodrženy aseptické podmínky

### 2.7.2 Použité živné půdy, roztoky a chemikálie

Fyziologický roztok	lach:ner (ČR)
MALT agar	HiMedia Laboratories (Indie)
Mueller Hinton agar	HiMedia Laboratories (Indie)
Neutralizátor	HiMedia Laboratories (Indie)
Sabouradův agar	HiMedia Laboratories (Indie)
Sterilní destilovaná voda	
Tryptone Soya agar	HiMedia Laboratories (Indie)

### 2.7.3 Testované mikroorganismy

<i>Candida albicans</i>	CCM 8186
<i>Escherichia coli</i>	CCM 4517
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	CCM 3955
<i>Staphylococcus aureus</i>	CCM 2022

Na základě požadavků zadávající firmy nebylo testování účinnosti konzervace prováděno s plísní *Aspergillus brasiliensis*.

### 2.7.4 Pracovní postup

Nejprve byly z jednotlivých referenčních kmenů připraveny pracovní kultury, a to takovým způsobem, že byly bakterie přeočkovány sterilní inokulační kličkou na Mueller Hinton agar, následně byly inkubovány v termostatu při 37 °C po dobu 24 h. Kvasinka byla stejným způsobem přeočkována pro ni vhodnou živnou půdou, tedy na MALT agar, a následně byla v termostatu inkubována při 30 °C po dobu 48 h. Poté byly vzorky za dodržení aseptických podmínek odměřeny do sterilních plastových 50 ml zkumavek. Veškeré vzorky byly dodávány v neředěné podobě a vždy dle přesných instrukcí zadavatele byly v laboratoři naředěny sterilní destilovanou vodou, a to v takových poměrech, které odpovídaly potřebným koncentracím testovaných látek. Konečný objem naředěného vzorku sterilní destilovanou vodou byl vždy fixní, tedy 10 ml.

Po inkubaci byly z pracovních kultur zhotoveny zákalové zákaly za pomoci denzitometru, dle zákalové stupnice McFarlanda. Z pracovních kultur bakterií byla zhotovena inokula, která byla rovna zákalu 1. stupni McFarlandovy zákalové stupnice ( $3 \cdot 10^8$  CFU/ml).

Z pracovní kultury kvasinky bylo zhotoveno inokulum, které bylo rovno zákalu 2. stupni McFarlandovi zákalové stupnice ( $6 \cdot 10^8$  CFU/ml).

Příprava inokula probíhala tak, že z každé pracovní kultury bylo sterilní inokulační kličkou přeneseno potřebné množství kolonií do sterilní skleněné zkumavky, která obsahovala fyziologický roztok (cca 5 ml). Poté bylo z každého inokula odpipetováno 0,1 ml do připravených 50 ml plastových zkumavek, které obsahovaly naředěné vzorky sterilní destilovanou vodou s konečným objemem 10 ml. Následovala důkladná homogenizace inokula v naředěném vzorku a dále inkubace vzorku s bakteriální suspenzí při laboratorní teplotě. Každá sterilní plastová 50 ml zkumavka obsahovala příslušný vzorek a inokulum pouze jednoho mikroorganismu.

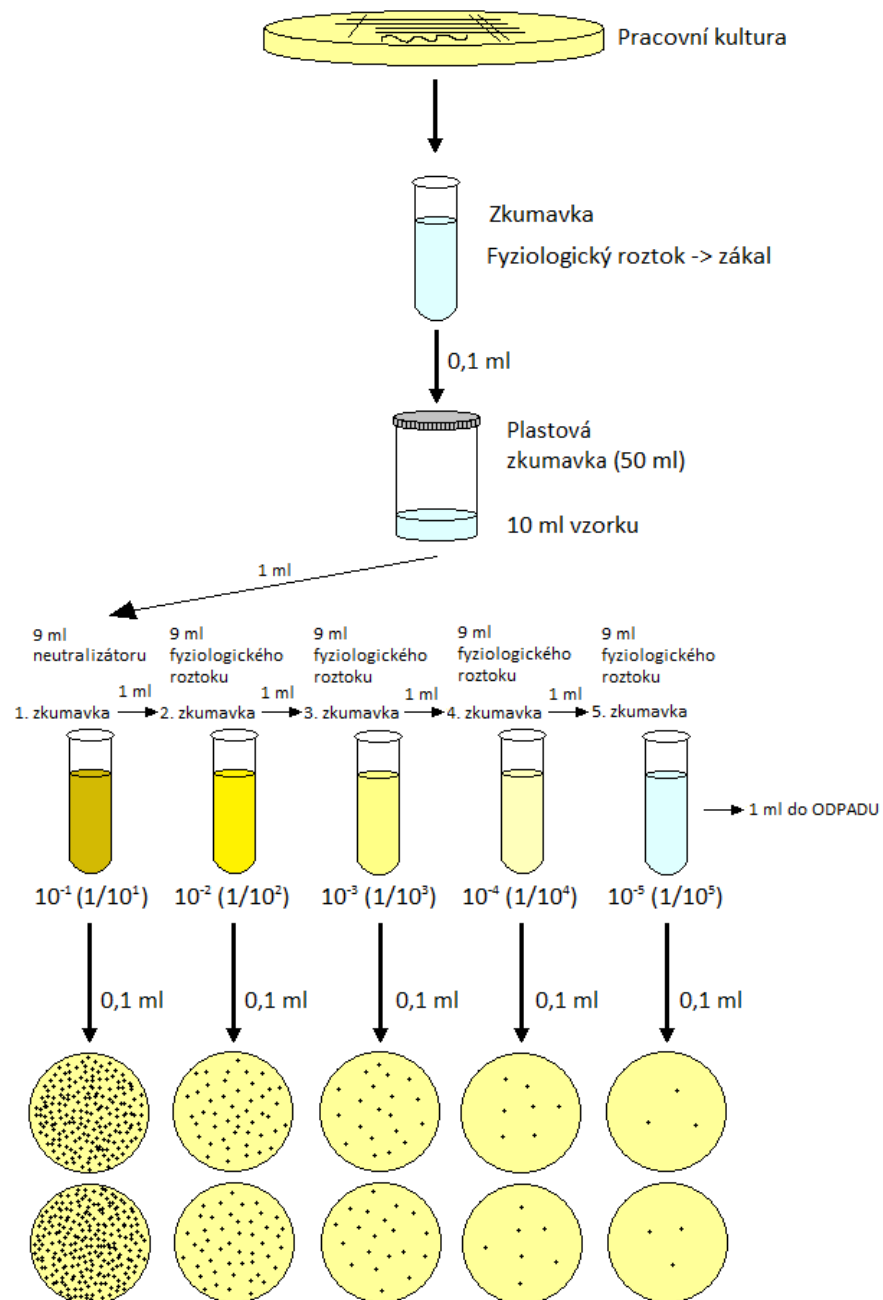
Dle normy byly odečty účinnosti konzervace prováděny 7., 14. a 28. den po inokulaci vzorků jednotlivými kmeny. Pro ověření přítomnosti či nepřítomnosti nežádoucí kontaminace vzorků byla zátěžová zkouška účinnosti konzervace provedena i bezprostředně po inokulaci vzorku mikroorganismy. Tento krok norma neobsahuje, byl striktně iniciován pro ověření mikrobiální čistoty individuálních vzorků.

Ve dnech, ve kterých byly prováděny odečty, byl ze zkumavek obsahujících vzorek a inokulum vždy odpipetován 1 ml do sterilní skleněné zkumavky, jež obsahovala 9 ml neutralizátoru (desítkové ředění). Poté byly roztoky za pomoci sterilní plastové špičky promíseny. Počet bakterií přítomných při prvním desítkovém ředění byl  $3 \cdot 10^5$  CFU/ml a počet kvasinek byl roven  $6 \cdot 10^5$  CFU/ml. Z této první zkumavky byl odpipetován také 1 ml roztoku ovšem do 9 ml fyziologického roztoku, jenž obsahovala druhá sterilní skleněná zkumavka. Roztoky byly opět homogenizovány a počet bakterií ve druhé zkumavce byl roven  $3 \cdot 10^4$  CFU/ml a pro kvasinku byl počet  $6 \cdot 10^4$  CFU/ml. Ze druhé zkumavky byl opět odpipetován 1 ml do třetí zkumavky, která taktéž obsahovala 9 ml fyziologického roztoku, následovalo promíchání. Počet bakterií ve třetí zkumavce byl  $3 \cdot 10^3$  CFU/ml a počet pro kvasinku byl  $6 \cdot 10^3$  CFU/ml. Stejně bylo postupováno ještě 2krát, tedy do páté zkumavky tak, aby nám vznikla ředící řada. Z této poslední zkumavky byl 1 ml odpipetován do biologického odpadu. Výsledný počet bakterií ve zkumavce č. 5 činil  $3 \cdot 10^1$  CFU/ml a výsledný počet pro kvasinku byl  $6 \cdot 10^1$  CFU/ml. Po vytvoření ředící řady byla z každé zkumavky odpipetována sterilní plastovou špičkou 0,1 ml (100  $\mu$ l) suspenze na vhodné živné půdy.



U naředěného vzorku, jenž obsahoval bakterie, bylo provedeno vyočkování 100  $\mu\text{l}$  roztoku na Tryptone Soya agar a pro kvasinku bylo vyočkováno 100  $\mu\text{l}$  roztoku na Sabouradův agar – vždy v dubletech (viz **Obr. 12**).

Roztoky na jednotlivých agarech byly rozetřeny sterilními jednorázovými plastovými L-hokejkami za použití otočného inokulačního stolu. Takto připravené plotny obsahující bakterie byly inkubovány v termostatu při 37 °C do druhého dne. Plotny obsahující kulturu kvasinky byly inkubovány při teplotě 30 °C po dobu 48 hodin.



Obrázek 12 Schéma zátěžového testu.

Na základě metody počítání kolonií byly po uplynutí inkubace misek v termostatu sečteny počty kolonií na všech plotnách za pomoci digitálního počítadla kolonií.

U misek, které splňovaly kritérium, bylo dle rovnice vypočteno logaritmické snížení a výsledné hodnoty byly porovnány s hodnotícími kritérii v tabulkách (viz **Tabulky 2 a 3**).

Rovnice pro výpočet logaritmického snížení:

$$R_x = \log N_0 - \log N_x$$

$N_0$ .....počet mikroorganismů zaočkovaných v čase  $t_0$

$N_x$ .....počet mikroorganismů v časech odběru vzorku

V posledním kroku bylo rozhodnuto, zda testované vzorky splňují podmínky antimikrobiální ochrany dle normy ČSN 11930 (kritérium A), vůči jednotlivým mikroorganismům.

**Tabulka 2** Hodnotící kritéria pro bakterie dle ČSN EN ISO 11930

Požadované hodnoty snížení v log			
Mikroorganismy	Bakterie		
Interval	T7	T14	T28
Kritérium A	≥3	≥3 a NI	≥3 a NI
*NI: žádné zvýšení počtu od předešlého intervalu T7, T14, T28 – časový interval zahájení kultivace inokulovaného vzorku po 7, 14 a 28 dnech Kritérium A – požadovaná minimální hodnota logaritmického snížení podle přílohy B v ČSN EN ISO 11930			

**Tabulka 3** Hodnotící kritéria pro *C. albicans* dle ČSN EN ISO 11930

Požadované hodnoty snížení v log			
Mikroorganismy	Kvasinka		
Interval	T7	T14	T28
Kritérium A	≥1	≥1 a NI	≥1 a NI
*NI: žádné zvýšení počtu od předešlého intervalu T7, T14, T28 – časový interval zahájení kultivace inokulovaného vzorku po 7, 14 a 28 dnech Kritérium A – požadovaná minimální hodnota logaritmického snížení podle přílohy B v ČSN EN ISO 11930			

## 2.8 Stanovení minimální inhibiční koncentrace testovaných látek

### 2.8.1 Testované vzorky

Všechny vzorky, u nichž se provádělo stanovení minimální inhibiční koncentrace, byly poskytnuty firmou K2 Pharm s. r. o. se sídlem v Opavě.

Monolaurin syntetický min 98 % MAG 12 č. š. 1164/152 VÚOS, Rybitví

Monolaurin 90 %, č. š. 01604878, Mosselman, Belgie

LAURICIDIN® min. 95 %, č. š. 121605, Med-Chem Labs Inc., USA

Kyselina laurová 99,5 %, č. š. 020010080, HSH Chemie, Praha

Propylenglycol Monolaurate LAUROGLYCOL® 90, č. š. 162978, Gattefossé, Francie

Epsilon polyL-lysin 98 %, č. š. 161201A, Zhengzhou Bainafo Bioengineering Co., Čína

### 2.8.2 Použité živné půdy, roztoky a chemikálie

BHI bujón	HiMedia Laboratories (Indie)
Ethanol 96 %	Penta (ČR)
Fyziologický roztok	lach:ner (ČR)
Mueller Hinton agar	HiMedia Laboratories (Indie)
Mueller Hinton bujón	HiMedia Laboratories (Indie)
Sterilní destilovaná voda	
Tryptone Soya agar	HiMedia Laboratories (Indie)

### 2.8.3 Testované mikroorganismy

<i>Bacillus subtilis</i>	CCM 2215
<i>Escherichia coli</i>	CCM 4517
<i>Micrococcus luteus</i>	CCM 735
MRSA	FNHK
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	CCM 3955
<i>Staphylococcus aureus</i>	CCM 2022
VRE	FNHK

## 2.8.4 Pracovní postup

Před počátkem samotného testování bylo nutné připravit zásobní roztoky, které vznikly smísením 0,5 g testovaného přípravku s 10 ml 96 % ethanolu, popřípadě byl testovaný přípravek smísen se sterilní destilovanou vodou.

Výpočet koncentrace zásobního roztoku:

$$c = \frac{m}{V} = \frac{0,5}{10} = 0,05 \text{ g/ml} = 50\,000 \text{ } \mu\text{g/ml}$$

c.....koncentrace

m.....hmotnost

V.....objem

V dalším kroku bylo vypočteno množství dílčích přídavek testovaných přípravků tak, abychom získali předem stanovené koncentrace pro testování vzorků v mikrotitrační destičce, neboli vhodnou koncentrační řadu. Výsledný objem testované látky (zásobní roztok) ve směsi s Mueller Hinton bujónem byl 4 ml.

Výpočet množství testované látky:

$$c_1 \cdot V_1 = c_2 \cdot V_2$$

$$50\,000 \cdot V_1 = 1\,500 \cdot 4\,000 \rightarrow V_1 = 120 \text{ } \mu\text{l}$$

c<sub>1</sub>,c<sub>2</sub>.....koncentrace

V<sub>1</sub>,V<sub>2</sub>.....objem

Tabulka 4 Ředění zásobních roztoků.

Koncentrace testované látky [ $\mu\text{g/ml}$ ]	Množství testované látky [ $\mu\text{l}$ ]	Množství Mueller Hinton bujónu [ $\mu\text{l}$ ]
1 500	120	3 880
1 000	80	3 920
500	40	3 960
250	20	3 980
100	8	3 992
50	4	3 996
25	2	3 998
0	0	4 000

Koncentrační řada vznikla naředěním vypočteného množství rozpuštěného testovaného vzorku spolu s Mueller Hinton bujónem. Ředění roztoků bylo provedeno za dodržení aseptických podmínek prostřednictvím metody pipetování v 15 ml sterilních plastových zkumavkách. Dále bylo nutné připravit bakteriální suspenze, u kterých byly následně testovány minimální inhibiční koncentrace. Inokula byly připraveny z 24 hodinových bakteriálních kultur, které byly pomnoženy ve sterilních plastových mikrozkušných Eppendorf s BHI bujónem (1 ml). Bakteriální kultury (pracovní) byly získány z referenčních kmenů narostlých na Mueller Hinton agaru. Všechny bakterie byly inkubovány v termostatu při 37 °C po dobu 24 hodin, kromě bakterie *B. subtilis*. Ten byl inkubován do druhého dne při 30 °C.

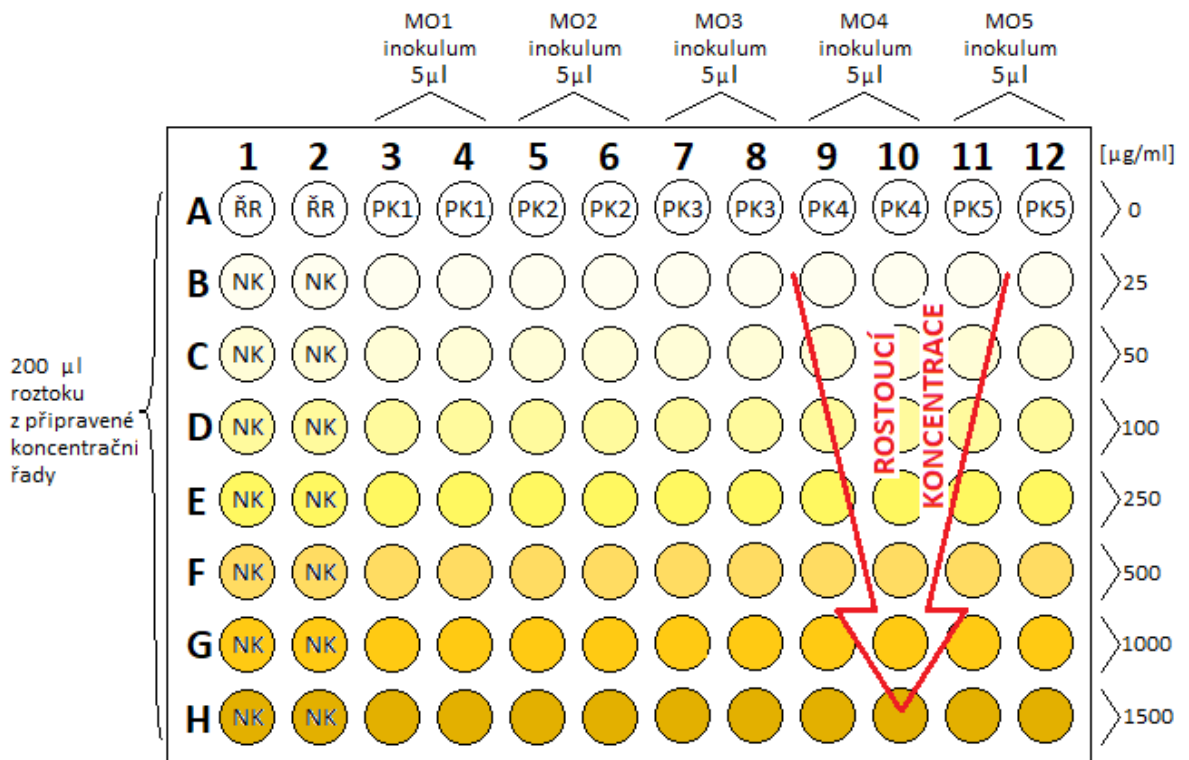
Po 24 hodinách inkubace byly mikrozkušné vyndány z termostatu a dány na krátkou dobu do centrifugy, aby na dně mikrozkušných vznikl sediment. Po ukončení centrifugace se z mikrozkušných opatrně odpipetoval supernatant a místo něho se do ní napipetoval 1 ml fyziologického roztoku. Bakteriální kultura byla ve fyziologickém roztoku homogenizována a postupně přidávána do skleněné zkumavky, která obsahovala již 5 ml fyziologického roztoku. Suspenze z mikrozkušné byla do skleněné zkumavky dávána do té doby, dokud nevznikl zákal odpovídající 0,5. stupni McFarlandovi zákalové stupnice ( $1,5 \cdot 10^8$  CFU/ml).

Další krok testování spočíval v přípravě mikrotitrační destičky. Jelikož se mikrotitrační destička skládá z 8 řádků a 12 sloupců, bylo možné v jedné destičce testovat celou ředící řadu zásobního roztoku maximálně pro 5 bakterií, neboť byla každá bakterie testována v dubletech (paralelách) a první dva sloupce (sloupce A a B) sloužily jako negativní kontrola pro ověření čistoty vzorku a použitých ředících roztoků (BHI bujón, 96 % ethanol, popřípadě sterilní destilované vody). Jelikož byl celkový počet bakterií 7, bylo nutné ke stanovení minimální inhibiční koncentrace (MIC) jednoho vzorku využít dvě mikrotitrační destičky.

Do všech jamek bylo postupně aplikováno 200  $\mu$ l roztoku z připravené koncentrační řady (viz **Tabulka 4**). Do řádků byla vždy aplikována stejná koncentrace účinné látky v již naředěném množství (0 – 1 500  $\mu$ g/ml). Poté bylo do všech jamek, kromě jamek nacházejících se v prvním a druhém sloupci, v dubletech napipetováno 5  $\mu$ l individuálních bakteriálních suspenzí. První řádek sloužil jako pozitivní kontrola (kromě jamek A1 a A2), jelikož kromě bakteriální suspenze neobsahoval žádnou účinnou látku. Jamky A1 a A2 obsahovaly pouze Mueller Hinton bujón, sloužily tak pro ověření kontaminace ředícího roztoku (viz **Obr. 13**).

Připravené destičky byly přikryty plastovým víčkem, vsunuty do plastových sáčků a dány do termostatu vyhřátého na 37 °C po dobu 20 – 24 hodin. Druhý den bylo provedeno vyočkování ze všech jamek na Tryptone Soya agar. Takto připravené půdy byly opět inkubovány 24 hodin při 37 °C.

Třetí den byly Petriho misky vyndány z termostatu a vizuálně hodnoceny. V případě, kdy byla při určité koncentraci narostlá viditelná kolonie, daná koncentrace byla stanovena jako neinhibující růst příslušné bakterie. V opačném případě, kdy nebyl na živném médiu zřetelný žádný nárůst kolonií dané bakterie, byla daná koncentrace testovaného vzorku klasifikována jako minimální inhibiční koncentrace.



ŘR.....ředící roztok                      MO = PK  
 NK.....negativní kontrola  
 MO.....mikroorganismus  
 PK.....pozitivní kontrola

Obrázek 13 Podrobné schéma mikrotitrační destičky.

## 2.9 Dodatečné morfologické a biochemické testy

Z důvodu nežádoucí kontaminace některých vzorků, které byly testovány výše zmíněnými metodami, bylo nutné blíže určit původce znečištění. V případě objevení kontaminace byly jednotlivé kolonie sterilní kličkou vyizolovány na připravené agary. Krevní agar a masopeptonový agar byly s vyizolovanými kulturami inkubovány v termostatu při 37 °C po dobu 24 hodin a také byl použit MALT agar, který byl inkubován při 30 °C po dobu 48 hodin. Po inkubaci byly u narostlých mikroorganismů určeny základní znaky, mezi něž patří tvar kolonií, velikost kolonií, barva, zápach, u krevního agaru tvorba hemolýzy, popřípadě zda vůbec samotné mikroorganismy na dané půdě narostly.

Z těchto kultur byly dále provedeny základní morfologické a biochemické testy.

### **Nativní preparát**

Pracovní postup: Na čisté podložní sklíčko byla napipetována kapka fyziologického roztoku, a do ní byla sterilní inokulační kličkou přenesena neznámá mikrobiální kultura, která byla ve fyziologickém roztoku kličkou řádně rozmíšena. Na povrch podložního sklíčka s bakteriální kulturou bylo dáno krycí sklíčko. U takto zhotoveného preparátu byla pozorována možná pohybová aktivita mikroorganismu. Pozorování bylo uskutečněno prostřednictvím světelného mikroskopu při zvětšení 600x.

### **Barvení dle Grama**

Pracovní postup: Kapka fyziologického roztoku byla napipetována na čisté podložní sklíčko. Na ploše sklíčka byla poté sterilní inokulační kličkou rozetřena mikrobiální kultura. Sklíčko se nechalo zaschnout. Ve chvíli, kdy bylo sklíčko suché, tak bylo fixováno plamenem. Nejdříve bylo sklíčko převrstveno krystalovou violetí, po 30 sekundách se barvivo slilo a na sklíčko byl nanesen Lugolův roztok, který byl po 30 sekundách slit. Po slití roztoku jódu bylo sklíčko opláchnuto alhokolem (dekolorizérem) a dále destilovanou vodou. Následovalo překrytí podložního skla roztokem safraninu a po 1 minutě bylo barvivo opět spláchnuto destilovanou vodou. Sklíčko se nechalo zaschnout a poté byl preparát pozorován světelným mikroskopem pod imerzním objektivem (zvětšení 1 500x). Modré kolonie byly hodnoceny jako gram-pozitivní a červené kolonie jako gram-negativní.

## **Barvení pouzder dle Burriho**

Pracovní postup: Na čisté podložní sklíčko byla nanесena kapka tuže, do které byla sterilní kličkou rozmísena mikrobiální kultura. Prostřednictvím druhého podložního sklíčka byl zhotoven nátěr, který se nechal zaschnout. Suché sklíčko bylo krátce fixováno plamenem a převrstveno krystalovou violetí. Po 1 minutě bylo barvivo slito a sklíčko bylo ve vertikální poloze opláchnuto v nádobě s destilovanou vodou. Takto zhotovený preparát se nechal zaschnout a poté byl opět pozorován světelným mikroskopem pod imerzním objektivem (zvětšení 1 500x). V případě pozitivního výsledku byla v mikroskopu viditelná neobarvená pouzdra oproti obarvenému pozadí preparátu a tělům mikroorganismů.

## **Katalázový test**

Pracovní postup: Několik kapek 3 % peroxidu vodíku bylo kapátkem aplikováno na podložní sklíčko. Do roztoku byla poté vnesena sterilní inokulační kličkou mikrobiální kultura. Produkce katalázy byla identifikována skrze viditelně unikající bublinky plynu na povrchu sklíčka.

## **Oxidázový test**

Pracovní postup: Filtrační papír nasycený činidlem (tetramethyl-*p*-fenylendiamin) byl na krátkou dobu sterilní pinzetou umístěn do testované narostlé kolonie na půdě. V případě pozitivního výsledku byla zaznamenána barevná změna papírku, neboli žlutý filtrační papír zmodral. Po 2 minutách od nanесení neznámé kultury na filtrační papír bylo následné zmodrání považováno za falešně pozitivní výsledek.



### 3 VÝSLEDKY A DISKUSE

Volba využití glycerol monolaurátu jako konzervans se jeví vhodnější oproti používání chemických konzervačních látek, a to z důvodu obav některých konzumentů z jejich potencionálních toxických či karcinogenních vlastností. Oproti tomuto aspektu jsou mastné kyseliny a jejich estery netoxické látky, které se přirozeně vyskytují v potravinách (Oh, Marshall, 1993). Využití konzervačních prostředků v kosmetických výrobcích určených pro osobní péči je důležité, neboť jsou tyto látky nezbytné pro zachování bezpečnosti a stability těchto produktů. Jejich účelem je zabránění mikrobiálního růstu (Kessler, 2015).

Další významná vlastnost glycerol monolaurátu spočívá v jeho antimikrobiální aktivitě, která je v posledních desetiletích značně zkoumána (Skřivanová *et al.*, 2006). Této vlastnosti jsou přikládány velké ambice z důvodu poklesu účinnosti velké škály antibiotických preparátů. Moderní doba antibiotik započala objevením penicilinu v roce 1928 Sirem Alexandrem Flemigem a následně bylo v druhé polovině 20. století na trh uvedeno markantní množství nových antibiotik (Ventola, 2015). Z tohoto důvodu je 20. století označováno jako „zlatá éra“ objevu antibiotik, která napomohla úspěšně léčit dosud nevléčitelné infekce (Mathur *et al.*, 2017). Postupem času se u některých bakterií začala objevovat rezistence proti různým druhům antibiotik (Ventola, 2015). Tento jev byl podpořen nadměrným předepisováním širokospektrých či úzkospektrých antibiotik v kombinaci s jejich přílišnou aplikací hospodářským zvířatům (Mathur *et al.*, 2017). V současné době je vzniklá rezistence zjevným problémem a vedou se četné debaty o tom, zda nám nehrozí post-antibiotická éra. Největší potíží je globální pandemie způsobená gram-pozitivní bakterií meticilin-rezistentní *S. aureus* (MRSA), a také bakterií vankomycin-rezistentní *Enterococcus* (VRE). Dle údajů je MRSA ve Spojených státech amerických zodpovědná za větší počet úmrtí jedinců ročně než infekce HIV/AIDS, Parkinsonova choroba, rozedma plic či násilná trestná činnost dohromady (Ventola, 2015). Z tohoto důvodu se vědecká komunita snaží vytvořit systém dohledu zaměřeného na antimikrobiální rezistenci a paralelně se vědci snaží objevit nové preparáty, které by svou funkcí plně nahradily dnes neúčinná antibiotika (Vidal *et al.*, 2014).

Cílem této diplomové práce bylo testování účinnosti konzervace nově syntetizovaného přípravku na bázi glycerol monolaurátu. Dále bylo provedeno testování antimikrobiálních vlastností vzorků na bázi kyseliny laurové a jejich derivátů. Na závěr bylo uskutečněno testování antimikrobiální účinnosti vzorku  $\epsilon$ -poly-L-lysinu.

### 3.1 Hodnocení antimikrobiální ochrany kosmetického výrobku

Prostřednictvím zátěžových testů účinnosti konzervace dle normy ČSN EN ISO 11930 byl testován zcela nový přípravek s pracovním názvem LAUROCIDS (3,5 % LA) external SMEDS koncentrát č. š. 25 0817 – MS. Formule byla připravena pracovníky ve firmě K2 Pharm s. r. o. se sídlem v Opavě.

Dle informací poskytnutých výrobcem se jedná o konzervants na bázi monolaurinu a lauroglykolu aplikovatelného do přípravku typu personal care products, neboli výrobků osobní péče. Přípravek by měl být využit striktně pro preparáty zaměřené na vnější aplikaci. Hodnota 3,5 % LA, označuje součet obsahu kyseliny laurové v monolaurinu, lauroglykolu a použitém tenzidu. Použitým a dle norem povoleným tenzidem byly alkylestery polyglycerolů.

Přípravek LAUROCIDS (3,5 % LA) vznikl podle předlohy již existujícího přípravku, který na trh uvedla španělská firma Chemipol pod registrovaným názvem SENSICARE FP 1 s monolaurinem. Dle informací dostupných na internetových stránkách Chemipol, firma zaručuje antimikrobiální účinnost proti bakteriím, plísním a kvasinkám. Dále je tato formule vhodná pro přípravu jakéhokoliv typu přípravku pro osobní péči a zaručuje účinnost bez vedlejších účinků. Obecně produkty řady SENSICARE® jsou výsledkem probíhajícího moderního výzkumného programu s cílem vyvinout inovační konzervační a antimikrobiální látky pro přípravky osobní péče. Velká výhoda těchto přípravků spočívá v jejich konzervačním účinku již při nízkých koncentracích, což minimalizuje nežádoucí vedlejší účinky, jako je senzibilizace a neslučitelnost s jinými látkami. Konkrétní hodnoty účinné koncentrace přípravků řady SENSICARE® nejsou firmou uvedeny ([online]. Dostupné z: <http://files.constantcontact.com/95822438401/006cdccb-2330-49b7-a7bb-fa8d69cb1396.pdf> [cit. 5. 4. 2018]).

Z důvodu, že se jedná o přípravek, jehož budoucí doménou má být využití jako konzervačního prostředku k další produkci a distribuci výrobků s kosmetickým zaměřením, byla pro jeho testování vybrána již několikrát zmiňovaná norma pro kosmetiku. Podle přesných instrukcí zadavatele se provedlo testování vzorku s pracovním názvem LAUROCIDS (3,5 % LA) ve dvou koncentracích zásobního roztoku. Konkrétně byla formule naředěna sterilní destilovanou vodou jako 10 % a 1 % zásobní roztok. Vzorek měl charakter polotekutého roztoku a v obou případech byl dobře rozpustný ve sterilní destilované vodě použitém jako rozpouštědla.

Počty kolonií a výsledky mikrobiologického testování zátěžových testů jsou pro 10 % roztok uvedeny v **Příloze 1, 2, 3, 4, 5, 6** a pro 1 % roztok v **Příloze 7, 8, 9, 10, 11 a 12**.

Testování vzorku jako 10 % a 1 % zásobního roztoku probíhalo paralelně. Zátěžové testy účinnosti konzervace pro normou určené bakterie (*Staphylococcus aureus* CCM 2022, *Escherichia coli* CCM 4517, *Pseudomonas aeruginosa* CCM 3955) probíhaly v časovém rozmezí 23. 10. – 22. 11. 2017 a zátěžový test účinnosti konzervace pro kvasinku (*Candida albicans* CCM 8186) byl uskutečněn v mírně odlišném časovém rozmezí od 23. 10. – 24. 11. 2017, kvůli delší době růstu kvasinky (48 hodin).

Z tabulek v **Přílohách** je zřejmé, že bylo provedeno testování i mimo normou určený interval, tedy bezprostředně po inokulaci vzorků. Tento krok byl zaveden z důvodu včasného odhalení možné nežádoucí kontaminace již samotného vzorku, která by mohla negativně ovlivnit celý průběh testování.

Ve dne 25. 10. 2017 byly uskutečněny odečty účinnosti konzervace 10 % a 1 % zásobního roztoku vzorku pro jednotlivé bakterie. Jelikož se jednalo o krok provedený striktně z vlastní iniciativy, proto nebyly pro bakterie ani kvasinku v 1. den odečtů provedeny žádné výpočty logaritmického snížení.

Již tento první den odečtu byla u všech půd viditelná kontaminace, která se objevovala od prvního dle paralelně. Kontaminace však nedosahovala takového rozměru, který by bránil samotné identifikaci testovaných mikroorganismů, a s klesající koncentrací se vždy kontaminace snižovala. Z tohoto důvodu bylo možné provést odečty počtu kolonií při daných koncentracích pro každou bakterii zvlášť a u každé bakterie vizuálně odhadnout míru kontaminace. Za kontaminaci byly celkem odpovědné 3 neznámé mikroorganismy, u kterých byly k jejich dourčení posléze provedeny základní morfologické a biochemické testy. Míra výskytu kontaminant závisela na intervalu odečtu, testovaném mikroorganismu, použité živné půdě či koncentraci zásobního roztoku vzorku.

Z důvodu zmíněné kontaminace bylo nutné zjistit její původ. Vzorek tak byl znovu naředěn sterilní destilovanou vodou jako 10 % a 1 % zásobní roztok a byl inkubován při laboratorní teplotě (ve tmě) bez inokula. Již v 1. den odečtu byla zaznamenána stejná kontaminace jako u vzorku s inokulem. Proto byla opět provedena izolace kolonií na různé typy živných půd a posléze bylo provedeno dourčení neznámých kmenů mikroorganismů. Stejný charakter kontaminace byl při obou koncentracích vzorku přítomen i 7., 14. a 28. den.

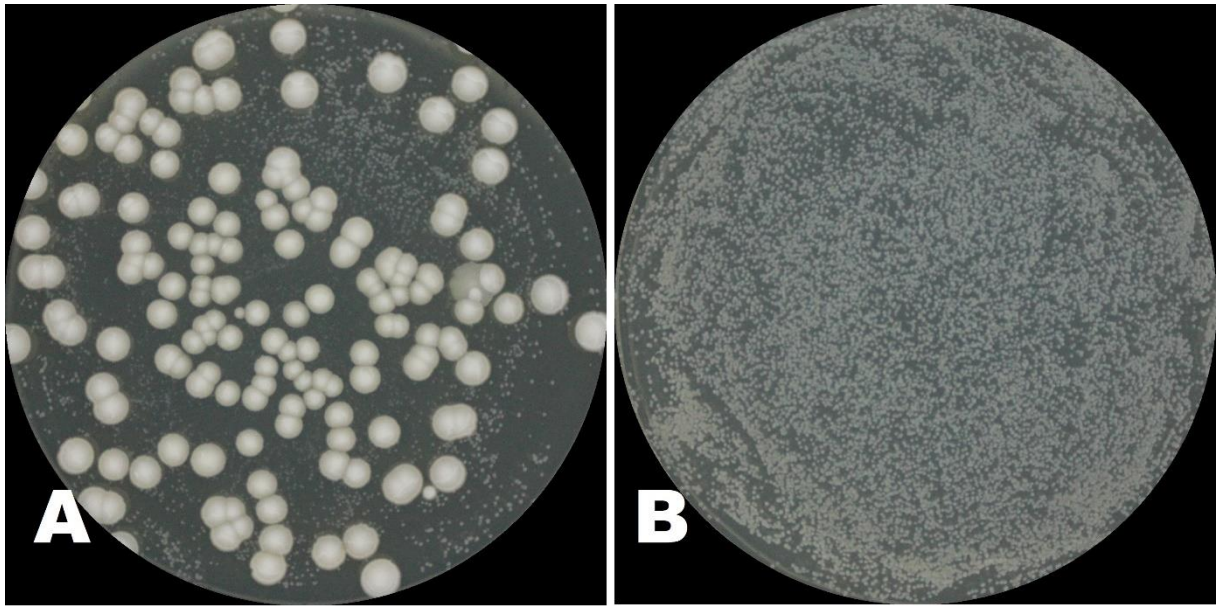
Výsledky identifikace neznámých kmenů, jenž byly odpovědné za kontaminaci vzorku, jsou vyjádřeny v podkapitole níže.

Dle **Přílohy 1** je patrné, že množství kolonií při testování 10 % zásobního roztoku se zaočkovaným inokulem bakterie *Staphylococcus aureus* (G<sup>+</sup> koky) bylo počítatelné v daném rozmezí (30 – 300 kolonií) dle předpisu počítání kolonií bakterií při ředění 10<sup>-4</sup> a celkový počet kolonií byl po zprůměrování dvou hodnot roven 43 koloniím. **Příloha 7** týkající se testování 1 % zásobního roztoku vzorku uvádí, že již při ředění 10<sup>-3</sup> byl stanoven celkový počet kolonií bakterie *Staphylococcus aureus* na hodnotu 261.

V **Příloze 2** je zobrazeno množství kolonií při testování 10 % zásobního roztoku s inokulem bakterie *Escherichia coli* (G<sup>-</sup> tyčinky), které bylo počítatelné již při prvním stupni desetinného ředění, tedy při ředění 10<sup>-1</sup>. Celkový počet kolonií byl po zprůměrování roven 61 koloniím. Dle údajů v **Příloze 8** týkajících se testování 1 % zásobního roztoku je zaznamenáno množství počítatelných kolonií bakterie *Escherichia coli* též při ředění 10<sup>-1</sup> a počet byl roven 41 koloniím.

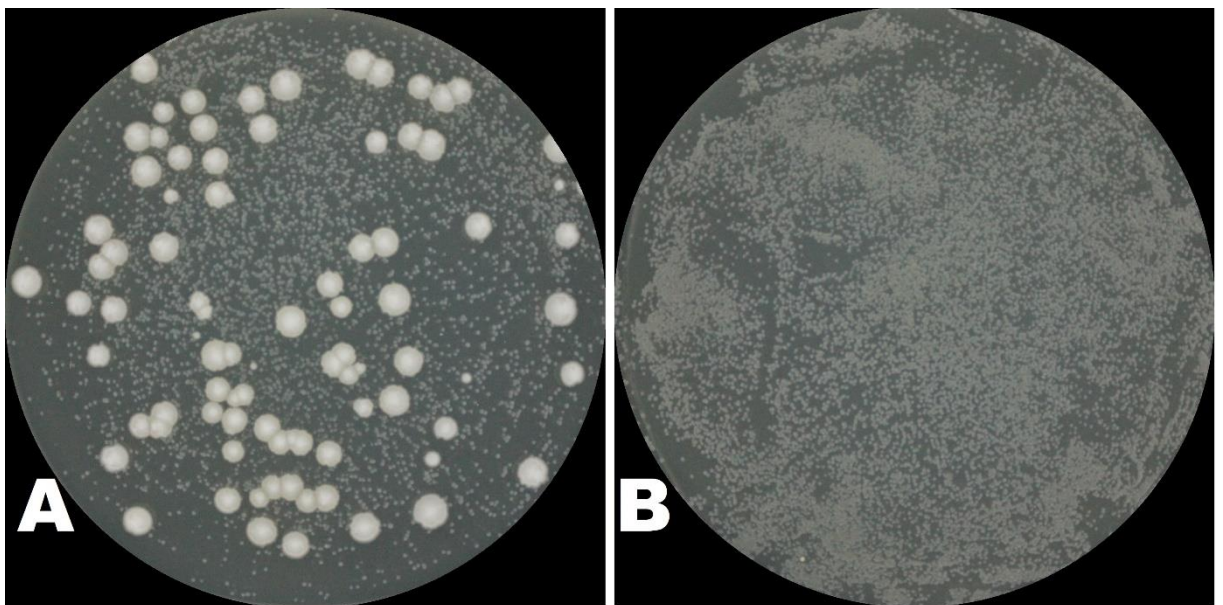
**Příloha 3** obsahuje data množství kolonií bakterie *Pseudomonas aeruginosa* (G<sup>-</sup> tyčinky) v 10 % zásobním roztoku vzorku. Množství kolonií nacházející se ve vymezeném rozmezí, bylo stanoveno již při ředění 10<sup>-2</sup> a celkový počet spočtených kolonií byl roven 193. Z údajů v **Příloze 9** byl při testování 1 % zásobního roztoku zaznamenán pozorovatelný růst bakterie *Pseudomonas aeruginosa* již při ředění 10<sup>-2</sup>. Celkový počet kolonií byl při tomto ředění roven 56.

V 7. den odečtu, tedy 1. 11. 2017, nebyl viditelný žádný nárůst testovaných bakterií (*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*), ale naneštěstí byla zřetelná kontaminace všech pūd tvořící ředící řady. U ředících řad vytvořených z 10 % zásobních roztoků vzorku s jednotlivými inokuly byly ve všech případech za kontaminaci odpovědné 2 mikroorganismy (drobné a velké kolonie). U 1 % zásobních roztoků vzorku s inokuly byly všude vizuálně identifikovány pouze 1 mikroorganismus (drobné kolonie), a to v celém rozsahu koncentračních řad a s větší četností výskytu než u 10 % zásobního roztoků vzorků s inokuly (viz **Obr. 14**).

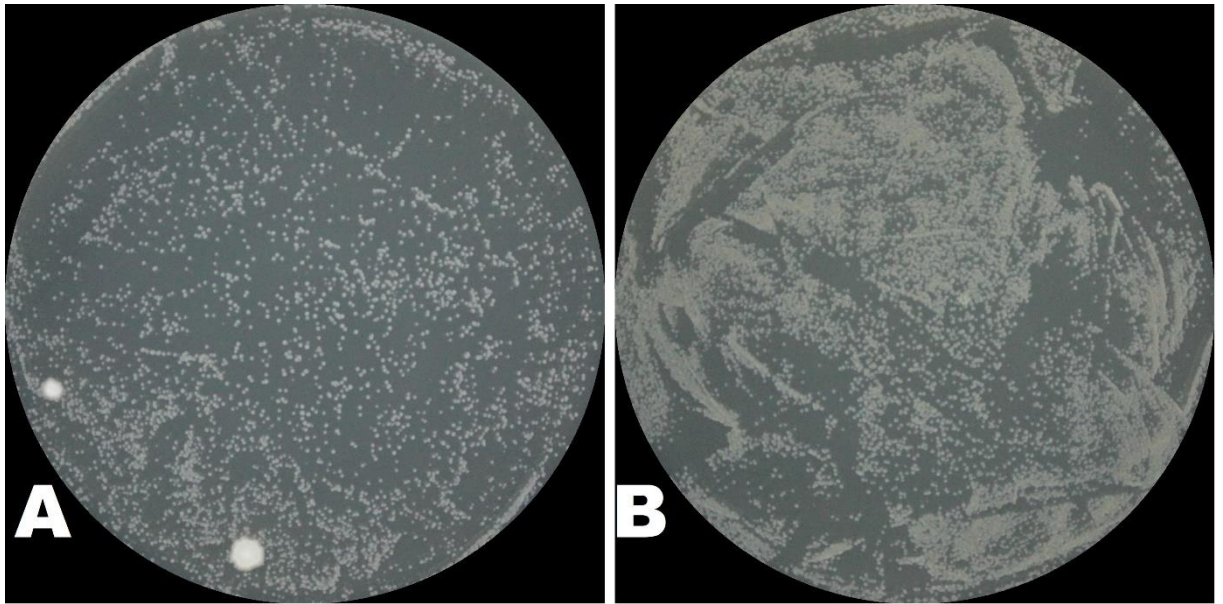


**Obrázek 14 Kontaminace vzorků s inokulem *E. coli* 7. den odečtu.** A) kontaminace 10 % zásobního roztoku vzorku s inokulem *E. coli* při ředění  $10^{-1}$ , B) kontaminace 1 % zásobního roztoku vzorku s inokulem *E. coli* při ředění  $10^{-1}$ . Živná půda Tryptone Soya agar (37 °C, 24 h). (foto: N. Voltnerová; BACMED).

8. 11. 2017, 14. den inkubace byly provedeny další odečty vzorků. Opět nebyl viditelný žádný nárůst testovaných bakterií. Na půdách byl zaznamenán pouze nárůst mikroorganismů, které byly odpovědné za kontaminaci (viz **Obr. 15**). Obdobných výsledků bylo dosaženo i 28. den odečtů, tedy 22. 11. 2017. (viz **Obr. 16**).



**Obrázek 15 Kontaminace vzorků s inokulem *E. coli* 14. den odečtu.** A) kontaminace 10 % zásobního roztoku vzorku s inokulem *E. coli* při ředění  $10^{-1}$ , B) kontaminace 1 % zásobního roztoku vzorku s inokulem *E. coli* při ředění  $10^{-1}$ . Živná půda Tryptone Soya agar (37 °C, 24 h). (foto: N. Voltnerová; BACMED).

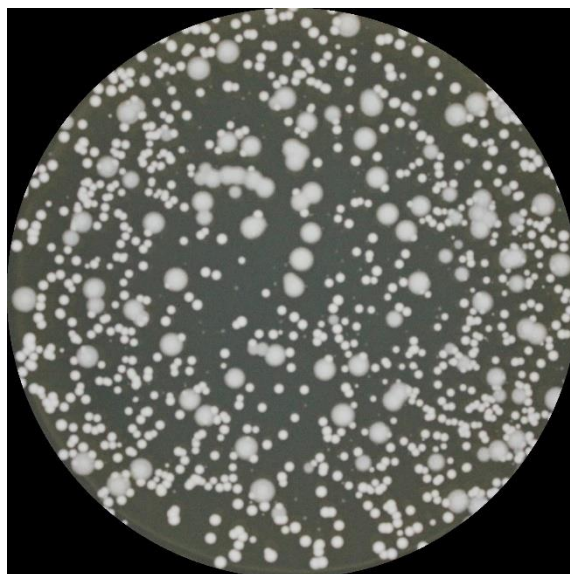


**Obrázek 16** Kontaminace vzorků s inokulem *E. coli* 28. den odečtu. A) kontaminace 10 % zásobního roztoku vzorku s inokulem *E. coli* při ředění  $10^{-1}$ , B) kontaminace 1 % zásobního roztoku vzorku s inokulem *E. coli* při ředění  $10^{-1}$ . Živná půda Tryptone Soya agar (37 °C, 24 h). (foto: N. Voltnerová; BACMED).

Jelikož nedošlo k žádnému nárůstu testovaných bakterií v žádném rozsahu ředících řad testování 10 % i 1 % zásobních roztoků vzorků s inokuly, tak bylo v obou případech splněno kritérium A, příloha B ČSN EN ISO 11930. Výsledky jsou zobrazeny v **Příloze 6 a 10**.

První odečet účinnosti konzervace 10 % a 1 % zásobního roztoku v kontextu testování udržitelnosti růstu kvasinky *Candida albicans* byl uskutečněn 27. 10. 2017. Již při tomto odečtu byla patrná kontaminace pouze u 10 % zásobního roztoku vzorku. Makroskopicky byly za původce kontaminace určeny dva rozdílné druhy mikroorganismů. Na základě dat uvedených v **Příloze 5** je patrné, že při testování 10 % zásobního roztoku již u ředění  $10^{-2}$  bylo možné stanovit celkový počet kolonií, který byl roven 90 koloniím. Ve srovnání s daty týkající se testování 1 % zásobního roztoku v **Příloze 11** je patrné, že byl při stejném ředění stanoven celkový počet kolonií mírně vyšší, tedy bylo spočteno 101 kolonií.

Následný týden 3. 11. 2017 (7. den) byly provedeny odečty, u kterých byl viditelný nárůst jednak testované kvasinky, a posléze i kolonií nežádoucí kontaminace (10 % zásobní roztok vzorku) (viz **Obr. 17**). U testování 10 % zásobního roztoku byl celkový počet kolonií při ředění  $10^{-2}$  roven 79. Počet mikroorganismů ve vzorku byl tak  $7,9 \cdot 10^3$  CFU/ml. Obdobně tomu bylo u 1 % zásobního roztoku, kdy byl počet kolonií při stejném ředění ( $10^{-2}$ ) spočten na hodnotu 91, což odpovídá počtu mikroorganismů ve vzorku  $9,1 \cdot 10^3$  CFU/ml.

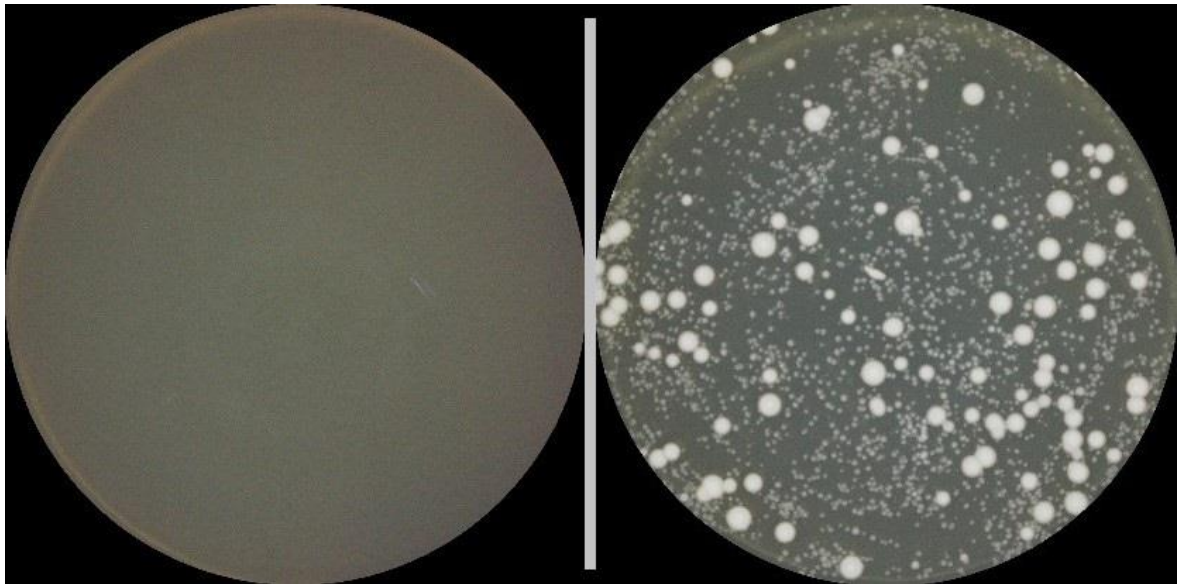


**Obrázek 17** Kontaminace vzorku s inokulem *C. albicans* 7. den odečtu. 10 % zásobní roztok vzorku, ředění  $10^{-1}$ , Sabouradův agar (30 °C, 48 h). (foto: N. Voltnerová; BACMED).

Odečty 14. den byly provedeny 8. 11. 2017, přičemž u 10 % zásobního roztoku vzorku nedošlo ke zvýšení počtu kolonií od předešlého intervalu, počet mikroorganismů ve vzorku byl  $3,2 \cdot 10^3$  CFU/ml. Oproti tomuto jevu u 1 % zásobního roztoku testovaného vzorku došlo k mírnému zvýšení počtu kolonií při stejném ředění ( $10^{-2}$ ) z 91 kolonií na 118 kolonií. Počet mikroorganismů ve vzorku byl roven  $1,18 \cdot 10^4$  CFU/ml.

Při provedení odečtů nebyla patrná žádná kontaminace. Na tento jev má pravděpodobně vliv změna základu živné půdy. Stejně jako u předešlých týdnů testování byl použit Sabouradův agar od stejného výrobce a stejného označení. Odlišnost spočívala v charakteru základu pro přípravu půd. Sypký základ byl obměněn za zcela nový typ granulovaného základu, ovšem postup přípravy půd zůstal nepozměněn.

Poslední interval odečtů byl proveden 22. 11. 2017 (28. den) a byl využit granulovaný základ pro přípravu živné půdy a opět nebyla znatelná žádná kontaminace. U 10 % zásobního roztoku vzorku bylo zaznamenáno snížení počtu kolonií kvasinky. Při ředění  $10^{-1}$  byl celkový počet 24 kolonií, počet mikroorganismů byl tedy roven hodnotě  $2,4 \cdot 10^2$  CFU/ml. Testovaný 1 % zásobní roztok vzorku nezaznamenal zvýšení počtu kolonií od předešlého intervalu, dokonce došlo k poklesu počtu kolonií na 15 při ředění  $10^{-2}$ . Počet mikroorganismů ve vzorku byl tedy  $1,5 \cdot 10^3$  CFU/ml. Dle výsledků v **Příloze 6** a **12** je zřejmé, že 10 % i 1 % zásobní roztok testovaného vzorku vůči patogenní kvasince *C. albicans* splňuje kritérium A, přílohy B ČSN EN ISO 11930.



**Obrázek 18** Kontaminace na Sabouradově půdách (30 °C, 48 h) s odlišným charakterem základu. 10 % zásobní roztok bez inokula. Vlevo byl vzorek vyočkován na Sabouradův agar s granulovaným základem (Himedia ME063), vpravo byl tentýž vzorek vyočkován na Sabouradův agar se sypkým základem (Himedia ME063). (foto: N. Voltnerová; BACMED).

Testovaný vzorek LAUROCIDS (3,5 % LA) external SMEDS koncentrát č. š. 25 0817 v koncentracích jako 10 % i 1 % zásobní roztok vyhověl požadavkům normy ČSN EN ISO 11930 vůči bakterii *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* a kvasince *Candida albicans*, ale bohužel byla již při jeho naředění sterilní destilovanou vodou prokázána přítomnost kontaminant. Jako postačující pro roli konzervants se jeví testovaný vzorek připravený jako 1 % zásobní roztok. Tento poznatek je podpořen studií Oh, Marshall (1993), kteří pro svůj výzkum využili 1 % zásobní roztok monolaurinu. Dále pojednávají o důležitém vlivu pH a teploty pro samotné testování vzorků na bázi monolaurinu.

Z důvodu zjištění již počáteční kontaminace bezprostředně po naředění vzorku sterilní destilovanou vodou bez předešlé inokulace testovaných mikroorganismů, lze na základě této skutečnosti zcela záměrně diskutovat o účinnosti daného vzorku jako konzervants dle normy ČSN EN ISO 11930, neboť celé mikrobiologické stanovení mohlo být ovlivněno nežádoucí kontaminací jeho samotného. Ke kontaminaci mohlo dojít během samotné přípravy vzorku, popřípadě při jeho manipulaci po syntéze. V mikrobiologické laboratoři Univerzity Pardubice bylo se vzorkem nakládáno za dodržení aseptických podmínek. Jelikož se jedná o zcela nový preparát, nebylo možné dohledat a srovnat výsledky jeho testování, provedeném jinou výzkumnou skupinou.



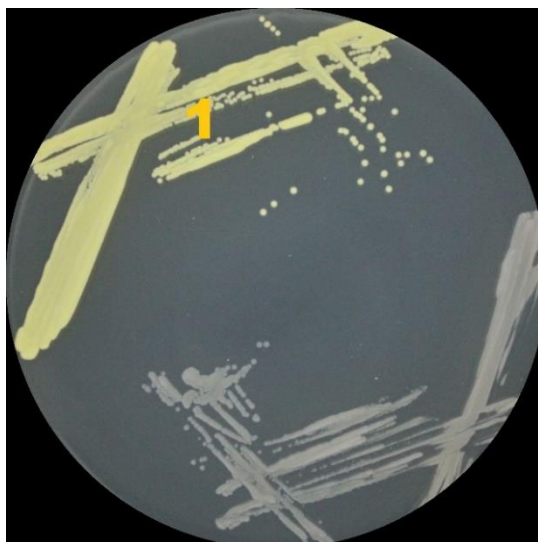
V budoucnu by bylo směřodatné připravit přípravek s pracovním názvem LAUROCIDS (3,5 % LA) external koncentrát znovu za dodržení stejných podmínek syntézy. Popřípadě provést syntézu vzorku za jiných fyzikálních či chemických podmínek, aby byla látka schopná splnit dostačující antimikrobiální ochranu, kterou požaduje již několikrát zmíněná norma. V případě splnění podmínek konzervace u tohoto vzorku se spekuluje o jeho možném využití jako antiseptika k hojení ran.

### 3.1.1 Identifikace původce kontaminace

Na základě získaných izolátů z 10 % a 1 % zásobního roztoku vzorku s jednotlivými inokuly testovaných mikroorganismů a též izolátů z 10 % a 1 % zásobního roztoku vzorku bez inokul, byla zjištěna přítomnost 3 kmenů mikroorganismů, zodpovědných za nežádoucí kontaminaci vzorku LAUROCIDS (3,5 % LA). Je nutné podotknout, že všechny 3 kmeny mikroorganismů současně se nacházely v naředěných vzorcích s i bez inokul pouze v 1. den odečtu. Tento poznatek byl uskutečněn na základě vizuálního porovnání izolátů na živných půdách a dále prostřednictvím provedených základních morfologických a biochemických testů.

První mikroorganismus narostlý na masopeptonovém agaru (živný agar č. 2) měl po inkubaci v termostatu (37 °C, 24 h) charakteristické sytě žluté zbarvení, povrch se jevil jako lesklý a hladký, tvar kolonií byl kruhový, zápach kvasničný. Na krevním agaru se po inkubaci (37 °C, 24 h) neprojevila hemolýza. Tento mikroorganismus na MALT agaru po inkubaci (30 °C, 48 h) nenarostl. Po provedení Gramova barvení byl dle mikroskopického pozorování hodnocen jako gram-pozitivní (modro-fialové koky samostatně či v tetradách). Při zkoumání nativního preparátu byl zjištěn pouze Brownův pohyb. Dle Burriho barvení nebyla přítomna pouzdra. Dále byly provedeny biochemické testy, kdy byla prokázána pozitivní kataláza a též pozitivní oxidáza. Růst tohoto mikroorganismu se projevil u všech vzorků s i bez inokula jen 1. den odečtu v závislosti na charakteru živné půdy.

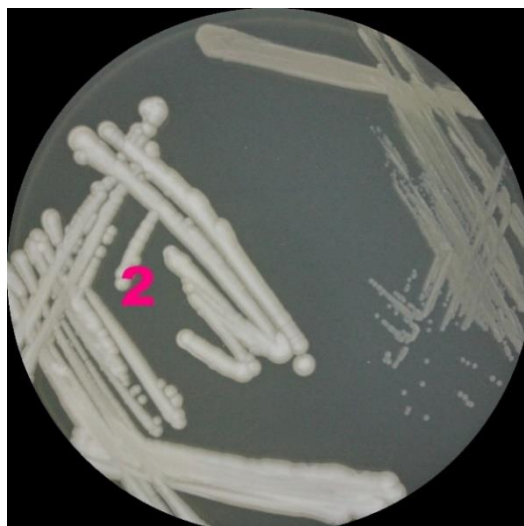
Po provedení testů byl neznámý kmen identifikován jako bakterie z rodu *Micrococcus*. Tento závěr je podpořen článkem publikovaným Greenblatt *et al.* (2003), kde popisují rod *Micrococcus* jako gram-pozitivní nepohyblivé koky, pro které je charakteristické uspořádání v tetradách. Dále uvádějí, že se tento rod přirozeně vyskytuje v prostředí kolem nás. Cullimore (2000) ve své publikaci popisuje pro rod *Micrococcus* charakteristický žlutý pigment, dále dle biochemických testů popisuje pozitivní produkci katalázy a oxidázy. Též uvádí, že se tento mikroorganismus přirozeně vyskytuje v životním prostředí (voda, půda) nebo dokonce na povrchu našeho těla.



**Obrázek 19 Izolát 1 z kontaminovaných vzorků na půdě MPA (37 °C, 24 h).** Izolát 1 je na fotografii zobrazen popiskem s číslem 1. (foto: N. Voltnerová; BACMED).

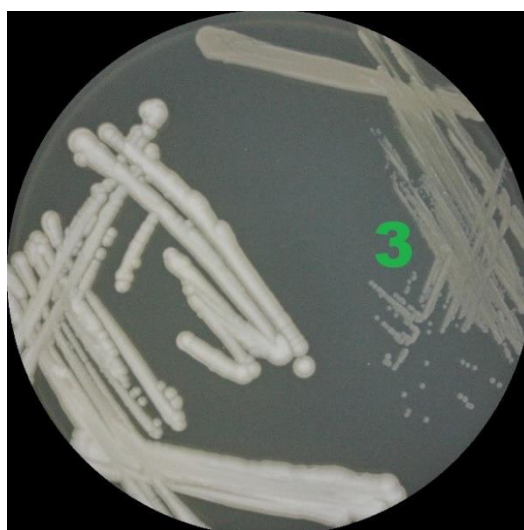
Druhý mikroorganismus po inkubaci na masopeptonovém agaru (37 °C, 24 h) tvořil velké nepravidelné kolonie, mléčného zabarvení a kvasničné vůně. Na krevním agaru nebyla po inkubaci (37 °C, 24 h) přítomna hemolýza. Na MALT agaru (30 °C, 48 h) se tento mikroorganismus projevil s totožnými morfologickými vlastnostmi jako u masopeptonového agaru. Prostřednictvím provedení dalších testů byl mikroorganismus stanoven jako gram-pozitivní (modro-fialové velké koky až tyčinky), pohyblivý, kataláza silně pozitivní, oxidáza negativní. Dále byla dle Burriho barvení prokázána přítomnost pouzder. Mikroorganismus byl přítomen ve všech 10 % vzorcích s inokuly a ve všech vzorcích bez inokula v obou ředění po celý interval všech odečtů.

Mikroorganismus 2 byl na základě provedených testů identifikován jako bakterie z rodu *Bacillus*, která je přítomna přirozeně v životním prostředí. Závěr plně koreluje s popisem rodu *Bacillus* v publikaci vydanou Public Health England (2018). Tento rod je zde klasifikován jako jeden z nejrozšířenějších a všudypřítomných mikroorganismů, který je znám extrémní fenotypovou rozmanitostí a heterogenitou. Společným znakem je vysoká adaptabilita vůči vlivům vnějšího prostředí a též skutečnost, že se jedná o gram-pozitivní bakterie. Winn *et al.* (2006) také popisují rod *Bacillus* jako rozmanitý s odlišnými fenotypovými a biochemickými vlastnosti. Také zdůrazňují vysokou přizpůsobivost vůči podmínkám vnějšího prostředí, čemuž napomáhá schopnost tvořit spory za přístupu kyslíku. Z tohoto důvodu mikroorganismus 2 vyrostl i na MALT agaru s kyselejším pH.



**Obrázek 20** Izolát 2 z kontaminovaných vzorků na půdě MPA (37 °C, 24 h). Izolát 2 je na fotografii zobrazen popiskem s číslem 2. (foto: N. Voltnerová; BACMED).

Třetí mikroorganismus se makroskopicky na masopeptonového agaru (37 °C, 24 h) jevil jako drobné, matné kolonie s pravidelným okrajem, šedým zbarvením a kvasničnou vůní. Na krevním agaru (37 °C, 24 h) jeho růst nedoprovázela hemolýza. Mikroorganismus také hojně vyrostl na MALT agaru (30 °C, 48 h), kde tvořil drobné, šedé kolonie. Na základě Gramova barvení byl mikroorganismus pod mikroskopem pozorován jako gram-pozitivní nerozvětvené tyčinky. Dále u něho nebyl zaznamenán pohyb, dle biochemických testů byl kataláza negativní a oxidáza silně pozitivní. Mikroorganismus byl hojně přítomen ve všech vzorcích s i bez inokula po celou dobu testování. Ve srovnání s výše zmíněnými mikroorganismy, kteří byli odpovědní za nežádoucí kontaminaci, byla četnost izolátu 3 ve vzorcích LAUROCIDS (3,5 % LA) s i bez inokula největší.



**Obrázek 21** Izolát 3 z kontaminovaných vzorků na půdě MPA (37 °C, 24 h). Izolát 2 je na fotografii zobrazen popiskem s číslem 2. (foto: N. Voltnerová; BACMED).

Prostřednictvím sledovaných makroskopických a mikroskopických morfologických znaků a na základě provedených základních biochemické testů, se bohužel nepodařilo tento rod blíže specifikovat.

V případě přítomnosti tohoto neznámého mikroorganismu v téže látce připravené v budoucnu, by bylo směřodlatné provést identifikaci mikroorganismu s využitím moderní techniky, která se běžně používá ve větších mikrobiologických a referenčních laboratořích, zvané MALDI-TOF.

### 3.2 Stanovení minimální inhibiční koncentrace

Pro provedení testů stanovení minimální inhibiční koncentrace byly všechny vzorky dodány firmou K2 Pharm s. r. o. se sídlem v Opavě. Tato zmíněná firma ovšem nezodpovídala za výrobu a distribuci jednotlivých vzorků, ale pouze posloužila jako jejich poskytovatel a zadavatel samotného testování. Celkem bylo testováno šest vzorků, přičemž pět z nich byly přípravky na bázi kyseliny laurové a jejich derivátů. Posledním testovaným vzorkem byl  $\epsilon$ -poly-L-lysin. Cílem testování bylo porovnat antimikrobiální účinnost všech přípravků a vybrat vzorek s nejlepšími výsledky.

Pro mikrobiologické testování a stanovení minimální inhibiční koncentrace byly vybrány vzorky: Monolaurin syntetický min 98 % MAG 12 č. š. 1164/152 VÚOS, Rybitví; Monolaurin 90 %, č. š. 01604878, Mosselman, Belgie; LAURICIDIN® min. 95 %, č. š. 121605, Med-Chem Labs Inc., USA, Kyselina laurová 99,5 %, č. š. 020010080, HSH Chemie, Praha; Propylenglycol Monolaurate LAUROGLYCOL® 90, č. š. 162978, Gattefossé, Francie a Epsilon-poly-L-lysin 98 %, č. š. 161201A, Zhengzhou Binafo Bioengineering Co., China. Antimikrobiální účinnost všech vzorků byla ověřena vůči vybraným gram-pozitivním (*Staphylococcus aureus* CCM 2022, *Micrococcus luteus* CCM 735, *Bacillus subtilis* CCM 2215, meticilin rezistentní *Staphylococcus aureus* (MRSA) klinický izolát z FNHK a vankomycin rezistentní *Enterococcus* (VRE) klinický izolát z FNHK) a gram-negativním bakteriím (*Escherichia coli* CCM 4517 a *Pseudomonas aeruginosa* CCM 3955).

Testování vzorků bylo postupně uskutečněno v časovém rozmezí 12. – 21. 9. 2017. Výsledky stanovení minimální inhibiční koncentrace jsou uvedeny v **Příloze 13, 14, 15, 16, 17 a 18.**

Nejdříve proběhlo testování a porovnávání třech vzorků (12. – 15. 9. 2017) na bázi glycerol monolaurátu, které se ovšem lišily procentuálním obsahem účinné látky. Monolaurin syntetický min 98 % MAG 12 č. š. 1164/152 VÚOS, Rybitví (**Příloha 13**); Monolaurin 90 %, č. š. 01604878, Mosselman, Belgie (**Příloha 14**); LAURICIDIN® min. 95 %, č. š. 121605, Med-Chem Labs Inc., USA (**Příloha 15**), všechny uvedené vzorky byly dodány v práškové formě a za dodržení aseptických podmínek byly rozpuštěny v absolutním ethanolu (96 %). Všechny tři vzorky vykazovaly stejné výsledky. U sbírkových kmenů gram-pozitivních bakterií byla stanovena MIC u těchto testovaných látek 25 µg/ml. Klinické izoláty gram-pozitivních rezistentních kmenů vůči antibiotikům, MRSA a VRE, vykazovaly oproti ostatním testovaným gram-pozitivním bakteriím horší výsledky. MIC bakterie MRSA byla u všech výše uvedených vzorků glycerol monolaurátu stanovena na hodnotu 50 µg/ml a u VRE byla MIC rovna 100 µg/ml. Antimikrobiální účinek těchto vzorků vůči gram-negativním bakteriím nebyl v testovaném koncentračním rozmezí zaznamenán. Na základě výsledků testování se jevil jako postačující vzorek s označením Monolaurin 90 %, č. š. 01604878, Mosselman, Belgie. Pro bližší porovnání účinku těchto tří vzorků by bylo vhodné stejným postupem celé testování opakovat při nižších koncentracích vzorků, aby byly pokryty i koncentrace nižší než 25 µg/ml.

Zare *et al.* (2014) provedli stanovení antimikrobiálního účinku vzorku Monolaurin (Lauricidin, Galena) vůči gram-pozitivní bakterii *S. aureus* a gram-negativní bakterii *E. coli*. Během jejich výzkumu zaznamenali obdobný výsledek účinku testovaného vzorku vůči bakterii *E. coli*, jako je uvedeno v této diplomové práci. To znamená, že nebyla zjištěna žádná inhibice růstu v rozmezí testované koncentrační řady (>4000 µg/ml). Jediným rozdílem byl rozsah testované koncentrační řady, neboť v této diplomové práci byla pro testování připravena řada v koncentračním rozmezí 0 – 1500 µg/ml. V jejich výzkumu byla MIC vůči bakterii *S. aureus* rovna 128 µg/ml. Hodnota se neshoduje s výsledkem testování uvedeném v této diplomové práci (25 µg/ml). Rozdíl ve výsledcích mohl být způsoben skutečností, že během výzkumu Zare *et al.* byl využit jiný sbírkový kmen *S. aureus*. Shoda obou prací spočívá ve stejném závěru, že gram-pozitivní testovaná bakterie (*S. aureus*) je citlivější vůči glycerol monolaurátu než testovaná gram-negativní bakterie (*E. coli*). Neboť gram-pozitivní bakterie mají buněčnou stěnu tvořenou z peptidoglykanu, ale u gram-negativních bakterií je struktura membrány odlišná. U gram-negativních bakterií je peptidoglykanová vrstva lokalizována mezi cytoplazmatickou membránou a liposacharidovou vrstvou. Z tohoto důvodu nemohou antimikrobiální látky tak snadno projít skrze vnější membránu gram-negativních bakterií.

Růžička *et al.* (2003) taktéž publikovali obdobné výsledky jejich výzkumu zabývajícím se testováním antimikrobiálního účinku vzorku Monolaurinu vůči vybraným gram-pozitivním a gram-negativním bakteriím. Výsledky jejich práce také nezaznamenaly žádný antimikrobiální účinek Monolaurinu vůči gram-negativním bakteriím (*E. coli*, *P. aeruginosa*) v celém rozsahu zvolené koncentrační řady (>500 µg/ml). Výsledky testování účinku vůči gram-pozitivním bakteriím se od uvedených v této diplomové práci mírně lišily. Avšak splňovaly skutečnost vyššího antimikrobiálního účinku vzorku vůči gram-pozitivním než vůči gram-negativním bakteriím. V jejich práci byla MIC vůči bakterii *B. subtilis* rovna 20 µg/ml a MIC bakterie *S. aureus* byla stanovena na hodnotu 35 µg/ml. Mírná odlišnost ve výsledcích mohla vzniknout na základě použití odlišných sbírkových kmenů vybraných bakterií.

Kyselina laurová 99,5 %, č. š. 020010080, HSH Chemie, Praha (**Příloha 16**), byla dalším testovaným vzorkem (12. – 15. 9. 2017). Vzorek byl dodán ve formě prášku a následně byl rozpuštěn v absolutním ethanolu (96 %). Oproti výše uvedeným vzorkům glycerol monolaurátu tento vzorek vykazoval nižší antimikrobiální účinek. U jednotlivých sbírkových kmenů gram-pozitivních bakterií se MIC lišila. Největší antimikrobiální účinek vzorku byl zaznamenán vůči bakterii *M. luteus*, kdy MIC byla rovna 25 µg/ml. MIC vůči bakterii *B. subtilis* byla 100 µg/ml a MIC vůči *S. aureus* byla dokonce stanovena na hodnotu 250 µg/ml. Účinek vzorku vzhledem ke klinickému izolátu VRE byl opět nižší, MIC byla rovna 500 µg/ml a u klinického izolátu MRSA byla MIC stanovena až při hodnotě 1500 µg/ml. Stejně jako u vzorků glycerol monolaurátu nebyla u gram-negativních bakterií zaznamenána inhibice růstu v testovaném koncentračním rozmezí.

Vyšší antimikrobiální účinnost glycerol monolaurátu (monolaurinu) než kyseliny laurové u gram-pozitivní bakterie *S. aureus* (klinický izolát) uvádí taktéž výzkum publikovaný Kelsey *et al.* (2006). Výsledky MIC pro glycerol monolaurát jsou obdobné jako v této diplomové práci (25 µg/ml), ale výsledky MIC pro kyselinu laurovou se liší. V našem případě byla MIC stanovena při hodnotě 100 µg/ml a autory článku byla MIC stanovena již při hodnotě 50 µg/ml. Rozdíl ve výsledku testování mohl být ovlivněn odlišným původem zvoleného mikroorganismu. V našem případě bylo testování provedeno na sbírkovém kmeni bakterie *S. aureus* a v tomto výzkumu proběhlo testování na klinickém izolátu bakterie *S. aureus* (původce bovinní mastitidy).

Další testovaný vzorek s označením Propylenglycol Monolaurate LAUROGLYCOL® 90, č. š. 162978, Gattefossé, Francie (**Příloha 17**), jako jediný z testovaných vzorků měl charakter kapaliny. Testování bylo uskutečněno 18. – 21. 9. 2017. Nejdříve byla snaha vzorek rozpustit ve sterilní destilované vodě, ale nedošlo k žádné homogenizaci kapalin. Poté byl vzorek rozpuštěn jako v předešlých případech v absolutním ethanolu (96 %). Jelikož se jednalo o bezbarvou kapalinu, nebylo možné určit, zda došlo ke 100 % rozpuštění vzorku v ethanolu. Ze všech testovaných vzorků vykazoval nejnižší antimikrobiální účinnost. U gram-negativních bakterií nebyla opět zaznamenána žádná inhibice růstu v rozsahu testovaných koncentrací. Inhibice nebyla při testovaných koncentracích zachycena ani vůči gram-pozitivní bakterii *S. aureus* a bakterii VRE. Nejvyšší antimikrobiální účinek měl vzorek vůči gram-pozitivní bakterii *M. luteus*, kdy MIC byla stanovena na hodnotu 25 µg/ml. MIC pro gram-pozitivní bakterii *B. subtilis* byla 500 µg/ml a pro MRSA byla 1000 µg/ml.

Výsledky jiné studie zabývající se antimikrobiální účinností propylenglykol monolaurátu se nepodařilo dohledat. Tato skutečnost je podpořena patentem, který publikoval již koncem minulého století Andrews (1996). Uvádí v něm, že využití propylenglykol monolaurátu při vyšším množství než 3 % roztok se nedoporučuje, a to z důvodu jeho špatné rozpustitelnosti. Při studii antimikrobiální účinnosti uvedené v této diplomové práci se k testování použil dokonce 5 % zásobní roztok tohoto vzorku. Jestliže nebyl propylenglykol monolaurát dokonale homogenizován za použití roztoku absolutní ethanolu (96 %) jako rozpouštědla, tak tato skutečnost mohla být odpovědná za nedostačující výsledky při jeho testování.

Poslední testovanou látkou byl vzorek s označením Epsilon-poly-L-lysine 98 %, č. š. 161201A, Zhengzhou Binafo Bioengineering Co., China (**Příloha 18**). Jak už název vzorku napovídá, nejednalo se o vzorek se žádným obsahem kyseliny laurové. Stanovení minimálních inhibičních koncentrací vůči jednotlivým bakteriím  $\epsilon$ -poly-L-lysinu posloužilo pouze pro porovnání výsledku jeho antimikrobiálního účinku s výsledky výše testovaných vzorků s jiným charakterem složení. Testování bylo uskutečněno 18. – 21. 9. 2017. Vzorek byl dodán ve formě prášku a nebyl rozpustný v absolutním ethanolu (96 %). Z tohoto důvodu byla jako rozpouštědlo vybrána sterilní destilovaná voda, ve které se vzorek plně homogenizoval. Minimální inhibiční koncentrace (MIC) pro všechny sbírkové kmeny gram-pozitivních a gram-negativních bakterií byly 25 µg/ml. Stejná MIC (25 µg/ml) byla zaznamenána i u klinického izolátu gram-pozitivní bakterie MRSA. Hodnota MIC ve sledovaném rozsahu koncentrací nebyla zaregistrována pouze u klinického izolátu gram-pozitivní bakterie VRE.

$\epsilon$ -Poly-lysine je homopolyamid složený z 25 – 30 zbytků aminokyseliny L-lysinu. Jedná se také o látku obsaženou v přírodních zdrojích a jako přírodní antimikrobiální přísada do potravin byla v roce 2003 schválena úřadem FDA.  $\epsilon$ -Poly-lysine může být v lidském těle bez jakýchkoli vedlejších účinků rozložen a využit jako zdroj lysinu (Li *et al.*, 2014). Ve studii Shima *et al.* (1984) byla MIC vůči gram-pozitivním bakteriím (*S. aureus*, *M. luteus*, *B. subtilis* a další) a gram-negativním bakteriím (*E. coli*, *P. aeruginosa* a další) stanovena v rozmezí koncentrací 1 – 8  $\mu\text{g/ml}$ . Studie Li *et al.* (2014) prokázala MIC  $\epsilon$ -poly-lysinu vůči gram-pozitivní bakterii *S. aureus* při koncentraci 12,5  $\mu\text{g/ml}$  a MIC gram-negativní bakterie *E. coli* byla zaznamenána též při stejné koncentraci. Na základě srovnání výsledků uvedených v této diplomové práci a výsledků obou zmíněných výzkumů by bylo vhodné v budoucnu provést stejné testování, ovšem za předpokladu využití nižších koncentrací vzorku.



## 4 ZÁVĚR

- Přípravek s pracovním názvem LAUROCIDS (3,5 % LA) external SMEDS koncentrát č. š. 25 0817, testovaný jako 10 % a 1 % zásobní roztok ředěný sterilní destilovanou vodou, v obou případech vyhověl kritériu A daným normou ČSN EN ISO 11930. Norma slouží k určení schopnosti testovaného výrobku splnit antimikrobiální ochranu vůči bakteriím *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* a patogenní kvasince *Candida albicans*.
- Testovaný vzorek LAUROCIDS (3,5 % LA) external SMEDS koncentrát č. š. 25 0817 splnil kritérium normy, ale bohužel byla při obou koncentracích bezprostředně po jeho naředění sterilní destilovanou vodou prokázána nežádoucí kontaminace. Za původce kontaminace byly označeny 3 mikroorganismy (rod *Micrococcus*, rod *Bacillus* a blíže neidentifikované G<sup>+</sup> tyčinky). Jejich výskyt byl závislý na délce inkubace, složení živné půdy, testovaném mikroorganismu a koncentraci testovaného vzorku.
- V závislosti na zjištěné kontaminaci již samotného vzorku by bylo směřodlatné připravit vzorek znovu a celé testování zopakovat. A to z důvodu, že přítomnost kontaminant mohla do značné míry zkreslit získané výsledky.
- Stanovení minimální inhibiční koncentrace (MIC) bylo uskutečněno u dvou skupin vzorků s odlišnou účinnou látkou. Nadpočetní většinu testovaných látek tvořily vzorky na bázi kyseliny laurové a jejich derivátů, druhou skupinu tvořil ε-poly-L-lysin. Ze souboru testovaných vzorků vykazoval největší antimikrobiální účinek vzorek s označením Epsilon-poly-L-lysin 98 %, č. š. 161201A, Zhengzhou Binafo Bioengineering Co., China, u kterého byla MIC pro všechny testované bakterie, kromě bakterie vankomycin rezistentní *Enterococcus* (VRE), stanovena na hodnotu 25 µg/ml.
- Ze vzorků na bázi kyseliny laurové a jejich derivátů vykazovaly nejnižší hodnoty minimální inhibiční koncentrace vzorky na bázi glycerol monolaurátu. Pro všechny tři vzorky byly výsledky obdobné a MIC byla stanovena vůči všem sbírkovým kmenům gram-pozitivních bakterií na hodnotu 25 µg/ml. Inhibice růstu vůči gram-negativním bakteriím nebyla v celém koncentračním rozmezí zaznamenána.
- Na základě uskutečněných analýz byl u vzorků na bázi glycerol monolaurátu potvrzen jejich antimikrobiální účinek, který je podstatný pro výzkum a vývoj suplementů obsahující monoacylglyceroly. Podstata výzkumu spočívá v úpravě fyzikálních, chemických či biologických vlastností monolaurinu, s cílem vyvinout perorální suplementy s vyšším antimikrobiálním účinkem, nezatěžující lidský makroorganismus.

## 5 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- 1 AMON, P., SANDERSON, I. What is the microbiome? *Archives of Disease in Childhood: Education and Practice Edition*, 2017, **102**(5), s. 258–261.
- 2 ANDREWS, J.F. *Topical antimicrobial composition and method*. United States. US005569461A. 1996-10-29.
- 3 ANDREWS, J. M. Determination of minimum inhibitory concentrations. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, 2001, **48**(1), s. 5–16.
- 4 ARIAS, C. A., MURRAY, B. E. The rise of the *Enterococcus*: Beyond vancomycin resistance. *Nature Reviews Microbiology*, 2012, **10**(4), s. 266–278.
- 5 ARORA, R., CHAWLA, R., MARWAH, R., ARORA, P., SHARMA, R. K., KAUSHIK, V., GOEL, R., KAUR, A., SILAMBARASAN, M., TRIPATHI, R. P., BHARDWAJ, J. R. Potential of complementary and alternative medicine in preventive management of novel H1N1 flu (swine flu) pandemic: Thwarting potential disasters in the Bud. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*, 2011, **2011**, s. 1–16.
- 6 BAKER, J. L., BOR, B., AGNELLO, M., SHI, W., HE, X. Ecology of the Oral Microbiome: Beyond Bacteria. *Trends in Microbiology*, 2017, **25**(5), s. 362–374.
- 7 BALOUIRI, M., SADIKI, M., IBNSOUDA, S. K. Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 2016, **6**(2), s. 71–79.
- 8 BELIZÁRIO, J. E., NAPOLITANO, M. Human microbiomes and their roles in dysbiosis, common diseases, and novel therapeutic approaches. *Frontiers in Microbiology*, 2015, **6**(10), s. 1–16.
- 9 BOATENG, L., ANSONG, R., OWUSU, W. B., STEINER-ASIEDU, M. Coconut oil and palm oil's role in nutrition, health and national development: A review. *Ghana medical journal*, 2016, **50**(3), s. 189–196.
- 10 BRAUNDMEIER, A. G., LENZ, K. M., INMAN, K. S., CHIA, N., JERALDO, P., WALTHER-ANTÓNIO, M. R. S., BERG MILLER, M. E., YANG, F., CREEDON, D. J., NELSON, H., WHITE, B. A. Individualized medicine and the microbiome in reproductive tract. *Frontiers in Physiology*, 2015, **6**(4), s. 1–11.
- 11 CASADEVALL, A., PIROFSKI, L. N. Ditch the term pathogen. *Nature*. 2014, **516**, s. 165–166.

- 12 COSTA, C. A. B. P., PEREIRA, C. A., BACK-BRITO, G. N. Mini-review - *Candida albicans* biofilms : characteristics , clinical relevance , and drug susceptibility. *The battle against microbial pathogens: Basic science, Technological advances and Educational programs*, 2015, **1**, s. 413–421.
- 13 CULLIMORE, D. R. Practical Atlas for Bacterial Identification. 1. vydání. Boca Raton: CRC Press, 2000, 232 s. ISBN 1-56670-392-1.
- 14 ČSN EN ISO 11930. *Kosmetika - Mikrobiologie - Hodnocení antimikrobiální ochrany kosmetického výrobku*. Praha: Úřad pro technickou normalizaci, metrologii a státní zkušebnictví, 2012. 23 s. Třídící znak 68 1561.
- 15 DAVIDSON, P. M., SOFOS, J. N., BRANEN, A. L. Antimicrobials in food. 3. rozšířené a aktualizované vydání. Boca Raton: CRC Press, 2005, 706 s. ISBN 0-8247-4037-8.
- 16 DIB, J. R., LIEBL, W., WAGENKNECHT M., FARÍAS, M. E. Extrachromosomal genetic elements in *Micrococcus*, *Applied microbiology and biotechnology*, 2013, **97**(1), s. 63–75.
- 17 EARL, A. M., LOSICK, R., KOLTER, R. Ecology and genomics of *Bacillus subtilis*. *Trends in Microbiology*, 2008, **16**(6), s. 1–11.
- 18 FOCA, M., JAKOB, K., WHITTIER, S., LATTA, P. D., FACTOR, S., RUBENSTEIN, D., SAIMAN, L. Endemic *Pseudomonas aeruginosa* Infection in a Neonatal Intensive Care Unit. *New England Journal of Medicine*, 2000, **343**(10), s. 695–700.
- 19 FRIAS-LOPEZ, J. Targeting specific bacteria in the oral microbiome. *Trends in Microbiology*, 2015, **23**(9), s. 527–528.
- 20 GARCÍA, J. I., GARCÍA-MARÍN, H., PIRES, E. Glycerol based Solvents : Synthesis , Properties and Applications. *Green Chemistry*, 2010, **12**, s. 426–434.
- 21 GELLATLY, S. L., HANCOCK, R. E. W. *Pseudomonas aeruginosa*: New insights into pathogenesis and host defenses. *Pathogens and Disease*, 2013, **67**(3), s. 159–173.
- 22 GIATSI, CH., SIPKEMA, D., RAMIRO-GARCIA, J., BACANU, G. M., ABERNATHY, J., VERRETH, J., SMIDT, H., VERDEGEM, M. Probiotic legacy effects on gut microbial assembly in tilapia larvae. *Scientific Reports*, 2016, **6**(8), s. 1–11.
- 23 GOOSSENS, A. Contact-Allergic Reactions to Cosmetics. *Journal of Allergy*, 2011, **2011**, s. 1–6.
- 24 GOSS, CH. H., MUHLEBACH, M, S. Review: *Staphylococcus aureus* and MRSA in cystic fibrosis. *Journal of Cystic Fibrosis*, 2011, **10**(5), s. 298–306.

- 25 GREENBLATT, C. L., BAUM, J., KLEIN, B., NACHSHON, S., KOLTUNOV, V., CANO, R. J. *Micrococcus luteus* - Survival in Amber. *Microbial Ecology*, 2004, **48**, s. 120-127.
- 26 GRICE, E. A., SEGRE, J. A. The skin microbiome. *Nature Reviews Microbiology*, 2011, **9**(4), s. 244–253.
- 27 HAASE, A. T., RAKASZ, E., SCHULTZ-DARKEN, N., NEPHEW, K., WEISGRAU, K. L., REILLY, C. S., LI, Q., SOUTHERN, P. J., ROTHENBERGER, M., PETERSON, M. L., SCHLIEVERT, P. M. Glycerol monolaurate microbicide protection against repeat high-dose SIV vaginal challenge. *PLoS ONE*, 2015, **10**(6), s. 1–12.
- 28 HANCZAKOWSKA, E. The Use of Medium-Chain Fatty Acids in Piglet Feeding – A Review. *Annals of Animal Science*, 2017, **17**(4), s. 967–977.
- 29 HESS, D. J., HENRY-STANLEY, M. J., WELLS, C. L. Antibacterial synergy of glycerol monolaurate and aminoglycosides in *Staphylococcus aureus* biofilms. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2014, **58**(11), s. 6970–6973.
- 30 HUANG, D. B., MOHANTY, A., DUPONT, H. L., OKHUYSEN, P. C., CHIANG, T. A review of an emerging enteric pathogen: Enteroaggregative *Escherichia coli*. *Journal of Medical Microbiology*, 2006, **55**(10), s. 1303–1311.
- 31 CHEMIPOL. SENSICARE® Intelligent microbial control [online]. ©2010 [cit. 3. 4. 2018]. Dostupné z: <http://files.constantcontact.com/95822438401/006cdccb-2330-49b7-a7bb-fa8d69cb1396.pdf>.
- 32 JACKMAN, J. A., YOON, B. K., LI, D., CHO, N. J. Nanotechnology formulations for antibacterial free fatty acids and monoglycerides. *Molecules*, 2016, **21**(3), s. 1-19.
- 33 JAFARI, A., BOUZARI, S., ASLANI, M. M. *Escherichia coli*: A brief review of diarrheagenic pathotypes and their role in diarrheal diseases in Iran. *Iranian Journal of Microbiology*, 2012, **4**(3), s. 102–117.
- 34 JAMLUS, N. N. A., DERAWI, D., SALIMON, J. Production of MAG via enzymatic glycerolysis. *AIP Conference Proceedings*, 2015, **1678**(9), s. 1-7.
- 35 JANEČKOVÁ, K. Inhibiční vliv monoacylglycerolu kyseliny laurové na mikroorganismy. Zlín, 2009. 67 s. Bakalářská práce: Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, Fakulta technologická. Vedoucí práce: RNDr. Leona Buňková, Ph.D.
- 36 JANG, J., HUR, H. G., SADOWSKY, M. J., BYAPPANAHALLI, M. N., YAN, T., ISHII, S. Environmental *Escherichia coli*: ecology and public health implications—a review. *Journal of Applied Microbiology*, 2017, **123**(3), s. 570–581.

- 37 JARVIS, B. On the compositing of samples for qualitative microbiological testing. *Letters in Applied Microbiology*, 2007, **45**(6), s. 592–598.
- 38 KELSEY, J. A., BAYLESS, K. W., SHAFII, B., MCGUIRE, M. A. Fatty Acids and Monoacylglycerols Inhibit Growth of *Staphylococcus aureus*. *Lipids*, 2006, **41**(10), s. 951-961.
- 39 KESSLER, R. More than cosmetic changes: taking stock of personal care product safety. *Environmental Health Perspect*, 2015, **123**(5), s. A120-A127.
- 40 KILIAN, M., CHAPPLE, I. L. C., HANNIG, M., MARSH, P. D., MEURIC, V., PEDERSEN, A. M. L., TONETTI, M. S., WADE, W. G., ZAURA, E. The oral microbiome – an update for oral healthcare professionals. *British dental journal* , 2016, **221**(10), s. 657–666.
- 41 LAMONT, R. F., SOBEL, J. D., AKINS, R. A., HASSAN, S. S., CHAIWORAPONGSA, T., PEDRO, J., ROMERO, R. The vaginal microbiome: New information about genital tract using molecular based techniques. *An International Journal of Obstetrics and Gynaecology*, 2011, **118**(5), s. 533–549.
- 42 LAPPANO, R., SEBASTIANI, A., CIRILLO, F., RIGIRACCILO, D. C., GALLI, G. R., CURCIO, R., MALAGUARNERA, R., BELFIORE, A., CAPPELLO, A. R., MAGGIOLINI, M. The lauric acid-activated signaling prompts apoptosis in cancer cells. *Cell Death Discovery*, 2017, **3**(8), s. 1-9.
- 43 LAUB, K., KRISTÓF, K., TIRCZKA, T., TÓTHPÁL, A., KARDOS, S., KOVÁCS, E., SAHIN-TÓTH, J., HORVÁTH, A., DOBAY, O. First description of a catalase-negative *Staphylococcus aureus* from a healthy carrier, with a novel nonsense mutation in the *katA* gene. *International Journal of Medical Microbiology*, 2017, **307**(8), s. 431–434.
- 44 LEIGUE, L., MONTIANI-FERREIRA, F., MOORE, B. A. Antimicrobial susceptibility and minimal inhibitory concentration of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from septic ocular surface disease in different animal species. *Open Veterinary Journal*, 2016, **6**(3), s. 215–222.
- 45 LI, K., BIHAN, M., YOOSEPH, S., METHÉ, B. A. Analyses of the microbial diversity across the human microbiome. *PLoS ONE*, 2012, **7**(6), s. 1435–1439.
- 46 LI, Y.-Q., HAN, Q., FENG, J.-L., TIAN, W.-L., MO, H.-Z. Antibacterial characteristics and mechanisms of  $\epsilon$ -poly-lysine against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Food Control*, 2014, **43**, s. 22-27.
- 47 LIEBERMAN, S., ENIG, M. G., PREUSS, H. G. A Review of Monolaurin and Lauric Acid. *Alternative & Complementary Therapies*, 2006, **12**(6), s. 310–315.

- 48 LIN, Y. CH., SCHLIEVERT, P. M., ANDERSON, M. J., FAIR, CH. L., SCHAEFERS, M. M., MUTHYALA, R., PETERSON, M. L. Glycerol monolaurate and dodecylglycerol effects on *Staphylococcus aureus* and toxic shock syndrome toxin-1 *in vitro* and *in vivo*. *PLoS ONE*, 2009, **4**(10), s. 1–10.
- 49 LIU, B., FALLER, L. L., KLITGORD, N., MAZUMDAR, V., GHODSI, M., SOMMER, D. D., GIBBONS, T. R., TREANGEN, T. J., CHANG, Y. CH., LI, S., STINE, O. C., HASTURK, H., KASIF, S., SEGRÈ, D., POP M., AMAR, S. Deep sequencing of the oral microbiome reveals signatures of periodontal disease. *PLoS ONE*, 2012, **7**(6), s. 1-17.
- 50 LOWDEN, J., MILLER NEILAN, R., YAHDI, M. Optimal control of vancomycin-resistant enterococci using preventive care and treatment of infections. *Mathematical Biosciences*, 2014, **249**(1), s. 8–17.
- 51 LUPINDU, A. M. Epidemiology of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 in Africa in review. *Southern African Journal of Infectious Diseases*, 2018, **33**(1), s. 24–30.
- 52 MACINTYRE, D. A., SYKES, L., BENNETT, P. R., MACINTYRE, D. The human female urogenital microbiome: complexity in normality. *Emerging Topics in Life Sciences*, 2017, **1**, s. 363-372.
- 53 MATH, M. C., CHANDRASHEKHARA, K. N. Optimization of Alkali Catalyzed Transesterification of Safflower Oil for Production of Biodiesel. *Journal of Engineering*, 2016, **2016**, s. 1-7.
- 54 MÉTHOT, P. O., ALIZON, S. What is a pathogen? Toward a process view of host-parasite interactions. *Virulence*, 2014, **5**(8), s. 775–785.
- 55 MATHUR, H., FIELD, D., REA, M. C., COTTER, P. D., HILL, C., ROSS, R. P. Bacteriocin-Antimicrobial Synergy: A Medical and Food Perspective. *Frontiers in Microbiology*, 2017, **8**(1205), s. 1-18.
- 56 MILTIADOUS, G., ELISAF, M. Native valve endocarditis due to *Micrococcus luteus*: a case report and review of the literature. *Journal of Medical Case Report*, 2011, **5**, s. 1-3.
- 57 MOOTZ, J. M., BENSON, M. A., HEIM, C. E., CROSBY, H. A., KAVANAUGH, J. S., DUNMAN, P. M., KIELIAN, T., TORRES, V. J., HORSWILL, A. R. Rot is a key regulator of *Staphylococcus aureus* biofilm formation. *Molecular Microbiology*, 2015, **96**(2), s. 388–404.

- 58 MORADALI, M. F., GHODS, S., REHM, B. H. A. *Pseudomonas aeruginosa* Lifestyle: A Paradigm for Adaptation, Survival, and Persistence. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2017, **7**(2), s. 1-29.
- 59 NEMATI, M., HAMIDI, A., DIZAJ, S. M., JAVAHERZADEH, V., LOTFIPOUR, F. An overview on novel microbial determination methods in pharmaceutical and food quality control. *Advanced Pharmaceutical Bulletin*, 2016, **6**(3), s. 301–308.
- 60 NITBANI, F. O., JUMINA, SISWANTA, D., SOLIKHAH, E. N. Reaction path synthesis of monoacylglycerol from fat and oils. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*, 2015, **35**(1), s. 126–136.
- 61 NOBILE, C. J., JOHNSON, A. D. *Candida albicans* Biofilm and Human Disease. *Annual Review of Microbiology*, 2015, **69**, s. 71–92.
- 62 O'DRISCOLL, T., CRANK, CH. V. Vancomycin-resistant enterococcal infections: Epidemiology, clinical manifestations, and optimal management. *Infection and Drug Resistance*, 2015, **8**(7), s. 217–230.
- 63 OH, D.-H., MARSHALL, D. L. Influence of Temperature, pH, and Glycerol Monolaurate on Growth and Survival of *Listeria monocytogenes*. *Journal of Food Protection*, 1993, **56**(9), s. 744-749.
- 64 ONG, I. M., GONZALEZ, J. G., MCILWAIN, S. J., SAWIN, E. A., SCHOEN, A. J., ADLURU, N., ALEXANDER, A. L., YU, J.-P. J. Gut microbiome populations are associated with structure-specific changes in white matter architecture. *Translational Psychiatry*, 2018, **8**(1), s. 1-11.
- 65 OTTO, M. MRSA virulence and spread. *Cellular Microbiology*, 2012, **14**(10), s. 1513–1521.
- 66 PANDAK, N., PAJIĆ-PENAVIĆ, I., SEKELJ, A., TOMIĆ-PARADŽIK, M., ČABRAJA, I., MIKLAUŠIĆ, B. Bacterial colonization or infection in chronic sinusitis. *Wiener Klinische Wochenschrift*, 2011, **123**(11), s. 710–713.
- 67 PASQUA, M., MICHELACCI, V., DI MARTINO, M. L., TOZZOLI, R., GROSSI, M., COLONNA, B., MORABITO, S., PROSEDA, G. The intriguing evolutionary journey of enteroinvasive *E. coli* (EIEC) toward pathogenicity. *Frontiers in Microbiology*, 2017, **8**(12), s. 1–12.
- 68 PINYAPHONG, P., SRIBURI, P., PHUTRAKUL, S. Synthesis of Monoacylglycerol from Glycerolysis of Crude Glycerol with Coconut Oil Catalyzed by *Carica Papaya* Lipase. *International Journal of Chemical and Molecular Engineering*, 2012, **6**(10), s. 506–511.

- 69 PUBLIC HEALTH ENGLAND. UK Standards for Microbiology Investigations: Identification of *Bacillus* species [online]. 2018 [cit. 5. 4. 2018]. Dostupné z: [https://assets.publishing.service.gov.uk/government/uploads/system/uploads/attachment\\_data/file/697260/ID\\_9i3.1.pdf](https://assets.publishing.service.gov.uk/government/uploads/system/uploads/attachment_data/file/697260/ID_9i3.1.pdf).
- 70 QIN, J., LI, R., RAES, J., ARUMUGAM, M., BURGDORF, K. S., MANICHANH, CH., NIELSEN, T., PONS, N., LEVENEZ, F., YAMADA, T., MENDE, D. R., LI, J., XU, J., LI, S., LI, D., CAO, J., WANG, B., LIANG, H., ZHENG, H., XIE, Y., TAP, J., LEPAGE, P., BERTALAN, M., BATTO, J. M., HANSEN, T., LE PASLIER, D., LINNEBERG, A., NIELSEN, H. B., PELLETIER, E., RENAULT, P., SICHERITZ-PONTEN, T., TURNER, K., ZHU, H., YU, CH., LI, S., JIAN, M., ZHOU, Y., LI, Y., ZHANG, X., LI, S., QIN, N., YANG, H., WANG, J., BRUNAK, S., DORÉ, J., GUARNER, F., KRISTIANSEN, K., PEDERSEN, O., PARKHILL, J., WEISSENBACH, J., BORK, P., EHRLICH, S. D., WANG, J., ANTOLIN, M., ARTIGUENAVE, F., BLOTTIERE, H., BORRUEL, N., BRULS, T., CASELLAS, F., CHERVAUX, CH., CULTRONE, A., DELORME, CH., DENARIAZ, G., DERVYN, R., FORTE, M., FRISS, C., VAN DE GUCHTE, M., GUEDON, E., HAIMET, F., JAMET, A., JUSTE, C., KACI, G., KLEEREBEZEM, M., KNOL, J., KRISTENSEN, M., LAYEC, S., LE ROUX, K., LECLERC, M., MAGUIN, E., MELO MINARDI, R., OOZEER, R., RESCIGNO, M., SANCHEZ, N., TIMS, S., TORREJON, T., VARELA, E., DE VOS, W., WINOGRADSKY, Y., ZOETENDAL, E. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature*, 2010, **464**(4), s. 59–65.
- 71 RATAJCZAK, M., KUBICKA, M. M., KAMIŃSKA, D., SAWICKA, P., DŁUGASZEWSKA, J. Microbiological quality of non-sterile pharmaceutical products. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 2015, **23**, s. 303–307.
- 72 RELMAN, D. A. 2020 visions - Microbiome. *Nature*, 2010, **463**(7), s. 26–27.
- 73 RUZIN, A., NOVICK, R. P. Equivalence of Lauric Acid and Glycerol Monolaurate as Inhibitors of Signal Transduction in *Staphylococcus aureus*. *Journal of Bacteriology*, 2000, **182**(9), s. 2668-2671.
- 74 RŮŽIČKA, J., VELCLOVÁ, K., JANIŠ, R., KREJČÍ, J. Antimicrobial effects of 1-monoacylglycerols prepared by catalytic reaction of glycidol with fatty acids. *European Food Research and Technology*, 2003, **217**, s. 329-331.



- 75 SARDI, J. C. O., SCORZONI, L., BERNARDI, T., FUSCO-ALMEIDA, A. M., MENDES GIANNINI, M. J. S. *Candida* species: Current epidemiology, pathogenicity, biofilm formation, natural antifungal products and new therapeutic options. *Journal of Medical Microbiology*, 2013, **62**, s. 10–24.
- 76 SCANNAPIECO, F. A. The oral microbiome: Its role in health and in oral and systemic infections. *Clinical Microbiology Newsletter*, 2013, **35**(20), s. 163–169.
- 77 SELEEM, D., CHEN, E., BENSO, B., PARDI, V., MURATA, R. M. *In vitro* evaluation of antifungal activity of monolaurin against *Candida albicans* biofilms. *PeerJ*, 2016, **4**, e2148.
- 78 SELLAM, A., WHITEWAY, M. Recent advances on *Candida albicans* biology and virulence. *F1000Research*, 2016, **5**, s. 1-7.
- 79 SETIANTO, W. B., WIBOWO, T. Y., YOHANES, H., ILLANINGTYAS, F., ANGGORO, D. D. Synthesis of glycerol mono-laurate from lauric acid and glycerol for food antibacterial additive. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 2017, **65**, s. 1-7.
- 80 SHAFI, J., TIAN, H., JI, M. *Bacillus* species as versatile weapons for plant pathogens: a review. *Biotechnology and Biotechnological Equipment*, 2017, 31(3), s. 446–459.
- 81 SHIMA, S., MATSUOKA, H., IWAMOTO, T., SAKAI, H. Antimicrobial action of  $\epsilon$ -poly-L-lysine. *The Journal of Antibiotics*, 1984, **37**(11), s. 1449-1455.
- 82 SHUKLA, S. D., BUDDEN, K. F., NEAL, R., HANSBRO, P. M. Microbiome effects on immunity, health and disease in the lung. *Clinical & Translational Immunology*, 2017, **6**(3), e133.
- 83 SCHARSCHMIDT, T. C., FISCHBACH, M. A. What lives on our skin: Ecology, genomics and therapeutic opportunities of the skin microbiome. *Drug Discovery Today: Disease Mechanisms*, 2013, **10**(3–4), s. 83–89.
- 84 SCHLIEVERT, P. M., PETERSON, M. L. Glycerol monolaurate antibacterial activity in broth and biofilm cultures. *PLoS ONE*, 2012, **7**(7), e40350.
- 85 SIDHU, M., VAN DER POORTEN, D. The gut microbiome. *Australian Family Physician*. 2017, **46**(4), s. 206-211.
- 86 SKŘIVANOVÁ, E., MAROUNEK, M., BENDA, V., BŘEZINA, P. Susceptibility of *Escherichia coli*, *Salmonella* sp. and *Clostridium perfringens* to organic acids and monolaurin. *Veterinarní Medicína*, 2006, **51**(3), s. 81-86.
- 87 Slovník cizích slov. 1. vydání. Praha: Ottovo nakladatelství, s. r. o., 2000, 708 s. ISBN 80-7181-376-1.

- 88 SWARUPA, V., CHAUDHURY, A., SARMA, P. V. G. K. Iron enhances the peptidyl deformylase activity and biofilm formation in *Staphylococcus aureus*. *3 Biotech*, 2018, **8**, s. 1–8.
- 89 TAN, H. W., ABDUL AZIZ, A. R., AROUA, M. K. Glycerol production and its applications as a raw material: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 2013, **27**, s. 118–127.
- 90 TONG, S. Y.C., DAVIS, J. S., EICHENBERGER, E., HOLLAND, T. L., FOWLER, V. G. *Staphylococcus aureus* infections: Epidemiology, pathophysiology, clinical manifestations, and management. *Clinical Microbiology Reviews*, 2015, **28**(3), s. 603–661.
- 91 *Velký lékařský slovník* [online]. Maxdorf 1998-2018 [cit. 22. 03. 2018]. Dostupné z: <http://lekarske.slovníky.cz/>.
- 92 VENTOLA, C. L. The Antibiotic Resistance Crisis: Part 1: Causes and Threats. *Pharmacy and Therapeutics*, 2015, **40**(4), s. 277-283.
- 93 VIDAL, L., THUAULT, V., MANGAS, A., COVEÑAS, R., THIENPONT, A., GEFFARD, M. Lauryl-poly-L-lysine: A New Antimicrobial Agent? *Journal of Amino Acids*, 2014, **2014**, s. 1-10.
- 94 VILA, J., SÁEZ-LÓPEZ, E., JOHNSON, J. R., RÖMLING, U., DOBRINDT, U., CANTÓN, R., GISKE, C. G., NAAS, T., CARATTOLI, A., MARTÍNEZ-MEDINA, M., BOSCH, J., RETAMAR, P., RODRÍGUEZ-BANÑO, J., BAQUERO, F., SOTO, S. M. *Escherichia coli*: An old friend with new tidings. *FEMS Microbiology Reviews*, 2016, **40**, s. 437–463.
- 95 VOGTMANN, E., GOEDERT, J. J. Epidemiologic studies of the human microbiome and cancer. *British Journal of Cancer*, 2016, **114**, s. 237–242.
- 96 WINN, W., ALLEN, S., JANDA, W., KONEMAN, E., PROCOP, G., SCHRECKENBERGER, P., WOODS, G. Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology. 6. rozšířené a přepracované vydání. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2006, 1565 s. ISBN 0-7817-3014-7.
- 97 WINSTANLEY, C., O'BRIEN, S., BROCKHURST, M. A. *Pseudomonas aeruginosa* Evolutionary Adaptation and Diversification in Cystic Fibrosis Chronic Lung Infections. *Trends in Microbiology*, 2016, **24**(5), s. 327–337.

- 98 ZARE, M. A., ROHANI, S. M. R., RAEISI, M., HOSSEINI, S. H. J., HASHEMI, M. Antibacterial Effects of Monolaurin, Sorbic Acid and Potassium Sorbate on *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *Journal of Food Quality and Hazards Control*, 2014, **1**, s. 52-55.
- 99 ZHANG, M. S., SANDOUK, A., HOUTMAN, J. C. D. Glycerol Monolaurate (GML) inhibits human T cell signaling and function by disrupting lipid dynamics. *Scientific Reports*, 2016, **6**, s. 1–13.

## 6 PŘÍLOHY

<b>Příloha 1</b> Stanovení počtu kolonií <i>S. aureus</i> (10 % zásobní roztok) .....	93
<b>Příloha 2</b> Stanovení počtu kolonií <i>E. coli</i> (10 % zásobní roztok).....	93
<b>Příloha 3</b> Stanovení počtu kolonií <i>P. aeruginosa</i> (10 % zásobní roztok).....	94
<b>Příloha 4</b> Výsledky účinnosti konzervace 10 % vzorku LAUROCIDS vůči bakteriím. ....	94
<b>Příloha 5</b> Stanovení počtu kolonií <i>C. albicans</i> (10 % zásobní roztok).....	95
<b>Příloha 6</b> Výsledky účinnosti konzervace 10 % vzorku LAUROCIDS vůči <i>C. albicans</i> . ....	95
<b>Příloha 7</b> Stanovení počtu kolonií <i>S. aureus</i> (1 % zásobní roztok) .....	96
<b>Příloha 8</b> Stanovení počtu kolonií <i>E. coli</i> (1 % zásobní roztok).....	96
<b>Příloha 9</b> Stanovení počtu kolonií <i>P. aeruginosa</i> (1 % zásobní roztok).....	97
<b>Příloha 10</b> Výsledky účinnosti konzervace 1 % vzorku LAUROCIDS vůči bakteriím. ....	97
<b>Příloha 11</b> Stanovení počtu kolonií <i>C. albicans</i> (1 % zásobní roztok).....	98
<b>Příloha 12</b> Výsledky účinnosti konzervace 1 % vzorku LAUROCIDS vůči <i>C. albicans</i> . ....	98
<b>Příloha 13</b> Výsledky stanovení MIC – Monolaurin syntetický min. 98 %.....	99
<b>Příloha 14</b> Výsledky stanovení MIC– Monolaurin 90 % .....	99
<b>Příloha 15</b> Výsledky stanovení MIC– LAURICIDIN® min. 95 %.....	99
<b>Příloha 16</b> Výsledky stanovení MIC – Kyselina laurová 99,5 % .....	99
<b>Příloha 17</b> Výsledky stanovení MIC – Propylenglykol monolaurát.....	100
<b>Příloha 18</b> Výsledky stanovení MIC – Epsilon-poly-L-lysin 98 % .....	100
<b>Příloha 19</b> <i>Staphylococcus aureus</i> (CCM 2022) a <i>Candida albicans</i> (CCM 8186).....	100
<b>Příloha 20</b> <i>Escherichia coli</i> (CCM 4517) a <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (CCM 3955).....	101
<b>Příloha 21</b> <i>Micrococcus luteus</i> (CCM 735) a <i>Bacillus subtilis</i> (CCM 2215).....	101
<b>Příloha 22</b> Meticilin rezistentní <i>S. aureus</i> (FNHK) a vankomycin rezistentní <i>Enterococcus</i> (FNHK).....	101

**Příloha 1** Stanovení počtu kolonií *S. aureus* (CCM 2022). Účinnost 10 % roztoku LAUROCIDS (3,5 % LA) vůči této bakterii.

<b><i>S. aureus</i> CCM 2022</b>						
<b>Datum, název vzorku: LAUROCIDS (3,5 % LA) external SMEDS koncentrát č. š. 25 0817 – MS, ředění 1:9, 23. 10. – 22. 11. 2017</b>						
<b>Datum</b>		<b>10<sup>-1</sup></b>	<b>10<sup>-2</sup></b>	<b>10<sup>-3</sup></b>	<b>10<sup>-4</sup></b>	<b>10<sup>-5</sup></b>
<b>25. 10. 2017</b>	<b>1. den</b>	příliš	příliš	příliš	43/43	13/7
					43	10
<b>1. 11. 2017</b>	<b>7. den</b>	0	0	0	0	0
<b>8. 11. 2017</b>	<b>14. den</b>	0	0	0	0	0
<b>22. 11. 2017</b>	<b>28. den</b>	0	0	0	0	0

\*příliš – množství kolonií vyšší než 300

**Příloha 2** Stanovení počtu kolonií *E. coli* (CCM 4517). Účinnost 10 % roztoku LAUROCIDS (3,5 % LA) vůči této bakterii.

<b><i>E. coli</i> CCM 4517</b>						
<b>Datum, název vzorku: LAUROCIDS (3,5 % LA) external SMEDS koncentrát č. š. 25 0817 – MS, ředění 1:9, 23.10. – 22. 11. 2017</b>						
<b>Datum</b>		<b>10<sup>-1</sup></b>	<b>10<sup>-2</sup></b>	<b>10<sup>-3</sup></b>	<b>10<sup>-4</sup></b>	<b>10<sup>-5</sup></b>
<b>25. 10. 2017</b>	<b>1. den</b>	60/62	20/17	3/8	2/1	0/0
		61	19	6	2	0
<b>1. 11. 2017</b>	<b>7. den</b>	0	0	0	0	0
<b>8. 11. 2017</b>	<b>14. den</b>	0	0	0	0	0
<b>22. 11. 2017</b>	<b>28. den</b>	0	0	0	0	0

**Příloha 3** Stanovení počtu kolonií *P. aeruginosa* (CCM 3955). Účinnost 10 % roztoku LAUROCIDS (3,5 % LA) vůči této bakterii.

<b><i>P. aeruginosa</i> CCM 3955</b>						
<b>Datum, název vzorku: LAUROCIDS (3,5 % LA) external SMEDS koncentrát č. š. 25 0817 – MS, ředění 1:9, 23. 10. – 22. 11. 2017</b>						
<b>Datum</b>		<b>10<sup>-1</sup></b>	<b>10<sup>-2</sup></b>	<b>10<sup>-3</sup></b>	<b>10<sup>-4</sup></b>	<b>10<sup>-5</sup></b>
<b>25. 10. 2017</b>	<b>1. den</b>	příliš	188/197	29/18	4/3	0/0
			193	24	0	0
<b>1. 11. 2017</b>	<b>7. den</b>	0	0	0	0	0
			0	0	0	0
<b>8. 11. 2017</b>	<b>14. den</b>	0	0	0	0	0
			0	0	0	0
<b>22. 11. 2017</b>	<b>28. den</b>	0	0	0	0	0
			0	0	0	0

\*příliš – množství kolonií vyšší než 300

**Příloha 4** Výsledky testování účinnosti konzervace 10 % vzorku LAUROCIDS (3,5 % LA) vůči testovaným bakteriím. Porovnání výsledků s normou ČSN EN ISO 11930.

<b>Kmeny mikroorganismů</b>	<b>Počáteční koncentrace MO KTJ/ml</b>	<b>Počty kolonií v ml přípravku</b>		
		<b>7. den</b>	<b>14. den</b>	<b>28. den</b>
<b>Datum analýzy</b>	<b>0. den</b>	<b>7. den</b>	<b>14. den</b>	<b>28. den</b>
	<b>24. 10. 2017</b>	<b>1. 11. 2017</b>	<b>8. 11. 2017</b>	<b>22. 1. 2017</b>
<b>Kritérium A</b>	-	≥3	≥3 a NI	≥3 a NI
<i>Staphylococcus aureus</i> CCM 2022	3 x 10 <sup>6</sup>	>3	NI	NI
<i>Escherichia coli</i> CCM 4517	3 x 10 <sup>6</sup>	>3	NI	NI
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> CCM 3955	3 x 10 <sup>6</sup>	>3	NI	NI
*NI: žádné zvýšení počtu od předešlého intervalu				
Kritérium A – požadovaná minimální hodnota logaritmického snížení podle přílohy B v ČSN EN ISO 11930				

**Příloha 5** Stanovení počtu kolonií *C. albicans* (CCM 8186). Účinnost 10 % roztoku LAUROCIDS (3,5 % LA) vůči této kvasince.

<b><i>C. albicans</i> CCM 8186</b>						
<b>Datum, název vzorku: LAUROCIDS (3,5 % LA) external SMEDS koncentrát č. š. 25 0817 – MS, ředění 1:9, 23. 10. – 24. 11. 2017</b>						
<b>Datum</b>		<b>10<sup>-1</sup></b>	<b>10<sup>-2</sup></b>	<b>10<sup>-3</sup></b>	<b>10<sup>-4</sup></b>	<b>10<sup>-5</sup></b>
<b>27. 10. 2017</b>	<b>1. den</b>	příliš	80/99	13/17	0/1	0/0
			90	15	1	0
<b>3. 11. 2017</b>	<b>7. den</b>	příliš	83/75	5/4	2/1	0/0
			<b>79</b>	5	2	0
<b>10. 11. 2017</b>	<b>14. den</b>	příliš	41/22	3/1	0/0	0/0
			<b>32</b>	2	0	0
<b>24. 11. 2017</b>	<b>28. den</b>	34/13	2/1	0/1	0/0	0/0
		<b>24</b>	2	1	0	0

\*příliš – množství kolonií vyšší než 150

**Příloha 6** Výsledky testování účinnosti konzervace 10 % vzorku LAUROCIDS (3,5 % LA) vůči *C. albicans*. Porovnání výsledků s normou ČSN EN ISO 11930.

<b>Kmeny mikroorganismů</b>	<b>Počáteční koncentrace MO KTJ/ml</b>	<b>Počty kolonií v ml přípravku</b>		
		<b>0. den</b>	<b>7. den</b>	<b>14. den</b>
<b>Datum analýzy</b>	<b>25. 10. 2017</b>	<b>3. 11. 2017</b>	<b>10. 11. 2017</b>	<b>24. 11. 2017</b>
<b>Kritérium A</b>	-	≥1	≥1 a NI	≥1 a NI
<b><i>Candida albicans</i> CCM 8186</b>	6 x 10 <sup>6</sup>	2,9	3,3	4,4
		>1	NI	NI

\*NI: žádné zvýšení počtu od předešlého intervalu  
Kritérium A – požadovaná minimální hodnota logaritmického snížení podle přílohy B v ČSN EN ISO 11930

**Příloha 7** Stanovení počtu kolonií *S. aureus* (CCM 2022). Účinnost 1 % roztoku LAUROCIDS (3,5 % LA) vůči této bakterii.

<b><i>S. aureus</i> CCM 2022</b>						
<b>Datum, název vzorku: LAUROCIDS (3,5 % LA) external SMEDS koncentrát č. š. 25 0817 – MS, ředění 1:99, 23. 10. – 22. 11. 2017</b>						
<b>Datum</b>		<b>10<sup>-1</sup></b>	<b>10<sup>-2</sup></b>	<b>10<sup>-3</sup></b>	<b>10<sup>-4</sup></b>	<b>10<sup>-5</sup></b>
<b>25. 10. 2017</b>	<b>1. den</b>	příliš	příliš	257/264	43/43	13/7
				261	43	10
<b>1. 11. 2017</b>	<b>7. den</b>	0	0	0	0	0
<b>8. 11. 2017</b>	<b>14. den</b>	0	0	0	0	0
<b>22. 11. 2017</b>	<b>28. den</b>	0	0	0	0	0

\*příliš – množství kolonií vyšší než 300

**Příloha 8** Stanovení počtu kolonií *E. coli* (CCM 4517). Účinnost 1 % roztoku LAUROCIDS (3,5 % LA) vůči této bakterii.

<b><i>E. coli</i> CCM 4517</b>						
<b>Datum, název vzorku: LAUROCIDS (3,5 % LA) external SMEDS koncentrát č. š. 25 0817 – MS, ředění 1:99, 23. 10. – 22. 11. 2017</b>						
<b>Datum</b>		<b>10<sup>-1</sup></b>	<b>10<sup>-2</sup></b>	<b>10<sup>-3</sup></b>	<b>10<sup>-4</sup></b>	<b>10<sup>-5</sup></b>
<b>25. 10. 2017</b>	<b>1. den</b>	40/41	18/15	0/0	0/0	0/0
		41	17	0	0	0
<b>1. 11. 2017</b>	<b>7. den</b>	0	0	0	0	0
<b>8. 11. 2017</b>	<b>14. den</b>	0	0	0	0	0
<b>22. 11. 2017</b>	<b>28. den</b>	0	0	0	0	0



**Příloha 9** Stanovení počtu kolonií *P. aeruginosa* (CCM 3955). Účinnost 1 % roztoku LAUROCIDS (3,5 % LA) vůči této bakterii.

<b><i>P.aeruginosa</i> CCM 3955</b>						
<b>Datum, název vzorku: LAUROCIDS (3,5 % LA) external SMEDS koncentrát č. š. 25 0817 – MS, ředění 1:99, 23. 10. – 22. 11. 2017</b>						
<b>Datum</b>		<b>10<sup>-1</sup></b>	<b>10<sup>-2</sup></b>	<b>10<sup>-3</sup></b>	<b>10<sup>-4</sup></b>	<b>10<sup>-5</sup></b>
<b>25. 10. 2017</b>	<b>1. den</b>	příliš	59/52	0/0	0/0	0/0
			56	0	0	0
<b>1. 11. 2017</b>	<b>7. den</b>	0	0	0	0	0
			0	0	0	0
<b>8. 11. 2017</b>	<b>14. den</b>	0	0	0	0	0
			0	0	0	0
<b>22. 11. 2017</b>	<b>28. den</b>	0	0	0	0	0
			0	0	0	0

\*příliš – množství kolonií vyšší než 300

**Příloha 10** Výsledky testování účinnosti konzervace 1 % vzorku LAUROCIDS (3,5 % LA) vůči testovaným bakteriím. Porovnání výsledků s normou ČSN EN ISO 11930.

<b>Kmeny mikroorganismů</b>	<b>Počáteční koncentrace MO KTJ/ml</b>	<b>Počty kolonií v ml přípravku</b>			
		<b>7. den</b>	<b>14. den</b>	<b>28. den</b>	
<b>Datum analýzy</b>	<b>0. den</b>	<b>7. den</b>	<b>14. den</b>	<b>28. den</b>	
	<b>24. 10. 2017</b>	<b>1. 11. 2017</b>	<b>8. 11. 2017</b>	<b>22. 1. 2017</b>	
<b>Kritérium A</b>	-	≥3	≥3 a NI	≥3 a NI	
<i>Staphylococcus aureus</i> CCM 2022	3 x 10 <sup>6</sup>	>3	NI	NI	
<i>Escherichia coli</i> CCM 4517	3 x 10 <sup>6</sup>	>3	NI	NI	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> CCM 3955	3 x 10 <sup>6</sup>	>3	NI	NI	

\*NI: žádné zvýšení počtu od předešlého intervalu  
Kritérium A – požadovaná minimální hodnota logaritmického snížení podle přílohy B v ČSN EN ISO 11930

**Příloha 11** Stanovení počtu kolonií *C. albicans* (CCM 8186). Účinnost 1 % roztoku LAUROCIDS (3,5 % LA) vůči této kvasince.

<b><i>C. albicans</i> CCM 8186</b>						
<b>Datum, název vzorku: LAUROCIDS (3,5 % LA) external SMEDS koncentrát č. š. 25 0817 – MS, ředění 1:99, 23. 10. – 24. 11. 2017</b>						
<b>Datum</b>		<b>10<sup>-1</sup></b>	<b>10<sup>-2</sup></b>	<b>10<sup>-3</sup></b>	<b>10<sup>-4</sup></b>	<b>10<sup>-5</sup></b>
<b>27. 10. 2017</b>	<b>1. den</b>	příliš	106/96	12/10	2/0	0/0
			101	11	1	0
<b>3. 11. 2017</b>	<b>7. den</b>	příliš	101/80	7/3	3/1	0/1
			<b>91</b>	5	2	1
<b>10. 11. 2017</b>	<b>14. den</b>	příliš	142/93	11/10	0/0	0/0
			<b>118</b>	11	0	0
<b>24. 11. 2017</b>	<b>28. den</b>	příliš	20/10	4/2	0/0	0/0
			<b>15</b>	3	0	0

\*příliš – množství kolonií vyšší než 150

**Příloha 12** Výsledky testování účinnosti konzervace 1 % vzorku LAUROCIDS (3,5 % LA) vůči *C. albicans*. Porovnání výsledků s normou ČSN EN ISO 11930.

<b>Kmeny mikroorganismů</b>	<b>Počáteční koncentrace MO KTJ/ml</b>	<b>Počty kolonií v ml přípravku</b>		
		<b>7. den</b>	<b>14. den</b>	<b>28. den</b>
<b>Datum analýzy</b>	<b>0. den</b>	<b>7. den</b>	<b>14. den</b>	<b>28. den</b>
	<b>25. 10. 2017</b>	<b>3. 11. 2017</b>	<b>10. 11. 2017</b>	<b>24. 11. 2017</b>
<b>Kritérium A</b>	-	≥1	≥1 a NI	≥1 a NI
<b><i>Candida albicans</i> CCM 8186</b>	6 x 10 <sup>6</sup>	2,8	2,7	3,6
		>1	>1	NI
*NI: žádné zvýšení počtu od předešlého intervalu				
Kritérium A – požadovaná minimální hodnota logaritmického snížení podle přílohy B v ČSN EN ISO 11930				

**Příloha 13 Výsledky stanovení MIC – Monolaurin syntetický min. 98 %.**

<b>Testovaný vzorek: Monolaurin syntetický min 98 % MAG 12 č. š. 1164/152 VÚOS, Rybitví – absolutní ethanol</b>																	
<b>Datum testování: 12. – 15. 9. 2017</b>																	
[µg/ml]	NK	NK	SA	SA	EC	EC	ML	ML	PA	PA	BS	BS	MRSA	MRSA	VRE	VRE	
0	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
25	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+	
50	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	
100	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	
250	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	
500	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	
1000	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	
1500	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	

**Příloha 14 Výsledky stanovení MIC– Monolaurin 90 %.**

<b>Testovaný vzorek: Monolaurin 90 %, č. š. 01604878, Mosselman, Belgie – absolutní ethanol</b>																	
<b>Datum testování: 12. – 15. 9. 2017</b>																	
[µg/ml]	NK	NK	SA	SA	EC	EC	ML	ML	PA	PA	BS	BS	MRSA	MRSA	VRE	VRE	
0	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
25	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+	
50	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	
100	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	
250	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	
500	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	
1000	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	
1500	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	

**Příloha 15 Výsledky stanovení MIC– LAURICIDIN® min. 95 %.**

<b>Testovaný vzorek: LAURICIDIN® min. 95 %, č. š. 121605 ,Med-Chem Labs Inc. USA – absolutní ethanol</b>																	
<b>Datum testování: 12. – 15. 9. 2017</b>																	
[µg/ml]	NK	NK	SA	SA	EC	EC	ML	ML	PA	PA	BS	BS	MRSA	MRSA	VRE	VRE	
0	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
25	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+	
50	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	
100	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	
250	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	
500	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	
1000	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	
1500	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	

**Příloha 16 Výsledky stanovení MIC – Kyselina laurová 99,5 %.**

<b>Testovaný vzorek: Kyselina laurová 99,5 % č. š. 020010080 HSH Chemie, Praha – absolutní ethanol</b>																	
<b>Datum testování: 12. – 15. 9. 2017</b>																	
[µg/ml]	NK	NK	SA	SA	EC	EC	ML	ML	PA	PA	BS	BS	MRSA	MRSA	VRE	VRE	
0	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
25	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	
50	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	
100	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+	
250	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+	
500	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	
1000	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	
1500	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	

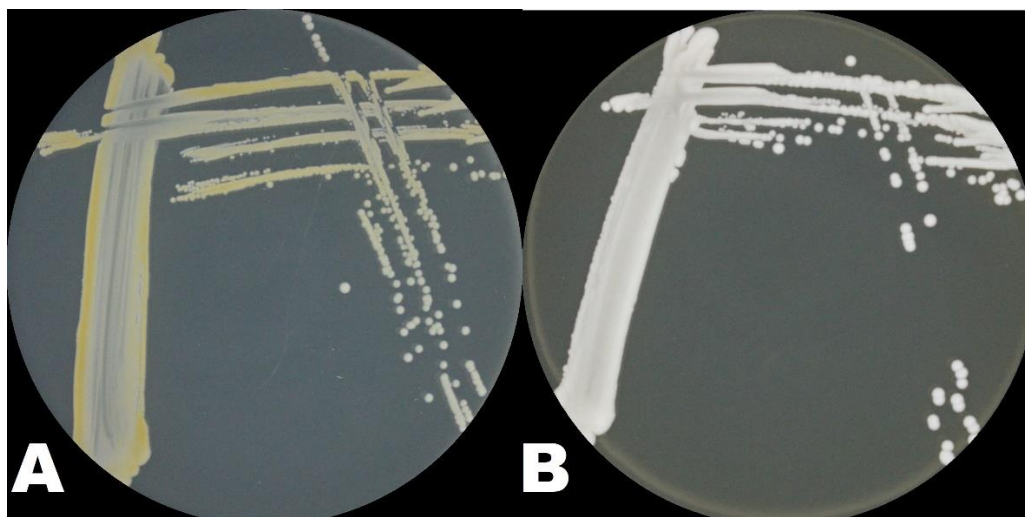
**Příloha 17 Výsledky stanovení MIC – Propylenglykol monolaurát.**

Testovaný vzorek: Propylenglycol Monolaurate LAUROGLYCOL® 90, č. š. 162978, Gattefossé, Francie – absolutní ethanol																
Datum testování: 18. – 21. 9. 2017																
[µg/ml]	NK	NK	SA	SA	EC	EC	ML	ML	PA	PA	BS	BS	MRSA	MRSA	VRE	VRE
0	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
25	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
50	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
100	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
250	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
500	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+
1000	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+
1500	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+

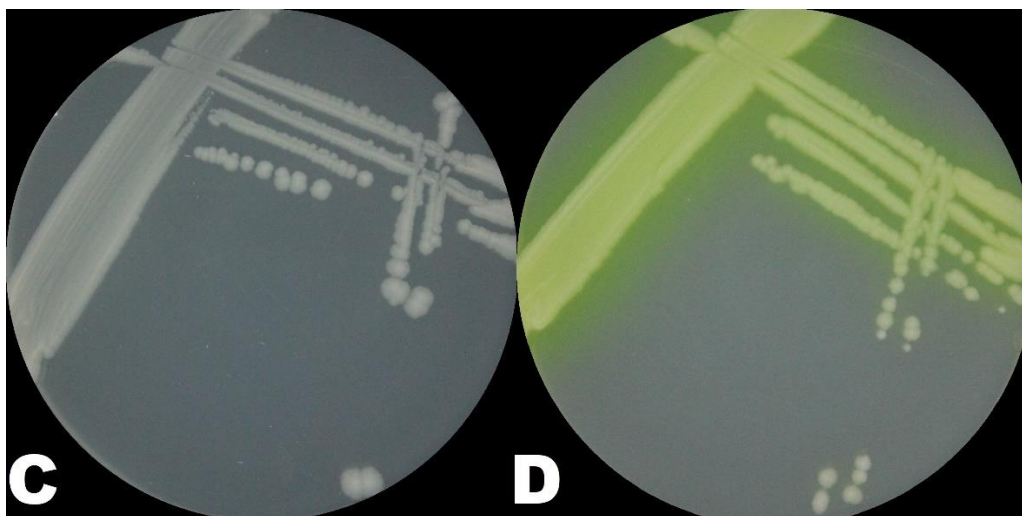
**Příloha 18 Výsledky stanovení MIC – Epsilon-poly-L-lysin 98 %.**

Testovaný vzorek: Epsilon-poly-L-lysin 98 %, č. š. 161201A, Zhengzhou Bainafo BioengineeringCo., China - sterilní destilovaná voda																
Datum testování: 18. – 21. 9. 2017																
[µg/ml]	NK	NK	SA	SA	EC	EC	ML	ML	PA	PA	BS	BS	MRSA	MRSA	VRE	VRE
0	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
25	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
50	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
100	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
250	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
500	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
1000	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
1500	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+

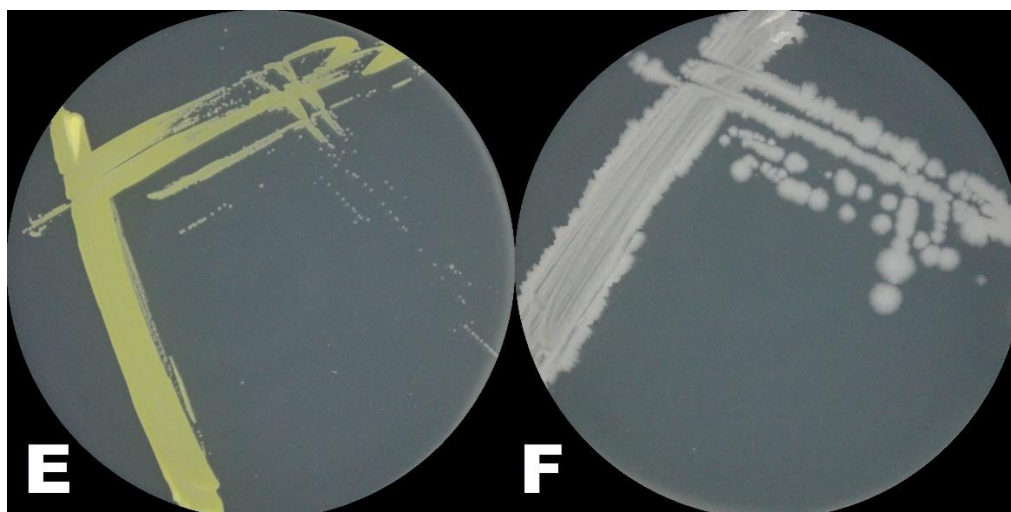
**Příloha 19 *Staphylococcus aureus* (CCM 2022) a *Candida albicans* (CCM 8186).** A) *S. aureus* na půdě MPA (37 °C, 24 h), B) *C. albicans* na MALT agaru (30 °C, 48 h). (foto: N. Voltnerová, BACMED).



**Příloha 20** *Escherichia coli* (CCM 4517) a *Pseudomonas aeruginosa* (CCM 3955). C) *E. coli* na půdě MPA (37 °C, 24 h), D) *P. aeruginosa* na půdě MPA (37 °C, 24 h). (foto: N. Voltnerová, BACMED).



**Příloha 21** *Micrococcus luteus* (CCM 735) a *Bacillus subtilis* (CCM 2215). E) *M. subtilis* na půdě MPA (37 °C, 24 h), F) *B. subtilis* na půdě MPA (30 °C, 24 h). (foto: N. Voltnerová, BACMED).



**Příloha 22** Meticilin rezistentní *S. aureus* (FNHK) a vankomycin rezistentní *Enterococcus* (FNHK). G) MRSA na krevním agaru (37 °C, 24 h), H) VRE na krevním agaru (37 °C, 24 h). (foto: N. Voltnerová, BACMED).

