

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Adrijana KROPE

**TESTIRANJE OBČUTLJIVOSTI BAKTERIJ NA NOVE
POTENCIALNE INHIBITORJE MUR ENCIMOV**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**SUSCEPTIBILITY TESTING OF BACTERIA TO A NEW
POTENTIAL INHIBITORS OF MUR ENZYMES**

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2010

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega študija mikrobiologije. Opravljeno je bilo v Laboratoriju za hemokulture in druge urgentne mikrobiološke preiskave Inštituta za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete v Ljubljani.

Študijska komisija dodiplomskega študija mikrobiologije je na seji dne 17.09.2008 za mentorico diplomskega dela imenovala prof. dr. Manico Mueller-Premru, dr. med., za somentorja prof. dr. Danijela Kiklja, mag. farm. in za recenzentko prof. dr. Evo Ružić-Sabljić, dr. med.

Mentorica: prof. dr. Manica Mueller-Premru, dr. med.

Somentor: prof. dr. Danijel Kikelj, mag. farm.

Recenzentka: prof. dr. Eva Ružić-Sabljić, dr. med.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednica: prof. dr. Darja Žgur Bertok, univ. dipl. biol.

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Članica: prof. dr. Manica Mueller-Premru, dr. med.

Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo

Član: prof. dr. Danijel Kikelj, mag. farm.

Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, Katedra za farmacevtsko kemijo

Članica: prof. dr. Eva Ružić-Sabljić, dr. med.

Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo

Datum zagovora:

Diplomsko delo je rezultat lastnega raziskovalnega dela. Podpisana se strinjam z objavo svoje naloge v polnem tekstu na spletni strani Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete. Izjavljam, da je naloga, ki sem jo oddala v elektronski obliki, identična tiskani verziji.

Adrijana Krope

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

- ŠD Dn
DK UDK 579.61+579.24:615.33(043)=163.6
KG protimikrobne učinkovine/protibakterijske učinkovine/inhibitorji Mur encimov/občutljivost za antibiotike/*E. faecalis*/*P. aeruginosa*/*E. coli*/*S. aureus*/klinični izolati/makrodilucijska metoda
AV KROPE, Adrijana
SA MUELLER-PREMRU, Manica (mentorica)/KIKELJ, Danijel (somentor)/RUŽIČ-SABLJIČ, Eva (recenzentka)
KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija mikrobiologije
LI 2010
IN TESTIRANJE OBČUTLJIVOSTI BAKTERIJ NA NOVE POTENCIALNE INHIBITORJE MUR ENCIMOV
TD Diplomsko delo (univerziteni študij)
OP XI, 57 str., 18 pregl., 5 sl., 43 vir.
IJ sl
JI sl/en
AI Zaradi vse pogostejšega pojava bakterijskih izolatov, ki so odporni proti posameznim ali celo več različnim antibiotikom (med temi najpogosteje omenjamo proti meticilinu odporne izolate *Staphylococcus aureus*-MRSA, proti vankomicinu odporne izolate enterokokov-VRE in nekatere druge) je zdravljenje zapletenih bolnišničnih okužb vse težje in potreba po razvoju novih protibakterijskih sredstev vse večja. Na Fakulteti za farmacijo Univerze v Ljubljani se ukvarjajo z načrtovanjem in sintezo novih protibakterijskih učinkovin. Eden od njihovih projektov je tudi razvoj inhibitorjev Mur encimov. Spojinam, načrtovanim kot inhibitorji Mur encimov, smo z metodo makrodilucijskega antibiograma v bujonu uspešno ovrednotili učinkovitost v obliki minimalne inhibitorne (MIK) in minimalne baktericidne (MBK) koncentracije. Testirali smo občutljivost standardnih bakterijskih sevov in kliničnih izolatov za 12 spojin. Protibakterijsko učinkovitost so pokazale 3 spojine, in sicer KNZ-21b, KNZ-22b in KNZ-52. Občutljivost za aktivne spojine smo zaznali le pri po Gramu pozitivnih bakterijah. Največjo učinkovitost je pokazala spojina KNZ-52, saj smo pri standardnem sevu *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 MIK ovrednotili kot 16 µg/ml, pri *S. aureus* ATCC 29213 pa kot 8 µg/ml. KNZ-52 je pokazala tudi baktericidni učinek, ostale pa ne. Spojine so pokazale protimikrobno učinkovitost tudi pri kliničnih izolatih. Tudi tukaj je bila najbolj učinkovita spojina KNZ-52. MIK smo pri protimicilinu občutljivih *S. aureus* in pri MRSA ovrednotili kot 8 µg/ml oz. 16 µg/ml, pri za vankomicin občutljivih *E. faecalis* in *E. faecium* prav tako 8 µg/ml oz. 16 µg/ml, pri VRE pa je MIK znašala od 0,5 µg/ml do 16 µg/ml. Naša pričakovanja smo izpolnili, saj so tri spojine pokazale protimikrobno učinkovitost, katerim smo uspešno ovrednotili učinkovitost v obliki MIK in MBK. Za potrditev primernosti spojin kot protimikrobnih zdravil so potrebne še nadaljne raziskave.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dn
DC UDC 579.61+579.24:615.33(043)=163.6
CX antimicrobials/antibacterial compounds/inhibitors of the Mur enzymes/antimicrobial susceptibility/*E. faecalis*/*P. aeruginosa*/*E. coli*/*S. aureus* /clinical isolates/ macrodilution method
AU KROPE, Adrijana
AA MUELLER-PREMRU, Manica (supervisor)/KIKELJ, Danijel (co-advisor)/RUŽIĆ-SABLJIĆ, Eva (reviewer)
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Interdepartmental Programme in Microbiology
PY 2010
TI SUSCEPTIBILITY TESTING OF BACTERIA TO A NEW POTENTIAL INHIBITORS OF MUR ENZYMES
DT Graduation Thesis (University studies)
NO XI, 57 p., 18 tab., 5 fig., 43 ref.
LA sl
AL sl/en
AB Recurrent emergence of bacterial isolates, resistant to one or more antibiotics (the most important of them are methicilin-resistant *Staphylococcus aureus* – MRSA and vancomycin-resistant enterococci-VRE) and spreading rapidly, becomes one of the main problems in many hospitals. Infections caused by multi-drug resistant bacteria are difficult to cure, therefore the need for development of new active antimicrobial agents is constantly growing. The Faculty of Pharmacy, University of Ljubljana is engaged in the design and synthesis of new antibacterial compounds. One of their projects is the development of Mur enzyme inhibitors. With the macrodilution method we tested 12 new antibacterial compounds. We successfully evaluated the efficacy in the form of minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC). We tested susceptibility of standard bacterial strains and clinical isolates of all 12 compounds. Antibacterial efficacy have shown only three compounds, namely: KNZ-21b, KNZ-22b and KNZ-52. Susceptibility for active compounds was detected only in Gram positive bacteria. The most efficacy showed the compound KNZ-52. The values of MIC of *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 were 16 µg/ml and of *S. aureus* ATCC 29213 were 8 µg/ml. KNZ-52 also showed bactericidal activity, while others did not. Active compounds have shown efficacy in the clinical isolates, the most effective compound was KNZ-52. The values of MIC for methicilin-susceptible *S. aureus* and MRSA were evaluated as 8 µg/ml and 16 µg/ml, for vancomycin-susceptible *E. faecalis*, and *E. faecium* also as 8 µg/ml and 16 µg/ml and for VRE from 0.5 µg/ml to 16 µg/ml. Our expectations were fulfilled, as the 3 compounds showed antimicrobial efficacy, to which we have successfully evaluated the effectiveness in the form of MIC and MBC. Further researches are still needed to confirm the suitability of the compounds as antibacterial agents.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO PREGLEDNIC	VIII
KAZALO SLIK	X
SEZNAM OKRAJŠAV	XI
1 UVOD	1
1.1 NAMEN DELA	3
2 PREGLED OBJAV	4
2.1 KLINIČNO POMEMBNE BAKTERIJE	4
2.2 ANTIBIOTIKI	6
2.2.1 Zaviralci sinteze celične stene	6
2.2.2 Zaviralci sinteze znotrajceličnih proteinov	7
2.2.3 Zaviralci sinteze jedrnih kislin	9
2.2.4 Zaviralci delovanja celične membrane	9
2.3 ODPORNOST BAKTERIJ PROTI ANTIBIOTIKOM	10
2.3.1 Vrste odpornosti	10
2.3.2 Mehanizmi odpornosti	11
2.3.3 Problem odpornosti in njeno omejevanje	12
2.4 RAZVOJ NOVIH PROTIMIKROBNIH UČINKOVIN	13
2.4.1 Bakterijska celična stena kot tarčno mesto za protimikrobne učinkovine .	13
2.4.2 Mur encimi	13
2.4.3 Inhibitorji Mur encimov	15
2.5 VREDNOTENJE UČINKOVITOSTI PROTIMIKROBNIH UČINKOVIN	16
2.5.1 Kvalitativne metode	16
2.5.1.1 Difuzijski antibiogram v agarju	16
2.5.2 Kvantitativne metode	17
2.5.2.1 Dilucijski antibiogram	17
2.5.2.2 Etest	18

3 MATERIAL IN METODE	19
3.1 TESTNE SPOJINE	19
3.2 STANDARDNI BAKTERIJSKI SEVI IN KLINIČNI IZOLATI	20
3.3 OSTALA LABORATORIJSKA OPREMA	21
3.4 PRIPRAVA RAZTOPIN TESTNIH SPOJIN	22
3.5 KLASIČNA IDENTIFIKACIJA BAKTERIJ	24
3.5.1 Rast bakterij na krvnem agarju	24
3.5.2 Barvanje po Gramu	25
3.5.3 Dokaz katalaze	26
3.5.4 Dokaz oksidaze	26
3.5.5 Deoksiribonukleaza (DNA-za)	26
3.5.6 Prisotnost vezane koagulaze	26
3.5.7 PYR (L-pirolidonil-β-naftilamid) test	26
3.6 PRIPRAVA UPORABLJENIH GOJIŠČ IN RAZTOPIN	27
3.6.1 Krvni agar	27
3.6.2 Tekoče gojišče Mueller Hinton bujon (MHB)	27
3.6.3 Fiziološka raztopina	28
3.7 PRIPRAVA BAKTERIJSKIH IZOLATOV IN BAKTERIJSKE SUSPENZIJE	28
3.7.1 Revitalizacija kultur	28
3.7.2 Priprava inokuluma	28
3.8 DOLOČANJE OBČUTLJIVOSTI BAKTERIJ ZA NOVE SPOJINE	29
3.8.1 Izvedba makrodilucijske metode v bujonu	29
3.9 KONTROLNI SEVI IN GENTAMICIN	31
4 REZULTATI	32
4.1 IDENTIFIKACIJA BAKTERIJ IN DOLOČITEV OBČUTLJIVOSTI	32
4.2 REZULTATI TESTIRANJA OBČUTLJIVOSTI KONTROLNIH SEVOV ZA GENTAMICIN	32
4.3 DOLOČANJE OBČUTLJIVOSTI STANDARDNIH SEVOV ZA NOVE SPOJINE	33
4.3.1 Rezultati testiranja občutljivosti standardnih sevov za spojine KNZ-47, KNZ-45, KNZ-44b-2 in KNZ-6b	33
4.3.2 Rezultati testiranja občutljivosti standardnih sevov za spojine KNZ-32c, KNZ-35, KNZ-4b, KNZ-10i in KNZ-50	33
4.3.3 Rezultati testiranja občutljivosti standardnih sevov za spojino KNZ-21b .	34

4.3.4 Rezultati testiranja občutljivosti standardnih sevov za spojino KNZ-22b .	35
4.3.5 Rezultati testiranja občutljivosti standardnih sevov za spojino KNZ-52....	36
4.4 DOLOČANJE OBČUTLJIVOSTI KLINIČNIH IZOLATOV ZA NOVE SPOJINE.....	37
4.4.1 Rezultati testiranja občutljivosti kliničnih izolatov za spojino KNZ-21b ...	37
4.4.2 Rezultati testiranja občutljivosti kliničnih izolatov za spojino KNZ-22b ...	39
4.4.3 Rezultati testiranja občutljivosti kliničnih izolatov za spojino KNZ-52	41
5 RAZPRAVA IN SKLEPI.....	47
5.1 RAZPRAVA	47
5.2 SKLEPI.....	50
6 POVZETEK.....	51
7 VIRI	53

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1:	Osnovni mehanizmi odpornosti proti antibiotikom (Seme, 2002a; Tenover, 2006)	11
Preglednica 2:	Testne spojine, njihova oznaka, struktura in molekulska masa	19
Preglednica 3:	Priprava raztopin potencialnega inhibitorja (Amsterdam, 1996: 59)	23
Preglednica 4:	Shema identifikacije po Gramu pozitivnih bakterij	24
Preglednica 5:	Oznake, ki smo jih uporabljali pri interpretaciji rezultatov	31
Preglednica 6:	Testiranje občutljivosti standardnih sevov <i>E. coli</i> ATCC 25922 in <i>S. aureus</i> ATCC 29213 za gentamicin	32
Preglednica 7:	Rezultati testiranja občutljivosti štirih standardnih sevov za spojine KNZ-47, KNZ-45, KNZ-44b-2 in KNZ-6b	33
Preglednica 8:	Rezultati testiranja občutljivosti štirih standardnih sevov za spojine KNZ-32c, KNZ-35, KNZ-4b, NZ-10i in KNZ-50	34
Preglednica 9:	Rezultati testiranja občutljivosti štirih standardnih sevov za spojino KNZ-21b	35
Preglednica 10:	Rezultati testiranja občutljivosti štirih standardnih sevov za spojino KNZ-22b	35
Preglednica 11:	Rezultati testiranja občutljivosti štirih standardnih sevov za spojino KNZ-52	36
Preglednica 12:	Rezultati testiranja občutljivosti osmih kliničnih izolatov za meticilin občutljivih <i>S. aureus</i> (MSSA) in proti meticilinu odpornih <i>S. aureus</i> (MRSA) za spojino KNZ-21b	38
Preglednica 13:	Rezultati testiranja občutljivosti osmih za vankomicin občutljivih in proti vankomicinu odpornih enterokokov (VRE) za spojino KNZ-21b	39
Preglednica 14:	Rezultati testiranja občutljivosti osmih kliničnih izolatov za meticilin občutljivih <i>S. aureus</i> (MSSA) in proti meticilinu odpornih <i>S. aureus</i> (MRSA) za spojino KNZ-22b	40
Preglednica 15:	Rezultati testiranja občutljivosti osmih za vankomicin občutljivih in proti vankomicinu odpornih enterokokov (VRE) za spojino KNZ-22b	41

- Preglednica 16:** Rezultati testiranja občutljivosti 20 kliničnih izolatov za meticilin občutljivih *S. aureus* (MSSA) in proti meticilinu odpornih *S. aureus* (MRSA) za spojino KNZ-52 **42**
- Preglednica 17:** Rezultati testiranja občutljivosti 22 za vankomicin občutljivih enterokokov (*E. faecalis* in *E. faecium*) za spojino KNZ-52 **44**
- Preglednica 18:** Rezultati testiranja občutljivosti 30 proti vankomicinu odpornih enterokokov (*E. faecium*-VRE) za spojino KNZ-52 **46**

KAZALO SLIK

Slika 1:	Membranski filtri	23
Slika 2:	Pripravljena raztopina spojine	23
Slika 3:	Metoda določanja minimalne inhibitorne in minimalne baktericidne koncentracije antibiotika (Ružič-Sabljić, 2003)	30
Slika 4:	Določitev MIK (prisotnost oz. odsotnost bakterijske rasti v epruveti)	30
Slika 5:	Določitev MBK (prisotnost oz. odsotnost bakterijske rasti na KA)	30

SEZNAM OKRAJŠAV

ATCC	ameriška zbirka mikrobov (angl. American Type Culture Collection)
CFU	angl. colony forming units
CLSI	angl. Clinical and Laboratory Standards Institute
DMSO	dimetilsulfoksid
ESBL	laktamaze beta z razširjenim spektrom delovanja (angl. extended spectrum beta lactamases)
HPK	histidin protein kinaze
KA	krvni agar
MHB	Mueller Hinton bujon
MBK	minimalna baktericidna koncentracija
MIK	minimalna inhibitorna koncentracija
MRSA	proti meticilinu odporen <i>Staphylococcus aureus</i> (angl. methicillin-resistant <i>S. aureus</i>)
MSSA	za meticilin občutljiv <i>Staphylococcus aureus</i> (angl. methicillin-sensitive <i>S. aureus</i>)
OPT	optohinski test
PBP	penicilin vezoči protein (angl. penicillin-binding proteins)
PYR	pirolidonil- β -naftilamid (angl. pyrrolidonyl- β -naphthylamide)
VRE	proti vankomicinu odporni enterokoki (angl. vancomycin-resistant <i>Enterococcus</i> spp.)

1 UVOD

Antibiotiki so eno najpomembnejših odkritij v medicini v 20. stoletju. Odkritje penicilina leta 1928, predvsem pa njegova široka uporaba v klinični praksi dobrih deset let kasneje, sta pomembno vplivala na zdravljenje in izid infekcijskih bolezni. Delujejo tako, da zavirajo rast bakterij ali pa jih razgradijo in s tem ubijejo. V medicini jih uporabljajo predvsem za zdravljenje bakterijskih okužb. Zaradi široke uporabe antibiotikov pa so se začeli pojavljati sevi bakterij odporni proti posameznim ali proti več različnim antibiotikom (Ribič, 2005).

Pojav bakterijske odpornosti proti antibiotikom poznamo že od samega začetka njihove uporabe v zdravljenju bakterijskih okužb. Selekcijo odpornih bakterijskih sevov namreč omogoča predvsem množična in mnogokrat nekritična uporaba antibiotikov. Tako je zaradi široke uporabe penicilina že konec 40. let prejšnjega stoletja prišlo do selekcije proti penicilinu odpornih bakterijskih sevov. Odpornost se je najprej pojavila pri bakteriji *Staphylococcus aureus*, ki je že okoli leta 1950 razvila več kot 50 % sevov, odpornih proti penicilinu (Seme, 2002a).

Problem odpornosti po vsem svetu je zelo narastel z odkritjem večkratno odpornih bakterij, ki povzročajo težave pri zdravljenju številnih okužb. Med njimi so najbolj znani proti meticilinu odporni izolati *Staphylococcus aureus* (MRSA iz angl. methicilin-resistant *S. aureus*), izolati enterobakterij, ki izločajo laktamaze beta z razširjenim spektrom delovanja (ESBL iz angl. extended spectrum betalactamases) in proti vankomicinu odporni izolati enterokokov (VRE iz angl. vancomycin-resistant enterococci) (MacDougall in Polk, 2005).

K širjenju proti antibiotikom odpornih bakterij prispevajo številni dejavniki okolja, ki ustvarjajo selekcijski pritisk. Tako široka, nepravilna in nekritična uporaba antibiotikov v bolnišnicah in zunaj njih poveča selekcijski pritisk in omogoči pojav odpornih bakterij v tem okolju. Za omejitev širjenja okužb in učinkovito zmanjšanje bakterijske odpornosti je zelo pomembno hitro in zgodnje odkrivanje odpornih izolatov. Pomemben del boja proti

bakterijski odpornosti pa predstavlja tudi smotrna uporaba antibiotikov (Madigan in sod., 2003).

Razvoj novih protimikrobnih spojin je dandanes ključnega pomena, saj se povečuje tako število okužb, odpornih proti trenutno razpoložljivim antibiotikom, kot se množi pogostost razširjenja infekcij, ki so posledica vse hitrejših in v razdaljah vse obsežnejših potovalnih navad človeka.

Mur encimi (MurA, MurB, MurC, MurD, MurE in MurF), ki katalizirajo znotrajcelične stopnje biosinteze peptidoglikana, so postali pomembne tarče za racionalno načrtovanje njihovih inhibitorjev kot potencialnih novih protimikrobnih učinkovin (Zoeiby in sod., 2003).

Razvoj novih protimikrobnih sredstev pa žal zaostaja za potrebami, saj farmacevtski razvoj namreč ni nikakor dovolj hiter, da bi z novimi učinkovinami sledil sposobnosti razvoja odpornosti mikroorganizmov. Da lahko razvijejo nov antibiotik do stopnje, ko ga lahko uporabimo pri ljudeh, je povprečno potrebno 15 let, cena razvoja enega antibiotika pa je okrog 800 milijonov evrov. Čeprav je bilo do danes razvitih več kot 100 vrst antibiotikov, jih je zaradi razvoja odpornosti v uporabi le še približno tretjina. Strokovnjaki ocenjujejo, da bi, če razmer ne bi nadzirali in ustrezno ukrepali, v 12 letih ostali brez učinkovin antibiotikov. Vrnili bi se v obdobje pred njihovim odkritjem, ko so ljudje zaradi infekcijskih bolezni množično umirali (Ribič, 2005).

1.1 NAMEN DELA

V diplomski nalogi smo želeli ugotoviti protimikrobno aktivnost novih potencialnih inhibitorjev Mur encimov tako, da smo testirali občutljivost standardnih bakterijskih sevov in sevov iz kliničnih vzorcev za te spojine. V ta namen smo uporabili 12 različnih spojin, ki naj bi imele protimikrobno aktivnost. Želeli smo opredeliti minimalno inhibitorno koncentracijo (MIK) in minimalno baktericidno koncentracijo (MBK). Občutljivost izbranih bakterij smo določili kvantitativno z določanjem MIK z makrodilucijskim antibiogramom. Po določanju MIK smo določili še MBK s pomočjo nacepitve na krvni agar in štetjem kolonij.

Pričakovali smo, da bosta vsaj dve spojini pokazali protimikrobno aktivnost. Pričakovali smo, da bodo spojine aktivne proti po Gramu pozitivnim bakterijam (stafilokoki, enterokoki), ne pa proti po Gramu negativnim bakterijam. Predvidevali smo, da bodo tudi med posameznimi vrstami oz. skupinah določene razlike v občutljivosti.

2 PREGLED OBJAV

2.1 KLINIČNO POMEMBNE BAKTERIJE

Enterobakterije

Enterobakterije sodijo v družino *Enterobacteriaceae*. Ker so številne vrste iz te družine prisotne v človeškem in živalskem črevesju, jim rečemo tudi črevesne bakterije. Zanje so značilne naslednje lastnosti: so po Gramu negativni bacili, imajo katalazo, nimajo oksidaze, ne tvorijo spor, fermentirajo glukozo in druge sladkorje in pri tem tvorijo plin, reducirajo nitrate v nitrite.

Nekatere vrste so povzročiteljice bolezni pri ljudeh, živalih in rastlinah. Pri človeku najpogosteje povzročajo črevesne in zunajčrevesne okužbe. Enterobakterije zelo pogosto izoliramo iz kliničnih vzorcev (predstavljajo okrog 50 % vseh izoliranih bakterij v kliničnih laboratorijih). Pogosto povzročajo okužbe prebavil (*Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Escherichia coli*, *Yersinia* spp.), sečil (*Escherichia coli*, *Proteus* spp., *Klebsiella* spp., *Morganella morganii*), osrednjega živčevja (*Escherichia coli*), spodnjih dihal (*Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp.), krvi (*Escherichia coli*, *Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp.) (Andlovic, 2002).

Staphylococcus aureus

Je po Gramu pozitiven kok, ki se ureja v grozdu podobne skupke. Je katalaza pozitiven, negibljiv, nesporogen fakultativni anaerob, ki ima koagulazo. Pri 20-30 % odraslih oseb kolonizira nosnici, podpazdušna predela, nožnico in žrelo. Poglavitne okužbe s *S. aureus* so invazivne okužbe kože, mehkih tkiv, dihal, kosti, sečil in osrednjega živčevja (Banneman, 2003).

S. aureus je eden poglavitnih povzročiteljev okužb v bolnišnicah in domačem okolju. Resen problem v bolnišnicah predstavljajo proti meticilinu odporni sevi MRSA (Rezar in Trampuž, 2002).

Pseudomonas aeruginosa

Pseudomonas aeruginosa je po Gramu negativen aeroben bacil. Je nesporogen, nefermentativen in ima oksidazo. Ima številne virulentne dejavnike: polarne piluse,

encime, toksine, v nekaterih okoliščinah pa še polisaharidno kapsulo. Tvori dva eksotoksina (A in S) ter endotoksin. Poglavitne okužbe so okužbe ran, opeklin in sečil, pljučnica ter sepsa (Mueller-Premru, 2002).

P. aeruginosa je v bolnišnicah najpogostejši povzročitelj okužb med nefermentativnimi bakterijami, saj lahko kolonizira prebavila tudi do 26 % bolnikov. V bolnišničnem okolju ga lahko najdemo v pitni vodi, bazenih, razkužilih, na surovem sadju in zelenjavi. Prenaša ga lahko celo medicinsko osebje (Blanc in sod., 2007).

Streptococcus pneumoniae

Streptococcus pneumoniae je po Gramu pozitiven kok, ki ga v mikroskopskem preparatu prepoznamo po tem, da tvori diplokoke ali kratke verižice. Nima katalaze in oksidaze. Je fakultativno anaerobna bakterija (bolje raste v atmosferi s 5 % CO₂) s polisaharidno kapsulo. Je pogost povzročitelj pljučnice, bronhitisa, vnetja obnosnih votlin, srednjega ušesa, meningitisa, bakteriemije in sepse (Ihan, 2002a).

Enterokoki

Enterokoki so katalaza negativni, po Gramu pozitivni koki, ki se v mikroskopskem preparatu pojavljajo posamič, v parih ali kratkih verižicah. So fakultativni anaerobi, ki večinoma hidrolizirajo pirolidonil- β -naftilamid (PYR). So del normalne bakterijske flore črevesja in nožnice, okužbe pa povzročajo, ko vdrejo v primarno sterilna področja (Seme, 2002b).

So med najpogostejšimi povzročitelji bolnišničnih okužb in so po pogostosti na tretjem mestu, za bakterijama *E. coli* in *S. aureus*. Poleg okužb sečil in ran povzročajo v bolnišnici tudi okužbe v trebušni votlini, okužbe krvi, endokarditis in drugo. Znanih je 40 vrst enterokokov, medicinsko pomembni sta predvsem vrsti *Enterococcus faecalis* in *Enterococcus faecium* (Ribič in sod., 2007).

2.2 ANTIBIOTIKI

Antibiotiki so učinkovita antimikrobna sredstva. Navadno so proizvod živih celic-gliv in bakterij, lahko pa so, zlasti v novejših časih, izdelani s sintezno modifikacijo naravnega antibiotika. Preprečujejo bakterijsko rast tako, da zavirajo sintezo celične stene, nukleinskih kislin, celičnih beljakovin ali pa motijo delovanje plazemske membrane. Njihovo učinkovitost ugotavljamo *in vitro* z merjenjem minimalne inhibitorne koncentracije in minimalne baktericidne koncentracije (Kotnik, 2001).

Antibiotike razdelimo v skupine glede na mehanizme delovanja in kemično zgradbo. Po učinkih na bakterije so baktericidni in bakteriostatični. Baktericidni antibiotiki poškodujejo mikroorganizem tako, da se ni več zmožen razmnoževati, medtem ko bakteriostatični razmnoževanje samo zavrejo. Glede na mehanizem delovanja razlikujemo 4 vrste antibiotikov, in sicer takšne, ki preprečujejo sintezo celične stene, delujejo na sintezo znotrajceličnih beljakovin, vplivajo na sintezo jedrnih kislin in ovirajo dejavnosti povezane s citoplazemsko membrano (Kotnik, 2002).

2.2.1 Zaviralci sinteze celične stene

Osnovna sestavina bakterijske celične stene je peptidoglikan. Njegova osnova je iz N-acetilglukozamina in N-acetilmuraminske kisline; molekuli sta izmenično povezani v dolgo polisaharidno verigo. Posamezne polisaharidne verige so s kratkimi peptidi povezane v trdno mrežo, ki ovija bakterijsko celico. Peptidoglikanska mreža ovija po Gramu pozitivne bakterije v številnih plasteh in tvori do 50 % mase bakterijske stene, medtem ko so po Gramu negativne bakterije ovite le z enojno ali dvojno plastjo peptidoglikana (Ihan, 2002b).

Zaviralci sinteze celične stene vplivajo na uvrščanje N-acetilmuraminske kisline in N-acetilglukozamina v peptidoglikansko verigo. Pri tem imajo pomembno nalogo encimi karboksi-peptidaze in transpeptidaze. Na te encime se lahko veže penicilin in inaktivira njihovo delovanje, zato jih imenujemo tudi penicilin vežoče proteine ali encime (PBP iz angl. penicillin binding proteins). Kadar se zaviralci sinteze celične stene vežejo z encimi PBP, potrebnimi za zamreženje sestavin bakterijske stene, pride do nakopičenja osnovnih sestavin, kar sproži bakterijski avtolitični sistem, ki celico razkroji (Kotnik, 2002).

Poznamo tri vrste antibiotikov, ki zavirajo sintezo celične stene. To so: betalaktami, glikopeptidi in bacitracin.

Betalaktami

Betalaktami delujejo predvsem na po Gramu pozitivne mikrobe, vendar jih s sintetičnimi načini lahko naredimo primerne tudi za ubijanje po Gramu negativnih bakterij. So malo toksični, pomembna slabost pa je, da lahko izzovejo nastanek preobčutljivosti. Med betalaktami so najpomembnejši penicilini, cefalosporini, karbapenemi in monobaktami (Kotnik, 2001).

Glikopeptidi

Glikopeptidi delujejo tako, da se vežejo z acil-D-alanil-D-alaninom v peptidoglikanu in preprečujejo dodajanje N-acetilglukozaminskih in N-acetilmuraminskih sestavin, potrebnih za nadaljno rast celične stene. Med glikopeptidi je pomemben vankomicin (Kotnik, 2001). Uporablja se za zdravljenje okužb s proti meticilinu odpornimi stafilocoki in drugimi bakterijami, odpornimi proti betalaktamskim antibiotikom (Mueller-Premru in sod., 2001).

Bacitracin

Deluje tako, da preprečuje obnovo lipidnega prenašalca sestavin celične stene. Preprečuje njegovo defosforilacijo, s tem pa ga naredi nezmožnega za prenašanje naslednjih molekul N-acetilglukozamina (Kotnik, 2001).

Bacitracin uporabljamo le za lokalno zdravljenje, ker je sicer toksičen (Kotnik, 2002).

2.2.2 Zaviralci sinteze znotrajceličnih proteinov

Aminoglikozidi

Delujejo tako, da preprečujejo vezavo t-RNK za ribosomsko podenoto 70 S, s čimer preprečijo začetno proteinsko sintezo. Najbolj znan aminoglikozid je streptomycin, s katerim danes zdravimo tuberkulozo. Druge aminoglikozide (npr. gentamicin) uporabljamo pri okužbah, ki jih povzročajo po Gramu negativni bacili. Na po Gramu pozitivne koke ne delujejo, izjema so stafilocoki (Kotnik, 2002).

Tetraciklini

So širokospektralni antibiotiki. Z vezavo na ribosomsko podenoto 30 S prepreči vezavo aminoacil-tRNA molekuli na akceptorsko mesto ribosoma in tako preprečijo sintezo proteinov. Povzročajo razmeroma malo stranskih učinkov. S tetraciklini zdravimo okužbe, ki jih povzročajo mikoplazme, klamidije in rikecije (Chopra in Roberts, 2001).

Kloramfenikol

Deluje tako, da se veže na ribosomsko podenoto 50 S in zavre delovanje peptidiltransferaze in s tem sintezo peptidnih vezi. Je bakteriostatičen. Uporabljamo ga za zdravljenje okužb s po Gramu negativnimi mikroorganizmi, klamidijami in rikecijami. Zlasti učinkovit je pri okužbi z bakterijo *Salmonella Typhi*. Negativna lastnost kloramfenikola je njegova toksičnost za kostni mozeg. Taka obolenja so sicer redka, vendar zelo resna, saj lahko vodijo v aplazijo celic kostnega mozga (Kotnik, 2002).

Makrolidi

Makrolidni antibiotiki s širokim spektrom delovanja, so v manjših koncentracijah bakteriostatični, v večjih pa baktericidni. Eden izmed najbolj znanih makrolidov je eritromicin, ki s svojo vezavo s 23S rRNK in ribosomsko podenoto 50 S preprečuje translacijo proteinov. Novejši makrolidni antibiotik je azitromicin, ki dobro prodira v nevtrofilce in makrofage in ga uporabljajo za zdravljenje okužb, katerih povzročitelji so ujeti v fagocitnih celicah (Murray in sod., 2002).

Piranozidni antibiotiki-linkozamidi

Tako kot makrolidi tudi linkozamidi (klindamicin, linkomicin) zavirajo sintezo proteinov, saj se vežejo na ribosomsko podenoto 50 S, natančneje na 23 rRNK molekulo in blokirajo podaljševanje polipeptida. Z njim zdravimo okužbe s po Gramu pozitivnimi bakterijami in anaerobi (Petinaki in sod., 2008).

2.2.3 Zaviralci sinteze jedrnih kislin

Sulfonamidi

Sulfonamidi so po kemični zgradbi podobni paraaminobenzojevi kislini, ki tekmujejo za ista vezavna mesta na encimu dihidropteroat sintetazi. Posledično je preprečena sinteza tetrahidrofolne kisline in pirimidinov, osnovnih gradnikov nukleinskih kislin, in s tem je prekinjena sinteza DNK. Sulfonamidi so bakteriostatični kemoterapevtiki, ki jih v kliničnem zdravljenju ne uporabljamo več pogosto zaradi vse večjega pojava odpornosti bakterij proti njim. Njihovo učinkovitost povečamo v kombinaciji z drugimi kemoterapevtiki, najpogosteje s trimetoprimom (sulfametoksazol in trimetoprim) (Brooks in sod., 2004).

Trimetoprim

Je učinkovit bakteriostatičen antibiotik, ki zavira delovanje encima dihidrofolne reduktaze in na ta način preprečuje sintezo tetrahidrofolne kisline. Je bolj toksičen za prokarionte kot za evkariontske celice, saj imajo encimi dihidrofolne kisline večjo afiniteto vezave za trimetoprim pri prokariontskih celicah. Pri zdravljenju bakterijskih okužb ga velikokrat uporabljamo v kombinaciji s sulfametoksazolom (Barrow in sod., 2007).

Kinoloni

Kinoloni zavirajo delovanje DNK-giraze, ki je potrebna pri podvojevanju DNK ter s tem preprečujejo oblikovanje bakterijskega kromosoma. Predstavljajo eno pomembnejših skupin sintetičnih antibiotikov z baktericidnim delovanjem. Uporabljamo jih pri zdravljenju sistemskih okužb in okužb sečil s po Gramu negativnimi atipičnimi povzročitelji (klamidije, rikecije). Najbolj znan je ciprofloksacin (Murray in sod., 2002).

2.2.4 Zaviralci delovanja celične membrane

Zaviralci delovanja celične membrane selektivno zavirajo procese v plazemski membrani in tako ovirajo razmnoževanje prokariontskih celic. Zaradi različne strukture evkariontske in prokariontske membrane, zaviralci večinoma niso toksični za evkariontske celice (Kotnik, 2002).

Polimiksini

So ciklični baktericidni polipeptidni antibiotiki, ki delujejo podobno kot detergenti in razgrajujejo fosfolipidni dvosloj. Uporabljamo jih za zdravljenje okužb s po Gramu negativnimi mikrobi. Najbolj znana sta kolistin in polimiksin (Tsubery in sod., 2005).

2.3 ODPORNOST BAKTERIJ PROTI ANTIBIOTIKOM

2.3.1 Vrste odpornosti

Odpornost proti antibiotikom je lahko naravna (intrinzična) ali pa pridobljena.

Naravna odpornost bakterij proti antibiotikom je vedno značilna za cel bakterijski rod in jo pogojujejo genetske, strukturne in fiziološke značilnosti mikroorganizmov. Posamezne bakterijske vrste ali rodovi so naravno odporni proti nekaterim antibiotikom, kadar nimajo tarčnih mest, na katera antibiotiki delujejo. Nekateri vrste bakterij z značilno sestavo celične stene preprečujejo antibiotikom prodor do tarčnega mesta njihovega delovanja. Primer slednjega so po Gramu negativne bakterije, ko celična stena deluje kot učinkovita ovira v prepustnosti za antibiotik (Seme, 2002a).

Po Gramu negativne bakterije so naravno odporne proti naravnemu penicilinu, makrolidom in glikopeptidom. Običajno občutljive pa so za semisintetske peniciline z ali brez inhibitorjev laktamaz beta, aminoglikozide, cefalosporine, karbapeneme, kinolone in za trimetoprim/sulfametoksazol (Kotnik, 2002).

Po Gramu pozitivne bakterije so naravno odporne proti aminoglikozidom, občutljive pa za peniciline, cefalosporine, karbapeneme, makrolide in glikopeptide.

Pridobljena odpornost proti antibiotikom je za razliko od naravne prisotna samo pri posameznih sevih določene bakterijske vrste ali rodu. Lahko je posledica mutacije kromosomskega ali plazmidnega gena ali pridobitve nove genetske informacije z genskim prenosom iz druge bakterijske celice najpogosteje s konjugacijo ali transformacijo. Zaradi nekaterih genov za odpornost, ki se prenašajo vezano, bakterije postanejo odporne proti več skupinam antibiotikov (Seme in Poljak, 2001).

Med večkratno odpornimi po Gramu pozitivnimi bakterijami so najbolj pomembne *S. aureus*, odporen proti meticilinu in drugim betalaktamskim antibiotikom, ki je pogosto odporen še proti makrolidom, linkozamidom, kinolonom in aminoglikozidom; proti

vankomicinu odporni enterokoki, ki so lahko odporni tudi proti teikoplaninu in primer *Streptococcus pneumoniae*, ki je odporen proti penicilinu in makrolidom (Mueller-Premru, 2001).

Odpornost je neizbežna posledica rabe protimikrobnih učinkovin v humani medicini, veterini in poljedelstvu. Ključni dejavniki za razvoj so celokupna raba antibiotikov, struktura rabe, režim predpisovanja, ki vključuje višino odmerka, trajanje zdravljenja, način dajanja (parenteralno, oralno, topično), pogostnost križnih okužb z odpornimi mikrobi, navade prebivalstva in socialni pogoji (Čižman, 2008).

2.3.2 Mehanizmi odpornosti

Poznamo pet osnovnih mehanizmov bakterijske odpornosti proti antibiotikom (Seme, 2002a; Tenover, 2006), ki si prikazani v preglednici 1:

Preglednica 1: Osnovni mehanizmi odpornosti proti antibiotikom (Seme, 2002a; Tenover, 2006)

OSNOVNI MEHANIZMI	PRIMER
1. Sprememba tarčnega mesta oz. prijemališča antibiotika	Sprememba penicilin vežočih beljakovin-PBP (angl. penicillin-binding proteins)
2. Encimska razgradnja antibiotika	Razgradnja betalaktamskih antibiotikov z laktamazami beta
3. Neprepustnost oz. zmanjšana prepustnost celične membrane za antibiotik	Pri po Gramu negativnih bakterijah sprememba porinov v celični steni
4. Sprememba presnovne poti, na katero deluje antibiotik	Preprečena sinteza timina v bakterijski celici povzroči odpornost proti sulfonamidom in trimetoprimu
5. Aktivno izčrpavanje antibiotika iz bakterijske celice z neke vrste aktivnim transportom	Odpornost po Gramu pozitivnih in po Gramu negativnih bakterij proti tetraciklinom

2.3.3 Problem odpornosti in njeno omejevanje

Velik problem odpornosti bakterij proti antibiotikom predstavljajo bakterijski sevi, ki so odporni proti več različnim antibiotikom.

Proti meticilinu odporen *S. aureus* je eden najpomembnejših povzročiteljev bolnišničnih okužb. MRSA je pogosto odporen tudi proti drugim antibiotikom in predstavlja izziv za sodobno protimikrobno zdravljenje, predvsem odkar so se pojavili sevi z zmanjšano občutljivostjo za vankomicin (Rezar in Trampuž, 2002).

Velik problem v zdravstvu, predvsem zaradi odpornosti proti številnim antibiotikom in zaradi širjenja sevov v bolnišnicah in drugih ustanovah za nego bolnih, predstavljajo proti vankomicinu odporni enterokoki. Geni za odpornost proti vankomicinu se lahko iz VRE širijo na druge enterokoke in tudi na druge po Gramu pozitivne koke, npr. *S. aureus*. Strokovnjaki predvidevajo, da bi neuspešno obvladovanje sevov proti meticilinu odpornih *S. aureus* in VRE lahko pripeljalo do neobvladljivosti proti vankomicinu odpornih sevov *S. aureus* (Ribič in sod., 2007).

Širjenje odpornosti proti antibiotikom je predvsem posledica široke in neustrezne uporabe antibiotikov. V praksi se to kaže z vse pogostejšimi neuspehi protimikrobnega zdravljenja in tako se je potrebno soočiti z novimi kliničnimi in ekonomičnimi izzivi za zdravljenje okužb z odpornimi sevi in izdelavo čim boljših laboratorijskih testov za diagnostiko ter v določenih primerih z zdravljenjem z dražjimi antibiotiki (Tenover, 2001).

Obvladovanje bakterij VRE in MRSA zahteva intenzivno ukrepanje. Potrebno je dejavno iskanje koloniziranih in okuženih, dosledno izvajanje osamitve bolnikov in njihovih stikov, intenzivno izvajanje ukrepov za higieno rok (najpomembnejši ukrep je razkuževanje rok z alkoholnim razkužilom, ki naj nadomesti umivanje rok z milom v večini primerov), čiščenje in razkuževanje površin in opreme, pravilna raba protimikrobnih zdravil, redno zbiranje epidemioloških podatkov, predvsem pa je potrebno izboljšati ozaveščenost vseh zdravnikov in splošnega prebivalstva (Ribič in sod., 2007; Rezar in Trampuž, 2002).

Ker pa odpornost ni aktualen problem, pač pa gre za "kronično" bolezen, je edina prava rešitev iskanje novih protimikrobnih učinkovin, ki bi delovale na zaenkrat še neizkoriščena prijemališča v bakteriji (Livermore, 2005).

2.4 RAZVOJ NOVIH PROTIMIKROBNIH UČINKOVIN

Zaradi vse pogostejše odpornosti bakterij proti antibiotikom, postaja iskanje novih protibakterijskih učinkovin, ki bi bile učinkovite proti odpornim mikroorganizmom, globalen izziv in pomembno področje raziskav farmacevtske industrije. V zadnjih 30 letih razvoj protimikrobnih učinkovin stagnira, kljub temu pa so na tržišče prišle ali pa so v razvoju nekatere obetavne učinkovine, ki delujejo predvsem na po Gramu pozitivne bakterije (linezolid, daptomicin...). Zaskrbljujoče pa je, da zaenkrat ni niti v fazi I kliničnih raziskav nobene učinkovine, ki bi razen na po Gramu pozitivne bakterije delovala tudi na po Gramu negativne bakterije, z izjemo tige ciklina (Livermore, 2005; Bush in sod., 2004).

2.4.1 Bakterijska celična stena kot tarčno mesto za protimikrobne učinkovine

Klasični in neklasični beta laktamski antibiotiki zavirajo stopnjo v biosintezi peptidoglikana, ki je pomembna sestavina bakterijske celične stene. Z vedno globljim razumevanjem biosinteznih stopenj peptidoglikana postajajo vse bolj zanimive tudi znotrajcelične stopnje biosinteze peptidoglikana, ki jo katalizirajo Mur encimi (MurA, MurB, MurC, MurD, MurE in MurF). Ti encimi, za katere so že znane kristalne strukture, so postali pomembne tarče za racionalno načrtovanje njihovih inhibitorjev kot potencialnih protimikrobnih učinkovin (Zoeiby in sod., 2003).

2.4.2 Mur encimi

MurA

Biosinteza peptidoglikana poteka v dveh stopnjah. Prva stopnja biosinteze prekurzorjev poteka v citoplazmi. V tej stopnji nastajajo osnovni "sestavni deli" mureina, kot so N-acetilglukozamin in N-acetil-muramilpentapeptid, in sicer v obliki derivatov uracil-difosfata (UDP). V prvi stopnji biosinteze, ki jo katalizira encim Mur A, pride do prenosa enolpiruvata iz fosfoenolpiruvata na UDP-*N*-acetilglukozamin (Zoeiby in sod., 2003).

MurB

Sledi redukcija UDP-*N*-acetilglukozamin enolpiruvata v UDP-*N*-acetilmuraminsko kislino, ki jo katalizira encim MurB (Zoeiby in sod., 2003).

Naslednje stopnje v biosintezi peptidoglikana katalizirajo od ATP odvisne aminokislinske ligaze, ki v procesu biosinteze peptidoglikana na UDP-*N*-acetilmuraminsko kislino pripnejo skupino petih aminokislin. Mednje spadajo MurC, MurD, MurE in MurF, ki katalizirajo sintezo amidne oz. peptidne vezi. Kristalna struktura pri različnih bakterijskih vrstah je pokazala, da imajo vse štiri skupno tridimenzionalno strukturo v treh domenah: centralni, C-terminalni in N-terminalni. Centralna domena je odgovorna za vezavo ATP, C-terminalna za vezavo aminokislinskega ostanka, N-terminalna pa za vezavo UDP-prekurzorja. Encimi obstajajo v odprti in zaprti konformaciji, kar je najbrž posledica vezave liganda (Zoeiby in sod., 2003).

MurC

Pripne prvo aminokislino, najpogosteje L-alanin, na UDP-*N*-acetilmuraminsko kislino. Sestavljajo ga tri strukturne domene, na stiku katerih leži aktivno mesto encima s specifičnimi mesti za tri substrate. Raziskave so pokazale, da se v poteku reakcije v svoje vezavno mesto na mejni površini med centralno in C-terminalno domeno najprej veže ATP, ob tem pa pride do pretvorbe encimov v aktivno konformacijo (Barreteau in sod., 2008; Smith, 2006).

MurD

Naslednjo aminokislino, D-glutaminsko kislino, pripne encim MurD. V poteku reakcije v svoje vezavno mesto na centralni domeni najprej veže ATP, naslednji UDP-*N*-acetilmuramil-L-alanin in kot zadnja D-glutaminska kislina v vezavno mesto na C-terminalni domeni (Bertrand in sod., 2000; Bertrand in sod., 1999).

MurE

Tretjo aminokislino, L-lizin, pripne po Gramu pozitivnih bakterijah ali mezo-2,6-diaminopimelinsko kislino pri po Gramu negativnih bakterijah, pripne encim MurE (Zoeiby in sod., 2003).

MurF

Pripne dipeptid D-alanil-D-alanin. Domene v samostojnem encimu MurF oblikujejo odprto konformacijo v obliki polmeseca, kjer kataliza ni možna, zato sklepajo, da pride med vezavo substratov do zaprtja strukture (Barreteau in sod. 2008; Zoeiby in sod., 2003).

2.4.3 Inhibitorji Mur encimov

Encimi Mur so potencialne tarče za razvoj novih protibakterijskih učinkovin. Raziskave bakterijske genomike so potrdile, da so geni od *murA* do *murF*, ki kodirajo zanje, nujni za obstoj bakterije, hkrati pa ugotavljajo visoko ohranjenost encimov Mur med različnimi bakterijskimi vrstami. To pomeni, da bi Mur inhibitor pričakovano izkazoval baktericidni učinek in širok spekter delovanja. Poleg tega ligaze Mur najdemo le pri bakterijah, kar reši problem selektivne toksičnosti. Znano je tudi, da vsi encimi Mur kot substrat vežejo molekulo z enakim strukturnim elementom, UDP-*N*-acetilmuramilno skupino, iz česar sklepamo, da bi Mur inhibitor zaviral delovanje večine encimov Mur in bil tako učinkovitejši in manj podvržen pojavu bakterijske odpornosti (Zoeiby in sod., 2003).

V literaturi je že opisanih nekaj inhibitorjev encimov Mur, vendar pa bodisi zaradi slabe protibakterijske učinkovitosti bodisi zaradi slabih farmakokinetičnih lastnosti, kot so absorpcija, porazdelitev, metabolizem in eliminacija, še nobeden izmed njih ni prišel v klinično uporabo. Problem večine je, da svoj inhibitorski učinek izkazujejo zgolj na izoliranih encimih, na celotno bakterijo pa nimajo učinka (Zoeiby in sod., 2003).

Kot edini doslej klinično uporaben inhibitor encimov Mur, ki kompetitivno kot analog fosfoenolpiruvata inhibira MurA tako, da se kovalentno veže na cisteinski ostanek encima, je fosfomicin (Gobec in Urleb, 1999).

2.5 VREDNOTENJE UČINKOVITOSTI PROTIMIKROBNIH UČINKOVIN

Kot pri vseh ostalih učinkovinah tudi učinkovitost novega protimikrobnega sredstva najprej preizkušamo *in vitro*, šele nato sledijo *in vivo* raziskave. Občutljivost in po drugi strani odpornost posameznega bakterijskega seva proti protimikrobni učinkovini *in vitro* določamo z antibiogramom, metoda pa je lahko kvalitativnega ali kvantitativnega tipa. Koncentracije protimikrobne učinkovine, izbor testnih bakterijskih sevov, postopki izvedbe antibiograma in interpretacija rezultatov so opredeljeni v mednarodnih standardih, večina držav, ki lastnih standardov nima izoblikovanih, pa upošteva priporočila CLSI (angl. Clinical and Laboratory Standards Institute, ZDA).

2.5.1 Kvalitativne metode

S temi metodami kvalitativno določimo, za katere protimikrobne učinkovine je posamezni bakterijski sev občutljiv.

2.5.1.1 Difuzijski antibiogram v agarju

To je preprosta in hitra metoda za določanje občutljivosti za antibiotike pri hitro rastočih bakterijah. Primerno gosto suspenzijo čiste kulture zasejemo na površino trdnega gojišča v petrijevki. Na zasejano ploščo položimo standardizirane diske z različnimi antibiotiki (disk-difuzijska metoda oziroma Kirby-Bauerjev test) ali pa v agar oblikujemo luknjico, v katero nanese protimikrobno učinkovino znane koncentracije (difuzijska metoda z luknjicami). Antibiotiki difundirajo v gojišče in zavirajo razmnoževanje občutljivih bakterij. Po inkubaciji izmerimo cono (v milimetrih) zaviralnega pasu okoli diska oziroma luknjice. Izmerjene vrednosti primerjamo s standardi, ki so na voljo za posamezni antibiotik in vrsto bakterij. Stopnjo občutljivosti bakterijskega seva izrazimo kot občutljiv (S-senzitiven), zmerno občutljiv (I-intermediaren) in neobčutljiv ali odporen (R-rezistenten) proti protimikrobni učinkovini (Ružič-Sabljić, 2003).

2.5.2 Kvantitativne metode

S temi metodami določimo, v kolikšni meri je bakterijski sev občutljiv za protimikrobno učinkovino oziroma v kakšnih koncentracijah protimikrobna učinkovina pokaže učinek. Določamo MIK, ki je najnižja koncentracija učinkovine, ki popolnoma ali skoraj popolnoma ustavi razmnoževanje in rast bakterij in MBK, ki je najnižja koncentracija učinkovine, ki uniči vsaj 99,9 % standardiziranega bakterijskega inokuluma.

2.5.2.1 Dilucijski antibiogram

Pri kvantitativnem določanju občutljivosti za določeno protibakterijsko učinkovino uporabljamo metodo dilucijskega antibiograma. Dokazujemo, kolikšna je MIK posameznega antibiotika za določeno vrsto bakterij.

Dilucijski antibiogram v tekočem gojišču

V serijo epruvet pripravimo razredčine protimikrobne učinkovine z znanimi rastočimi koncentracijami, nato pa dodamo suspenzijo izolirane bakterijske čiste kulture. Po inkubaciji ovrednotimo MIK kot najnižjo koncentracijo učinkovine, kjer ne zaznamo bakterijske rasti (Struthers in Westran, 2003).

Metoda je lahko mikrodilucijskega tipa, kjer uporabljamo mikrotitrne ploščice z vdolbinicami in manjše volumne, rezultate pa ovrednotimo z merjenjem gostote rasti, ali makrodilucijska, kjer uporabljamo epruvete in večje volumne, rezultate pa ovrednotimo vizualno z opazovanjem bistrosti oziroma motnosti gojišča.

Po določanju MIK lahko določimo še baktericidno delovanje antibiotika. Vse razredčine protimikrobne učinkovine, kjer ne pride do bakterijske rasti, precepimo na trdno gojišče brez antibiotika. Po inkubaciji ugotavljamo pri kateri razredčini antibiotika so vse bakterije uničene (trdno gojišče ostane sterilno). Ta razredčina antibiotika je MBK, ki ubije vsaj 99,9 % standardiziranega bakterijskega inokuluma (Ružić-Sabljić, 2003).

Dilucijski antibiogram v agarju

Agar-dilucijsko gojišče je gojišče, ki ima že vgrajeno protimikrobno učinkovino v določeni znani koncentraciji, ki zavira rast nekaterih mikroorganizmov. Nanj nanesimo inokulum

testnega bakterijskega seva in po inkubaciji rezultate opredelimo kot prisotnost oziroma odsotnost bakterijske rasti na mestu nanosa inokuluma.

2.5.2.2 Etest

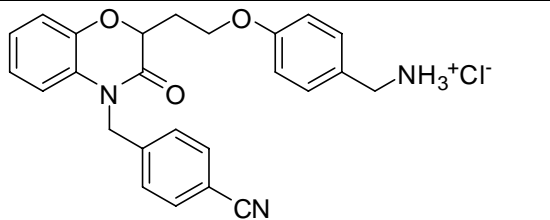
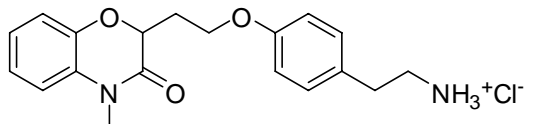
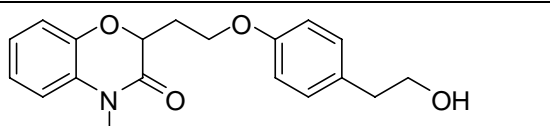
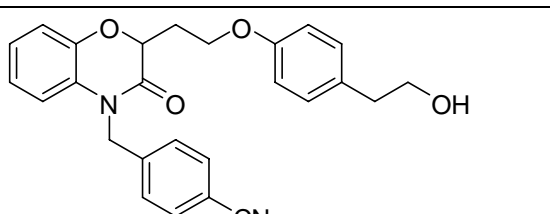
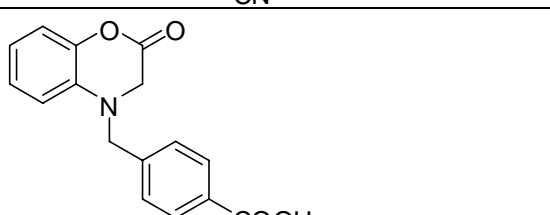
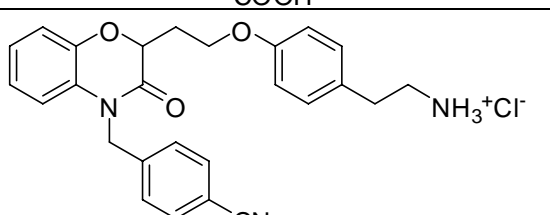
Etest je kvantitativna metoda za določanje občutljivosti mikroorganizmov za protimikrobna sredstva. Etesti so posebne, zelo tanke membrane, impregnirane z rastočimi koncentracijami antibiotika. MIK je tista koncentracija antibiotika, pri kateri se rob bakterijskih kolonij dotika traka z antibiotikom (Mueller-Premru in Seme, 2003).

3 MATERIAL IN METODE

3.1 TESTNE SPOJINE

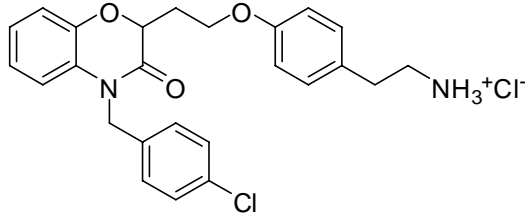
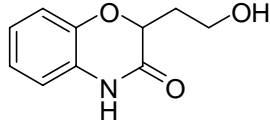
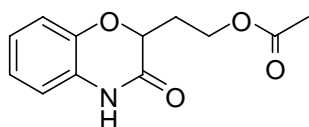
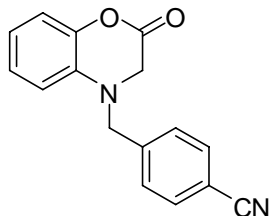
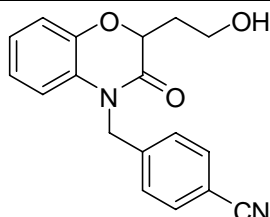
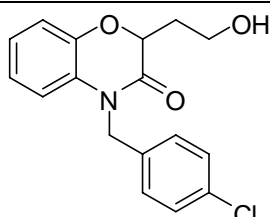
V diplomski nalogi smo testirali 12 spojin. Ugotavljali smo ali imajo protimikrobno aktivnost. V preglednici 2 so navedene oznake testiranih spojin, njihova struktura in molekulska masa. Vse podatke smo dobili na Fakulteti za farmacijo.

Preglednica 2: Testne spojine, njihova oznaka, struktura in molekulska masa (Kemijske lastnosti..., 2008)

OZNAKA	STRUKTURA	MOL. MASA
KNZ-21b		449,929
KNZ-47		362,851
KNZ-45		327,374
KNZ-44b-2		428,480
KNZ-6b		283,279
KNZ-22b		463,956

Se nadaljuje...

Nadaljevanje preglednice 2: Testne spojine, njihova oznaka, struktura in molekulska masa

OZNAKA	STRUKTURA	MOL. MASA
KNZ-52		473,392
KNZ-32c		193.199
KNZ-35		235.236
KNZ-4b		264,279
KNZ-10i		308,331
KNZ-50		317,767

3.2 STANDARDNI BAKTERIJSKI SEVI IN KLINIČNI IZOLATI

Testirali smo občutljivost standardnih oz. referenčnih bakterijskih sevov iz zbirke ATCC (angl. American Type Culture Collection) za vseh 12 spojin. ATCC je neodvisen neprofiten biološki center, ki kultivira in distribuira avtentične mikroorganizme in celične linije. Med po Gramu negativnimi bakterijami smo v raziskavo vključili seve vrst

Escherichia coli ATCC 25922 in *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, med po Gramu pozitivnimi bakterijami pa seve vrst *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 in *Staphylococcus aureus* ATCC 29213. Za vsak standardni bakterijski sev smo najprej pripravili čisto kulturo na krvnem agarju (KA), ki smo jo hranili v hladilniku, iz nje pa smo tedensko na KA precepljali sveže delovne kulture za izvedbo antibiogramov.

S spojinami, pri katerih smo s testiranjem standardnih sevov zaznali aktivnost, smo testirali tudi izolate iz kliničnih vzorcev. V raziskavo smo vključili 72 izolatov, in sicer 20 izolatov bakterije *S. aureus* in 52 izolatov enterokokov.

Bakterije smo osamili v Laboratoriju za hemokulture in druge urgentne mikrobiološke preiskave, in sicer iz kužnin bolnikov z različnih oddelkov Kliničnega centra v Ljubljani. Nekaj bakterijskih izolatov pa smo izbrali iz zbirke tega laboratorija ter iz zbirke izolatov Laboratorija za bakteriološko diagnostiko infekcij sečil. Izolate smo osamili iz različnih kužnin, in sicer iz krvi, urina, tkiva, brisov ran in vsebine abdomna. Vsi izolati so bili do testiranja shranjeni pri $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

3.3 OSTALA LABORATORIJSKA OPREMA

- splošni mikrobiološki material: petrijeve plošče, bakteriološke cepilne zanke, sterilne plastične epruvetke s pokrovčki (10 ml), sterilne platenke s pokrovčki (40 ml), sterilne steklenice s pokrovčki (125 ml), avtomatske pipete s sterilnimi nastavki (1000 μl , 200 μl), sterilne plastične kapalke (3 ml), sterilne steklene merilne pipete (50 ml, 10 ml), sterilni bombažni brisi,
- zamrzovalnik, nastavljen na $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$,
- zamrzovalna omara, nastavljena na $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$,
- hladilnik, nastavljen na $4\text{ }^{\circ}\text{C}$,
- termostat za aerobno inkubacijo s temperaturo $35\text{-}37\text{ }^{\circ}\text{C}$,
- plinski gorilnik,
- merilec optične gostote (denzitometer),
- stresalnik,
- sterilni membranski filtri z velikostjo por $0,2\text{ }\mu\text{m}$, brizge.

3.4 PRIPRAVA RAZTOPIN TESTNIH SPOJIN

Na Fakulteti za farmacijo Univerze v Ljubljani se ukvarjajo z načrtovanjem, sintezo in vrednotenjem protibakterijske učinkovitosti novih učinkovin ter razjasnjevanjem njihovega mehanizma delovanja na molekularnem nivoju. Eden od njihovih projektov je tudi razvoj inhibitorjev Mur encimov, ki sodelujejo pri znotrajceličnih stopnjah biosinteze peptidoglikana.

Program obsega racionalno načrtovanje učinkovin na osnovi že znanih in novih validiranih tarč, sintezo in izolacijo učinkovin ter njihovo biološko in fizikalno kemijsko vrednotenje. Validirane tarče so izbirali med proteini z znano kristalno strukturo ali znano strukturo v raztopini, ki so dostopne v bazi PDB (angl. Protein Data Bank), v okviru lastnih raziskav pa so si prizadevali odkriti, izolirati in validirati nove tarčne makromolekule.

To so ugotavljali z virtualnim rešetanjem. Virtualno reševanje je ena izmed najbolj uporabljenih tehnik visoko zmogljivostnega odkrivanja učinkovin. Metode so oblikovali za pregledovanje velikih podatkovnih baz in za izbor omejenega števila spojin z ustreznim delovanjem, ki gredo v nadaljnia testiranja. Računalniški programi uporabljajo različne filtre, omejitve, algoritme ter podobnosti med molekulami, da na koncu iz npr. 10^{12} molekul izberejo cca. 1000 spojin, ki jih je možno v krajšem času preizkušati za biološko aktivnost (Walters in sod., 1998).

Vsako od spojin z maso 10 mg smo za izvedbo metode makrodilucijskega antibiograma v Mueller Hinton bujonu (MHB) dobili raztopljene v 5 ml dimetilsulfoksida (DMSO), s koncentracijo 2 mg/ml.

Raztopino smo nato sterilno redčili z MHB kot je prikazano v preglednici 3, tako da smo dobili osnovno raztopino potencialnega inhibitorja s koncentracijo 256 $\mu\text{g/ml}$ (Amsterdam, 1996). Raztopino smo sterilizirali s filtracijo skozi sterilni membranski filter z velikostjo por 0,2 μm in jo uporabili kot izhodišče za izvedbo metode makrodilucijskega antibiograma. Membranski filtri so prikazani na sliki 1. Po delu smo raztopine zamrznili in jih v primeru ponovnega testiranja spet odmrznili. Pripravljene raztopine spojin vidimo na sliki 2.

Preglednica 3: Priprava raztopin potencialnega inhibitorja (Amsterdam, 1996: 59)

Volumen osnovne raztopine [ml]	Volumen Mueller Hinton bujona [ml]	Koncentracija dobljene raztopine [$\mu\text{g/ml}$]
2	13,62	256
2	13,62	256
1	6,81	256



Slika 1: Membranski filtri

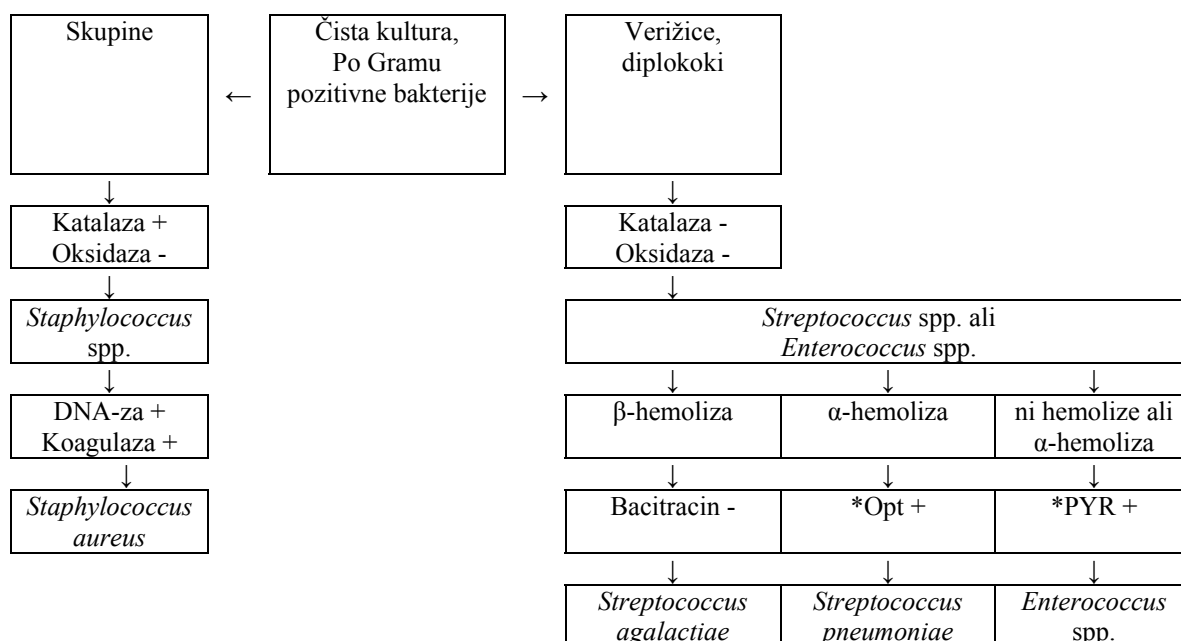


Slika 2: Pripravljena raztopina spojine

3.5 KLASIČNA IDENTIFIKACIJA BAKTERIJ

Najprej smo pregledali rast bakterij na krvnem agarju. Nato smo naredili mikroskopski preparat in ga obarvali po Gramu. Sledila sta testa za dokaz prisotnosti katalaze in oksidaze, nato pa določitev drugih biokemijskih lastnosti, kot kaže preglednica 4.

Preglednica 4: Shema identifikacije po Gramu pozitivnih bakterij



Legenda: *OPT-optohinski test, *PYR-pirolidonil-β-naftilamidni test

3.5.1 Rast bakterij na krvnem agarju

Staphylococcus aureus

Na KA raste največkrat v zlatorumenih kolonijah (tvori endopigment), ki so obdane s prozornim robom beta hemolize. Beta hemoliza imenujemo pojav, ko bakterija izloča hemolizin, ki razgradi eritrocite, izplavi še hemoglobin ter je KA v okolici bakterijske kolonije popolnoma prozoren (Ružič-Sabljić, 2003).

***Staphylococcus aureus*-MRSA**

Proti meticilinu odporen *S. aureus* dokažemo, kadar ni inhibicijske cone ob disku oksacilina/meticilina. Oksacilinska plošča se uporablja kot presejalni test za ugotavljanje odpornosti stafilokokov proti oksacilinu. V uporabi je kot dopolnilna metoda za detekcijo bakterije MRSA.

Enterococcus faecalis

Tvori na KA prosojne kolonije največkrat brez hemolize.

***Enterococcus faecalis*-VRE**

Proti vankomicinu odporen enterokok dokažemo, kadar ni inhibicijske cone ob disku vankomicina. Plošča z vankomicinom se uporablja kot presejalni test za ugotavljanje odpornosti enterokokov proti vankomicinu.

3.5.2 Barvanje po Gramu

V kapljico fiziološke raztopine na objektniku smo s cepilno zanko prenesli kolonijo s plošče in kulturo razmazali. Preparat smo pred barvanjem posušili ter fiksirali z metanolom.

- Preparat smo nato prelili z raztopino kristal vijoličnega (barvilo 1 bioMérieux, Francija) za 30-60 sekund.
- Odlili smo barvilo in preparat rahlo sprali z vodo.
- Odlili smo vodo in preparat prelili z raztopino joda (barvilo 2 bioMérieux, Francija) za 20-60 sekund.
- Nežno smo sprali z vodo.
- Nato smo preparat razbarvali z aceton alkoholom.
- Barvilo smo sprali z nežnim spiranjem z vodo.
- Preparat smo prelili s safraninom (barvilo 3 bioMérieux, Francija) za 30 sekund.
- Safranin smo rahlo sprali z vodo in preparat osušili.

3.5.3 Dokaz katalaze

Na predmetnik smo nanegli 1 kolonijo bakterijske kulture, dodali 1 kapljico 3 % vodikovega peroksida (H_2O_2). V primeru pozitivne reakcije smo opazili nastanek mehurčkov, v primeru negativne reakcije pa mehurčkov ni bilo.

3.5.4 Dokaz oksidaze

Košček filtrirnega papirja smo položili na predmetnik. Na papir smo nanegli nekaj kapljic oksidaznega reagenta (1 % tetrametil p-fenildiamina). S stekleno paličico smo prenesli del kolonije na filtrirni papir. Pojav vijoličaste barve takoj ali v dveh minutah dokazuje, da ima bakterija oksidazo.

3.5.5 Deoksiribonukleaza (DNA-za)

Na gojišče z DNA smo zasejali na enem mestu kulturo in inkubirali pri 35 °C. Po 24 urah smo gojišče prelili z 1M klorovodikovo kislino (HCl). Zbistritev gojišča okoli zasejane kulture je dokaz za DNA-zo.

3.5.6 Prisotnost vezane koagulaze

Kapljico citrirane plazme smo kanili na predmetnik. Dodali smo 1 kolonijo preiskovane bakterije in s plastično paličico dobro premešali. Pozitivna reakcija nastane v 5 sekundah kot koagulacija v obliki drobnih zrn.

3.5.7 PYR (L-pirolidonil- β -naftilamid) test

Za biokemično identifikacijo po Gramu pozitivnih bakterij smo uporabili že pripravljen komercialni test PYR.

Na komercialni test BBL Dry Slide smo nanegli 1 kapljico destilirane vode. Bakterijsko kulturo smo razmazali na navlaženo področje na testni ploščici. Inkubirali smo 2 minuti pri sobni temperaturi. Pripravili smo si ampulo PYR Color developer, jo stisnili s palcem in

kazalcem, da smo strli njeno notranjost in iztisnili 1 kapljico na ploščico. Pozitiven rezultat, ki se pojavi v minuti, je pojav rožnate barve na mestu bakterijske kulture.

3.6 PRIPRAVA UPORABLJENIH GOJIŠČ IN RAZTOPIN

Pri pripravi mikrobioloških gojišč in dodatkov smo se opirali na predpise Splošnih postopkov Inštituta za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete v Ljubljani, pri izvajanju metod pa na priporočila CLSI (CLSI, 2008).

3.6.1 Krvni agar

Vse izolate smo gojili na krvnem agarju in jih inkubirali aerobno pri 35 °C. Krvni agar je s krvjo obogateno osnovno gojišče. V diagnostičnih laboratorijih se uporablja za rast patogenih bakterij.

Za pripravo gojišča KA (Merck KGaA, Nemčija) smo v 1 l vode dodali 40 g pripravljene mešanice (Blood Agar Base).

Mešanica vsebuje:

20,0 g ekstrakta govejega srca

5,0 g NaCl

15,0 g agarja

Priprava: Sestavine smo raztopili. Nastalo gojišče smo sterilizirali z avtoklaviranjem 15 minut pri temperaturi 121 °C. Nato smo ga ohladili na 50 °C in mu aseptično dodali citrirano govejo kri (5 %) in razlili v petrijeve plošče.

3.6.2 Tekoče gojišče Mueller Hinton bujon (MHB)

Sestava osnovnega medija za MHB (pH=7,3):

goveji ekstrakt 300 g/l

hidroliziran kazeinat 17,5 g/l

škrob 1,5 g/l

Priprava: V 1 l destilirane vode smo raztopili 22 g dehidriranega osnovnega medija MHB, ki vsebuje goveji ekstrakt, kisli hidrolizat kazeina in škrob. Dobljeno raztopino smo nalili v steklenice po 100 ml in avtoklavirali 15 minut pri temperaturi 121 °C. MHB je primeren za kultivacijo širokega spektra mikroorganizmov in za pripravo bakterijskega inokuluma.

3.6.3 Fiziološka raztopina

Priprava: V 1 l destilirane vode smo raztopili 8,5 g natrijevega klorida (NaCl), raztopino avtomatsko razlivali v steklene epruvete po 9 ml in jih avtoklavirali 15 minut pri temperaturi 121 °C.

3.7 PRIPRAVA BAKTERIJSKIH IZOLATOV IN BAKTERIJSKE SUSPENZIJE

3.7.1 Revitalizacija kultur

Posamezne izolate bakterij, ki so bili shranjeni v krioeprevetkah pri -80 °C, smo najprej odmrznili in nato s cepilno zanko aseptično prenesli na KA. Petrijeve plošče smo nato inkubirali v aerobnih pogojih 24 ur pri temperaturi 35-37 °C, oziroma do pojava tipičnih kolonij.

Ostale izolate, ki smo jih dobili dnevno iz rutine, smo nacepili direktno na KA in nato inkubirali enako v aerobnih pogojih 24 ur pri temperaturi 35-37 °C, oziroma do pojava tipičnih kolonij.

Po inkubaciji smo iz delovne kulture pripravili bakterijski inokulum.

3.7.2 Priprava inokuluma

V 3 ml fiziološke raztopine (0,9 % NaCl) smo iz čiste kulture izolata pripravili bakterijsko suspenzijo gostote 0,5 McFarland (McF), kar pomeni, da je vsebovala približno 1 do 2-krat 10^8 bakterijskih celic oziroma CFU/ml (angl. colony forming units).

V diplomski nalogi smo uporabljali koncentracijo bakterij 10^6 CFU/ml. Ustrezno redčitev smo pripravili s pomočjo Mueller Hinton bujona. Koncentracijo bakterij 10^6 CFU/ml smo pripravili tako, da smo 1 ml bakterijske suspenzije gostote 0,5 McF dodali v stekleničko s 100 ml MHB.

3.8 DOLOČANJE OBČUTLJIVOSTI BAKTERIJ ZA NOVE SPOJINE

3.8.1 Izvedba makrodilucijske metode v bujonu

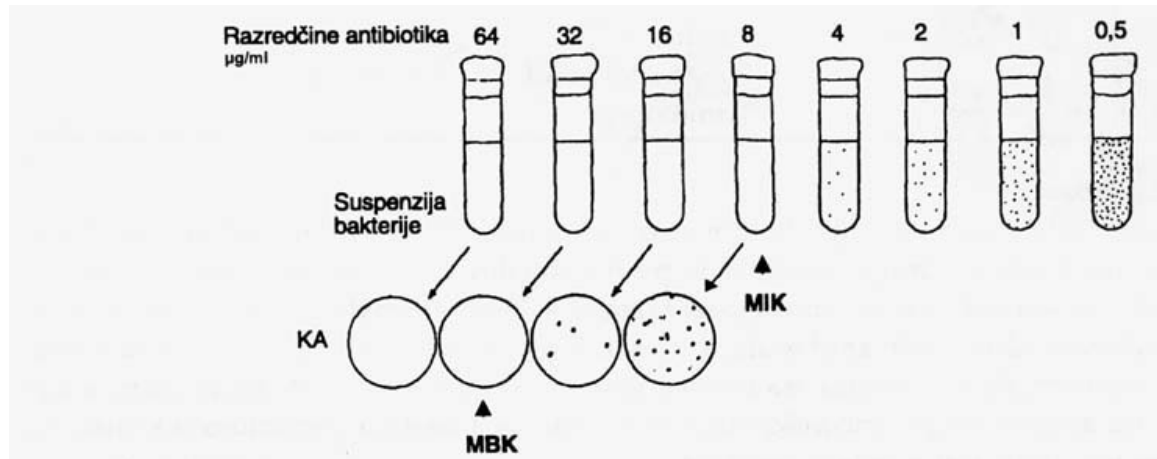
Ob prižganem gorilniku smo v vrsto 14 epruвет (razen v prvo) sterilno odpipetirali po 0,5 ml MHB. V prvo epruveto smo nato dodali 1 ml pripravljene raztopine potencialnega inhibitorja s koncentracijo 256 $\mu\text{g/ml}$. Nato smo 0,5 ml prenesli v drugo epruveto, premešali ter znova po 0,5 ml prenesli v naslednjo epruveto ter tako nadaljevali vse do zadnje epruvete iz katere smo zavręli 0,5 ml. Po končanem redčenju smo v vsako epruveto odpipetirali po 0,5 ml pripravljenega bakterijskega inokuluma, ki je vseboval približno 10^6 CFU/ml. Zaradi direktne inokulacije so bile končne koncentracije potencialnega inhibitorja zdaj ustrezno nižje (od 128 $\mu\text{g/ml}$ do 0,016 $\mu\text{g/ml}$), gostota bakterijskih celic pa je bila približno 5-krat 10^5 CFU/ml. Epruvete smo zamašili in aerobno inkubirali 18 do 24 ur pri temperaturi 35-37 °C.

Po inkubaciji smo v vsaki epruveti vizualno ocenili, ali je bakterijska rast prisotna (motno gojišče) ali ne (bistro gojišče). Na ta način smo kvantitativno ovrednotili učinek potencialnega inhibitorja z vrednostjo MIK, ki smo jo določili kot najnižjo koncentracijo kjer ni bilo prisotne bakterijske rasti, in jo upoštevali kot najmanjšo koncentracijo potencialnega inhibitorja, ki ustavi razmnoževanje in rast bakterij (slika 3 in slika 4).

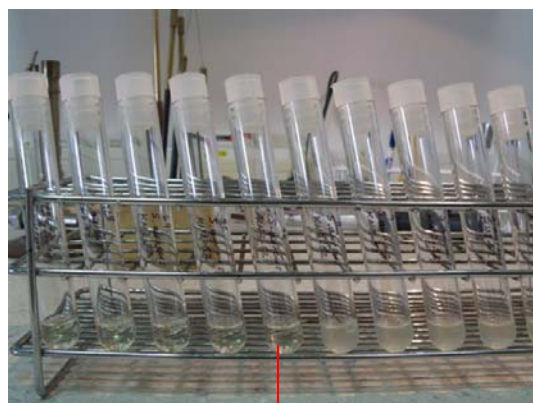
Po inkubaciji smo določili še minimalno baktericidno koncentracijo (MBK). Vse razredčine, v katerih ni bilo prisotne bakterijske rasti in prvo, v kateri je bakterijska rast bila prisotna, smo po 0,1 ml nacepili na novo ploščo KA, ki smo jo označili z zaporedno številko epruvete. Plošče smo nato inkubirali 18 do 24 ur pri temperaturi 35-37 °C.

Po inkubaciji smo na vsaki plošči vizualno ocenili, ali je bakterijska rast bila prisotna (bakterijske kolonije so zrastle, kjer se je dalo smo jih prešteli oz. ocenili njihovo število) ali ne (ni zrastle nobene bakterijske kolonije). Na ta način smo kvantitativno opredelili učinek potencialnega inhibitorja z vrednostjo MBK, ki smo jo določili kot koncentracijo v zadnji (najnižji) razredčini, kjer po precepitvi na ploščo KA ni bilo prisotne bakterijske rasti (ni zrastle nobene bakterijske kolonije) in jo upoštevali kot najnižja koncentracija, ki

uniči vse bakterije (baktericidni učinek). MBK je tista koncentracija spojine, ki ubije vsaj 99,9 % standardiziranega bakterijskega inokuluma (slika 3 in slika 5).

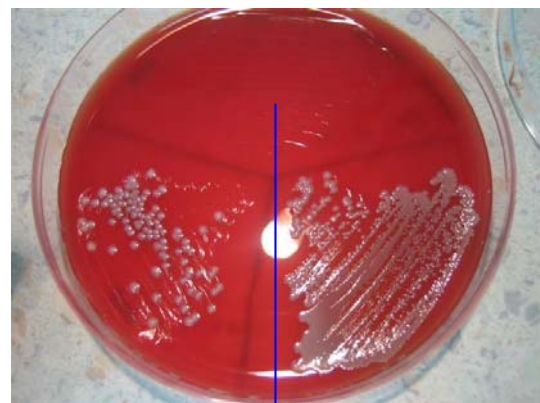


Slika 3: Metoda določanja minimalne inhibitorne in minimalne baktericidne koncentracije antibiotika (Ružič-Sabljič, 2003).



Odsotnost rasti Prisotnost rasti

MIK



MBK

Slika 4: Določitev MIK (prisotnost oz. odsotnost bakterijske rasti v epruveti)

Slika 5: Določitev MBK (prisotnost oz. odsotnost bakterijske rasti na KA)

V preglednici 5 so prikazane oznake, ki smo jih uporabljali pri interpretaciji rezultatov.

Preglednica 5: Oznake, ki smo jih uporabljali pri interpretaciji rezultatov

	POMEN	OZNAKA
Določitev MIK	Prisotnost bakterijske rasti v epruveti (motno gojišče)	+
	Odsotnost bakterijske rasti v epruveti (bistro gojišče)	-
Določitev MBK	Prisotnost bakterijske rasti na KA (rast bakterijskih kolonij)	✓
	Odsotnost bakterijske rasti na KA (ni rasti bakterijskih kolonij)	x

3.9 KONTROLNI SEVI IN GENTAMICIN

Za kontrolo kvalitete makrodilucijske metode smo uporabili standardna seva *Escherichia coli* ATCC 25922 in *Staphylococcus aureus* ATCC 29213. Tudi tukaj smo izvedli metodo makrodilucijskega antibiograma v MHB. Uporabili smo znani antibiotik gentamicin. Sprejemljiva meja MIK za gentamicin pri bakteriji *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 se giblje med 0,12-1 µg/mL in pri bakteriji *Escherichia coli* ATCC 25922 med 0,25-1 µg/mL (preglednica 6). Meje so določene po mednarodnem standardu CLSI (CLSI, 2008).

4 REZULTATI

4.1 IDENTIFIKACIJA BAKTERIJ IN DOLOČITEV OBČUTLJIVOSTI

V raziskavo smo vključili 72 izolatov, in sicer 20 izolatov bakterije *S. aureus*, od tega 10 proti meticilinu odpornih *S. aureus* (MRSA) in 10 občutljivih (MSSA) ter 52 izolatov enterokokov, od tega 22 za vankomicin občutljivih *E. faecalis* in *E. faecium* ter 30 proti vankomicinu odpornih *E. faecium* (VRE).

Za klasično identifikacijo smo uporabljali naslednje teste: barvanje po Gramu, test oksidaze in katalaze, test DNA-ze, test vezane koagulaze in komercialni test PYR, za ugotavljanje občutljivosti za standardne antibiotike pa metodo difuzije v agarju z diski.

4.2 REZULTATI TESTIRANJA OBČUTLJIVOSTI KONTROLNIH SEVOV ZA GENTAMICIN

V preglednici 6 so predstavljeni rezultati testiranja občutljivosti standardnih sevov *E. coli* ATCC 25922 in *S. aureus* ATCC 29213 za gentamicin.

MIK gentamicina smo pri *E. coli* ATCC 25922 ovrednotili kot 0,5 µg/ml pri *S. aureus* ATCC 29213 pa kot 0,12 µg/ml. Rezultata se nahajata v sprejemljivih mejah, ki so določene po mednarodnem standardu CLSI.

Preglednica 6: Testiranje občutljivosti standardnih sevov *E. coli* ATCC 25922 in *S. aureus* ATCC 29213 za gentamicin

STANDARDNI SEV	MIK gentamicina [µg/ml]	
	STANDARD (CLSI, 2008)	NAŠ REZULTAT
<i>E. coli</i> ATCC 25922	0,25-1	0,5
<i>S. aureus</i> ATCC 29213	0,12-1	0,12

4.3 DOLOČANJE OBČUTLJIVOSTI STANDARDNIH SEVOV ZA NOVE SPOJINE

4.3.1 Rezultati testiranja občutljivosti standardnih sevov za spojine KNZ-47, KNZ-45, KNZ-44b-2 in KNZ-6b

Iz preglednice 7 je razvidno, da smo po inkubaciji bakterijsko rast zaznali pri vseh standardnih sevih, in sicer pri vseh razredčinah testnih spojin, zato smo MIK in MBK ovrednotili kot večjo od 128 µg/ml.

Preglednica 7: Rezultati testiranja občutljivosti štirih standardnih sevov za spojine KNZ-47, KNZ-45, KNZ-44b-2 in KNZ-6b

Standardni sevi	KNZ-47, KNZ-45, KNZ-44b-2, KNZ-6b [µg/ml]														MIK [µg/ml]	MBK [µg/ml]
	128	64	32	16	8	4	2	1	0,5	0,25	0,125	0,06	0,03	0,015		
<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	>128	>128
	✓															
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	>128	>128
	✓															
<i>E. coli</i> ATCC 25922	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	>128	>128
	✓															
<i>S. aureus</i> ATCC 29213	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	>128	>128
	✓															

4.3.2 Rezultati testiranja občutljivosti standardnih sevov za spojine KNZ-32c, KNZ-35, KNZ-4b, KNZ-10i in KNZ-50

Iz preglednice 8 je razvidno, da smo tudi pri tem testiranju po inkubaciji bakterijsko rast zaznali pri vseh standardnih sevih, in sicer prav tako pri vseh razredčinah testnih spojin, zato smo MIK in MBK ovrednotili kot večjo od 128 µg/ml.

Preglednica 8: Rezultati testiranja občutljivosti štirih standardnih sevov za spojine KNZ-32c, KNZ-35, KNZ-4b, KNZ-10i in KNZ-50

Standardni sevi	KNZ-32c, KNZ-35, KNZ-4b, KNZ-10i, KNZ-50 [$\mu\text{g/ml}$]														MIK [$\mu\text{g/ml}$]	MBK [$\mu\text{g/ml}$]
	128	64	32	16	8	4	2	1	0,5	0,25	0,125	0,06	0,03	0,015		
<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	>128	>128
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	>128	>128
<i>E. coli</i> ATCC 25922	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	>128	>128
<i>S. aureus</i> ATCC 29213	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	>128	>128

4.3.3 Rezultati testiranja občutljivosti standardnih sevov za spojino KNZ-21b

Iz preglednice 9 je razvidno, da smo občutljivost za spojino KNZ-21b zaznali le pri po Gramu pozitivnih standardnih sevih.

Pri sevu *E. faecalis* ATCC 29212 pri koncentraciji spojine 128 $\mu\text{g/ml}$, bakterijske rasti nismo zaznali (gojišče je bilo bistro), zato smo MIK ovrednotili kot 128 $\mu\text{g/ml}$. Izvedli smo še dodatno testiranje za vrednotenje MBK. Razredčini s koncentracijo 128 $\mu\text{g/ml}$ in 64 $\mu\text{g/ml}$ smo precepili na ploščo KA, ki smo jo razdelili na polovico in ustrezno označili. Po inkubaciji smo na obeh polovicah plošče zaznali bakterijsko rast (rast bakterijskih kolonij), zato smo MBK ovrednotili kot >128 $\mu\text{g/ml}$.

Pri sevu *S. aureus* ATCC 29213 bakterijske rasti nismo zaznali pri koncentracijah 32 $\mu\text{g/ml}$, 64 $\mu\text{g/ml}$ in 128 $\mu\text{g/ml}$, zato smo MIK ovrednotili kot 32 $\mu\text{g/ml}$. Tudi tukaj smo izvedli dodatno testiranje za vrednotenje MBK. Razredčine s koncentracijo 16 $\mu\text{g/ml}$, 32 $\mu\text{g/ml}$, 64 $\mu\text{g/ml}$ in 128 $\mu\text{g/ml}$ smo precepili na ploščo KA, ki smo jo razdelili na 4 dele. Po inkubaciji smo na vseh delih plošče zaznali bakterijsko rast, zato smo MBK ovrednotili kot >128 $\mu\text{g/ml}$.

Preglednica 9: Rezultati testiranja občutljivosti štirih standardnih sevov za spojino KNZ-21b

Standardni sevi	KNZ-21b [$\mu\text{g/ml}$]														MIK [$\mu\text{g/ml}$]	MBK [$\mu\text{g/ml}$]
	128	64	32	16	8	4	2	1	0,5	0,25	0,125	0,06	0,03	0,015		
<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	128	>128
	✓	✓														
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	>128	>128
	✓															
<i>E. coli</i> ATCC 25922	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	>128	>128
	✓															
<i>S. aureus</i> ATCC 29213	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	32	>128
	✓	✓	✓	✓												

4.3.4 Rezultati testiranja občutljivosti standardnih sevov za spojino KNZ-22b

Iz preglednice 10 je razvidno, da smo občutljivost za spojino KNZ-22b zaznali znova le pri po Gramu pozitivnih standardnih sevih.

Tako kot pri sevu *E. faecalis* ATCC 29212 tudi pri sevu *S. aureus* ATCC 29213 bakterijske rasti nismo zaznali pri koncentracijah 64 $\mu\text{g/ml}$ in 128 $\mu\text{g/ml}$, zato smo MIK ovrednotili kot 64 $\mu\text{g/ml}$. MBK smo ovrednotili kot >128 $\mu\text{g/ml}$, saj smo pri vseh koncentracijah spojine zaznali bakterijsko rast.

Preglednica 10: Rezultati testiranja občutljivosti štirih standardnih sevov za spojino KNZ-22b

Standardni sevi	KNZ-22b [$\mu\text{g/ml}$]														MIK [$\mu\text{g/ml}$]	MBK [$\mu\text{g/ml}$]
	128	64	32	16	8	4	2	1	0,5	0,25	0,125	0,06	0,03	0,015		
<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	64	>128
	✓	✓	✓													
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	>128	>128
	✓															
<i>E. coli</i> ATCC 25922	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	>128	>128
	✓															
<i>S. aureus</i> ATCC 29213	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	64	>128
	✓	✓	✓													

4.4 DOLOČANJE OBČUTLJIVOSTI KLINIČNIH IZOLATOV ZA NOVE SPOJINE

S testiranjem standardnih sevov smo zaznali aktivnost nekaterih spojin le pri po Gramu pozitivnih bakterijah, in sicer pri *E. faecalis* ATCC 29212 in *S. aureus* ATCC 29213. Aktivne spojine so bile KNZ-21b, KNZ-22b in KNZ-52. Zanimalo nas je ali bodo spojine aktivne tudi na kliničnih izolatih.

Občutljivost kliničnih izolatov za spojini KNZ-21b in KNZ-22b smo testirali na 8 izolatih *S. aureus*, od tega 4 proti meticilinu odpornih *S. aureus* (MRSA) in 4 občutljivih (MSSA) ter na 8 izolatih *E. faecalis*, od tega 4 za vankomicin občutljivih ter 4 proti vankomicinu odpornih enterokokov (VRE).

Pri spojini KNZ-52 smo zaznali najvišjo aktivnost pri standardnih sevih zato smo se odločili, da uporabimo večje število kliničnih izolatov. Občutljivost za spojino KNZ-52 smo tako testirali na 20 izolatih *S. aureus*, od tega 10 proti meticilinu odpornih *S. aureus* in 10 občutljivih ter na 52 izolatih *E. faecalis*, od tega 22 za vankomicin občutljivih ter 30 proti vankomicinu odpornih enterokokov.

4.4.1 Rezultati testiranja občutljivosti kliničnih izolatov za spojino KNZ-21b

Iz preglednice 12 je razvidno, da pri za meticilin občutljivih kliničnih izolatih *S. aureus* (MSSA) bakterijske rasti nismo zaznali pri koncentracijah 64 µg/ml in višjih, zato smo pri vseh MIK ovrednotili kot 64 µg/ml. Prav tako smo izvedli dodatno testiranje za vrednotenje MBK. Po inkubaciji smo odsotnost bakterijske rasti zaznali le pri razredčini s koncentracijo 128 µg/ml, zato smo MBK ovrednotili kot 128 µg/ml. Pri koncentraciji 64 µg/ml smo število bakterijskih kolonij lahko tudi prešteli, in sicer 90 smo jih prešteli pri izolatu 1, 99 pri izolatu 2, 80 pri izolatu 3 in 30 pri izolatu 4.

Pri dveh proti meticilinu odpornih kliničnih izolatih *S. aureus* (MRSA) bakterijske rasti nismo zaznali pri koncentracijah 32 µg/ml in višjih, zato smo MIK ovrednotili kot 32 µg/ml. Pri ostalih dveh izolatih bakterijske rasti nismo zaznali pri koncentraciji 64 µg/ml, zato smo MIK ovrednotili kot 64 µg/ml. MBK smo ovrednotili kot 32 µg/ml, 64 µg/ml in 128 µg/ml. Tukaj števila bakterijskih kolonij nismo mogli določiti, saj je prišlo do konfluentne rasti.

Preglednica 12: Rezultati testiranja občutljivosti osmih kliničnih izolatov za meticilin občutljivih *S. aureus* (MSSA) in proti meticilinu odpornih *S. aureus* (MRSA) za spojino KNZ-21b

Klinični izolati	KNZ-21b [$\mu\text{g/ml}$]													MIK [$\mu\text{g/ml}$]	MBK [$\mu\text{g/ml}$]	
	128	64	32	16	8	4	2	1	0,5	0,25	0,125	0,06	0,03			0,015
<i>S. aureus</i> (MSSA)-izol.1	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	64	128
	x	90	✓													
<i>S. aureus</i> (MSSA)-izol.2	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	64	128
	x	99	✓													
<i>S. aureus</i> (MSSA)-izol.3	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	64	128
	x	80	✓													
<i>S. aureus</i> (MSSA)-izol.4	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	64	128
	x	30	✓													
<i>S. aureus</i> (MRSA)-izol.1	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	32	32
	x	x	x	✓												
<i>S. aureus</i> (MRSA)-izol.2	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	64	128
	x	✓	✓													
<i>S. aureus</i> (MRSA)-izol.3	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	64	64
	x	x	✓													
<i>S. aureus</i> (MRSA)-izol.4	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	32	128
	x	✓	✓	✓												

Opomba: izol. je krajšava za izolat.

Iz preglednice 13 je razvidno, da pri za vankomicin občutljivih izolatih *E. faecalis* bakterijske rasti nismo zaznali pri koncentracijah 64 $\mu\text{g/ml}$ in višjih, zato smo pri vseh izolatih MIK ovrednotili kot 64 $\mu\text{g/ml}$. MBK smo ovrednotili kot 128 $\mu\text{g/ml}$, saj smo pri vseh izolatih popolno odsotnost bakterijske rasti zaznali le pri koncentraciji 128 $\mu\text{g/ml}$. Pri izolatu 3 smo število kolonij lahko tudi prešteli, in sicer pri koncentraciji 64 $\mu\text{g/ml}$ je zrastle ena kolonija.

Pri proti vankomicinu odpornih izolatih *E. faecium* (VRE) prav tako bakterijske rasti nismo zaznali pri koncentracijah 64 $\mu\text{g/ml}$ in višjih, zato smo MIK ovrednotili kot 64 $\mu\text{g/ml}$. MBK smo pri dveh izolatih ovrednotili kot 64 $\mu\text{g/ml}$ in pri dveh 128 $\mu\text{g/ml}$. Pri izolatu 1 in 3 smo pri koncentraciji 64 $\mu\text{g/ml}$ prešteli število zrastlih kolonij, in sicer pri izolatu 1 je zrastle 9 kolonij, pri izolatu 3 pa 12 kolonij.

Preglednica 13: Rezultati testiranja občutljivosti osmih za vankomicin občutljivih in proti vankomicinu odpornih enterokokov (VRE) za spojino KNZ-21b

Klinični izolati	KNZ-21b [$\mu\text{g/ml}$]														MIK [$\mu\text{g/ml}$]	MBK [$\mu\text{g/ml}$]
	128	64	32	16	8	4	2	1	0,5	0,25	0,125	0,06	0,03	0,015		
<i>E. faecalis</i> -izolat 1	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	64	128
	x	✓	✓													
<i>E. faecalis</i> -izolat 2	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	64	128
	x	✓	✓													
<i>E. faecalis</i> -izolat 3	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	64	128
	x	1	✓													
<i>E. faecalis</i> -izolat 4	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	64	128
	x	✓	✓													
<i>E. faecium</i> (VRE)-izolat 1	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	64	128
	x	9	✓													
<i>E. faecium</i> (VRE)-izolat 2	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	64	64
	x	x	✓													
<i>E. faecium</i> (VRE)-izolat 3	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	64	128
	x	12	✓													
<i>E. faecium</i> (VRE)-izolat 4	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	64	64
	x	x	✓													

4.4.2 Rezultati testiranja občutljivosti kliničnih izolatov za spojino KNZ-22b

Iz preglednice 14 je razvidno, da je bila pri za meticilin občutljivih kliničnih izolatih *S. aureus* (MSSA) najnižja koncentracija brez bakterijske rasti (MIK) 64 $\mu\text{g/ml}$. Prav tako smo izvedli dodatno testiranje za vrednotenje MBK. Po inkubaciji smo odsotnost bakterijske rasti (MBK) zaznali pri treh izolatih, in sicer pri razredčini s koncentracijo 64 $\mu\text{g/ml}$. Pri enem izolatu odsotnost bakterijskih kolonij nismo zaznali, zato smo MBK ovrednotili kot >128 $\mu\text{g/ml}$. Pri izolatu 3 smo pri določanje MBK lahko prešteli tudi število kolonij, in sicer pri koncentraciji 64 $\mu\text{g/ml}$ je zrastle 99 kolonij.

Pri dveh proti meticilinu odpornih kliničnih izolatih *S. aureus* (MRSA) je bila najnižja koncentracija brez bakterijske rasti (MIK) 32 $\mu\text{g/ml}$. Pri ostalih dveh izolatih je bila 64 $\mu\text{g/ml}$. MBK je bila pri dveh 64 $\mu\text{g/ml}$, pri enem 128 $\mu\text{g/ml}$ in pri enem >128 $\mu\text{g/ml}$. Pri izolatu 2 smo število kolonij lahko tudi prešteli, in sicer pri koncentraciji 64 $\mu\text{g/ml}$ je zrastle 97 kolonij.

Preglednica 14: Rezultati testiranja občutljivosti osmih kliničnih izolatov za meticilin občutljivih *S. aureus* (MSSA) in proti meticilinu odpornih *S. aureus* (MRSA) za spojino KNZ-22b

Klinični izolati	KNZ-22b [$\mu\text{g/ml}$]													MIK [$\mu\text{g/ml}$]	MBK [$\mu\text{g/ml}$]	
	128	64	32	16	8	4	2	1	0,5	0,25	0,125	0,06	0,03			0,015
<i>S. aureus</i> (MSSA)-izol.1	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	64	64
	x	x	✓													
<i>S. aureus</i> (MSSA)-izol.2	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	64	64
	x	x	✓													
<i>S. aureus</i> (MSSA)-izol.3	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	64	>128
	15	99	✓													
<i>S. aureus</i> (MSSA)-izol.4	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	64	64
	x	x	✓													
<i>S. aureus</i> (MRSA)-izol.1	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	32	64
	x	x	✓	✓												
<i>S. aureus</i> (MRSA)-izol.2	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	64	128
	x	97	✓													
<i>S. aureus</i> (MRSA)-izol.3	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	32	64
	x	x	✓	✓												
<i>S. aureus</i> (MRSA)-izol.4	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	64	>128
	✓	✓	✓	✓												

Opomba: izol. je krajšava za izolat.

Iz preglednice 15 je razvidno, da je bila pri za vankomicin občutljivih izolatih *E. faecalis* najnižja koncentracija, kjer bakterijske rasti nismo zaznali 32 $\mu\text{g/ml}$. MBK smo pri treh izolatih ovrednotili kot 64 $\mu\text{g/ml}$, pri enem pa kot 128 $\mu\text{g/ml}$. Pri vseh izolatih smo pri koncentraciji 32 $\mu\text{g/ml}$ lahko prešteli tudi število zrastle kolonij, in sicer pri izolatu 1 je zrastle 5 kolonij, pri izolatu 2 je zrastle 10 kolonij pri izolatu 3 sta zrastle 2 koloniji in pri izolatu 4 je zrastle 99 kolonij. Pri izolatu 4 smo število kolonij lahko prešteli tudi pri koncentraciji 64 $\mu\text{g/ml}$, in sicer teh je bilo 4.

Pri treh proti vankomicinu odpornih izolatih *E. faecium* (VRE) je bila MIK 32 $\mu\text{g/ml}$, pri enem izolatu pa 64 $\mu\text{g/ml}$. MBK smo pri treh izolatih ovrednotili kot 64 $\mu\text{g/ml}$, pri enem izolatu pa kot 128 $\mu\text{g/ml}$. Pri izolatu 1 smo pri koncentraciji 32 $\mu\text{g/ml}$ lahko prešteli tudi število kolonij, in sicer teh je bilo 14, pri izolatu 4 smo število kolonij lahko prešteli pri koncentraciji 32 $\mu\text{g/ml}$ oz. 64 $\mu\text{g/ml}$, in sicer teh je bilo 46 oz. 25.

Preglednica 15: Rezultati testiranja občutljivosti osmih za vankomicin občutljivih in proti vankomicinu odpornih enterokokov (VRE) za spojino KNZ-22b

Klinični izolati	KNZ-22b [$\mu\text{g/ml}$]														MIK [$\mu\text{g/ml}$]	MBK [$\mu\text{g/ml}$]
	128	64	32	16	8	4	2	1	0,5	0,25	0,125	0,06	0,03	0,015		
<i>E. faecalis</i> -izolat 1	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	32	64
	x	x	5	✓												
<i>E. faecalis</i> -izolat 2	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	32	64
	x	x	10	✓												
<i>E. faecalis</i> -izolat 3	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	32	64
	x	x	2	✓												
<i>E. faecalis</i> -izolat 4	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	32	128
	x	4	99	✓												
<i>E. faecium</i> (VRE)-izolat 1	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	32	64
	x	x	14	✓												
<i>E. faecium</i> (VRE)-izolat 2	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	32	128
	x	25	46	✓												
<i>E. faecium</i> (VRE)-izolat 3	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	64	64
	x	x	✓													
<i>E. faecium</i> (VRE)-izolat 4	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	32	64
	x	x	✓	✓												

4.4.3 Rezultati testiranja občutljivosti kliničnih izolatov za spojino KNZ-52

Iz preglednice 16 je razvidno, da je bila pri osmih za meticilin občutljivih kliničnih izolatih *S. aureus* (MSSA) najnižja koncentracija brez bakterijske rasti (MIK) 8 $\mu\text{g/ml}$. Pri dveh izolatih bakterijske rasti nismo zaznali pri koncentraciji 16 $\mu\text{g/ml}$. Prav tako smo izvedli dodatno testiranje za vrednotenje MBK, ki je pri štirih izolatih znašala 16 $\mu\text{g/ml}$, pri šestih pa 32 $\mu\text{g/ml}$. Pri devetih proti meticilinu odpornih kliničnih izolatih *S. aureus* (MRSA) je bila najnižja koncentracija, kjer bakterijske rasti nismo zaznali (MIK) 8 $\mu\text{g/ml}$. Pri enem izolatu bakterijske rasti nismo zaznali pri koncentraciji 16 $\mu\text{g/ml}$. MBK je pri enem izolatu znašala 8 $\mu\text{g/ml}$, pri štirih izolatih 16 $\mu\text{g/ml}$, pri štirih 32 $\mu\text{g/ml}$ in pri enem izolatu 128 $\mu\text{g/ml}$. Pri izolatih 3, 4, 5 in 10 smo lahko prešteli tudi število posameznih kolonij. Pri izolatu 3 je pri koncentraciji 8 $\mu\text{g/ml}$ zrastle 7 kolonij, pri izolatu 4 in 5 je pri koncentraciji 16 $\mu\text{g/ml}$ zrastle 1 kolonija, pri izolatu 10 je pri koncentraciji 32 $\mu\text{g/ml}$ oz. 64 $\mu\text{g/ml}$ zrastle 12 oz. 16 kolonij.

Preglednica 16: Rezultati testiranja občutljivosti 20 kliničnih izolatov za meticilin občutljivih *S. aureus* (MSSA) in proti meticilinu odpornih *S. aureus* (MRSA) za spojino KNZ-52

	KNZ-52 [$\mu\text{g/ml}$]														MIK [$\mu\text{g/ml}$]	MBK [$\mu\text{g/ml}$]	
	128	64	32	16	8	4	2	1	0,5	0,25	0,125	0,06	0,03	0,015			
Klinični izolati																	
<i>S. aureus</i> (MSSA)-izol.1	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	8	16	
<i>S. aureus</i> (MSSA)-izol.2	x	x	x	x	✓	✓									8	16	
<i>S. aureus</i> (MSSA)-izol.3	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	8	16	
<i>S. aureus</i> (MSSA)-izol.4	x	x	x	x	✓	✓									8	16	
<i>S. aureus</i> (MSSA)-izol.5	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	8	32	
<i>S. aureus</i> (MSSA)-izol.6	x	x	x	✓	✓	✓									8	32	
<i>S. aureus</i> (MSSA)-izol.7	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	16	32	
<i>S. aureus</i> (MSSA)-izol.8	x	x	x	✓	✓	✓									8	32	
<i>S. aureus</i> (MSSA)-izol.9	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	8	32	
<i>S. aureus</i> (MSSA)-izol.10	x	x	x	✓	✓										16	32	
<i>S. aureus</i> (MRSA)-izol.1	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	16	16	
<i>S. aureus</i> (MRSA)-izol.2	x	x	x	x	x	✓									8	8	
<i>S. aureus</i> (MRSA)-izol.3	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	8	16	
<i>S. aureus</i> (MRSA)-izol.4	x	x	x	1	✓	✓									8	32	
<i>S. aureus</i> (MRSA)-izol.5	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	8	32	
<i>S. aureus</i> (MRSA)-izol.6	x	x	x	✓	✓	✓									8	32	
<i>S. aureus</i> (MRSA)-izol.7	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	8	16	
<i>S. aureus</i> (MRSA)-izol.8	x	x	x	x	✓	✓									8	16	
<i>S. aureus</i> (MRSA)-izol.9	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	8	32	
<i>S. aureus</i> (MRSA)-izol.10	x	16	12	✓	✓	✓									8	128	

Opomba: izol. je krajšava za izolat.

Iz preglednice 17 je razvidno, da smo pri devetih za vankomicin občutljivih kliničnih izolatih enterokokov (*E. faecalis* in *E. faecium*) MIK ovrednotili kot 8 µg/ml, pri 13 izolatih pa kot 16 µg/ml.

MBK smo pri 10 izolatih ovrednotili kot 16 µg/ml, prav tako pri 10 izolatih 32 µg/ml in pri dveh izolatih 64 µg/ml.

Pri nekaterih izolatih *E. faecium* smo bakterijske kolonije lahko tudi prešteli.

Iz preglednice 18 je razvidno, da je bila pri testiranju občutljivosti proti vankomicinu odpornih enterokokov (*E. faecium*-VRE) najnižja koncentracija, kjer bakterijske rasti nismo zaznali 0,5 µg/ml. Tako smo MIK pri enem izolatu ovrednotili kot 0,5 µg/ml, prav tako pri enem izolatu 2 µg/ml, pri 9 izolatih 4 µg/ml, pri 10 izolatih 8 µg/ml in pri 9 izolatih kot 16 µg/ml.

MBK smo pri petih izolatih ovrednotili kot 8 µg/ml, pri 16 izolatih 16 µg/ml, pri 9 izolatih 32 µg/ml in pri 2 izolatih 64 µg/ml. Kjer se je dalo smo bakterijske kolonije tudi prešteli.

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

V diplomski nalogi smo ugotavljali protimikrobno aktivnost novih potencialnih inhibitorjev Mur encimov tako, da smo testirali občutljivost standardnih sevov in sevov iz kliničnih vzorcev za te spojine. Spojinam, načrtovanim kot inhibitorji Mur encimov, smo z metodo makrodilucijskega antibiograma v Mueller Hinton bujonu (MHB) uspešno ovrednotili učinkovitost v obliki vrednosti minimalne inhibitorne koncentracije (MIK) in minimalne baktericidne koncentracije (MBK).

Najprej smo testirali občutljivost štirih standardnih oz. referenčnih bakterijskih sevov iz zbirke ATCC za vseh 12 spojin. Med po Gramu negativnimi bakterijami smo v raziskavo vključili seve vrst *Escherichia coli* ATCC 25922 in *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, med po Gramu pozitivnimi bakterijami pa seve vrst *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 in *Staphylococcus aureus* ATCC 29213. Testirali smo spojine KNZ-47, KNZ-45, KNZ-44b-2, KNZ-6b, KNZ-32c, KNZ-35, KNZ-4b, KNZ-10i, KNZ-50, KNZ-21b, KNZ-22b in KNZ-52.

Spojinam smo z metodo makrodilucijskega antibiograma v MHB ovrednotili učinkovitost v seriji 14 epruвет s tekočim gojiščem redčene testirane spojine z znanimi padajočimi koncentracijami, in sicer od 128 µg/ml do 0,016 µg/ml. Gostota bakterijskih celic, ki je tudi priporočena, pa je bila približno 5-krat 10^5 CFU/ml (Amsterdam, 1996; Jorgensen in Turnidge, 2007).

Pri devetih spojinah (KNZ-47, KNZ-45, KNZ-44b-2, KNZ-6b, KNZ-32c, KNZ-35, KNZ-4b, KNZ-10i, KNZ-50) smo po inkubaciji bakterijsko rast zaznali pri vseh bakterijskih standardnih sevih, pri vseh razredčinah spojine, zato smo MIK in MBK na teh bakterijskih sevih ovrednotili kot >128 µg/ml (preglednici 7 in 8). Testirane bakterije so bile odporne proti spojinam.

Pri ostalih treh spojinah (KNZ-21b, KNZ-22b, KNZ-52) pa smo ugotovili protibakterijsko aktivnost, ki smo jo zaznali le pri po Gramu pozitivnih standardnih sevih, in sicer pri sevu *E. faecalis* ATCC 29212 in *S. aureus* ATCC 29213. Največjo učinkovitost je pri testiranju pokazala spojina KNZ-52. Nobena spojina, razen spojina KNZ-52, ni pokazala baktericidnega učinka.

S spojinami, pri katerih smo s testiranjem standardnih sevov zaznali aktivnost, smo testirali tudi izolate iz kliničnih vzorcev. V raziskavo smo pri testiranju spojine KNZ-52 vključili 20 izolatov bakterije *S. aureus*, od tega 10 proti meticilinu odpornih *S. aureus* (MRSA) in 10 občutljivih (MSSA). Testirali smo tudi 52 izolatov enterokokov, od tega 22 za vankomicin občutljivih *E. faecalis* in *E. faecium* ter 30 proti vankomicinu odpornih enterokokov (VRE). Pri testiranju spojin KNZ-21b in KNZ-22b pa smo vključili manjše število kliničnih izolatov (preglednice 12, 13, 14 in 15).

Tudi tukaj je največjo učinkovitost pri testiranju pokazala spojina KNZ-52, in sicer pri *S. aureus*-MSSA (MIK od 8 µg/ml do 16 µg/ml), pri *S. aureus*-MRSA (MIK od 8 µg/ml do 16 µg/ml), pri za vankomicin občutljivih izolatih *E. faecalis* in *E. faecium* (MIK od 8 µg/ml do 16 µg/ml) in pri proti vankomicinu odpornih izolatih *E. faecium*-VRE (MIK od 0,5 µg/ml do 16 µg/ml). Vse spojine (KNZ-21b, KNZ-22b, KNZ-52) so pokazale tudi baktericidni učinek.

Spojina KNZ-52 bi bila tako primerna za nadaljne raziskave, saj je pri testiranju pokazala največjo učinkovitost. Za nadaljne raziskave so primerne tiste spojine z MIK 32 µg/ml ali manj (Struthers in Westran, 2003). V nalogi smo zaradi nepoznavanja farmakodinamičnih in farmakokinetičnih lastnosti testiranih spojin, testirali širok spekter koncentracij (od 128 µg/ml do 0,016µg/ml).

Na podlagi rezultatov testiranja občutljivosti standardnih sevov za spojine KNZ-21b, KNZ-22b in KNZ-52 lahko potrdimo na začetku postavljeno hipotezo, da bodo spojine učinkovale le pri po Gramu pozitivnih standardnih sevih, ne pa pri po Gramu negativnih standardnih sevih.

Za preživetje bakterijske celice je celična stena nujna. Kakršnakoli motnja v biosintezi njene najpomembnejše sestavine, peptidoglikana, lahko vodi v lizo celice, zato peptidoglikan predstavlja eno izmed najpomembnejših tarč za delovanje že znanih protimikrobnih učinkovin.

Vse bolj postajajo zanimive tudi znotrajcelične stopnje biosinteze peptidoglikana, ki jo katalizirajo Mur encimi. Ti encimi, za katere so že znane kristalne strukture, so postali pomembne tarče za racionalno načrtovanje njihovih inhibitorjev kot potencialnih protimikrobnih učinkovin (Zoeiby in sod., 2003).

Tako so na Fakulteti za farmacijo na osnovi poznavanja strukture Mur encimov in histidin protein kinaz (HPK) domnevali, da bi nekateri znani inhibitorji HPK in njim sorodne spojine lahko inhibirali tudi Mur encime, ki imajo v svoji strukturi vezavno mesto za ATP.

V literaturi je že opisanih nekaj inhibitorjev Mur encimov, vendar pa bodisi zaradi slabe protibakterijske učinkovitosti zaradi slabih farmakokinetičnih lastnosti, kot so absorpcija, porazdelitev, metabolizem in eliminacija, še noben izmed njih ni prišel v klinično uporabo. Problem večine je, da svoj inhibitorski učinek izkazujejo zgolj na izoliranih encimih, na celotno bakterijo pa nimajo učinka. Velikokrat je problem neučinkovitosti v slabem prehajanju celične membrane in s tem nedosegljivost tarče, saj prva faza biosinteze peptidoglikana poteka v citoplazmi, pri po Gramu negativnih bakterijah pa dodatno oviro predstavlja še zunanja membrana. Tako spojina v bakterijski celici ne doseže dovolj visokih koncentracij za inhibitorski učinek.

Z našim delom smo prav tako potrdili, da je makrodilucijska metoda v bujonu primerna metoda za kvantitativno vrednotenje učinka potencialnega inhibitorja z vrednostjo MIK.

Naša pričakovanja smo izpolnili, saj so tri spojine pokazale protimikrobno učinkovitost, s pomočjo katerih smo z metodo makrodilucijskega antibiograma v bujonu na kvantitativni način ovrednotili učinkovitost z vrednostjo MIK in MBK.

5.2 SKLEPI

- Devet spojin, pri standardnih sevih ni pokazalo protimikrobnega učinka: KNZ-47, KNZ-45, KNZ-44b-2, KNZ-6b, KNZ-32c, KNZ-35, KNZ-4b, KNZ-10i in KNZ-50.
- Tri spojine, so pri standardnih sevih pokazale protimikrobno učinkovitost: KNZ-21b, KNZ-22b in KNZ-52. Največjo učinkovitost je pri testiranju pokazala spojina KNZ-52.
- Spojine so bile aktivne le pri po Gramu pozitivnih standardnih sevih (*E. faecalis* ATCC 29212 in *S. aureus* ATCC 29213).
- Spojine KNZ-21b, KNZ-22b in KNZ-52 so pokazale protimikrobno učinkovitost tudi pri kliničnih izolatih (*S. aureus*-MSSA, *S. aureus*-MRSA, *E. faecalis*, *E. faecium* in *E. faecium*-VRE).
- Največjo učinkovitost je pri testiranju pokazala spojina KNZ-52, in sicer pri *S. aureus*-MSSA (MIK od 8 µg/ml do 16 µg/ml), pri *S. aureus*-MRSA (MIK od 8 µg/ml do 16 µg/ml), pri za vankomicin občutljivih izolatih *E. faecalis* in *E. faecium* (MIK od 8 µg/ml do 16 µg/ml) in pri proti vankomicinu odpornih izolatih *E. faecium*-VRE (MIK od 0,5 µg/ml do 16 µg/ml).
- Spojina KNZ-52 bi bila primerna za nadaljne raziskave.

6 POVZETEK

Zaradi vse pogostejšega pojava bakterijskih izolatov, ki so odporni proti posameznim ali celo več različnim antibiotikom, je zdravljenje zapletenih bolnišničnih okužb vse težje in potreba po razvoju novih učinkovitih protibakterijskih sredstev vse večja. Med najpogostejše povzročitelje bolnišničnih okužb spadajo tako po Gramu pozitivne kot po Gramu negativne bakterije. Resen problem pa predstavljajo predvsem večkratno odporne bakterije, za katere ostaja le še ozek izbor protimikrobnih sredstev. Med temi najpogosteje omenjamo proti meticilinu odporne izolate *S. aureus* – MRSA, proti vankomicinu odporne izolate enterokokov – VRE in nekatere druge.

V zadnjem času so raziskave usmerjene predvsem v razvoj novih protimikrobnih učinkovin, tudi takšnih, katerih tarča so Mur encimi, ki katalizirajo biosintezo peptidoglikana v bakterijski celični steni. Na Fakulteti za farmacijo Univerze v Ljubljani se ukvarjajo z načrtovanjem, sintezo in vrednotenjem protibakterijske učinkovitosti novih učinkovin ter razjasnjevanjem njihovega mehanizma delovanja na molekularnem nivoju. Eden od njihovih projektov je tudi razvoj inhibitorjev Mur encimov.

Program obsega racionalno načrtovanje učinkovin na osnovi že znanih in novih validiranih tarč, sintezo in izolacijo učinkovin ter njihovo biološko in fizikalno kemijsko vrednotenje. Tako so na osnovi poznavanja strukture Mur encimov in histidin protein kinaz (HPK) domnevali, da bi nekateri znani inhibitorji HPK in njim sorodne spojine lahko inhibirali tudi Mur encime, ki imajo v svoji strukturi vezavno mesto za ATP.

Spojinam, načrtovanim kot inhibitorji Mur encimov, smo z metodo makrodilucijskega antibiograma v MHB uspešno ovrednotili učinkovitost v obliki MIK in MBK.

Testirali smo občutljivost standardnih oz. referenčnih bakterijskih sevov iz zbirke ATCC za vseh 12 spojin. Med po Gramu negativnimi bakterijami smo v raziskavo vključili seve vrst *Escherichia coli* ATCC 25922 in *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, med po Gramu pozitivnimi bakterijami pa seve vrst *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 in *Staphylococcus aureus* ATCC 29213.

Protimikrobno učinkovitost pri standardnih sevih so pokazale tri spojine, in sicer KNZ-21b, KNZ-22b in KNZ-52, vendar le pri po Gramu pozitivnih bakterijah. Največjo učinkovitost je pri po Gramu pozitivnih standardnih sevih pokazala spojina KNZ-52. Pri standardnem sevu *E. faecalis* ATCC 29212 smo MIK ovrednotili kot 16 µg/ml, pri *S. aureus* ATCC pa kot 8 µg/ml. Določili smo tudi MBK, in sicer pri obeh kot 128 µg/ml.

S spojinami, pri katerih smo s testiranjem standardnih sevov zaznali aktivnost, smo testirali tudi izolate iz kliničnih vzorcev. V raziskavo smo vključili izolate bakterije *S. aureus* (MSSA in MRSA) in izolate enterokokov (za vankomicin občutljive *E. faecalis* in *E. faecium* ter *E. faecium*-VRE).

Spojine KNZ-21b, KNZ-22b in KNZ-52 so pokazale protimikrobno učinkovitost tudi pri kliničnih izolatih. Tudi tukaj je največjo učinkovitost pokazala spojina KNZ-52. MIK smo pri protimetilinu občutljivih *S. aureus* in pri MRSA ovrednotili kot 8 µg/ml oz. 16 µg/ml, pri za vankomicin občutljivih *E. faecalis* in *E. faecium* prav tako 8 µg/ml oz. 16 µg/ml, pri VRE pa je MIK znašala od 0,5 µg/ml do 16 µg/ml. Vse spojine so pri kliničnih izolatih pokazale tudi baktericidni učinek.

Naša pričakovanja smo izpolnili, saj so tri spojine pokazale protimikrobno učinkovitost, katerim smo z metodo makrodilucijskega antibiograma v MHB uspešno ovrednotili učinkovitost v obliki MIK in MBK.

7 VIRI

- Amsterdam D. 1996. Susceptibility testing of antimicrobials in liquid media. V: Antibiotics in laboratory medicine. 4th ed. Lorian V. (ed.). Baltimore, Williams and Wilkins: 52-75
- Andlovic A. 2002. Enterobakterije. V: Medicinska bakteriologija z imunologijo in mikologijo. Gubina M., Ihan A. (ur.). Ljubljana, Medicinski razgledi: 179-184
- Banneman T. L. 2003. *Staphylococcus*, *Micrococcus* and other catalase-positive cocci that grow aerobically. V: Manual of clinical microbiology. 8th ed. Murray P. R., Baron E. J., Jorgensen J. H., Pfaller M. A., Tenover F. C., Tenover F. C. (eds.). Washington, D. C., ASM Press: 384-404
- Barreteau H., Kovač A., Boniface A., Sova M., Gobec S., Blanot D. 2008. Cytoplasmic steps of peptidoglycan biosynthesis. FEMS Microbiology Reviews, 32, 2: 168-207
- Barrow E.W., Dreier J., Reinelt S., Bourne P.C., Barrow W.W. 2007. *In vitro* efficacy of new antifolates against trimethoprim-resistant *Bacillus anthracis*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 51, 12: 4447-4452
- Bertrand J.A., Auger G., Martin L., Fanchon E., Blanot D., Le Beller D., van Heijenoort J., Dideberg O. 1999. Determination of the MurD mechanism through crystallographic analysis of enzyme complexes. Journal of Molecular Biology, 289, 3: 579-590
- Bertrand J.A., Fanchon E., Martin L., Chantalat L., Auger G., Blanot D., van Heijenoort J., Dideberg O. 2000. "Open" structures of MurD: domain movements and structural similarities with folylpolyglutamate synthetase. Journal of Molecular Biology, 301, 5: 1257-1266
- Blanc D.S., Francioli P., Zanetti G. 2007. Molecular epidemiology of *Pseudomonas aeruginosa* in the intensive care units. Open Microbiology Journal, 1: 8-11

Brooks G.F., Butel J.S., Morse S.A. 2004. Antimicrobial chemotherapy. V: Jawetz, Melnick, & Adelberg's medical microbiology. 23th ed. Brooks G.F., Butel J.S., Morse S.A. (eds.). New York, McGraw-Hill Professional: 161-195

Bush K., Macielag M., Weidner-Wells M. 2004. Taking inventory: Antibacterial agents currently at or beyond Phase 1. *Current Opinion in Microbiology*, 7: 466-476

Chopra I., Roberts M. 2001. Tetracycline antibiotics: Mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 65, 2: 232-260

CLSI. 2008. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: Eighteenth Informational Supplement. M100-S18. Winkler M.A. (ed.). Wayne, CLSI-Clinical and Laboratory Standards Institute: 181 str.

Čižman M. 2008. Evropski dan antibiotikov. *Zdravstveni vestnik*, 77: 673-675

Gobec S., Urleb U. 1999. Inhibitorji biosinteze peptidoglikana. *Zdravstveni vestnik*, 50, 2: 183-193

Ihan A. 2002a. Pnevmonok. V: *Medicinska bakteriologija z imunologijo in mikologijo*. Gubina M., Ihan A. (ur.). Ljubljana, Medicinski razgledi: 155-158

Ihan A. 2002b. Bakterijska celica. V: *Medicinska bakteriologija z imunologijo in mikologijo*. Gubina M., Ihan A. (ur.). Ljubljana, Medicinski razgledi: 3-15

Jorgensen J.N., Turnidge J.D. 2007. Susceptibility test methods: Dilution and disk diffusion methods. V: *Manual of clinical microbiology*. 9th ed. Murray P.R., Baron E.J., Jorgensen J.H., Landry M.R., Pfaller M.R. (eds.). Washington, American Society for Microbiology: 1160-1161

Kemijske lastnosti protimikrobnih učinkovin. Interno gradivo. 2008. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, Katedra za farmacevtsko kemijo: 2 str.

Kotnik V. 2001. Kje in kako delujejo antibiotiki v mikrobnih celicah. V: Mikrobi in antibiotiki 2001. Mikrobiološki simpozij z mednarodno udeležbo 2001, Ljubljana, 22.-23. junij 2001. Mueller-Premru M., Gubina M. (ur.). Ljubljana, Zavod za farmacijo in za preiskušanje zdravil: 17-25

Kotnik V. 2002. Antibiotiki in kemoterapevtiki. V: Medicinska bakteriologija z imunologijo in mikologijo. Gubina M., Ihan A. (ur.). Ljubljana, Medicinski razgledi: 427-438

Livermore D.M. 2005. Minimising antibiotic resistance. *Lancet Infectious Diseases*, 5: 450-459

MacDougall C., Polk R.E. 2005. Antimicrobial stewardship program in health care systems. *Clinical Microbiology Reviews*, 18, 4: 638-656

Madigan M.T., Martinko J.M., Parker J. 2003. *Brock biology of microorganisms*. 10th ed. Upper Saddle River, New Jersey, Prentice-Hall International: 965-993

Mueller-Premru M. 2001. Mehanizmi odpornosti pri po Gramu pozitivnih bakterijah. V: Mikrobi in antibiotiki 2001. Mikrobiološki simpozij z mednarodno udeležbo 2001, Ljubljana, 22.-23. junij 2001. Mueller-Premru M., Gubina M. (ur.). Ljubljana, Zavod za farmacijo in za preiskušanje zdravil: 27-38

Mueller-Premru M. 2002. Nefermentativni po Gramu negativni bacili. V: Medicinska bakteriologija z imunologijo in mikologijo. Gubina M., Ihan A. (ur.). Ljubljana, Medicinski razgledi: 225-228

Mueller-Premru M., Kržan-Hergouth V., Seme K., Gubina M. 2001. Odkrivanje in dokazovanje stafilokoknih okužb. *Medicinski razgledi*, 40, 2: 13-18

- Mueller-Premru M., Seme K. 2003. Določanje občutljivosti bakterij za antibiotike-antibiogram. V: Priročnik za vaje iz mikrobiologije in imunologije za študente medicine. Gubina M., Mueller-Premru M. (ur.). Ljubljana, Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete v Ljubljani: 99-106
- Murray P.R., Rosenthal K.S., Kobayashi G.S., Pfaller M.A. 2002. Antibacterial agents. V: Medical microbiology. 4th ed. Murray P.R., Rosenthal K.S., Kobayashi G.S., Pfaller M.A. (eds.). St. Louis, Mosby: 185-194
- Petinaki E., Guérin-Faubleé V., Pichereau V., Villers C., Achard A., Malbruny B., Leclercq R. 2008. Lincomycin resistance gene *Inu* (D) in *Streptococcus uberis*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 52, 2: 626-630
- Rezar L., Trampuž A. 2002. Proti meticilinu odporen *Staphylococcus aureus* kot nevarna bolnišnična klica. Zdravstveni vestnik, 71: 543-547
- Ribič H. 2005. Ali lahko obvladamo odpornost bakterij? Zdravstveno varstvo, 44: 61-64
- Ribič H., Grmek-Košnik I., Kramar Z., Rus I. 2007. Naše izkušnje s proti vankomicinu odpornim enterokokom v Splošni bolnišnici Jesenice. Zdravstveni vestnik, 76: 701-707
- Ružić-Sabljić E. 2003. Praktikum iz bakteriologije za študente mikrobiologije. Ljubljana, Medicinska fakulteta: 79 str.
- Seme K. 2002a. Mehanizmi bakterijske odpornosti proti antibiotikom. V: Medicinska bakteriologija z imunologijo in mikologijo. Gubina M., Ihan A. (ur.). Ljubljana, Medicinski razgledi: 439-446
- Seme K. 2002b. Streptokoki. V: Medicinska bakteriologija z imunologijo in mikologijo. Gubina M., Ihan A. (ur.). Ljubljana, Medicinski razgledi: 147-153

- Seme K., Poljak M. 2001. Mehanizmi odpornosti pri po Gramu negativnih bakterijah. V: Mikrobi in antibiotiki 2001. Mikrobiološki simpozij z mednarodno udeležbo 2001, Ljubljana, 22.-23. junij 2001. Mueller-Premru M., Gubina M. (ur.). Ljubljana, Zavod za farmacijo in za preizkušanje zdravil: 39-48
- Smith C.A. 2006. Structure, function and dynamics in the *mur* family of bacterial cell wall ligases. *Journal of Molecular Biology*, 362, 4: 640-655
- Struthers K.J., Westran R.P. 2003. Use of antibiotics. V: *Clinical bacteriology*. Struthers K.J. (ed.). Washington D.C., ASM Press: 49-64
- Tenover F.C. 2001. Development and spread of bacterial resistance to antimicrobial agents: An overview. *Clinical Infectious Diseases*, 33, Suppl. 3: S108-S115
- Tenover F.C. 2006. Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria. *American Journal of Medicine*, 119, 6: 3-10
- Tsubery H., Yaakov H., Cohen S., Giterman T., Matityahou A., Fridkin M., Ofek I. 2005. Neopeptide antibiotics that function as opsonins and membrane-permeabilizing agents for gram-negative bacteria. *Antimicrobial Agents of Chemotherapy*, 49, 8: 3122-3128
- Walters W.P., Sthal M.T., Murcko M.A. 1998. Virtual screening-an overview. *Drug Discoveries & Therapeutics*, 3: 160-177
- Zoeiby A.E., Sanschagrin F., Levesque R.C. 2003. Structure and function of the Mur enzymes: Development of novel inhibitors. *Molecular Microbiology*, 47, 1: 1-12

ZAHVALA

Iskreno se zahvaljujem mentorici prof. dr. Manici Mueller-Premru, dr. med. za vso pomoč, prijaznost in potrpežljivost, predvsem pa za strokovno vodenje, svetovanje in usmerjanje pri izvajanju diplomske naloge.

Zahvaljujem se tudi recenzentki prof. dr. Evi Ružič-Sabljić za zelo natančen pregled diplomske naloge.

Prav tako bi se rada zahvalila svoji družini, ki je v večji meri prispevala k mojemu uspehu ter Juretu, ki je z mano v lepih in malo manj lepih trenutkih.