



ČESKÉ VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V PRAZE

**Fakulta biomedicínského inženýrství
Katedra přírodovědných oborů**

Antibakteriální stabilita víceúčelových roztoků k péči o kontaktní čočky

Antibacterial stability of multipurpose contact lens care solutions

Bakalářská práce

Studijní program: Biomedicínská a klinická technika

Studijní obor: Optika a optometrie

Autor bakalářské práce: Aneta Pekáčová

Vedoucí bakalářské práce: Mgr. Veronika Vymětalová, Ph.D.

Název práce: Antibakteriální stabilita víceúčelových roztoků k péči o kontaktní čočky

Abstrakt:

V první části této práci jsou shrnuty současné poznatky o problematice infekcí předního segmentu oka způsobené zejména bakteriálními agens. Samostatné kapitoly jsou zaměřeny na bakteriální keratitidu u nositelů a nenositelů kontaktních čoček. Další část této práce rozebírá hygienické zásady při péči o kontaktní čočky jako faktor snižující počet bakteriálních kolonií adherovaných ke kontaktní čočce. Jednou z metod dezinfekce kontaktních čoček je použití víceúčelových roztoků. Tato práce se věnuje chemickému složení multifunkčních roztoků, zejména na antibakteriální účinnost a konzervační vlastnosti. Uvedené vlastnosti roztoků k péči o kontaktní čočky jsou zkoumány v experimentální části práce. Cílem práce je otestování antibakteriální účinnosti multifunkčních roztoků s různými daty expirace a různou dobou jejich otevření. Použity jsou následující metody – diskový difuzní test, diluční metoda a metoda dle Českého lékopisu.

Klíčová slova:

Antibakteriální účinnost, konzervační látky, víceúčelové roztoky, bakteriální infekce, kontaktní čočky

Thesis title: Antibacterial stability of multipurpose contact lens care solution

Abstract:

Study summarizes findings of anterior segment of eye infection issues caused especially by bacterial agents. Individual chapters are focused on bacterial keratitis in wearers and non-wearers of contact lenses. Analyses of hygienic principles in care of contact lenses as a factor decreasing amount of bacterial colonies adhered to contact lenses was employed. One of disinfection methods of contact lenses is utilization of multipurpose solutions. This thesis devotes to chemical structure of multipurpose contact lens care solutions, especially with antimicrobial efficacy and preservative properties. Mentioned chemical properties of multipurpose contact lens care solutions are researched in experimental part of thesis. Comparison of multipurpose contact lens care solutions with different time of expiration and different time from opening was performed. The following methods are used in this thesis – disc diffusion test, dilution method and method according to the Czech Pharmacopoeia.

Key words:

Antibacterial stability, preservatives, multipurpose solutions, bacterial infections, contact lenses

PODĚKOVÁNÍ

Mé poděkování patří Mgr. Veronice Vymětalové, Ph.D. za odborné vedení, trpělivost a ochotu, kterou mi v průběhu zpracování bakalářské práce věnovala.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem práci s názvem „*Antibakteriální stabilita víceúčelových roztoků k péči o kontaktní čočky*“ vypracovala samostatně a použila k tomu úplný výčet citací použitých pramenů, které uvádím v seznamu přiloženém k bakalářské práci.

Nemám závažný důvod proti užití tohoto školního díla ve smyslu §60 Zákona č.121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon).

V dne

.....

podpis

Obsah

Úvod.....	7
1 Současný stav řešené problematiky	9
1.1 Přední segment oka a přídatné orgány	9
1.2 Bakteriální infekce oka a očních adnex	12
1.3 Bakteriální keratitida.....	19
1.3.1 Rizikové faktory	19
1.3.2 Bakteriální infekce u nositelů kontaktních čoček	19
1.3.3 Bakteriální infekce u nenositelů kontaktních čoček	21
1.4 Imunologie předního segmentu oka	25
1.5 Kontaktní čočky a hygiena.....	29
1.6 Víceúčelové roztoky.....	31
1.6.1 Chemické složení.....	31
1.6.2 Konzervační vlastnosti a antibakteriální účinnost	32
1.6.3 Chelatáty, surfaktanty a zvlhčovačla	33
2 Cíle práce	34
3 Metody	34
3.1 Zkouška na antibakteriální účinnost diskovým difuzním testem (DDT).....	34
3.2 Zkouška na antibakteriální účinnost diluční metodou	36
3.3 Zkouška na sterilitu dle Českého lékopisu.....	37
3.3.1 Půda z hydrolyzátů sóji a kaseinu.....	38
4 Experimentální část.....	39
4.1 Materiály	39
4.1.1 Použité bakteriální kultury	39
4.1.2 Multifunkční roztoky k péči o kontaktní čočky.....	42
5 Výsledky	45
5.1 Experiment na antibakteriální účinnost na principu diskového difuzního testu ...	45
5.1.1 Výseč z filtračního papíru.....	45
5.1.2 Sterilní gáza	47
5.1.3 Jamkové nanášení	49
5.2 Experiment na antibakteriální účinnost diluční metodou.....	50
5.3 Experiment podle Českého lékopisu.....	52

6	Diskuse.....	53
	Závěr	56
	Seznam použité literatury	58
	Seznam symbolů a zkratk	62
	Seznam obrázků.....	63
	Seznam tabulek	65
	Seznam příloh	66

Úvod

Lidské tělo je vhodným prostředím pro velké množství neškodných mikroorganismů, které vytváří přirozený mikrobiom. Nicméně mohou se zde vyskytovat také patogenní bakterie způsobující různě závažná onemocnění. Stejná pravidla platí pro oko a oční adnexa. Riziko vzniku některé z bakteriálních infekcí se ještě může znatelně zvýšit při aplikaci kontaktních čoček. Správnou péčí o kontaktní čočky je možné toto riziko eliminovat. Používání kontaktních čoček, ať už jako korekce refrakčních vad či jako kosmetická záležitost, je čím dál rozšířenější. Existuje několik druhů dezinfekce kontaktních čoček. Statisticky nejvyužívanější metodou dezinfekce kontaktních čoček je jejich uložení do multifunkčních roztoků (asi 92%). Uvedená metoda kontaktní čočky uchovává, čistí a dezinfikuje, ale pokud nemá antibakteriální účinnost, nedokáže zničit veškeré bakterie uchycené na povrchu kontaktní čočky.

Bakterie můžeme taxonomicky rozčlenit do dvou základních skupin, grampozitivní a gramnegativní bakterie. Většinu mikrobiomu oka a očních adnex tvoří grampozitivní bakterie, zejména pak stafylokoky, streptokoky, mikrokoky, korynebakteria a propionibakteria. Ze zmíněných bakterií je nejvíce zastoupen rod stafylokoků. Za nejfrekventovanější lidský patogen je všeobecně považován *Staphylococcus aureus*. Přestože přibližně u třetiny lidí žije ve vztahu blízkém komensalismu, již při nepatrné odchylce od přirozeného stavu může dojít ke vzniku hnisavé infekce. Méně častým zástupcem rodu stafylokoků je například *S. epidermidis* či *S. haemolyticus*. Rod streptokokus často vytváří drobnější kolonie, dvojice či řetízky. Četným zástupcem uvedeného rodu bakterií je *S. pneumoniae*, který se může stát snadno patogenem, obdobně jako *S. Aureus*, a způsobit tak například bakteriální konjunktivitidu. Gramnegativní bakterie, *Neisseria gonorrhoeae*, je původcem kapavky. Příznakem tohoto onemocnění je právě hyperakutní bakteriální konjunktivitida. Stejný projev má také onemocnění meningitida, které je způsobeno bakterií *Neisseria meningitidis*. [1, 2, 3]

Nejčastější příčinou keratokonjunktivitidy ve vyspělých zemích je pravidelné nošení kontaktních čoček. V České republice nosí pravidelně kontaktní čočky přibližně 5 % obyvatel. Nejvíce nositelů je v USA, kde je kolem 8% nositelů kontaktních čoček. I přes správnou péči o kontaktní čočky se mohou na jejich povrchu přichytit některé bakterie. Gramnegativní bakterie *Pseudomonas aeruginosa* adhezuje k plastům, tedy i na pouzdra pro kontaktní čočky a na kontaktní čočky samotné. [37]

Cílem práce je shrnout současné poznatky o problematice infekcí oka a to zejména infekce bakteriálního původu. V teoretické části práce je popsán biofilm oka a očních adnex a jejich

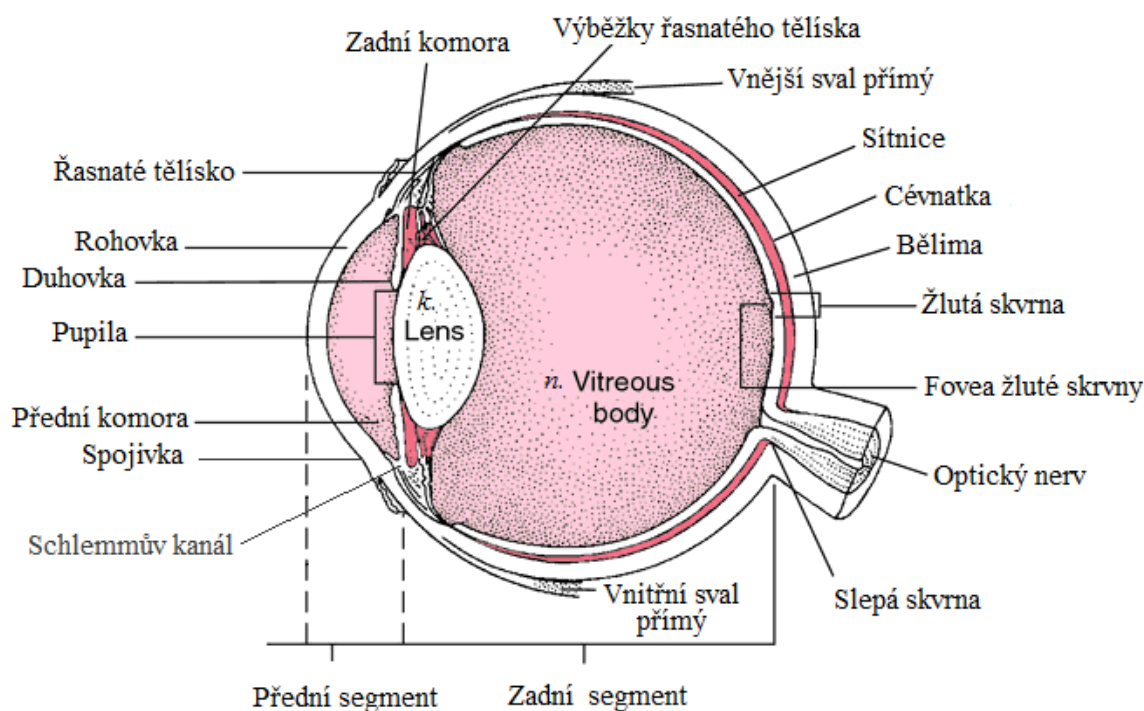
obranný systém proti patogenním bakteriím. V práci jsou podrobněji rozebrány bakteriální infekce a zvláště pak bakteriální keratitida u nositelů, ale i nenositelů kontaktních čoček. Další část je zaměřena na péči o kontaktní čočky a dezinfekční metody víceúčelových roztoků. Samostatné kapitoly se věnují konzervačním a dalším chemickým vlastnostem multifunkčních roztoků.

Experimentální část je zaměřena na testování různě exspirovaných vzorků multifunkčních roztoků k péči o kontaktní čočky. Dalším faktorem, který hypoteticky ovlivňuje antibakteriální účinnost, je rozdílná doba otevření jednotlivých vzorků roztoků. Zhodnocení antibakteriální účinnosti zmíněných roztoků a potvrzení výsledků je provedeno pomocí několika metod.

1 Současný stav řešení problematiky

1.1 Přední segment oka a přídatné orgány

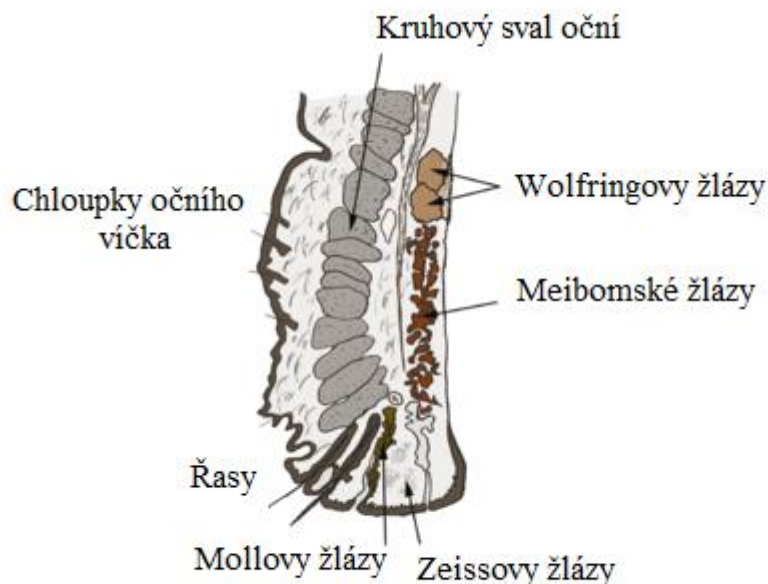
Přední segment oka zahrnuje rohovku, bělimu, uveu a čočku. K přídatným orgánům řadíme spojivku, víčka, slzný aparát, obočí a okohybné svaly.



Obrázek 1 Transverzální řez okem [Upraveno dle 26].

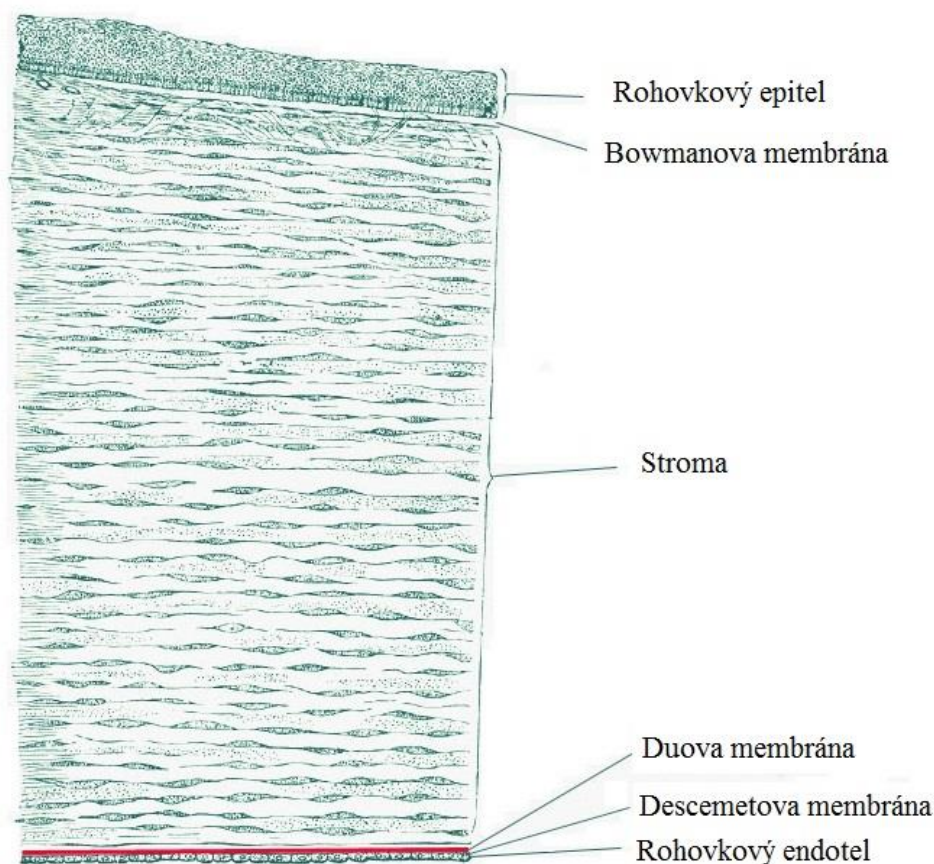
Spojivka je lesklá, tenká, cévnatá vrstva pokrývající přední část bulbu a zadní část víček. Na limbu přechází v rohovkový epitel a na okraji víček do marga a kůže víček. Funkce spojivky je především ochranná a sekreční. Spojivka je z histologického hlediska tvořena dvěma vrstvami, epitelem a stromou. Stroma obsahuje fibroblasty, leukocyty, plazmatické a Langerhansovy buňky, melanocyty a přídatné žlázy Krauseho a Wolfringovy. Uvedené žlázy se podílejí na tvorbě vodné vrstvy slzného filmu. Udržení stability slzného filmu je podmíněno dostatečným množstvím mucinu, který je produkován pohárkovými buňkami v epitelu. Produkce mucinu se může značně zvýšit při konjunktivitidách různého původu. Olejovou vrstvu slzného filmu zajišťují Meibomské žlázy ústící na margu víček. Chalazion, tedy zánět

Meibomské žlázy může být způsoben také bakteriálními agens. V horním víčku jsou uloženy ještě další dva typy žláz, Mollovy a Zeisovy žlázy. Při zánětu zmíněných žláz může vzniknout onemocnění zvané Hordeolum, které může být stejně jako v případě Chalazionu způsobené bakteriemi. [1, 4]



Obrázek 2 Přídavné slzné žlázy v očním víčku [upraveno dle 27].

Kornea je transparentní, avaskulární optická tkáň, která společně se spojivkou a sklerou mechanicky odděluje přední komoru oční od vnějšího prostředí. Zároveň je to nejdůležitější refrakční prostředí. Rohovka je tvořena několika vrstvami. První vrstvou je epitel, který umožňuje přilnutí mucinové vrstvy slzného filmu a zabraňuje možnosti vniknutí infekce. Následující vrstvou je Bowmanova membrána, při jejímž porušení může vzniknout korneální jizva a může dojít ke ztrátě regenerace. Bowmanova membrána od sebe odděluje epitel a stroma. Rohovkové stroma tvoří 90% tloušťky korney a obsahuje kolagenní fibrily přísně uspořádané do lamel. Podle výzkumu Harmindera Dua z roku 2013 existuje vrstva mezi stromatem a Descemetovou membránou. Nově pojmenovaná Duova membrána složená z kolagenních vláken má především zpevňovací funkci. Již zmíněná Descemetova membrána je tvořena mřížkou kolagenních vláken a s věkem její tloušťka nabývá. Poslední vrstvou rohovky je vnitřní epitel, který je zodpovědný za její průhlednost. Významnou funkcí epitelu je také hydratace celé rohovky. Transparentnost a hydratovanost korney udržuje její optickou mohutnost konstantní, tedy přibližně 43 D. [1, 4, 5]



Obrázek 3 Vrstvy rohovky [Upraveno dle 28].

Čočka je bikonvexní struktura, jejíž funkcí je akomodace, refrakce a udržení vlastní transparentnosti. Je uložena mezi duhovkou a přední sklivcovou membránou, zavěšena na závěsném aparátu a připojena k ciliárnímu tělesu. Čočka se skládá z pouzdra, epitelu, kortexu a jádra. S rostoucím věkem přibývají čočce jednotlivé vrstvy a dochází k zaoblování. Optická mohutnost čočky se pohybuje mezi 16 až 20 D.

Úvea je cévnatá tkáň zahrnující také duhovku, ciliární těleso a cévnatku. Hlavní funkcí je zásobení oka krví, produkce komorové vody, umožnění akomodace a umožnění odtoku komorové vody. Iris odděluje přední komoru od zadní a funguje na principu clony. Při osvětlení se svěrač zornice stáhne, čímž ovlivní množství paprsků dopadajících na sítnici a naopak. Řasnaté těleso přechází na jedné straně v cévnatku a na straně druhé se spojuje s duhovkou. Díky kontrakci svalů řasnatého tělesa dochází k akomodaci. [1, 4]

1.2 Bakteriální infekce oka a očních adnex

Bakterie jsou mikroskopické prokaryotní organismy, které nám mohou způsobit bakteriální infekce oka. Řadu běžných konjunktivitid vyvolávají zejména stafylokoky a streptokoky, méně často i další bakterie. [1, 2]

Původcem zánětu mazových žláz víčka, zvaného ječné zrno (**hordeolum**), je již zmíněný rod stafylokokus. Hordeolum je akutní purulentní zánět folikulů řas, Mollovy nebo Zeissovy žlázy. Počátečním příznakem může být svědění či pocit tlaku ve víčku. Existuje možnost progredace do stadia, kdy můžeme pozorovat v okolí postižené žlázy edém a zarudnutí. Postupem času se zvyšuje citlivost a bolestivost při mrkání a může se objevit zánětlivá infiltrace až hnisavý absces. Po několika dnech se většinou obsah hordeola spontánně uvolní. Poté se podávají sulfonamidy nebo antibiotika pro zabránění šíření infekce. [1, 2]

Vlčí zrno neboli **chalazion**, je akutní hnisavý zánět Meibomovy žlázy uložené v oblasti tarzální ploténky. Příznaky bývají stejné jako v případě hordeola, ale výraznější. Někdy můžeme pozorovat i reakci okolních uzlin. Neléčené chalazion může dojít až ke vzniku flegmony či abscesu. Flegmona je agresivní neohrazený zánět šířící se měkkými tkáněmi, naopak absces je dobře ohraničené zánětlivé ložisko. Častěji ale přechází akutní stav do chronického chalazia. Velmi účinná bývá injekce triamcinolonu. [1, 2, 6]

Překrvení okrajů víček je nejčastějším klinickým příznakem blefaritidy. Důvodem je výrazné cévní zásobení okrajů víček. **Blepharitis ulcerosa** je onemocnění okrajů víček vyvolané streptokoky či stafylokoky, zejména *Staphylococcus aureus*. Mezi řasami se objevuje zaschlý sekret, který vytváří řasy slepující krusty. Řasy vypadávají, mohou vznikat jizvy spojené s trichiázou. Často dochází ke vzniku ektropia, což je změna polohy okraje víčka ve smyslu jeho odstávání až vyvrácení od bulbu. Onemocnění může být také doprovázeno chronickou konjunktivitidou nebo epiforou. Epifora je nadměrné slzení způsobené zvýšenou sekrecí slzných žláz nebo neprůchodností odvodných slzných cest. Okolí víček je zarudlé a zduřené. Dochází ke vzniku hnisavých vředů v místě již předtím postiženém skvamózní blefaritidou. **Blepharitis squamosa** je zánět okrajů víček charakteristický tvorbou šupinek mezi řasami. Příčinou zmíněného onemocnění může být špatně korigovaná refrakční vada či jiná celková onemocnění jako diabetes mellitus, chronická onemocnění ledvin a jiné. K rozvoji skvamózní blefaritidy také přispívá cigaretový kouř, chemické výpary, chlad a teplo. Blepharitis ulcerosa i blepharitis squamosa se léčí lokálně podávanou antibiotikovou či sulfonamidovou mastí. [2, 4, 7]

Konjunktivitida je nejčastější zánětlivý proces charakteristický náhlou jednostrannou spojivkovou injekcí, buněčnou infiltrací, exsudací, edémem víček a mukopurulentní sekrecí. Druhé oko bývá postiženo v odstupu několika dnů. Infekce můžeme klasifikovat dle jejich nástupu a trvání. Hyperakutní zánět spojivky se projevuje do několika hodin po kontaktu s bakterií. Akutní jednostranná konjunktivitida vzniká během hodin až dní, do týdne postihuje i druhé oko a do 4 týdnů odezní. V případě, že konjunktivitida trvá více než 4 týdny, hovoříme o chronickém stavu. Příčinou hyperakutní bakteriální konjunktivitidy je *Neisseria gonorrhoeae* a *Neisseria meningitidis*. V prvním případě jde převážně o pohlavní přenos přímý nebo zprostředkovaný. Přímým přenosem rozumíme pohlavní akt či přenos z matky na dítě, u zprostředkovaného přenosu jde o autoinfekci u dospělého jedince. V druhém případě je přenos infekce způsoben zejména krevní cestou při současném plicním postižení. Pro gonokokovou konjunktivitidu je typický oboustranný výskyt papilární hyperplazie spojivky, mukopurulentní sekrece, chemóza, prknavitý edém víček a spojivkové překrvení. Zpravidla se objevuje zduření preaurikulárních uzlin. Současně může dojít k rohovkovým komplikacím jako vřed či perforace rohovky nebo ke vzniku přední uveitidy s hypopyem. Hypopyon je nahromadění hnisu v přední komoře oční, které způsobuje zkalení jejího obsahu a tím hnisavý zánět duhovky, druhotně rohovky. Meningoková infekce postihuje více děti než dospělé a spolupostižení rohovky či uvey není tak časté. Diagnózu stanovíme stěrem ze spojivky barveném podle Grama a kultivací na čokoládovém agaru. Při nálezů gramnegativního diplokoků je diagnóza potvrzena. Případně je možné použít fermentační test. Léčíme lokálně i systémově antibiotiky. Podáváme 100 000 m.j./kg/den krystalického penicilinu G intramuskulárně ve čtyřech dávkách po dobu 5 – 7 dnů. Lokálně aplikujeme 100 000 j./ml krystalického penicilinu první den po hodině, druhý den po dvou hodinách a následně pětkrát za den. [2, 4, 7]



Obrázek 4 Konjunktivitida [29]

Mezi patogeny akutní bakteriální konjunktivitidy patří zejména *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Haemophilus influenzae*, *Moraxella lacunata* a *Corynebacterium diphtheria*. Onemocnění se projevuje jednostrannou povrchovou injekcí bulbární i tarzální spojivky, hlenohnisavou sekrecí slepující víčka či epiforou. Do několika dnů bývá zpravidla postiženo i druhé oko. Příčinou recidivujících nebo chronických zánětů spojených s blepharitis ulcerosa bývá *Staphylococcus aureus*. Spolupostížení kornej je časté. Následkem uvolnění toxinů může vznikat povrchová tečkovitá keratopatie. Při přecitlivělosti na stafylokoky se mohou objevit bílé marginální infiltráty či flykténová limbální keratitida. Flykténa je onemocnění spojivky alergického původu s přítomností drobných bělavých uzlíčků. Méně častým původcem bakteriální konjunktivitidy je *Staphylococcus epidermidis*. Pokud je patogenem *Streptococcus pneumoniae*, v klinickém obraze dominuje navíc edém víček, spojivkové hemoragie, tvorba membrán na tarzální spojivce. Pneumokokový zánět spojivky bývá doprovázen postižením plic, rohovkovými petechiemi a podspojivkovými hemoragiemi. Onemocnění postihuje zejména děti a to v zimním období. Pro letní období je typická hemofilová konjunktivitida, která se projevuje častěji u dětí s opakovanými záněty středního ucha nebo recidivujícími záněty respiračního traktu. Projevem onemocnění jsou podspojivkové hemoragie a vznik rohovkových marginálních infiltrátů. Infekce *Haemophilus influenzae* může být spojena s rohovkovými komplikacemi, například tvorbou ulcerací a infiltrátů nebo vzniká epiteliální keratitida. *Haemophilus aegypticus* vyvolává brazilskou hemoragickou horečku, což je kombinace akutního zánětu spojivek, horečky

a gastrointestinálních či kožních lézích v důsledku rozsáhlých petechií. Původcem opakovaných akutních a chronických konjunktivitid je také *Moraxella lacunata*. Napadá rizikové skupiny naší populace, kterými jsou především chroničtí alkoholici, narkomani nebo osoby s malnutricí. Moraxelový zánět spojivky je typicky doprovázen angulární blefarokonjunktivitidou, vznikem rohovkových vředů a často také preaurikulární adenopatií. Bakterie rodu *Moraxella* jsou méně častým původcem konjunktivitid. Zánět spojivek může být vzácně způsoben také bakterií *Corynebacterium diphtherae*. K přenosu bakterie může dojít bezprostředně po očkování. Průnik bakterií intaktním epitelem do rohovky může vyústit v těžké stromální keratitidy s rohovkou perforací. Záškrtová konjunktivitida se může vytvářet během membranózní konjunktivitidy a faryngitidy, myokarditidy a svalové obrny. Akutní zánět spojivky ve více než 85% případů samovolně odeznívá do jednoho až dvou týdnů nezávisle na původci onemocnění. Oko vyplachujeme ředěným jodpovidonem a podáváme širokospektrá antibiotika každé 2 – 4 hodiny lokálně v podobě kapek či masti po dobu 7 – 10 dní. Podmínkou úspěšné léčby je dodržování hygieny. Systémová antibiotika podáváme pouze při chronické bakteriální konjunktivitidě (viz. Tab. 1). Bakteriologické vyšetření se provádí ve výjimečných případech, kdy zánět nereaguje na běžná antibiotika. Vhodným kultivačním médiem pro streptokoky je krevní agar, pro neisserie a hemofily využíváme čokoládového agaru a pro anaeroby thioglykolátového média. [2, 4, 7]

Etiologickým agens chronického zánětu spojivky je zejména *Staphylococcus aureus* a *Moraxella lacunata*. Méně běžné bakterie způsobující uvedené onemocnění jsou střevní bakterie *Proteus mirabilis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* a *Serratia marcescens*. Výjimečně může spojivku postihovat *Branhamella catarrhalis*, což je bakterie horních cest dýchacích. Chronická konjunktivitida je spojena se zánětem víček a je typická dlouhým a nedramatickým průběhem. *Staphylococcus aureus* vyvolává zánět spojivky uvolněním svých toxinů. Dochází k difúznímu překrvení a ztluštění konjunktivy se současným vznikem papil či folikulů. Přítomnost mukopurulentní sekrece je minimální. Na okrajích víček se mohou tvořit teleangiektázie, recidivující hordeola, ulcerace v oblasti řas. Teleangiektázie je nahromadění rozšířených drobných krevních kapilár a žilek. Řasy mohou vypadávat. Moraxelová konjunktivitida je zpravidla doprovázena blefaritidou vnitřního i zevního koutku oka. V postižených koutcích vzniká macerace a následně krusty. Zpravidla dochází k folikulární spojivkové reakci a vzniká epiteliální keratitida. Pro léčbu stafylokokové i moraxelové konjunktivitidy je nutné dodržení hygieny víček. Je třeba pravidelně odstraňovat krusty, například pomocí teplých obkladů, mechanické odstranění pomocí vlhčených tamponů,

případně odmaštění zředěným dětským šamponem. V suchém stavu víček aplikujeme antibiotika v masti (tetracyklin, erytromycin, bacitracin). Celková léčba tetracyklinem probíhá po dobu dvou týdnů (viz. Tab. 1). Podáváme 2 g čtyřikrát denně. Terapie může pokračovat několik měsíců v dávce 0,5 g za den. Při vzniku marginálních infiltrátů krátkodobě využijeme k léčbě steroidy. [2, 4, 8]



Obrázek 5 *Haemophilus influenzae* na čokoládovém agaru.

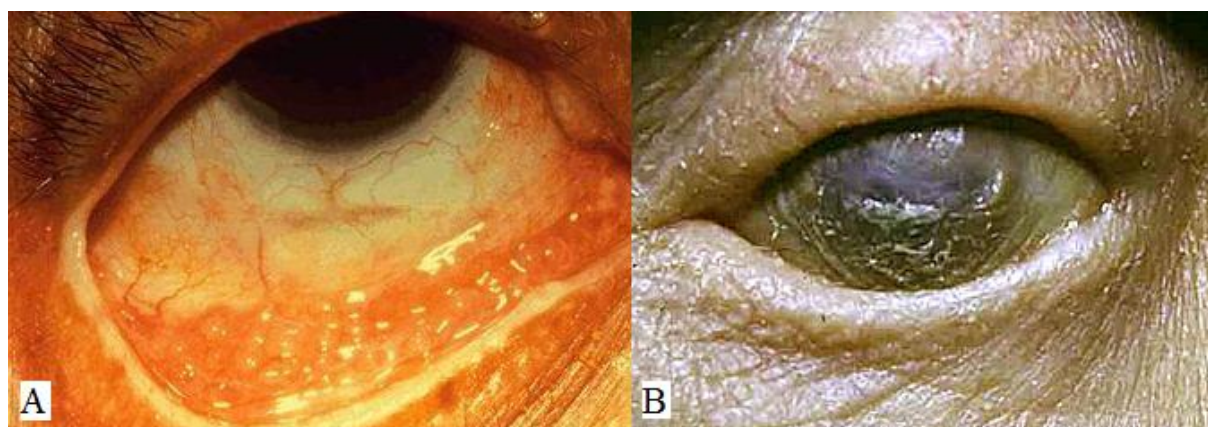
Tabulka 1 Přehled antibiotik a spektrum jejich působení

<i>Antibiotikum</i>	<i>Kategorie</i>	<i>Spektrum působení</i>	
		<i>Citlivost</i>	<i>Rezistence</i>
ofloxacin ciproflaxin lomefloxacin	fluorochinolony	stafylokoky hemofily neisserie chlamydiová trachomatóza pseudomonády	anaeroby streptokoky
bacitracin	cyklopeptidy	grampozitivní bakterie	

<i>Antibiotikum</i>	<i>Kategorie</i>	<i>Spektrum působení</i>	
		<i>Citlivost</i>	<i>Rezistence</i>
Gentamicin tobramycin neomycin	aminoglykosidy	stafylokoky gonokoky pseudomonády (tobramycin, polymyxin B)	meningokoky streptokoky
polymyxin B	cyklopeptidy	hemofily (polymyxin B)	
oxytetracyklin	cykliny	grampozitivní a gramnegativní bakterie chlamydie	některé gramnegativní bakterie
erytromycin	makrolidy	stafylokoky neisserie chlamydiová trachomatóza hemofily	některé stafylokoky streptokoky (pneumonie) pseudomonády
chloramfenikol	fenikol	streptokoky neisserie chlamydiová trachomatóza	některé gramnegativní bakterie

Onemocnění **trachom** je prudký zánět spojivkového vaku. V současnosti se jedná o nejčastější příčinu slepoty v rozvojových zemích v důsledku nízké úrovně zdravotnictví a hygieny. Celosvětově trpí zmíněným onemocněním asi 500 milionů lidí, přičemž slepotou je postiženo přibližně 8 milionů lidí. Etiologickým agens trachomu je bakterie rodu *Chlamydia*. Jedná se o unikátní bakterie, které stavbou své stěny připomínají gramnegativní bakterie, ale postrádají peptidoglykan a obsahují větší množství lipidů. Chlamydie jsou obligátní intracelulární parazité, protože nemají schopnost syntetizovat ATP a jsou závislé na makroergních fosfátech hostitelské buňky. Trachom vyvolává konkrétně bakterie *Chlamydia trachomatis*. Uvedená infekce začíná povrchovou injekcí, pocitem cizího tělesa

a mukopurulentní sekrecí. Trachom vede k nekrotickým jizvám na spojivce, v jejichž důsledku dochází ke stočení očního víčka. Následně řasy dráždí rohovku při mrkání a může tak dojít k její abrazi. Infekce se může opakovat, protože nedochází k vytvoření aktivní imunitní ochrany. Konjunktivitidu může také způsobit *Chlamydia psittaci*, která se projevuje folikulárním zánětem spojivek, epiteliální infiltrací a preaurikulární adenopatií. Keratitidu bez rohovkového postižení vyvolává *Chlamydia pneumoniae*. Chlamydie mohou také způsobit inkluzní konjunktivitidu či Parinaudův okuloglandulární syndrom. Pro laboratorní vyšetření se provádí přímý cytologický stěr na sklíčko s následným barvením Lugolovou nebo Giemsovou metodou. Prokázání chlamydií je možné provést polymerovou řetězovou reakcí, hybridizací a komplement fixačních reakcí. Lokálně se podávají kapky s obsahem tetracyklinu či erytromycinu a to dvakrát denně po dobu dvou měsíců. Zároveň probíhá systémová léčba tetracyklinem či doxocyklinem až 6 týdnů. [1, 2, 3, 7, 9, 10]



Obrázek 6 A. Počínající trachom (papilární hypertrofie); B. Konečné stádium trachomu (rohovkový zákal a nekróza) [Upraveno dle 30]

Episkleritida je benigní zánět tkáně nacházející se mezi spojivkou a sklérou, které může být způsobeno bakteriemi, zejména stafylokoky. Uvedené onemocnění nebývá spojeno se systémovým onemocněním na rozdíl od skleritidy. **Skleritida** je závažný zánět bělimy, který může být vyvolán *Pseudomonas aeruginosa*, *Treponema pallidum* či *Mycobacterium tuberculosis*. Ke vzniku skleritidy dochází šířením agens sousedních zanícených tkání, prostřednictvím organismů v krevním řečišti nebo skrz sklerální trauma. Bakterie *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* či *Streptococcus pneumoniae* mohou být původcem sklerokeratitidy, kdy dochází k rozšíření od rohovky do skléry. Rozšíření endoftalmitidy do

skléry se nazývá **panoftalmitida**, jejími původci jsou zejména *Staphylococcus aureus* a *Streptococcus equinus*. [2, 7]

Uveitida je zánět žilnatky, který zahrnuje mimo jiné iritidu a iridocyklitidu. V počáteční fázi je typická náhlá bolest při akomodaci, smíšená injekce a výrazná fotofobie. Mohou se tvořit drobné precipitáty a hypopyon. Terapie se provádí pomocí kortikosteroidů a mydriatik. [2, 7]

1.3 Bakteriální keratitida

1.3.1 Rizikové faktory

Predisponujícím faktorem vzniku rohovkové infekce je zejména zánět okolních tkání, jako například zánět očních víček, trichiáza či meibomianitida. Dalším rizikovým faktorem je jakýkoli povrchový epiteliální defekt, například porucha slzného filmu. Nebezpečná je také neuroparalytická keratitida. V tomto případě dochází ke ztrátě korneální citlivosti způsobené poruchou senzitivní inervace oka, konkrétně nervus trigeminus a nervus ophtalmicus. Lagofthalmus je další komplikací, která usnadňuje rozvoj keratitidy. Při lagofthalmu se oční štěrbinu nedovírá a oko zůstává obnaženo. Následným osycháním mohou vznikat zánětlivé reakce. Rizikovým faktorem je také lokální či systémová imunosuprese. Stejná pravidla platí pro systémové choroby. Častým důvodem vzniku keratitidy je také špatná péče o kontaktní čočky a jejich následné nošení. Na kontaktní čočku adherují mikroorganismy a aplikace nesprávně dezinfikovaných kontaktních čoček může zapříčinit vznik keratitidy či keratokonjunktivitidy. Riziko vzniku infekce se zvyšuje také při přespávání s kontaktními čočkami, které pro to nejsou určeny. Často dochází k používání kontaktních čoček pro prodloužené nošení, což může vyvolat keratitidy. Pod kontaktními čočkami nemusí vždy docházet k dostatečné výměně slzného filmu, následně pak rohovka osychá, což může vést k zánětlivému onemocnění. Výrazný vliv má i vnější prostředí. [1, 11]

1.3.2 Bakteriální infekce u nositelů kontaktních čoček

Původcem infekce u nositelů kontaktních čoček může být například *Streptococcus viridans*. Jedná se o grampozitivní kokovitou bakterii. Zánět zapříčiněný *Streptococcus viridans* probíhá pod obrazem infekční krystalové keratopatie a je charakteristický jehlicovitými opacitami ve všech vrstvách stromatu. Většinou nedochází k nekróze. Objevuje

se také po operacích či u pacientů s imunodeficitem. Etiologickým agens jsou *Propionibacterium acnes*, grampozitivní nesporeující anaerobní tyčky. Jedná se o nejčastěji nalézané nesporeující anaeroby v klinickém materiálu. Často se objevují i na povrchu kontaktních čoček. Běžně se vyskytuje v mikrobiomu spojivkového vaku. Zánět rohovky může vznikat po operacích, traumatem, dlouhodobém užíváním kortikosteroidů a také častým užíváním kontaktních čoček. Klinický obraz propionbakteriové keratitidy je typický infekční zánět, méně často se objevuje stromální absces. Kontaktní čočky nejvíce ze všech bakterií kontaminuje *Pseudomonas aeruginosa*. Běžně se vyskytuje v bazenách, ventilátorech, očních kapkách či na hrdle multifunkčních roztoků, zamožují nemocniční prostředí, katetry, infuzní roztoky a další. Pseudomonáda je gramnegativní nefermentující bakterie, která rychle proniká skrz porušený epitel do stromatu. Vzhledem k tomu, že pseudomonáda produkuje endotoxin a destruktivní enzymy (protáza a lipáza), dochází k rychlému rozvoji zánětu s tvorbou nekrotizujících vředů. K průniku dochází prostřednictvím porušeného epitelu, odkud se rychle šíří do stromatu. Během infekce dochází ke vzniku prstencovitých ulcerací a okolní tkáň jsou opakní. Nekrózy a perforace rohovky jsou běžné. Infekce proniká až do přední komory s tvorbou hypopyon. U nositelů hydrofilních kontaktních čoček se projevuje keratitida difúzní formou. [1, 2, 4]



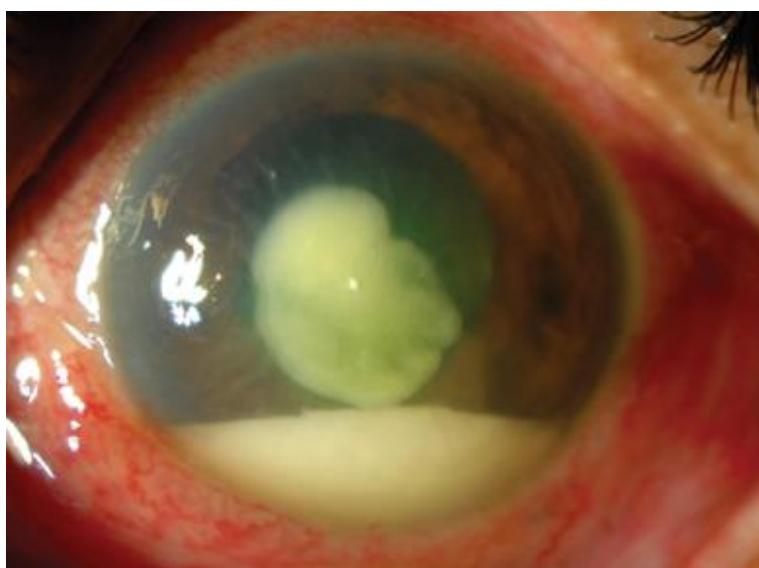
Obrázek 7 Pseudomonádová keratitida [31]

Enterokokové záněty rohovky jsou dalším onemocněním, které je mnohdy způsobeno v souvislosti s nošením kontaktních čoček. Druh *Serratia marcescens* je gramnegativní tyčinka, který je výrazným nozokomiálním patogenem. V počáteční fázi keratitidy dochází ke tvorbě

centrálního či paracentrálního vředu, který postupem času proniká do hlubších vrstev. Vzhledem k produkci endotoxinu a proteázy je proces ulcerace a perforace agresivní. Zánět mohou vyvolat i *Escherichia coli*, *Klebsiella* a *Proteus*. V tomto případě je průběh onemocnění podobný pseudomonádové keratitidě. V jiných případech nemusí být keratitida vyvolaná uvedenými agens agresivní a bolestivá. U nositelů kontaktních čoček se mnohdy objevuje keratitida vyvolaná *Haemophilus influenzae* a *H. aegypticus*. Nejprve vzniká zánět spojivky, který následně progreduje v povrchovou, ale rozsáhlou keratitidu. Hemofilová keratitida může dále indukovat uveitidu s hypopyem. Během onemocnění se běžně tvoří hnis a marginální vřed způsobující přecitlivělost. [1, 2, 4]

1.3.3 Bakteriální infekce u nenositelů kontaktních čoček

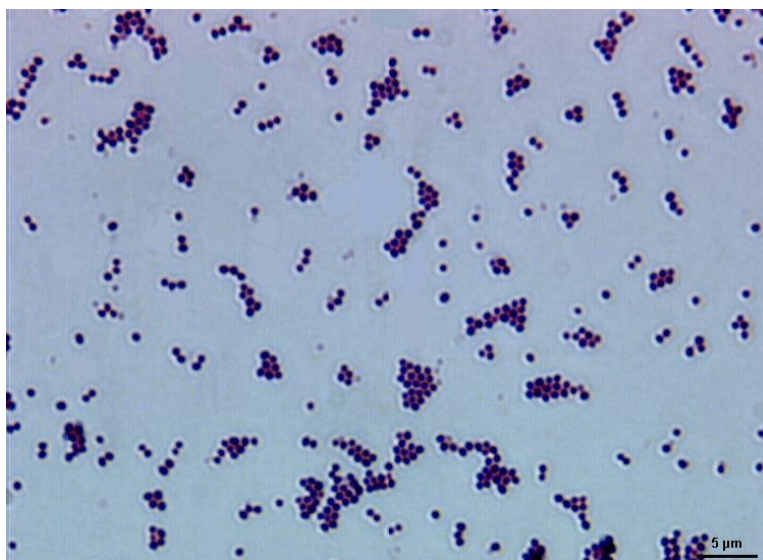
Nejčastějším původcem keratitidy je *Staphylococcus epidermidis* a *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae* a *Proteus*. Klinický obraz závisí na původci, jeho virulenci a době trvání infekce. Průběh závisí také na množství patogenů vniklých do rohovky. Všeobecně se objevuje zprvu ciliární, poté smíšená injekce, epifora, fotofobie, bolest či blefarospasmus. Během bakteriální keratitidy se tvoří bělavé infiltráty a postupem času dochází k likvidaci lamel rohovky. V přední komoře vznikají zánětlivé reakce v podobě sraženin na endotelu rohovky a často se tvoří zánětlivý výpotek sedimentující v přední komoře. Neléčená keratitida může vést ke vzniku descemetokély až k perforaci rohovky. Chronický stav je spojen s neovaskularizací. [1, 2, 4]



Obrázek 8 Bakteriální ulcerace s hypopyem v dolním segmentu rohovky [32].

Stafylokoková keratitida se projevuje dobře ohraničeným zánětem a krémovitými infiltráty. V průběhu onemocnění dochází často k ulceraci. Nekrózu a hypopyon vyvolává *Staphylococcus aureus*. Při zanedbání léčby může dojít k perforaci rohovky a tím k trvalému poškození zraku. Streptokokovou keratitidu způsobuje nejčastěji *Streptococcus pneumoniae*, α -hemolytický *Streptococcus viridans* či β -hemolytický *Streptococcus pyogenes*. Bakterie vstupují prostřednictvím trauma, odkud se rychle šíří do rohovky. V centru rohovky může dojít k vytvoření hlubokého abscesu doprovázeného zánětlivou reakcí s hypopyon. V případě, že je infekce vyvolaná *Streptococcus pyogenes*, průběh onemocnění je agresivnější. Mezi keratitidy způsobené grampozitivními tyčkami patří bacilová keratitida. Původcem je nejčastěji *Bacillus cereus*, který se vyskytuje ve vodě i v půdě. Do rohovky se dostává traumatem a během jednoho dne dojde k rozvoji. Začíná jako prstenec edému na rohovce a rychle se mění v absces. Vzhledem k vysoké virulenci mikroorganismu, může dojít k perforaci rohovky během několika hodin. Další grampozitivní tyčkou způsobující zánět rohovky je *Corynebacterium diphtheriae*. Charakteristická je ztráta transparence epitelu, stromální nekróza až roztavení korney. Onemocnění může být spojeno s membranózní konjunktivitidou či preaurikulární adenopatií. Listériová keratitida vyvolaná *Listeria monocytogenes* způsobuje defekty rohovkového epitelu až nekrotizující keratitidu. Charakteristická je prstencová ulcerace s fibrinovým výpotkem. Dalším původcem jsou klostridia působící marginální keratitidu doprovázenou konjunktivitidou. Pro uvedený typ keratitidy je typická tvorba plynu (intraepiteliálně, subepiteliální, intrastrmálně), který může být patrný i v přední komoře. Anaerobní bakterie *Actinomyces* působí rohovkové vředy s nekrotickou spodinou ohraničenou žlutou linií. Rozvoj infekce je pomalý a končí descemetokélou či perforací. Ke kontaminaci další z původců keratitid, nocardii, dochází nejčastěji v případě styku traumatu s hlínou. Bakterie může proniknout i endogenní cestou. Po průniku dochází k pomalému rozvoji. Vzniká povrchová ulcerace s šedobílou infiltrací a nekrotickými okraji. Podobá se plísňovým infekcím. Obranné mechanismy proti nocardiové infekci nejsou objasněny. Mezi gramnegativní koky vyvolávající zánět rohovky patří *Neisseria gonorrhoea* a *Neisseria meningitis*. Nalézají se v epitelových buňkách a tvoří mnohočetné infiltráty, ze kterých následně mohou vznikat vředy. Zánět často navazuje na konjunktivitidu a je doprovázen mukopurulentním sekretem. U gonokokové infekce novorozenců je typický průnik intaktním epitelem. Etiologickými agens jsou také *Escherichia coli*, *Klebsiella* či *Proteus*. Záněty, které vyvolávají zmíněné bakterie se podobají pseudomonádové keratitidě s rychlou nekrózou, prstencovou ulcerací až proděravěním rohovky. Mohou vyvolávat i méně agresivní formu. Pro infekci *Escherichia coli* je typická purulentní nebolestivá keratitida doprovázená těžkou iridocyklitidou a hypopyon. Moraxelová

keratitida postihuje častěji alkoholiky. Vyvolává marginální vřed s šedavými infiltráty. Vřed bývá lokalizován v dolní polovině rohovky a často je nebolestivý. Více progreduje do hloubky a v přední komoře vyvolává prudkou zánětlivou reakci. Původcem povrchové keratokonjunktivitidy, který stejně jako v případě *Moraxella* působí marginální vřed, je *Haemophilus aegyptus*. Dalšími známými bakteriálními agens jsou *Mycobacterium tuberculosis*, *M. leprae*, *M. fortuitum*, *M. chelonae* a méně často *M. avium intracellulare* či *M. goodii*. Tuberkulózní keratitida se projevuje flykténou s tvorbou tuberkulózního panu. Je provázena postižením konjunktivy a skléry, kdy vznikají ulcerózní granulomy a následně nebolestivé vředy rohovky. Často dochází k neovaskularizaci a perforaci kornej. Je třeba terapie tuberkulostatiky. Jednou z manifestací Hansenovy choroby může být lepromatózní keratitida, která vzniká v důsledku systémové infekce *Mycobacterium leprae*. Zmíněným onemocněním trpí 12 milionů lidí na světě. Subepiteliálně vznikají opacity v důsledku ukládání agregátů mykobakterií s makrofágy a lymfocyty. Agregáty mohou progredovat ke zkalení rohovky, vaskularizaci a tvorbě lepromatózního panu. Onemocnění je často doprovázeno akutní iritidou, atrofií iris, kataraktou či glaukomem. Postižena bývají také oční adnexa. Bakteriální záněty rohovky mohou být součástí systémového onemocnění jako například lues, borelióza, tuberkulóza. Nejčastěji se projevují v podobě vmezeřené keratitidy, vzácně v důsledku endogenního rozsevu. [1, 2, 4]



Obrázek 9 *Staphylococcus aureus* barvený dle Grama [33].

Pro cílenou léčbu je třeba určit etiologické agens pomocí kultivace z výtěru spojivkového vaku, nebo přímým přenesením materiálu na médium. Vhodným médiem může být čokoládový agar, krevní agar, bujon nebo Sabouradova půda. Poté se stěr nabarví podle Grama (viz. Obr. 8), případně Giemsky, pro cytologickou identifikaci mikroorganismů. Při podezření na mykobakteriální infekci je nezbytná biopsie rohovky. V prvotní fázi, kdy neznáme výsledky testování, nasazujeme širokospektrá antibiotika ze skupiny aminoglykosidů samostatně nebo v kombinaci s flurochinolony. Lokálně aplikujeme antibiotika v kapkách s vysokou frekvencí a podle účinku frekvence snižujeme. Je nezbytné udržet mydriázu a zabránit vzniku synechií. Nokardie reaguje na sulfonamidy, penicilin či cefalosporiny. [2]

Tabulka 2 Antibiotika užívaná k léčbě bakteriální keratitidy.

Antibiotikum	Koncentrace (%)	Aplikace	Spektrum citlivosti
AMINOGLYKOSIDY			
amikacin	0,67	lokální	G- bakterie stafylokoky některé streptokoky netuberkulózní mykobakterie
	5	podspojivková	
gentamycin	1,4	lokální	
	4	podspojivková	
tobramycin	1,4	lokální	
	4	podspojivková	
CEFALOSPORINY			
cefazolin	7,5-10	lokální	bakterie neprodukující peniciliny
	20	podspojivková	G+ bakterie běkteré G- bacily
FLUROCHINOLONY			
ciproflaxin	0,3	lokální	G- bakterie
ofloxacin			G+ bakterie
lomefloxacin			anaeroby pneumokoky

Antibiotikum	Koncentrace (%)	Aplikace	Spektrum citlivosti
PENICILINY			
penicilin G	100 000 U/ml	lokální	bakterie produkující i neprodukující peniciliny G+ bakterie některé G- bakterie
	1 000 000 U/ml	podspojivková	
metcilin	5	lokální	
	20	podspojivková	
piperacilin	0,7	lokální	
	20	podspojivková	
RŮZNÉ			
vankomycin	3,3	lokální	G+ bakterie

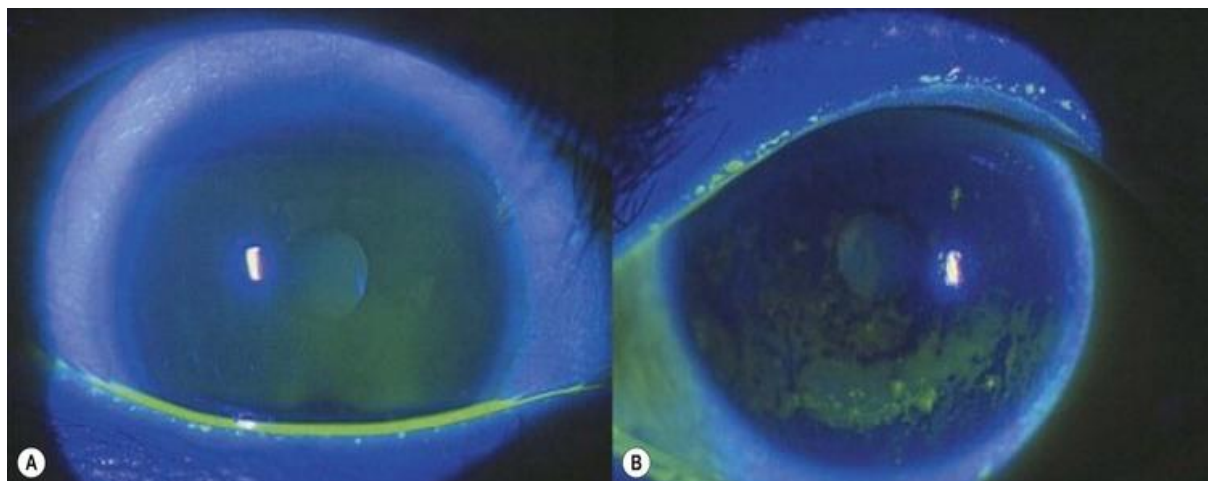
1.4 Imunologie předního segmentu oka

Existují tři základní funkce imunitního systému - rozpoznat tkáň organismu vlastní a tolerovat je, rozpoznat vnitřní škodliviny a průběžně odstraňovat staré či mutované buňky a rozpoznat vnější škodliviny a chránit organismus před infekcemi. Poruchami uvedených funkcí dochází k usnadnění průniku škodlivých látek do organismu. [12]

Dřívější studie považovaly oko za tzv. imunologicky privilegované místo. Představa hematookulární bariéry bránící průniku vysokomolekulárním látkám a buněk z periferní krve do oka je v současnosti již překonaná. Imunologická reaktivita intraokulárních prostor je dnes považována za důsledek buněčné i humorální struktury a jedná se zejména o výsledek komplexních regulací imunitní odpovědi. [2, 13]

Základní charakteristikou oka je především nízká schopnost obnovy a reparace vnitřních oddílů. Součástí přirozených bariér vnějších povrchů oka je fyziologická mikrobiota. Bylo prokázáno, že časté nošení kontaktních čoček může mít značný vliv na složení oční mikrobioty, což může nést negativní následky z hlediska obranného systému. Oko může být infikováno všemi typy infekčních agens. Vnějšími škodlivými látkám je nejvíce vystavena rohovka. Ochrannou vrstvu rohovky proti rozvoji infekce tvoří slzný film. Způsob ochrany slzami spočívá v mechanickém odplavování mikroorganismů a nečistot ze spojivkového vaku. Slzný film se skládá ze tří vrstev. Vnitřní mukózní vrstva přímo nasedá na rohovku. Funkcí uvedené vrstvy je vyrovnání nerovností na povrchu rohovky a spojivky, zajišťuje hydrofilitu povrchu

rohovky, podílí se na obalení bakterií a jejich snadnější odplavení z povrchu oka. Dále umožňuje přilnavost následující vodné složky slzného filmu k rohovce. Střední vodná složka obsahuje enzymy, zejména antibakteriálně účinkující lysozym. Obsahuje také prealbumin, ceruloplasmin, laktoferin, IgA, IgG, IgM a IgE, což jsou imunologicky aktivní látky. Význačnou funkci má třída IgA obsahující opsoniny, pomocí kterých dochází k usnadnění fagocytózy. V slzách se nachází v sekreční formě, která je odolnější před působením proteináz. Přítomnost IL-1 α v slzách je fyziologická. Jde o protizánětlivé cytokiny, které stimulují lymfocyty a řadu dalších buněk účastnících se zánětu. IL-1 α je produkován zejména epiteliálními buňkami rohovky. V slzách se také vyskytuje EGF napomáhající při reparačních procesech. Pokud není slzný film v dostatečné míře vytvářen, může dojít ke vzniku keratokonjunktivitidy. [2, 8, 13]



Obrázek 10 A. Fyziologický slzný film; B. Poškození slzného filmu, suché oko (nabarveno fluoresceinem pod modrým světlem) [Upraveno dle 34].

Konjunktiva je přímo vystavována aeroalergenům, chemickým noxám, látkám dráždící mechanicky, infekčním činitelům a nepřímo podnětům prostřednictvím lymfatických cest. Je imunologicky nejaktivnějším obranným mechanismem oka. Obsahuje značné množství buněk imunitního systému, především neutrofilní granulocyty, lymfocyty, plazmatické a žírné buňky. Neutrofilní granulocyty a epiteliální buňky spojivky odstraňují cizorodé částice pomocí fagocytózy, což bylo prokázáno u infekcí způsobených bakteriálními rody *Listeria* a *Chlamydia*. Ve zmíněných buňkách se také nacházejí lysozymy, které obsahují acidózní hydrolázy s baktericidním účinkem. Spojivka obsahuje všechny třídy imunoglobulinů, které bývají nahromaděné v subepiteliální tkáni. Nachází se zde lymfatické folikly, které jsou tvořeny

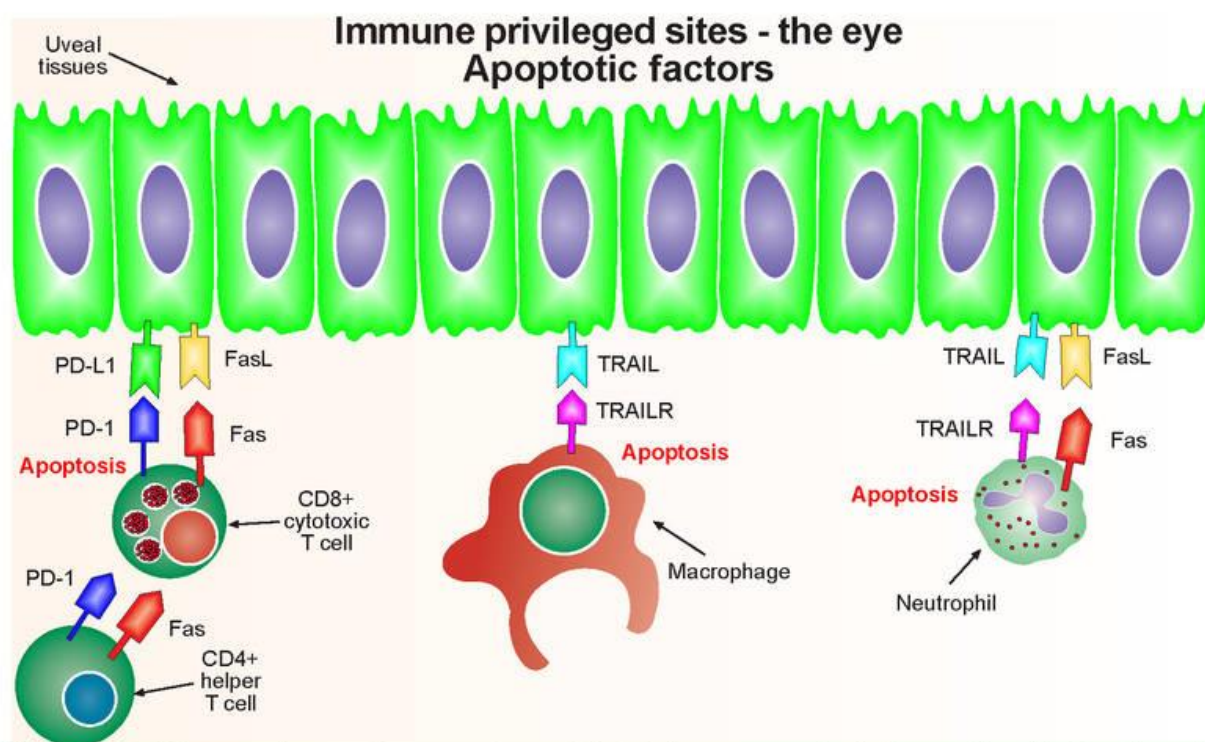
buňkami T a B lymfocytů společně s dendritickými buňkami. Obranná zánětlivá reakce je přísně regulována pomocí cytokinů IL-10 a TGF β . Vzhledem k přítomnosti uvedených struktur můžeme hovořit o tzv CALT (Conjunctiva Associated Lymphoid Tissue) systému. Jedná se o sekundární lymfatické tkáň spojené se spojivkou. Jsou součástí MALT (Mucosal Associated Lymphoid Tissue) systému, což je souhrnný imunitní systém lokalizovaný na sliznicích. [2, 13, 14]

Rohovka musí zachovat transparentnost pro svoji optickou funkci. Z toho důvodu je avaskulární a neobsahuje lymfatickou drenáž. Fyziologicky obsahuje jen nízký počet antigen prezentujících buněk. Epitel rohovky je tvořen intaktními buňkami s pevnými spoji, které vytvářejí mechanickou obrannou bariéru. Po stimulaci zde dochází k tvorbě cytokinů IL-1 α , IL-1 β , TNF α , IL-8 a IL-6. Rohovkový epitel obsahuje také antiangiogenní faktory a má rychlou regenerační schopnost v případě narušení. Povrch epitelu je hydrofobní, což je považováno také za bariérovou funkci epitelu. Ve stromální části se nachází dendritické buňky, které se zapojují do zpracování a prezentace antigenů T lymfocytům. Zmíněné buňky tvoří také protizánětlivé cytokiny, chemokiny a defenziny. Dendritické buňky můžeme najít v menším množství na periférii epitelu rohovky. Při reakci na různé podněty se mohou v centru rohovky vyskytovat Langerhansovy buňky. Indikátorem přítomnosti Langerhansových buněk jsou cévy, čímž dochází ke ztrátě původních optických vlastností rohovky.

Při průniku antigenu do přední komory oka dojde ke speciálnímu typu útlumu imunitní reakce, tzv. ACAID (Anterior Chamber-Associated Immune Deviation – imunitní odchylka vázaná na přední komoru oční). Dříve byla tato odpověď chápána jako forma imunitní „nevšímavosti“, v současné době se považuje za cílenou odpověď. Buňky rohovky a spojivky produkují řadu cytokinů regulující procesy akumulace leukocytů, angiogeneze, apoptózy a dalších. Cytokin IL-10 má imunosupresivní účinek podílející se na fenoménu ACAID. Dalším imunosupresivním cytokinem je TGF β produkovaný dendritickými buňkami a rezidentními makrofágy. Studie prokázaly, že imunosupresivní intraokulární prostředí zamezuje navození T buněčné reakce. Fenomén ACAID je zprostředkován mechanismy vedoucími k navození apoptózy. Na nitroočních strukturách je vylučována molekula FasL, která se váže na proapoptickou molekulu Apo-1/Fas, tvořící se pomocí aktivovaných T lymfocytů. Molekula FasL indukuje apoptózu Apo-1/Fas molekul. Tímto způsobem dochází k likvidaci aktivovaných T lymfocytů, které by mohly navodit nežádoucí reakci na přítomné antigeny. Probíhá-li ve vnitřním oku současně zánětlivá reakce s antigenním podnětem, je ACAID fenomén narušen.

Vzhledem k izolovanému vývoji čočky v embryogenezi je z imunologického hlediska čočka unikátní. Imunitní systém rozpoznává antigeny čočky jako cizorodé a v krvi se mohou objevit protilátky. V důsledku stárnutí či nedostatečné funkce buněk čočkového epitelu se mění bazální membrána na propustnou pro změněné čočkové krystaliny. Intraokulární útlumové mechanismy brání rozvoji autoimunitní reakce.

Obecně je přijímán názor, že v uveální tkáni mohou probíhat všechny imunopatologické reakce. U humánních uveitid není možné rutinně odebrat vzorky tkání a provést histologické vyšetření. Výzkum je proto zaměřen na zvířata s indukovanou neinfekční uveitidou. Ovšem klinické i patologické výsledky se liší na základě druhu pokusného zvířete. Odráží se zde také vliv chemické povahy a množství antigenů či způsob aplikace do organismu. V současné době převládá názor, že poškození zdravého oka se děje prostřednictvím aktivovaných buněk či protilátek po poranění uveální tkáně druhého oka. Přesná etiologie však dosud není známa. [2, 13]



Cell-associated factors such as membrane receptors participate in immunosuppression in the eye. The cells of certain ocular tissues express cell surface molecules that trigger apoptosis of activated immune cells. FasL and PD-L1 engagement promotes apoptosis in activated T cells following interaction with respective Fas and PD-1 receptors. TRAIL engages with receptors on macrophages and neutrophils to induce apoptosis. Activated neutrophils also express Fas that interacts with FasL to promote apoptosis.

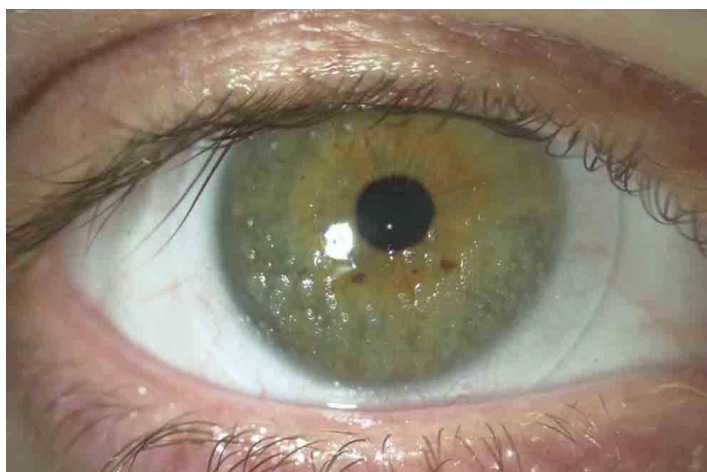
1.5 Kontaktní čočky a hygiena

Kontaktní čočka je malý optický systém umístěný přímo na rohovce. Existuje několik možností, jak klasifikovat kontaktní čočky. Z hlediska materiálu jsou kontaktní čočky polymery (viz. Tab. 3).

Tabulka 3 Běžně užívané materiály pro výrobu kontaktních čoček a jejich charakteristiky. [15]

MONOMER	VÝHODY	NEVÝHODY
HEMA	hydrofilita pružnost měkkost dobrá smáčivost	nízká propustnost pro kyslík
EGDMA	stabilita	nízká propustnost pro kyslík
MAA	hydrofilní	dráždivé pH
MMA	mechanická odolnost optická transparentnost stabilita netečnost	nepropustnost pro kyslík
NVP	hydrofilita dobrá smáčivost vysoká absorpce vody vysoká propustnost pro kyslík	dráždivé pH
GMA	dobrá smáčivost odolnost proti ukládání deposit	nízká propustnost pro kyslík
PVA	hydrofilita vysoká absorpce vody odolnost proti ukládání deposit	náročnost výroby

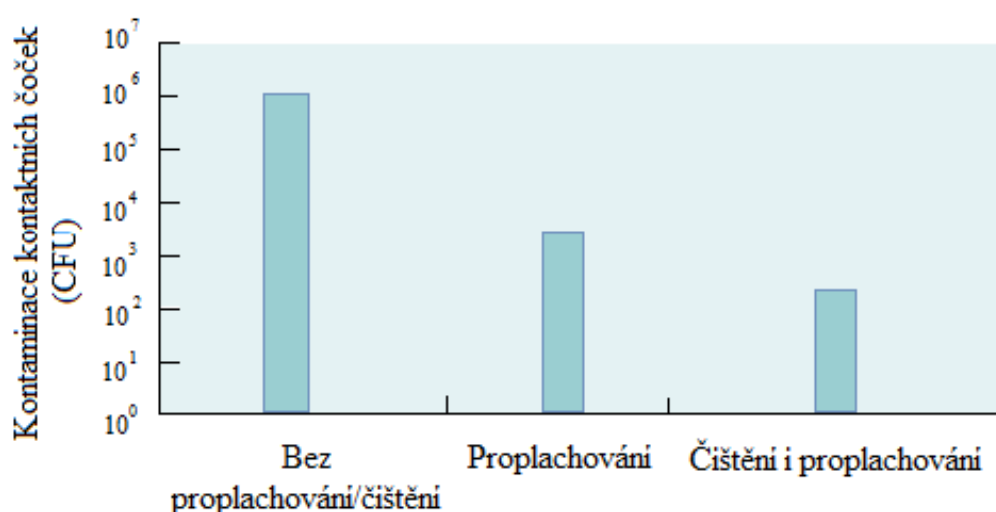
Významným problémem v souvislosti s kontaktními čočkami je jejich dezinfekce. Dezinfekce je základní způsob ničení mikroorganismů k zabránění jejich škodlivého působení na člověka či výrobky, kterým je v našem případě kontaktní čočka. Na kontaktních čočkách ulpívají depozita různého druhu. Bílkovinná depozita vznikají usazením denaturovaných proteinů ze slzného filmu. Objevují se zejména u ionizovaných polymerů nebo při použití tepelné dezinfekce. Lipidová depozita vznikají z lipidové vrstvy slzného filmu. Může dojít ke zhoršení stavu při onemocnění Meibomských žláz. Dalším druhem depozit hromadících se na povrchu kontaktních čoček jsou anorganická depozita, která pocházejí ze slz, z dezinfekčních prostředků či prachových částic vnějšího prostředí. Bakteriální a mykotická depozita se objevují na kontaktních čočkách v případě špatné péče, nebo při použití kontaminovaných roztoků. Dalším zdrojem usazenin jsou oplachovací roztoky, oční kapky, kosmetika a líčidla nebo vlastní ruce.



Obrázek 12 *Bílkovinná depozita na kontaktní čočce [35].*

Rozlišujeme několik stupňů péče o kontaktní čočky. Jedná se o čištění, oplachování, dezinfekce, sterilizace, zvlhčování a odstraňování usazenin. Pro správný postup se prstem jemně tře o povrch čočky ve sterilním fyziologickém roztoku. Pokud bychom chtěli dosáhnout lepšího výsledku, přidávají se látky snižující povrchové napětí, například izopropylalkohol. Mechanické čištění slouží také jako prevence akantamébové keratitidy. Pokud budeme kontaktní čočku proplachovat po dobu deseti vteřin, dojde ke snížení počtu kolonií z jednoho milionu na tři tisíce. Mnutím po dobu deseti vteřin dosáhneme snížení počtu kolonií na tři sta. Bakterie a jiná depozita adherují nejen ke kontaktním čočkám, ale také k pouzdrům, do kterých se kontaktní čočky ukládají. Výzkumy prokázaly, že 77% pouzder na kontaktní čočky je

kontaminováno patogenními bakteriemi, které následně snižují účinnost dezinfekčních roztoků. Bakterie si vytváří svůj biofilm, kterým se chrání před dezinfekčními účinky. Kontaminace pouzder nesouvisí s druhem použitého roztoku. Mechanické čištění pouzdra na kontaktní čočky je nezbytné. Doporučeno je čištění pomocí multifunkčního roztoku a následné vyschnutí otevřeného pouzdra. Maximální doba pro použití jednoho pouzdra je stanovena na 3 měsíce, nicméně odborníci doporučují výměnu s každým novým roztokem (přibližně po půl roce). [15, 16, 17, 18, 19, 20]



Obrázek 13 Účinek proplachování a čištění na bakteriální kontaminaci kontaktních čoček. [upraveno dle 15]

Při manipulaci s kontaktními čočkami je vždy nezbytné důkladné umytí rukou. Umytí pod tekoucí vodou sníží počet bakterií o 77%, při užití mýdla až o 92 %. Voda však není sterilní. Kontaminaci kontaktních čoček ovlivňuje také místo, kde dochází k aplikaci. Mnoho nositelů aplikuje své kontaktní čočky nad umyvadlem, což je jedno z nejkontaminovanějších míst. Častou chybou je nošení kontaktních čoček během nemoci, užití expirovaných kontaktních čoček či oplachování pomocí vody. [15, 19]

1.6 Víceúčelové roztoky

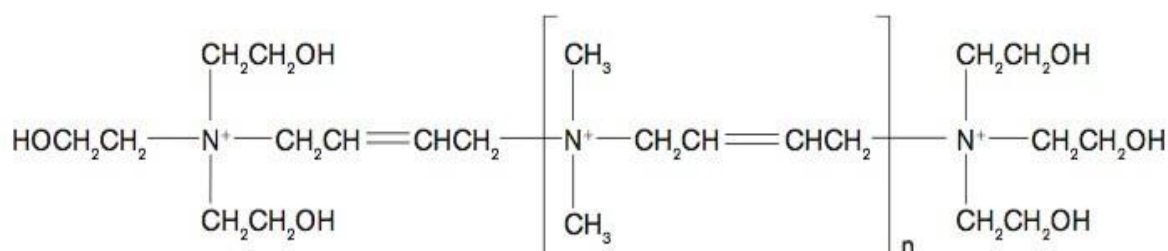
1.6.1 Chemické složení

Víceúčelové roztoky jsou jednou z možností každodenní dezinfekce kontaktních čoček. Roztoky musí být izotonické. Osmolarita roztoku by měla být stejná nebo vysoce podobná jako

je osmolarita slz, což je kolem 320 nmol/kg. Uvedená koncentrace odpovídá 0,9% roztoku NaCl. Roztoky musí splňovat podmínku acidobazické rovnováhy. pH roztoku by se mělo pohybovat mezi 6,6 – 7,8. Někteří nositelé kontaktních čoček mohou změny pH pocítit, proto se přidávají do roztoků pufrů. Jako pufrů se využívají fosfáty, boritany či citráty. Boritany se nejvíce užívají u roztoků založených na polyhexamidinu a citráty u roztoků založených na polyquaterniu. Viskozita je vnitřní tření kapaliny. Do roztoků se pro zvýšení viskozity přidávají viskozitní látky, zejména methylcelulosa. Pomocí methylcelulosity se udrží roztok na kontaktní čočce delší dobu, čímž se prodlužuje komfort. [15, 17, 21, 22]

1.6.2 Konzervační vlastnosti a antibakteriální účinnost

Roztok musí být dostatečně antimikrobiálně účinný, ale zároveň minimálně toxický vůči tkáním oka. Jako konzervační látka se dříve používal chlorhexidin, který však mnohdy vyvolával alergické reakce. Také docházelo k jeho elektrostatické absorpci na hydrofilní materiál. Chlorhexidin je schopen ničit buněčné stěny a následně buněčné membrány mikroorganismů. Další konzervační látkou, která se již v současnosti nevyužívá je thiomersal. Jedná se o sloučeninu obsahující rtuť, která je méně antimikrobiálně účinná než chlorhexidin. Thiomersal je nízkomolekulární sloučenina, tudíž docházelo k absorpci molekuly kontaktní čočkou a následné interakci s oční tkání způsobující pálení oka. V současné době se nejvíce využívá polyhexanid, který je účinný proti širokému spektru bakterií. Jedná se o vysokomolekulární látku, která neproniká skrz kontaktní čočku a zajišťuje dostatečnou antibakteriální účinnost. Polyhexanid se naváže na negativně nabitě fosfolipidy mikrobiální plazmatické membrány, kterou následně naruší a dojde k buněčné lýze. Další dnes využívanou látkou je polyquaternium – 1. Zmíněná vysokomolekulární látka se používá často v kombinaci s MAPD a citrátovými pufrů. Uvedené pufrů se přidávají pro snížení přilnavosti konzervační látky k povrchům ionogenních kontaktních čoček. Polyquad je velká molekula, která neproniká skrz kontaktní čočku a nepůsobuje tak žádné reakce s okolní tkání. [15, 23]



Obrázek 14 Chemická struktura polyquad [36].

1.6.3 Chelatáty, surfaktanty a zvlhčovačla

Chelatáty jsou látky zamezující vzniku proteinových depozit. Uvedené látky na sebe navážou ionty kovů, zejména vápenaté ionty, které mohou vytvářet krusty. Nejběžnější chelatáty jsou hydranát, citrát nebo EDTA.

Surfaktanty jsou čisticí látky s dlouhými řetězci. Snižují povrchové napětí, čímž usnadňují omyvatelnost jednotlivých složek. Pomocí surfaktantů dochází také k usnadnění rozetření kapaliny po povrchu kontaktní čočky, k čemuž dochází na základě otáčení hydrofobního konce k lipidové nečistotě a hydrofilního konce k vodnému prostředí. Následně vznikají micely. Surfaktanty zvyšují povrchovou smáčivost silikonhydrogelových čoček. Surfaktantem s neionickým charakterem je poloxamer či tyloxapol.

Zvlhčovačla jsou látky, které udržují tekutinu déle na kontaktní čočce, čímž napomáhají udržet kontaktní čočku na oku. Mezi zvlhčovačla patří PVA, PVP, kyselina hyaluronová, hydroxypropylmethylcelulosa, glykol a sorbitol. [15, 24, 25]

Tabulka 4 Vybrané multifunkční roztoky a jejich složení. [15]

SPOLEČNOST	PRODUKT	KOZERVAČNÍ LÁTKA	SURFAKTANT
Abatron	Quatro	Polyhexanid	Lubricare
Alcon	Opti-Free express	Polyquad + MAPD	Poloxamer
Alcon	Opti-Free replenish	Polyquad + MAPD	Poloxamer + nonanoyl EDTA
Bausch & Lomb	ReNu	Polyhexanid	Polyxamer
Bausch & Lomb	ReNu MultiPlus	Polyhexanid	Poloxamer
CIBA vision	Solocare soft	Polyhexanid	Poloxamer a TrikLens
Sauflon	All-in-One	Polyhexanid	Poloxamer
Sauflon	Synergi	Oxipol	Poloxamer

2 Cíle práce

Cílem práce je zjistit antimikrobiální účinnost vybraných víceúčelových roztoků určených k péči o kontaktní čočky. Experiment navazuje na bakalářskou práci „Víceúčelové roztoky k péči o kontaktní čočky jako rizikový faktor bakteriální keratitidy“ z roku 2014, jejíž autorkou je Bc. Eva Dragounová [42]. Bakalářská práce Bc. Evy Dragounové zkoumala pouze antibakteriální účinnost správně a nesprávně skladovaných multifunkčních roztoků. Z experimentu uvedené práce vyplývá, že způsob skladování nemá vliv na antibakteriální účinnost vybraných multifunkčních roztoků k péči o kontaktní čočky. Má práce je rozšířena o faktor expirace a doby jeho použitelnosti od prvního dne otevření vzorku. Dalším rozdílem, je provedení testování pomocí několika variant diskového difuzního testu (dále jen DDT), a to pomocí výseče z filtračního papíru, sterilní gázy a jamkového nanášení. Je použita také diluční metoda a modifikovaná metoda dle Českého lékopisu. Následně je provedeno porovnání výsledků zmíněných metod. Experiment se uskutečnil v mikrobiologické laboratoři katedry přírodovědných oborů FBMI ČVUT, která umožňuje testování pomocí grampozitivních bakterií *Bacillus subtilis* a *Micrococcus luteus*.

Teoretickým předpokladem diskového difuzního testu je vznik inhibiční zóny charakterizující antibakteriální účinnost. V případě diluční metody je předpokládaným výsledkem vyhodnocená ABÚ kolem 99%. V případě testování dle lékopisu by nemělo dojít k nárůstu bakteriální kultury díky antibakteriálnímu působení testovaného roztoku.

3 Metody

3.1 Zkouška na antibakteriální účinnost diskovým difuzním testem (DDT)

Diskový difuzní test kvalitativně hodnotí citlivost bakterií vůči antibiotikům. V případě tohoto experimentu došlo k modifikaci a nahrazení antibiotik vzorky víceúčelových roztoků, které budou popsány v následující kapitole. [38]

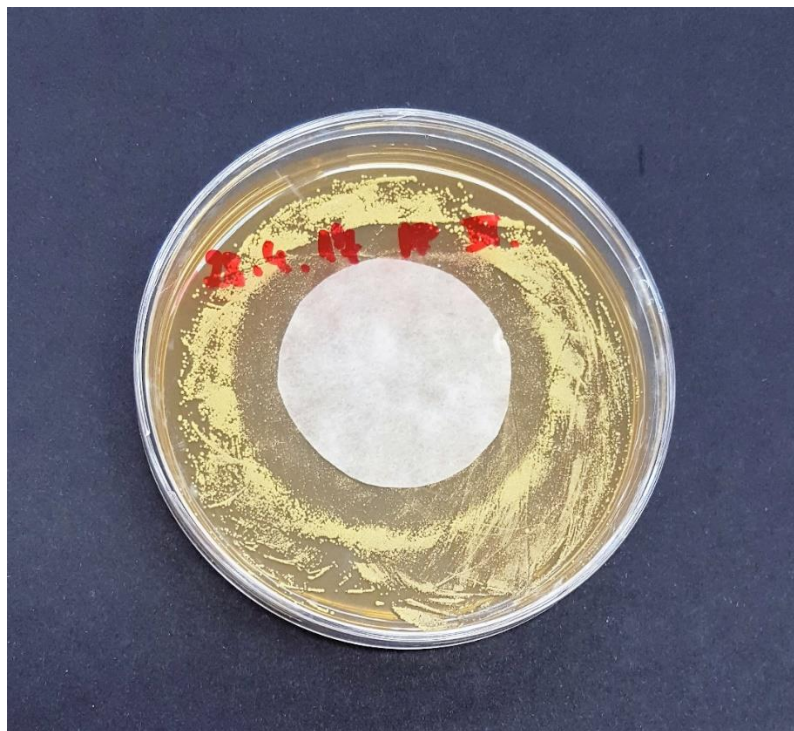
Byla provedena na vlastně připravených kultivačních médiích kultivace bakterie *Micrococcus luteus*. Nejprve bylo třeba vytvořit kultivační médium LB a MPA. Pro LB médium bylo do Erlenmayerovy baňky (objem 500 ml) naváženo 2,5 g Trypton (zn. Carl Roth; p.a.); 1,25 g Hefeextraktu (zn. Carl Roth; p.a.); 1,25 g NaCl (zn. Lachner; R:- S:-) a 5 g agaru. Navážené chemikálie byly zality 250 ml destilované vody. Pro MPA médium bylo do

Erlenmayerovy baňky (objem 500 ml) naváženo 2,5 g masového extraktu; 1,25 g peptonu (zn. Carl Roth; p.a.); 1,25 g NaCl (zn. Lachner; R:- S:-) a 5 g agaru. Erlenmayerovy baňky se uzavřely alobalem a byly vysterilizovány.

Následně se ve sterilním laminárním boxu (LABOX MB120; Vitrum; třída II EN 12 469 : 2000) provede příprava pevných agarových půd. Po úspěšné přípravě kultivačního média se nabere vzorek bakterie *Micrococcus luteus* a nanese se na médium. Okraje Petriho misek se zalepí parafilmem (Parafilm M, Bemis), aby nedošlo narušení kultivace a následně se misky vloží do inkubátoru (Incucell; Brněnská medicínská technika). Po několika dnech je viditelný nárůst bakterií (viz. Obr. 13). Dále bylo provedeno naočkování bakterie *Bacillus subtilis* a *Micrococcus luteus* do tekutého média.

Na LB médium bylo naneseo a následně rozhojekováno 100 µl bakteriální suspenze. Na takto zaočkované médium byla umístěna výseč z filtračního papíru, která byla ponořena do vzorku multifunkčního roztoku. Stejný postup byl proveden u experimentu se sterilní gázou. Další variantou DDT je vyhloubení jamek do pevného naočkovaného agaru, do kterých byl následně napipetován 1 µl vzorku víceúčelového roztoku.

Poté byly Petriho misky uloženy do inkubátoru na 48 hodin při teplotě 30 °C. Po uplynutí 48 hodin dochází k nárůstu mikrobiální kultury. Jestliže zkoušený vzorek multifunkčního roztoku má antibakteriální účinnost, bakterie na filtračním disku či sterilní gáze nenarostou. Dochází k vytvoření tzv. haló efektu, při kterém vznikají inhibiční zóny. V inhibičních zónách došlo k rozšíření antibakteriálního účinku přípravku, který zabránil růstu bakterií. Pro vyhodnocení je třeba změřit průměr inhibičních zón pravítkem ve dvou na sebe kolmých směrech. Dle literatury [54] je vytvořena tabulka č. 6, kterou můžeme modifikovat a použít pro tento pokus. Je – li průměr větší než stanovená hranice, mikroorganismus je vůči roztoku citlivý. Velikost zón ovlivňuje koncentrace testované látky, složení kultivační půdy, vlhkost půdy, tloušťka kultivační půdy, pH půdy, doba inkubace a stabilita látky. [38, 40]



Obrázek 15 Test s filtračním papírem se vzorkem č. 3.

Tabulka 5 Interpretace inhibičních zón. [54]

Antimikrobiální látka	Obsah na disku	Průměr inhibiční zóny (mm)		
		Rezistentní	Střední	Citlivý
Bacitracin	10 jednotek	<8	9-12	>13
Penicilin G, <i>Staphylococcus</i>	10 jednotek	<28	-	>29
Penicilin G, ostatní bakterie	10 jednotek	<14	-	>15
Kanamycin	30 mcg	<13	14-17	>18

3.2 Zkouška na antibakteriální účinnost diluční metodou

Nejprve došlo k vytvoření médií a bakteriální suspenze stejným způsobem jako v předchozí kapitole. Následně byla provedena příprava vzorků napipetováním 4 ml automatickou jednonálovou pipetou (Research, Eppendorf) do nádob. Vzorky byly smíchány s 0,5 ml bakteriální suspenze. Dle tzv. desítkového ředění bylo odebráno 0,1 ml ze vzorku smíchaného s bakteriální suspenzí a napipetováno do 9,9 ml fyziologického roztoku (0,9 % roztok chloridu sodného). Pro výsledné zředění 10^{-6} , byl tento postup ještě dvakrát zopakován.

Ze zředěného vzorku bylo odebráno 0,1 ml a následně napipetováno na tuhé médium MPA a LB. Pomocí bakteriologické hokejky došlo k důkladnému rozetření zředěného vzorku na daných médiích. Pro větší přesnost byly použity tři Petriho misky. Jako kontrolní vzorek sloužila narostlá bakteriální kultura doplněná na stejný objem fyziologickým roztokem. Celý uvedený proces zaočkování musí být prováděn ve sterilním laminárním boxu. Všechny naočkované Petriho misky byly zalepeny parafilmem a uloženy do inkubátoru při teplotě 30 °C.

Poté bylo provedeno vyhodnocení nárůstu jednotlivých bakteriálních kolonií na Petriho miskách. Na základě nárůstu byla stanovena antibakteriální účinnost testovaného vzorku. Antibakteriální účinnost jednotlivých vzorků byla stanovena dle vzorce

$$ABÚ (\%) = \frac{P_{REF} - P_{EXP}}{P_{EXP}} \cdot 100 ,$$

kde P_{REF} značí počet bakterií v referenční skupině a P_{EXP} počet bakterií v experimentální skupině. [38]

3.3 Zkouška na sterilitu dle Českého lékopisu

„Zkouška na sterilitu se provádí za aseptických podmínek, např. použitím laminárního boxu o třídě čistoty A umístěného v místnosti vyhovující třídě čistoty B, nebo v izolátoru. Opatření přijatá proti kontaminaci nepůsobí na mikroorganismy, které se mají při zkoušce zjistit. Pracovní podmínky, v nichž je zkouška prováděna, se pravidelně monitorují vhodným vzorkováním pracovního prostředí a provádějí se vhodné kontroly, jak jsou popsány v příslušných směrnících Evropského společenství a v navazujících Notes for guidance on GMP [Český lékopis 1997].“

Pro zkoušku sterility byla shledána vhodnou půda thioglykolanová a půda z hydrolyzátů sóji a kaseinu. Thioglykolanová půda je určena pro kultivaci anaerobních mikroorganismů, ale umožňuje zjistit také aerobní mikroorganismy. Půda z hydrolyzátu sóji a kaseinu je určena v první řadě pro kultivaci aerobních bakterií, ale je možné ji použít také pro kultivaci hub.

Po převedení obsahu zkoušené nádoby do živné půdy bylo třeba naočkovat malé množství živých mikroorganismů (doporučeno 20 až 100 jednotek vytvářejících kolonie). Následně byla

provedena pozitivní kontrola pomocí růstové zkoušky. V případě půdy z hydrolyzátů sóji a kaseinu je doporučena maximální doba inkubace pro *Bacillus subtilis* 5 dní při teplotě $22,5 \pm 2,5$ °C.

Jestliže dojde k viditelnému růstu, který je možno srovnat s růstem v kontrolních nádobách bez zkoušeného přípravku, potom přípravek nemá v podmínkách zkoušky žádný antimikrobiální účinek. Zkouška na sterilitu se pak může provést bez dalších modifikací. V případě, že nedojde v přítomnosti zkoušeného přípravku k časnému růstu, vizuálně srovnatelného s růstem v kontrolních nádobách bez zkoušeného přípravku, přípravek má antibakteriální účinky, které nebyly v průběhu zkoušky uspokojivě vyloučeny. Podmínky zkoušky se upraví tak, aby byl protimikrobní účinek odstraněn a zkouška se opakuje.

Do živné půdy se naočkovalo 10 % zkoušeného přípravku. Poté se naočkované půdy inkubovaly. Na závěr inkubace se vizuálně zjistil případný růst organismů. Pokud by došlo ke zkalení živné půdy působením přípravku, tak nelze určit přítomnost nebo absenci mikrobiálního růstu vizuálně, ale přenesla by se vhodná část živné půdy do nové nádoby se stejnou živnou půdou a pokračovalo by se v inkubaci. Jestliže nebyl pozorován žádný růst, je zkoušený přípravek považován za sterilní. V opačném případě přípravek nevyhovuje zkoušce na sterilitu. [39]

3.3.1 Půda z hydrolyzátů sóji a kaseinu

Tabulka 6 Složení půdy z hydrolyzátů sóji a kaseinu při pH po sterilizaci $7,3 \pm 0,2$ [39].

LÁTKA	MNOŽSTVÍ
pankreatický hydrolyzát kaseinu	17,0 g
papainový hydrolyzát sóji	3,0 g
chlorid sodný	5,0 g
hydrogen fosforečnan draselný	2,5 g
glukosa monohydrát	2,5 g
voda R	1000 ml

Pevné látky se za mírného zahřátí rozpustí ve vodě a roztok se ochladí na pokojovou teplotu. V případě potřeby se přidá hydroxid sodný (1 mol/l RS) tak, aby měl roztok po sterilizaci pH $7,3 \pm 0,2$. Rozplní se do vhodných nádob a sterilizuje se validovaným postupem.

Uchovává se při teplotě mezi 2 °C až 25 °C ve sterilních, utěsněných nádobách, pokud není určena pro okamžité použití.

4 Experimentální část

4.1 Materiály

4.1.1 Použité bakteriální kultury

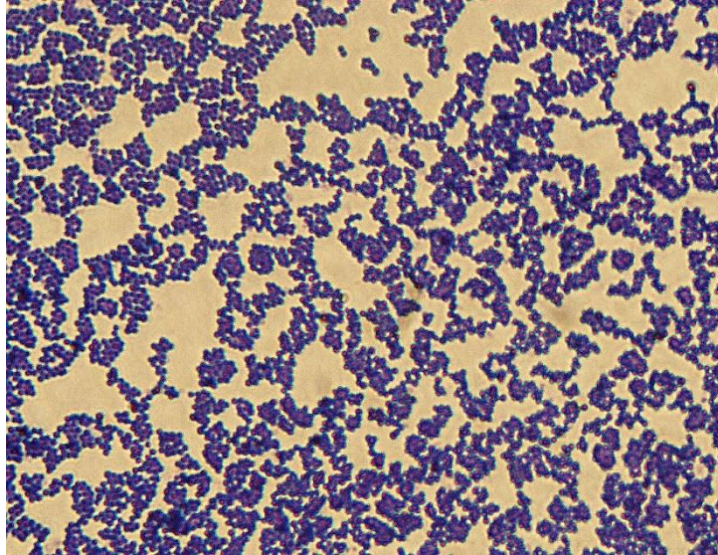
Micrococcus luteus je grampozitivní koka tvořící nejčastěji tetrády nebo pakety. Vzhledem k produkci pigmentu vytvářejí na běžných půdách žlutavé kolonie. Obvykle se vyskytují na kůži, v půdě, v potravinách, ve vodě, v prachu. Mikrokoky nebývají patogenní. Výjimku tvoří lidé s oslabenou imunitou, u kterých mohou způsobit endokarditidy, mozkové abscesy nebo septickou artritidu. K léčbě se využívá vankomycin, penicilin či rifampicin.



Obrázek 16 *Micrococcus luteus* na agarové půdě v Petriho misce.

Pro získání následující fotografie (obr. č. 18) bylo provedeno grammovo barvení. Došlo k nanesení bakterie *Micrococcus luteus* do kapky destilované vody na podložním sklíčku, které bylo třikrát fixováno protažením preparátů s bakteriální kulturou nad kahanem. Poté byla na sklíčko nalita krystalová violet, která působila 1 minutu. Po uplynutí času bylo sklíčko zalito Lugolovým roztokem, po další minutě ethanolem, který působil opět 1 minutu. Nakonec byl

použit safranin a po vyschnutí bylo možno mikroskopicky (100x s imerzním olejem) pozorovat bakterie *Micrococcus luteus*. [47]

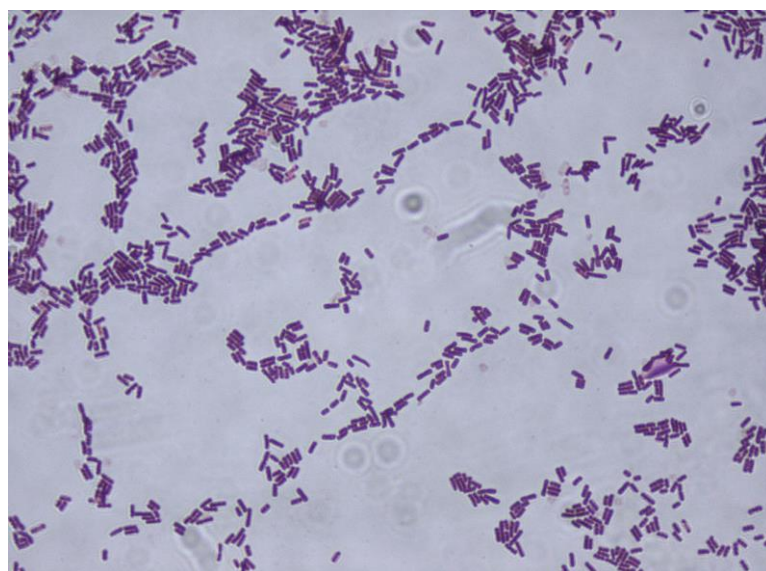


Obrázek 17 *Micrococcus luteus* mikroskopicky.

Bacillus subtilis patří mezi grampozitivní sporulující aerobní tyčinky. Bakterie rodu *Bacillus* vykazují schopnost vytvořit jednu endosporu a to za přítomnosti kyslíku, který je nutný pro získání energie. *Bacillus subtilis* je bakterie ze skupiny s nízkými nutričními nároky a sporami ve tvaru elipsy. Průměr uvedené bakterie je menší než 1 μm . Ve farmaceutickém průmyslu se *B. subtilis* používá jako producent antibiotik polypeptidové povahy. Patogenita je obligátní, některé kmeny mohou vyvolat enterotoxikózy, záněty plic či způsobit ulcerace. Účinnou léčbou jsou penicilinová antibiotika. [9]



Obrázek 18 *Bacillus subtilis* na agarové půdě. [44]



Obrázek 19 *Bacillus subtilis* mikroskopicky. [45]

4.1.2 Multifunkční roztoky k péči o kontaktní čočky

Pro experiment jsem vybrala několik vzorků víceúčelových roztoků.

Oté fine – Oté pharma

Prvním vzorkem je víceúčelový roztok pro tvrdé plynopropustné kontaktní čočky (RGP) Oté fine firmy Oté pharma. Vzorek byl otevřený na začátku pokusu, tedy před 23 dny. Datum expirace byl v dubnu 2013. Uvedený roztok dle výrobce čistí, dezinfikuje a uchovává RGP čočky v případě jejich uložení do roztoku minimálně na 4 hodiny. Roztok přestává být účinný po 90 dnech od otevření.

Složení: polysorbát 80, hypromelóza, polyhexanid (0,0002 %) [53]

Clean Active - Barnaux

Vzorek č. 2 je Clean Active od nizozemské firmy Barnaux. Vzorek prochází v březnu 2018. Otevřen byl čerstvě na začátku pokusu (23 dní). Vzorek č. 6 je stejný roztok, který byl otevřen 283 dní a exspiroval v dubnu 2017.

Roztok je vhodný pro všechny typy kontaktních čoček. Výrobce uvádí, že čočky mohou být uloženy v roztoku po 7 dní bez jeho výměny, minimální doba je 6 hodin. Doporučené spotřebení roztoku je 90 dnů od otevření.

Složení: chlorid sodný, kyselina boritá, tetraboritan sodný, citrát sodný, poloxamer 407, kyselina hyaluronová, edetát disodný (EDTA – 0,02%), polyhexamethylen biguanid (0,0001 %), destilovaná voda

OPTI-FREE PureMoist – Alcon

Vzorek č. 3 je OPTI-FREE Pure Moist od firmy Alcon s datem expirace 2019. Uvedený roztok byl používán po 90 dní. Doporučená doba dezinfekce je minimálně 6 hodin. Maximální doba uložení kontaktních čoček do pouzdra se zmíněným roztokem je 30 dní. Doba použitelnosti od otevření je 6 měsíců.

Složení: citrát sodný, chlorid sodný, kyselina boritá, sorbitol, aminomethylpropanol, edetan disodný, TETRONIC 1304 (zvlhčovač), HydraGlyde zvlhčující složka

(polyoxyetylen – polyoxybutylen), polyquaternium – 1 (0,001 %), myristamidopropyl dimethylamin (0,0006 %) [48]

Options Multi – Cooper Vision

Vzorkem č. 4 je roztok Options Multi (Cooper Vision), který byl otevřen v lednu 2017. Expirace tohoto vzorku je stanovena na září 2019. Po 90 dnech užívání roztoku se snižuje jeho účinnost.

Složení: chlorid sodný, kyselina ethylendiamintetraoctová, hydrogenfosforečnan disodný, polyhexanid biguanid (0,0001 %), coopase I a II [49]

Synergi MULTIPURPOSE SOLUTION – Cooper Vision

Dalším vzorkem (č.5) je roztok Synergi MULTIPURPOSE SOLUTION od firmy Cooper Vision používaný 205 dní. Datum expirace vzorku je stanoven na říjen 2018. Výrobce doporučuje dezinfekci kontaktních čoček minimálně 6 hodin, maximálně 7 dní. Doba použitelnosti od otevření je 90 dní.

Složení: oxipol (0,1%), hydroxypropylmethylceluloza, chlorid sodný, fosforečnan sodný [50]

BioTrue – Bausch & Lomb

Vzorek č. 7 je roztok BioTrue od firmy Bausch & Lomb s expirací v červenci roku 2016. Vzorek byl otevřen v květnu roku 2016. Roztoky BioTrue byly použity dále ve vzorku č. 9, který exspiroval v červenci roku 2015 a otevřen byl po 2 roky. Vzorek č. 10 s datem expirace v prosinci roku 2015 byl otevřen 3 roky.

Uvedené roztoky čistí, odstraňují proteiny, dezinfikují, oplachují a uchovávají kontaktní čočky. Kontaktní čočky bychom měli ponechat v roztoku nejméně 4 hodiny. Po otevření roztoku je doporučeno spotřebovat do 90 dnů. [51]

Složení: hyaluronan, sulfobetain, poloxamin, kyselina boritá, boritan sodný, edetát disodný, chlorid sodný, polyaminopropyl biguanid (0,00013 %), polyquaternium (0,0001 %)

Max OptiFresh – Maxvue Vision

Další vzorek (č. 8) je roztok Max OptiFresh (firma Maxvue vision), otevřený v říjnu 2015 s datem expirace 5/2018. Do roztoku se kontaktní čočky ukládají minimálně na 6 hodin. Roztok přestává být účinný po 90 dnech od otevření.

Složení: chlorid sodný, chlorid draselný, EDTA, polyhexanid (0,0001 %), hypromelóza (1,5 mg/ml), fosfátový pufr [52]



Obrázek 20 Multifunkční roztoky použité k experimentu

5 Výsledky

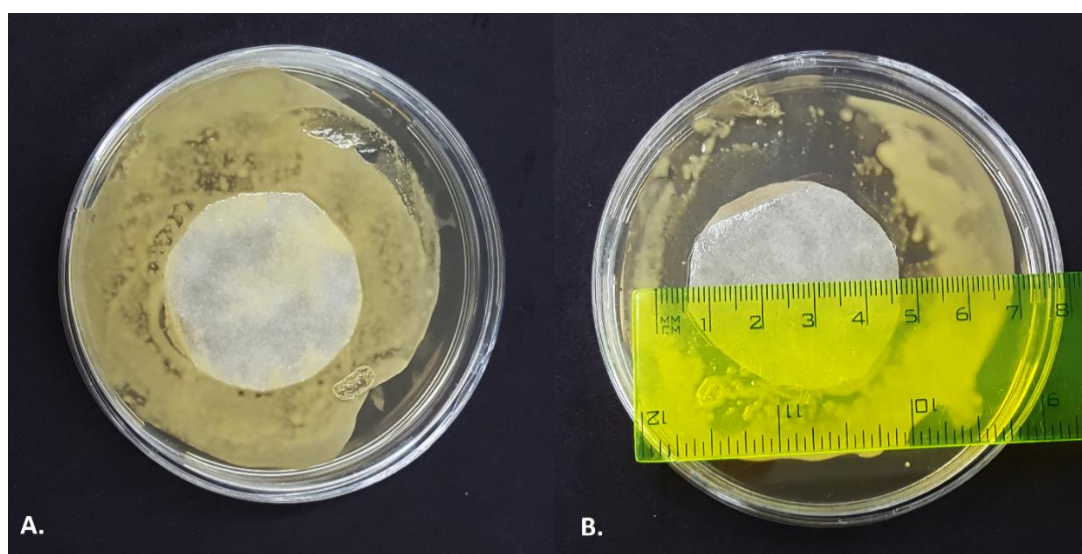
5.1 Experiment na antibakteriální účinnost na principu diskového difuzního testu

5.1.1 Výseč z filtračního papíru

Test byl proveden s bakteriální kulturou *Micrococcus luteus* na následujících vzorcích multifunkčních roztoků.

Tabulka 7 Výsledky testu DDT s filtračním papírem

Číslo vzorku	Počet dní od otevření	Doba expirace	Průměr inhibiční zóny 1 (mm)	Průměr inhibiční zóny 2 (mm)
1.	23	2013 – 04	5,0	5,8
2.	23	2018 – 03	5,0	1,5
3.	90	2019 – 07	5,0	3,8
4.	132	2019 – 09	3,5	1,2
7.	374	2016 – 07	1,3	1,0
8.	580	2018 – 05	0	0
9.	730	2015 – 07	1,5	1,0
10.	1095	2015 – 12	0,5	0



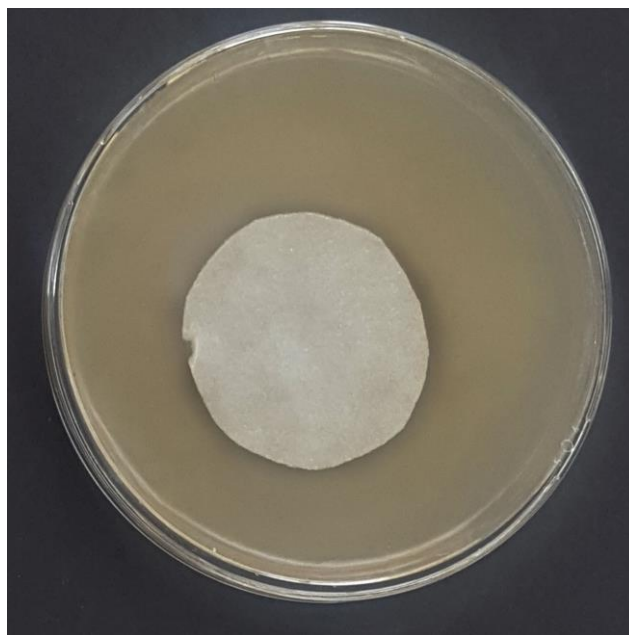
Obrázek 21 Porovnání inhibičních zón; A. vzorek č. 4, B. vzorek č. 1

Dle naměřených inhibičních zón se dají považovat vzorky č. 1, 2, 4 za středně rezistentní a vzorky č. 7, 8, 9, 10 za rezistentní. Citlivost byla určena modifikací tabulky č. 6.

Pokus byl proveden také pomocí bakterie *Bacillus subtilis*. Byly vybrány následující vzorky multifunkčních roztoků.

Tabulka 8 Výsledky DDT pomocí výseče z filtračního papíru pomocí *Bacillus subtilis*.

Číslo vzorku	Počet dní od otevření	Doba expirace	Průměr inhibiční zóny (mm)	Průměr inhibiční zóny (mm)
3.	90	2019 – 07	0	0
5.	205	2018 – 10	0	0
6.	283	2017 – 04	0	0
9.	730	2015 – 07	0	0
10.	1095	2015 – 12	3,0	1,2



Obrázek 22 Slabě vytvořené inhibiční zóny na vzorku č. 10

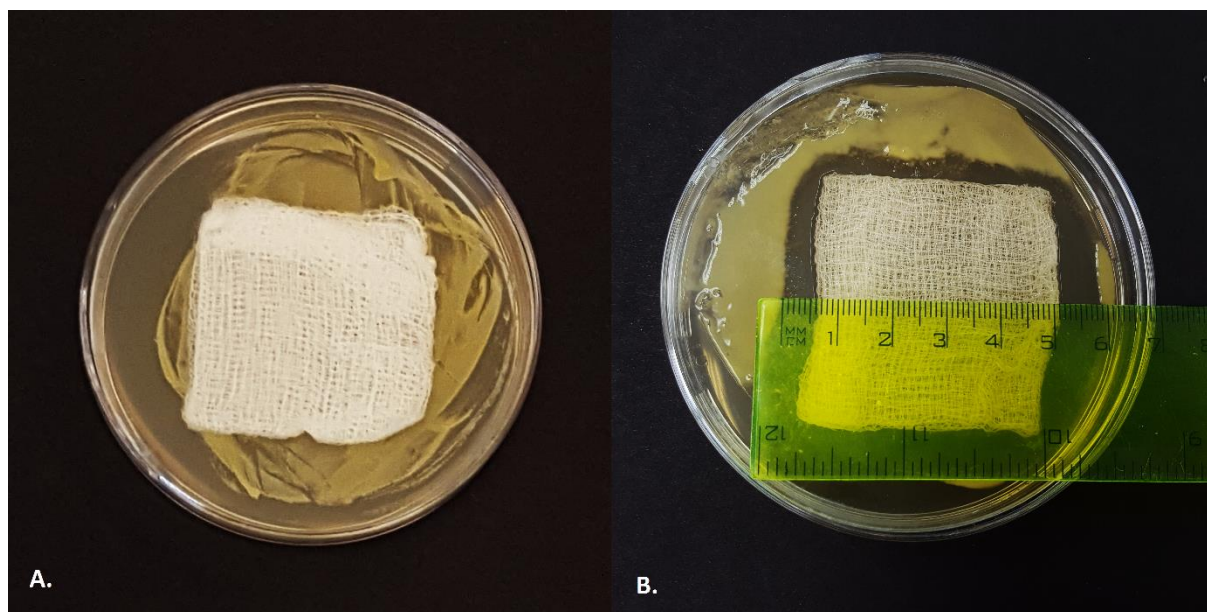
Jediný vzorek, který vytvořil inhibiční zóny byl vzorek č. 10. Bakterii *Bacillus subtilis* lze považovat za středně rezistentní vůči konzervačním látkám daného roztoku (BioTrue – vzorek č. 10).

5.1.2 Sterilní gáza

Test probíhal za stejných podmínek jako test pomocí výseče z filtračního papíru.

Tabulka 9 Výsledku testu DDT se sterilní gázou a bakterií *Micrococcus luteus*.

Číslo vzorku	Počet dní od otevření	Doba expirace	Průměr inhibiční zóny (mm)	Průměr inhibiční zóny (mm)
1.	23	2013 – 04	7,9	7,35
2.	23	2018 – 03	7,5	6,1
4.	132	2019 – 09	5,8	3,3
7.	374	2016 – 07	3	1,6
8.	580	2018 – 05	1,5	0,5
9.	730	2015 – 07	5,15	4,1
10.	1095	2015 – 12	4	3,35



Obrázek 23 Porovnání inhibičních zón; A. vzorek č. 8, B. vzorek č. 4

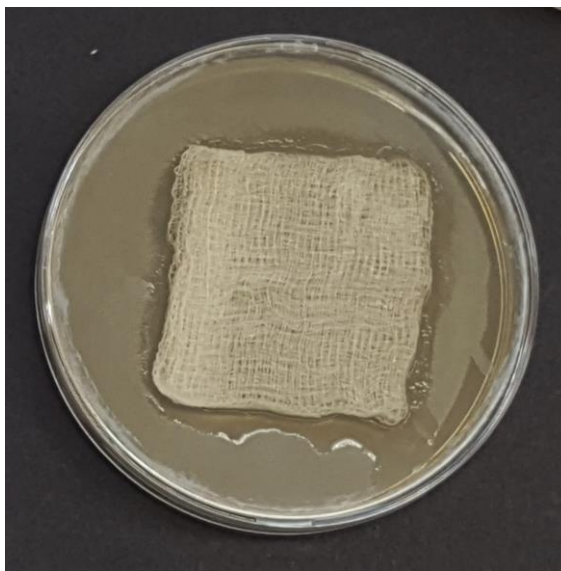
Dle naměřených inhibičních zón se dají považovat vzorky č. 1, 2, 4 za citlivé, vzorky č. 7, 9, 10 za středně rezistentní a vzorek č. 8 za rezistentní antibakteriálnímu účinku. DDT experiment se sterilní gázou byl u každého vzorku třikrát zopakován. Výsledky byly následně zprůměrovány. Během jednotlivých měření nedocházelo ke vzniku výrazných odchylek.

V druhém testu byla využita bakterie *Bacillus subtilis* na následujících vzorcích víceúčelových roztoků.

Tabulka 10 Výsledky testu DDT se sterilní gázou a bakterií *Bacillus subtilis*.

Číslo vzorku	Počet dní od otevření	Doba expirace	Průměr inhibiční zóny (mm)	Průměr inhibiční zóny (mm)
2.	23	2018 – 03	5,5	4,1
7.	374	2016 – 07	0	0
8.	580	2018 – 05	0	0
9.	730	2015 – 07	4,0	2,8
10.	1095	2015 – 12	5,0	4,4

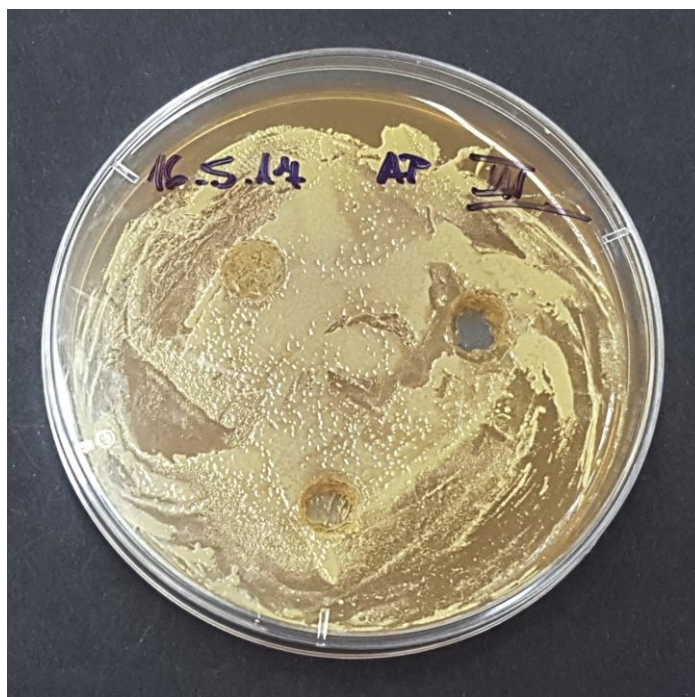
Na základě výsledků lze považovat vzorky č. 2, 9 a 10 za středně rezistentní a vzorky č. 7 a 8 za rezistentní. U vzorku č. 7 mohly být výsledky ovlivněny vypotřebením roztoku, a tím nedostatečná absorpce sterilní gázou.



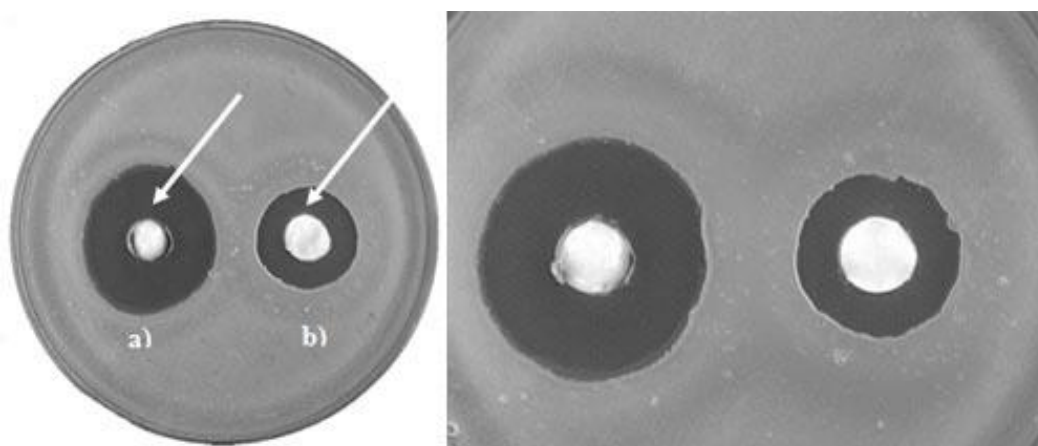
Obrázek 24 Inhibiční zóny u testu se sterilní gázou a bakterií *Bacillus subtilis*.

5.1.3 Jamkové nanášení

Test proběhl za stejných podmínek jako testy předchozí. Také byly použity stejné vzorky (vzorky č. 1 – 7), ale u žádného z nich nedošlo k vytvoření požadovaných inhibičních zón. Vyhloubené jamky byly prorostlé mikrobiální kulturou *Micrococcus luteus* a použité vzorky tak nevykazovaly žádné antibakteriální účinky. Uvedená metoda byla zhodnocena jako nevhodná pro účely experimentu.



Obrázek 25 Experiment na principu DDT pomocí jamkového nanášení; v místech s naneseným roztokem nejsou pozorovatelné inhibiční zóny



Obrázek 26 Inhibiční zóny vytvořené na Petriho misce s narostlou bakteriální kulturou [46].

5.2 Experiment na antibakteriální účinnost diluční metodou

Test byl proveden pomocí bakterie *Micrococcus luteus* se vzorky č. 1, 2, 4, 7, 8, 9 a 10. Na základě literatury [38] mělo dojít k nárůstu mikrobiálních kolonií. Ani jedna inokulovaná Petriho miska nevykazovala známky růstu bakterií. K nárůstu došlo v malém množství pouze na vzorku č. 2.

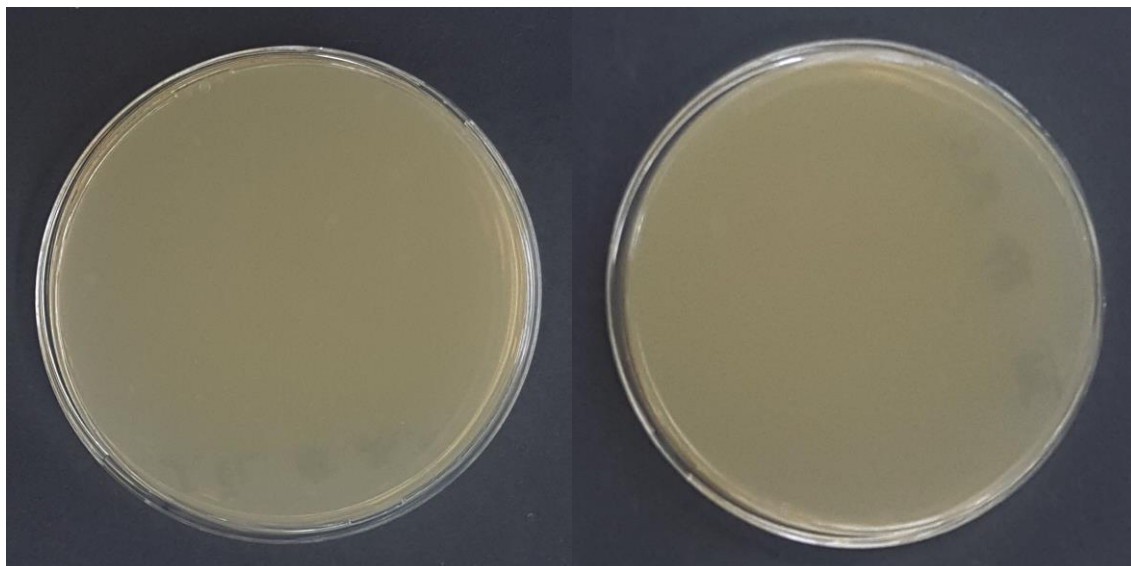


Obrázek 27 *Micrococcus luteus* na Petriho miskách diluční metodou.

Podruhé byl test opět proveden pomocí bakteriální kultury *Bacillus subtilis*. Doba působení bakterie byla 4 hodiny. Otestovány byly následující vzorky roztoků.

Tabulka 11 Výsledky experimentu diluční metodou s bakterií *Bacillus subtilis*.

Číslo vzorku	Počet dní od otevření	Doba expirace	Počet CFU	ABÚ
2.	23	2018 – 03	0	100 %
3.	90	2019-07	0	100 %
6.	283	2017-04	0	100 %
9.	730	2015 – 07	0	100 %
10.	1095	2015 – 12	0	100 %
P _{REF}	-	-	134	



Obrázek 28 Petriho misky se vzorky č. 6 a 3; $ABÚ = 100 \%$

Vzhledem k tomu, že na žádné Petriho misce nedošlo k nárůstu bakterií, lze všechny považovat za 100% antibakteriálně účinné. Na kontrolních miskách (P_{REF}) bylo napočítáno 134 CFU. Výsledná $ABÚ$ byla vypočítána pomocí následujícího vzorce

$$ABÚ (\%) = \frac{P_{REF} - P_{EXP}}{P_{EXP}} \cdot 100$$

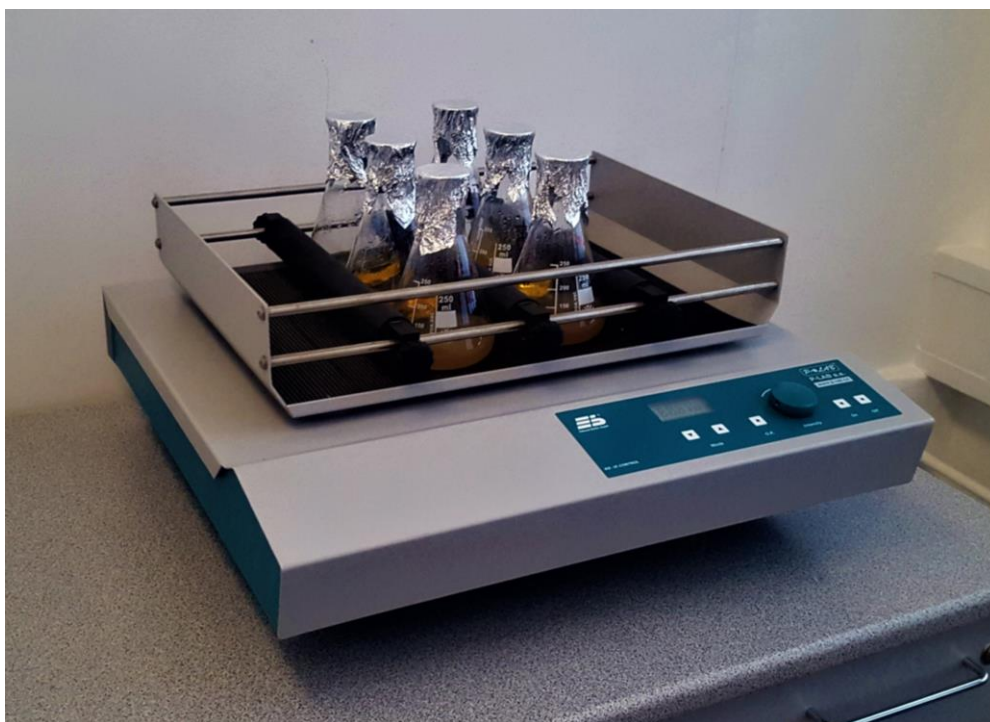
$$ABÚ (\%) = \frac{134 - 0}{0} \cdot 100 = 0 \rightarrow 100 \%$$

5.3 Experiment podle Českého lékopisu

Test byl proveden pomocí bakterie *Bacillus subtilis*. Doba inkubace byla stanovena na 60 hodin. K testu byly využity následující multifunkční roztoky.

Tabulka 12 Výsledky experimentu podle Českého lékopisu.

Číslo vzorku	Počet dní od otevření	Doba expirace	ABÚ
3.	90	2019-07	ANO
6.	283	2017-04	NE



Obrázek 29 Inokulované Erlenmayerovy baňky při experimentu dle Českého lékopisu.

V případě vzorku č. 6 lze pozorovat v Erlenmayerově baňce zkalení, které značí přítomnost bakterií. Vzorek č. 3 byl po celou dobu pokusu zachován čirý, z čehož vyplývá, že vzorek má antibakteriální účinky.

6 Diskuse

Cílem experimentální části bylo otestovat antibakteriální účinnost víceúčelových roztoků k péči o kontaktní čočky. Byla zvolena metoda diskového difuzního testu, diluční metoda a metoda dle Českého lékopisu.

Experiment na antibakteriální účinnost na principu diskového difuzního testu a jeho modifikace byla provedena dle výzkumu *Synthesis of ZnO nanoparticles using PS-b-PAA reverse micelle cores for UV protective, self-cleaning and antibacterial textile applications* [41]. Výsledky experimentu Bc. Evy Dragounové [42], která taktéž testovala antibakteriální účinky multifunkčních roztoků metodou DDT, byly neprůkazné. U žádného testovaného vzorku nevznikla inhibiční zóna. V porovnání s výsledky mého experimentu uvedenou metodou s použitím bakterie *Micrococcus luteus* došlo k vytvoření inhibičních zón ve většině případů (viz Tab. 7 a 8). Výsledky mohlo ovlivnit hned několik faktorů. U diskového difuzního testu s výsečí z filtračního papíru docházelo zejména k rychlému vysychání a odpařování roztoku, což lze považovat za jednu z hlavních příčin rozdílných výsledků při porovnání s testem se sterilní gázou. Roztok z filtračního papíru vyschl do několika hodin od absorpce. Sterilní gázy při diskovém difuzním testu zůstaly navlhčené i po 48 hodinách a antibakteriální účinnost roztoku působila delší dobu. Roztok difundoval do okolí, jak se předpokládalo a vznikly měřitelné inhibiční zóny. Obecně nejlepších výsledků dle DDT dosahovaly vzorky, které byly poprvé použity na začátku pokusu (roztoky byly otevřeny před 23 dny) a opět uzavřeny bez ohledu na datum expirace roztoku. Inhibiční zóny u vzorků č. 1 a 2 měřily 7,9 mm. Dle hypotéz se očekávalo nejhorších výsledků u vzorku č. 10, který byl otevřen nejdelší dobu a navíc exspirovaný. Inhibiční zóny vzorku č. 10 ovšem dosahovaly dokonce 4 mm. Nejhorší výsledky v obou variantách testu měl roztok MaxVue Optifresh (vzorek č. 8), který byl otevřený 580 dní a nebyl exspirovaný. Jeho inhibiční zóny měřily pouze 1,5 mm. Zkreslení výsledku způsobilo zřejmě rychlejší odpaření roztoku, narušení sterility či velký objem naočkované bakteriální suspenze. Dalším důvodem může být jiné složení roztoku. Vliv uskladnění můžeme vyloučit na základě výsledků práce Bc. Evy Dragounové [42]. Všechny vzorky vykazovaly alespoň minimální inhibiční zóny, tudíž vykazují antibakteriální účinky i přes překročení doby expirace i použitelnosti. Většina výrobců víceúčelových roztoků doporučuje používat daný roztok po dobu 90 dnů. Vzorek č. 4 byl používán 132 dní vytvořil inhibiční zóny 5,8 mm. Přestože byl ještě označen za citlivý (dle Tab. č. 6), je možné pozorovat zmenšení „haló efektu“. Dle mého experimentu na antibakteriální účinnost na principu diskového difuzního testu pomocí výseče z filtračního papíru či sterilní gázy a použitím bakterie

Micrococcus luteus lze vyvodit, že antibakteriální účinnost nezávisí na datu expirace víceúčelového roztoku. Naopak ovlivňujícím faktorem je počet dnů od otevření a následném uzavření roztoku. Čím kratší dobu byl roztok otevřen, tím větší antibakteriální účinky vykazoval.

Na základě problému s rychlým odpařením roztoku z výseče z filtračního papíru byla použita bakterie *Bacillus subtilis* z důvodu kratší generační doby než u bakterie *Micrococcus luteus*. I v tomto případě ale docházelo k přerůstání bakterie. Jediný vzorek č. 10 vytvořil inhibiční zóny, které měřily 3 mm. Důvodem přerůstání mohl být nekvalitní filtrační papír, nestejně množství roztoku absorbovaného filtračním papírem, vyšší rezistence bakterie *Bacillus subtilis* vůči konzervačním látkám daných vzorků či velký objem bakteriální suspenze nanášený na Petriho misku. Se stejnou bakteriální kulturou byl proveden také test se sterilní gázou. Největší inhibiční zóna byla naměřena opět u nově používaného roztoku Clean Active (vzorek č. 2). Inhibiční zóna uvedeného vzorku činila 5,5 mm, což lze považovat za středně rezistentní (dle Tab. č. 6). V porovnání s DDT pomocí bakterie *Micrococcus luteus* byly inhibiční zóny tohoto vzorku o 2,8 mm menší. Vzorek č. 10, který byl používán nejdelší dobu (1095 dní) a exspirovaný v prosinci 2015, vytvořil naopak o 1 mm větší zóny než v obdobném testu s bakterií *Micrococcus luteus*. Vzorek č. 10 byl také určen středně rezistentním. U vzorku č. 9 bylo zaznamenáno zmenšení zón o 2,3 mm. Vzorek č. 7 neměl naměřené žádné inhibiční zóny, což mohlo být způsobeno nedostatečným množstvím roztoku obsaženým ve sterilní gáze, dále vyrobenou šarží vzorku (bylo by vhodné dále testovat včetně chemického složení vzorku). Vzorek č. 8 vykazuje stejné výsledky jako v předchozích variantách experimentu na antibakteriální účinnost diskovým dilučním testem. Dle naší hypotézy měly být inhibiční zóny srovnatelné se stejným testem pomocí bakterie *Micrococcus luteus*. Bakterie *Bacillus subtilis*, má relativně krátkou generační dobu, a proto by při bakteriální kultivaci mělo dojít k odpaření malého množství zkoušeného vzorku z výseče filtračního papíru či sterilní gázy. Rozdílné výsledky mohly být způsobeny vyšší rezistencí bakterie *Bacillus subtilis* vůči použitým konzervačním látkám ve vzorcích a odlišnou absorpcí použitého filtračního papíru. Na základě výsledků experimentu na antibakteriální účinnost diskovým difuzním testem pomocí výseče z filtračního papíru či sterilní gázy a použitím bakterie *Bacillus subtilis*, nelze jednoznačně určit závislost antibakteriální účinnosti na datu expirace či na době používání daných roztoků.

Další variantou experimentu na antibakteriální účinnost na principu DDT bylo jamkové nanášení. Zmíněná metoda byla použita na základě experimentu v diplomové práci Mgr. Evy Rakovské [40], kde byly použity bakterie *Bacillus cereus* a *Micrococcus luteus* a byl pozorován

antibakteriální účinek extraktu ze stévie. Výsledkem bylo vytvoření inhibičních zón. V mém experimentu se tato metoda neukázala jako vhodná. Ve všech případech došlo k přerůstání mikrobiální kultury přes jamky naplněné multifunkčním roztokem. Důvodem mohla být rychlá absorpce roztoku pevným agarem a nebo naopak moc rychlé odpaření roztoku. U žádného ze vzorků nedošlo k vytvoření inhibiční zóny.

Diluční metoda byl další způsob, kterým byla experimentálně testována účinnost víceúčelových roztoků. Nejprve bylo využito bakterie *Micrococcus luteus*. Výsledky jsou v mém experimentu považovány za neprůkazné. V případě bakalářské práce [42] proběhlo testování diluční metodou dle předpokladů. Ovlivňujícím faktorem mohlo být narušení sterility během ředění či chyba v postupu. Vzhledem k výsledkům byla použita ještě bakterie *Bacillus subtilis*. V tomto případě proběhlo testování úspěšně. Na kontrolních vzorcích proběhl nárůst bakterií (viz. Tab č. 11). Všechny testované vzorky vykazovaly 100 % antibakteriální účinnost. Na základě výsledků experimentu na antibakteriální účinnost diluční metodou pomocí bakterie *Bacillus subtilis* lze považovat všechny testované vzorky za antibakteriálně účinné bez ohledu na datum expirace či dobu od otevření roztoku.

Poslední metoda, která byla použita pro zjištění antimikrobiální účinnosti byla metoda dle Českého lékopisu [39]. Vzhledem k náročnosti testu na objem tekutých médií a testovaných vzorků byly do pokusu zařazeny pouze dva vzorky. Vzorek č. 6 byl otevřen 283 dní. Datum expirace uvedeného vzorku byla v dubnu 2017. Inkubace vzorků trvala 60 hodin. V erlenmayerově baňce s bakteriální kulturou *Bacillus subtilis* a vzorkem č. 6 bylo po ukončení inkubace makroskopicky pozorovatelné bakteriální zkalení. Výsledkem metody dle Českého lékopisu [39] je, že vzorek č. 6 nemá antibakteriální účinky. Druhým testovaným roztokem byl PureMoist značky Alcon (vzorek č. 3), který byl otevřen po dobu 90 dnů. Datum expirace je stanoven na rok 2019. Výsledkem experimentu u vzorku č. 3 je potvrzení jeho antibakteriální účinnosti. Na základě metody dle Českého lékopisu v mé práci lze tvrdit, že u exspirovaných víceúčelových roztoků či roztoků používaných delší dobu než je doporučeno výrobcem, dochází ke snížení antibakteriální účinnosti.

V problematice antibakteriální účinnosti víceúčelových roztoků k péči o kontaktní čočky setrvává stále několik nevyřešených otázek. Bylo by vhodné zjistit, zda uplynutí doby expirace či doba používání mají vliv i na další vlastnosti roztoků, které by také mohly nepřímo souviset s patogenními stavy oka. Stejný experiment jako v mé práci by měl být proveden také s patogenními bakteriemi. Do experimentu by bylo vhodné zahrnout testování chemického složení roztoků.

Závěr

Bakteriální keratitida a konjunktivitida jsou rizikovými faktory, se kterými se můžeme často setkat u nositelů kontaktních čoček. V rámci projektu byly shrnuty současné informace o problematice infekcí oka. Samostatné kapitoly se věnují bakteriálním infekcím, které se mohou objevit u nositelů kontaktních čoček. Původcem bakteriální keratitidy u nositelů kontaktních čoček je nejčastěji *Pseudomonas aeruginosa*. Dodržování hygienických zásad v péči o kontaktní čočky vede ke snížení rizika vzniku bakteriálních infekcí, přesto mohou na kontaktních čočkách přežít některé patogenní bakterie. Průniku zbylým bakteriím mají zabránit antibakteriální látky obsažené v multifunkčních roztocích, nejčastěji polyhexanid či polyquad.

Cílem experimentální části bylo otestovat antibakteriální účinnost víceúčelových roztoků k péči o kontaktní čočky. Bylo využito metody na principu diskového difuzního testu, diluční metody a metody dle Českého lékopisu. Antibakteriální účinnost testovaných roztoků byla ovlivněna různým překročením data expirace a různou dobou od otevření (a následným uzavřením) roztoků. Diskový difuzní test byl prováděn pomocí výseče z filtračního papíru a sterilní gázy. Nejprve byla využita bakterie *Micrococcus luteus* a následně *Bacillus subtilis*. Na základě výsledků s bakterií *Micrococcus luteus*, lze stanovit závislost antibakteriální účinnosti na době používání roztoku. Čím déle byl daný roztok používán, tím horších výsledků ve zmíněném testu dosahoval. Obdobný test pomocí sterilních gáz se stejnou bakterií avšak výsledky nepotvrdil. Při testu pomocí výseče z filtračního papíru s bakterií *Bacillus subtilis* byly výsledky neprůkazné, stejně tak výsledky diskového difuzního testu jamkovým nanášením. Další použitou metodou byla diluční metoda. Na základě výsledků diluční metody pomocí bakterie *Bacillus subtilis* lze považovat, že překročení expirace ani doby použitelnosti nesnižuje antibakteriální účinky roztoků. Poslední experiment byl proveden dle Českého lékopisu s bakterií *Bacillus subtilis*. Vzhledem k velkému objemu spotřebovaných látek, byly otestovány pouze dva vzorky. Jeden vzorek (Clean Active – Barnaux) exspirovaný s překročením doby použitelnosti, který vykazoval známky snížení antibakteriální účinnosti. U druhého vzorku (PureMoist – Alcon) s expirací v roce 2019 a nepřekročením doby použitelnosti roztoku byla antibakteriální účinnost zachována.

Na základě validních testů lze částečně potvrdit hypotézu. Antibakteriální účinnost víceúčelových roztoků je závislá na době jejich používání. Vliv překročení data expirace nelze zcela vyřadit. Výsledky testů ale poukazují na nezávislost antimikrobiální účinnosti na zmíněném faktoru. Bylo by vhodné otestovat antibakteriální účinnost také s patogenními

bakteriemi a do experimentu zahrnout otestování chemického složení jednotlivých víceúčelových roztoků.

Seznam použité literatury

- [1] KUCHYNKA, Pavel. *Oční lékařství*. 2., přepracované a doplněné vydání. Praha: Grada, 2016. ISBN 9788024750798.
- [2] ROZSÍVAL, Pavel. *Infekce oka*. Praha: Grada, 2003. ISBN 80-247-0505-2.
- [3] BEDNÁŘ, Marek, Věra FRAŇKOVÁ, Jiří SCHINDLER a Andrej SOUČEK. *Lékařská mikrobiologie: bakteriologie, virologie, parazitologie*. Praha: Marvil, 1996.
- [4] ROZSÍVAL, Pavel. *Oční lékařství*. Praha: Galén, c2006. ISBN 8072624040.
- [5] PALMER, Chris. New Structure Found in Human Cornea. In: *The Scientist* [online]. Ontario, 2013 [cit. 2016-12-14]. Dostupné z: <http://www.the-scientist.com/?articles.view/articleNo/36027/title/New-Structure-Found-in-Human-Cornea/>
- [6] SAMCOVÁ, Michaela. Flegmóna: co to je a jak se to léčí. In: *Medlicker* [online]. London, 2013 [cit. 2016-12-14]. Dostupné z: <http://cs.medlicker.com/101-flegmona-co-to-je-a-jak-se-to-leci>
- [7] VLKOVÁ, Eva, Šárka PITROVÁ a František VLK. *Lexikon očního lékařství: výkladový ilustrovaný slovník*. Brno: František Vlk, 2008. ISBN 978-80-239-8906-9.
- [8] *Velký lékařský slovník* [online]. Praha: Maxdorf [cit. 2016-12-14]. Dostupné z: <http://lekarske.slovniky.cz/>
- [9] VOTAVA, Miroslav. *Lékařská mikrobiologie speciální*. Brno: Neptun, 2003. ISBN 8090289665.
- [10] JULÁK, Jaroslav. *Úvod do lékařské bakteriologie*. 2. vydání. Praha: Univerzita Karlova v Praze, nakladatelství Karolinum, 2015. ISBN 9788024632100.
- [11] BOYD, Kierstan. Contact Lens-Related Eye Infections. In: *American Academy of Ophthalmology* [online]. San Francisco: American Academy of Ophthalmology, 2015 [cit. 2016-12-14]. Dostupné z: <https://www.aao.org/eye-health/diseases/contact-lens-related-eye-infections>
- [12] BARTŮŇKOVÁ, Jiřina a Anna ŠEDIVÁ. *Imunologie: minimum pro praxi*. Vyd. 3. Praha: Triton, 2001. Levou zadní. ISBN 8072542052.
- [13] KREJSEK, Jan a Otakar KOPECKÝ. *Klinická imunologie*. Hradec Králové: Nucleus HK, 2004. ISBN 80-862-2550-X.
- [14] KNOP, N. a E. KNOP. Conjunctiva-associated lymphoid tissue in the human eye. In: *The National Center for Biotechnology Information: PubMed* [online]. Washington, 2000 [cit. 2016-12-14]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10798640>
- [15] EFRON, Nathan (ed.). *Contact lens practice*. 2nd ed. Oxford: Elsevier, 2010. ISBN 9780750688697.
- [16] MELICHERČÍKOVÁ, Věra. *Sterilizace a dezinfekce*. Druhé, doplněné a přepracované vydání. Praha: Galén, 2015. ISBN 9788074921391.
- [17] SYNEK, Svatopluk a Šárka SKORKOVSKÁ. *Kontaktní čočky*. Brno: Národní centrum ošetřovatelství a nelékařských zdravotnických oborů, 2003. ISBN 8070133872.

- [18] PETROVÁ, Sylvie, Zdeňka MAŠKOVÁ a Tomáš JUREČKA. *Základy aplikace kontaktních čoček*. Vyd. 2., přeprac. a dopl. Brno: Národní centrum ošetřovatelství a nelékařských zdravotnických oborů v Brně, 2008. ISBN 9788070134702.
- [19] *Česká oční optika*, Praha: Společenství českých optiků a optometristů, 2016, roč. 57, č. 4. ISSN 1211-233X
- [20] BENNETT, Edward S. a Vinita Allee. HENRY. *Clinical manual of contact lenses*. 3rd ed. Philadelphia: Wolters Kluwer/Lippincott Williams & Wilkins, c2009. ISBN 0781778298.
- [21] Michálek, J.: Materiály pro kontaktní čočky II. Typy měkkých hydrofilních kontaktních čoček na našem trhu – přehled, možnosti volby, poznámky. Sborník přednášek, kurz kontaktologů, II. Teoretická část. Praha 1997.
- [22] DALTON, KRISTINE, LAKSHMAN N. SUBBARAMAN, RONAN ROGERS a LYNDON JONES. Physical Properties of Soft Contact Lens Solutions. *Optometry and Vision Science*. 2008, **85**(2), 122-128. DOI: 10.1097/OPX.0b013e318162261e. ISSN 1040-5488. Dostupné také z: <http://content.wkhealth.com/linkback/openurl?sid=WKPTLP:landingpage>
- [23] JONES, L. SENCHYNA, M. Soft Contact Lens Solutions Review Part 1: Components of Modern Care Regimens. *Optometry in practice: the continuing education journal of the College of Optometrists*. 2007. ISSN 1467-9051
- [24] FRANKLIN, Valerie J., LAKSHMAN N. SUBBARAMAN, RONAN ROGERS a LYNDON JONES. Cleaning efficacy of single-purpose surfactant cleaners and multi-purpose solutions. *Contact Lens and Anterior Eye*. 1997, **20**(2), 63-68. DOI: 10.1016/S1367-0484(97)80042-2. ISSN 13670484. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1367048497800422>
- [25] ACADEMY OF VISION CARE. Contact Lens Maintenance: Lens Care Solutions and Compliance. [online]. [cit. 2016-12-14]. Dostupné z: <http://www.academyofvisioncare.com/files/documents/lens-care-article.pdf>
- [26] EYESOCKET. (n.d.) Miller-Keane Encyclopedia and Dictionary of Medicine, Nursing, and Allied Health, Seventh Edition. (2003). Retrieved January 2 2017 from <http://medical-dictionary.thefreedictionary.com/Eyesocket>
- [27] Slzný aparát. In: Wikipedia: the free encyclopedia [online]. San Francisco (CA): Wikimedia Foundation, 2001- [cit. 2017-01-02]. Dostupné z: https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Accessory_lacrimal_glands.png
- [28] Scientists Discover Previously Undetected Layer in Human Eye – Dua's Layer. In: Sci News [online]. 2016 [cit. 2017-01-02]. Dostupné z: http://cdn.sci-news.com/images/enlarge/image_1151e-eye-dua-s-layer.jpg
- [29] Záněty spojivek u dětí. In: Studio ForBio [online]. Praha [cit. 2017-01-02]. Dostupné z: http://www.forbio.cz/upload/695-100625_v.png
- [30] Trachom. In: Augenheilkunde MedUni Graz [online]. Graz [cit. 2017-01-02]. Dostupné z: <http://e-learning.studmed.unibe.ch/augenheilkunde/systematik/bindehaut/images/trachom.jpg>
- [31] Chlamydiové infekce. In: 004 [online]. [cit. 2017-01-02]. Dostupné z: <http://www.004.cz/z-chlamydie/chlamydieoko.jpg>

- [32] Keeping the Drug Pipeline Stocked. In: Ophthalmology Management [online]. Philadelphia, 2009 [cit. 2017-01-08]. Dostupné z: http://www.ophtalmologymanagement.com/content/archive/2009/june/images/omd_june_a10_fig01.jpg
- [33] Staphylococcus aureus ssp. aureus. In: Miniatlas mikroorganismů [online]. [cit. 2017-01-08]. Dostupné z: <https://old.vscht.cz/main/soucasti/fakulty/fpbt/ostatni/miniatlas/images/bakterie/mikro/saure6r.jpg>
- [34] The tear film anatomy and physiology. In: Clinical Gate [online]. 2015 [cit. 2017-01-08]. Dostupné z: <http://clinicalgate.com/the-tear-film-anatomy-structure-and-function/>
- [35] Contact lens photogallery. In: Andrew Gasson [online]. London, 2014 [cit. 2017-01-08]. Dostupné z: http://www.andrewgasson.co.uk/images/gallery_deposits.jpg
- [36] OLIVIER LAMARRE, Martin Dion. Polyquad. In: World of Images [online]. CCDMD, 2002 [cit. 2017-01-08]. Dostupné z: <http://monde.ccdmd.qc.ca/media/image449/54303.jpg>
- [37] CENDELÍN, Jiří; ústní informace [cit. 2017-01-10]
- [38] SCHINDLER, Jiří. Mikrobiologie: pro studenty zdravotnických oborů. 1. vyd. Praha: Grada, 2010, 223 s., [24] s. příl. ISBN 978-802-4731-704. [cit. 2017-05-13]
- [39] Český lékopis ...: Pharmacopoea bohemica .. Praha: Grada Publishing, 1997. ISBN 80-247-1532-5.
- [40] RAKOVSKÁ, Eva. Studium antimikrobiálních účinků extraktů stévie cukerné. Brno, 2006. 136 s. Fakulta Chemická, Vysoké učení technické v Brně. Vedoucí diplomové práce RNDr. Milena Vespálcová, Ph.D. [cit. 2017-05-13]
- [41] CAKIR B. A., BUDAMA L., TOPEL O., HODA N., „Synthesis of ZnO nanoparticles using PS-b-PAA reverse micelle cores for UV protective, self-cleaning and antibacterial textile applications“, *Elsevier*, pp. 132-139. [cit. 2017-05-13]
- [42] DRAGOUNOVÁ, Eva. *Víceúčelové roztoky k péči o kontaktní čočky jako rizikový faktor bakteriální keratitidy*. Kladno, 2014. Bakalářská práce. České vysoké učení technické v Praze, Fakulta biomedicínského inženýrství. Vedoucí práce MUDr. Jiří Cendelín, CSc.
- [43] Immune privilege sites: The eye apoptotic factors. [Www.immunopaedia.org](http://www.immunopaedia.org) [online]. 2016 [cit. 2017-05-17]. Dostupné z: <http://www.immunopaedia.org.za/wp-content/uploads/2014/12/apoptotic-factors-and-inhibitory-factors.jpg>
- [44] Bacillus subtilis. www.is.muni.cz [online]. 2016 [cit. 2017-05-17]. Dostupné z: <https://is.muni.cz/do/rect/el/estud/prif/ps06/mikroorg/web/images/bakterie/kolonie/?lang=en;so=nx;mapa=1>
- [45] Bacillus subtilis: Microscopy. [Www.studyblue.com](http://www.studyblue.com) [online]. 2015 [cit. 2017-05-17]. Dostupné z: https://s3.amazonaws.com/classconnection/676/flashcards/10952676/jpg/1280px-bacillus_subtilis_gram_stain-1537D68972830BFE4E8.jpg
- [46] ZIKÁNOVÁ, Blanka. Inhibiční účinek látek obsažených v zubní pastě. *Metodický portál: Články* [online]. 03. 01. 2008, [cit. 2017-05-24]. Dostupný z WWW: <http://clanky.rvp.cz/clanek/c/G/1775/INHIBICNI-UCINEK-LATEK-OBSAZENYCH-V-ZUBNI-PASTE.html>. ISSN 1802-4785.

- [47] VYMĚTALOVÁ, Veronika. *Biologie pro biomedicínské inženýrství: laboratorní cvičení*. 2. vyd. V Praze: České vysoké učení technické, 2013. ISBN 978-80-01-05187-0.
- [48] Návod k použití OPTI-FREE PureMoist. In: Www.alcon.com [online]. Camberley, 2015 [cit. 2017-05-25]. Dostupné z: https://www.cz.alcon.com/sites/www.cz.alcon.com/files/PureMoist_PIL.pdf
- [49] Option Multi Solution. In: Www.namigroup.ir [online]. 2015 [cit. 2017-05-25]. Dostupné z: <http://namigroup.ir/en/wp-content/uploads/2015/11/Options-Multi-Solution.pdf>
- [50] SYNERGI. In: Www.coopervision.co.uk [online]. London, 2015 [cit. 2017-05-25]. Dostupné z: <https://coopervision.co.uk/sites/coopervision.co.uk/files/synergi-en.pdf>
- [51] BioTrue multipurpose solution: BAUSCH&LOMB. In: Www.biotrue.gr [online]. New York, 2014 [cit. 2017-05-25]. Dostupné z: <https://www.biotrue.gr/ecp/biotrue-packaging-insert.pdf>
- [52] Max OptiFresh: Maxvue Vision. In: Www.maxvuevision.com [online]. Chennai [cit. 2017-05-25]. Dostupné z: <http://www.maxvuevision.com/v3/index.php/products/lens-care/max-optifresh-multi-purpose-solution>
- [53] Oté fine: Oté Pharma. In: Www.otepharma.nl [online]. Uden, 2015 [cit. 2017-05-25]. Dostupné z: <http://www.otepharma.nl/es/fine.html>
- [54] FRÉBORTOVÁ, Jitka. *Laboratorní cvičení z mikrobiologie UP Olomouc*. Olomouc, 2015. [cit. 2017 – 05 – 26]

Seznam symbolů a zkratk

MAPD = myristamidopropyl dimethylamin

EDTA = polyaminokarboxylová kyselina

PVA = polyvinyl alkohol

PVP = polivinyl propylen

HEMA = hydroxyethylmetakrylát

NVP = N vinyl pyrrolidon

MMA = methylmetakrylát

MAA = kyselina metakrylová

EGDMA = ethylenglykol dimetakrylát

GMA = glykolmetakrylát

MPS = víceúčelový roztok

DDT = diskový difuzní test

Seznam obrázků

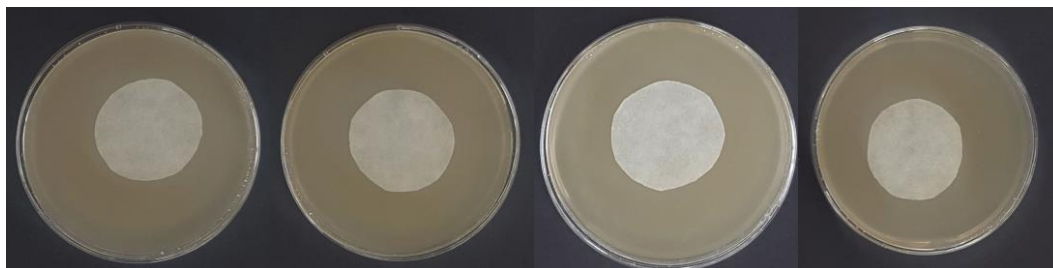
<i>Obrázek 1</i> Transverzální řez okem [Upraveno dle 26].	9
<i>Obrázek 2</i> Přídavné slzné žlázy v očním víčku [upraveno dle 27].	10
<i>Obrázek 3</i> Vrstvy rohovky [Upraveno dle 28].	11
<i>Obrázek 4</i> Konjunktivitida [29].	14
<i>Obrázek 5</i> <i>Haemophilus influenzae</i> na čokoládovém agaru.	16
<i>Obrázek 6</i> A. Počínající trachom (papilární hypertrofie); B. Konečné stádium trachomu (rohovkový zákal a nekróza) [Upraveno dle 30]	18
<i>Obrázek 7</i> Pseudomonádová keratitida [31].	20
<i>Obrázek 8</i> Bakteriální ulcerace s hypopyem v dolním segmentu rohovky [32].	21
<i>Obrázek 9</i> <i>Staphylococcus aureus</i> barvený dle Grama [33].	23
<i>Obrázek 10</i> A. Fyziologický slzný film; B. Poškození slzného filmu, suché oko (nabarveno fluoresceinem pod modrým světlem) [Upraveno dle 34].	26
<i>Obrázek 11</i> Apoptóza v průběhu imunitní reakce. [43].	28
<i>Obrázek 12</i> Bílkovinná depozita na kontaktní čočce [35].	30
<i>Obrázek 13</i> Účinek proplachování a čištění na bakteriální kontaminaci kontaktních čoček. [upraveno dle 15]	31
<i>Obrázek 14</i> Chemická struktura polyquad [36].	32
<i>Obrázek 15</i> Test s filtračním papírem se vzorkem č. 3.	36
<i>Obrázek 17</i> <i>Micrococcus luteus</i> na agarové půdě v Petriho misce.	39
<i>Obrázek 18</i> <i>Micrococcus luteus</i> mikroskopicky.	40
<i>Obrázek 19</i> <i>Bacillus subtilis</i> na agarové půdě. [44]	41
<i>Obrázek 20</i> <i>Bacillus subtilis</i> mikroskopicky. [45]	41
<i>Obrázek 21</i> Multifunkční roztoky použité k experimentu	44
<i>Obrázek 22</i> Porovnání inhibičních zón; A. vzorek č. 4, B. vzorek č. 1	45
<i>Obrázek 23</i> Slabě vytvořené inhibiční zóny na vzorku č. 10	46
<i>Obrázek 24</i> Porovnání inhibičních zón; A. vzorek č. 8, B. vzorek č. 4	47
<i>Obrázek 25</i> Inhibiční zóny u testu se sterilní gázou a bakterií <i>Bacillus subtilis</i> .	48
<i>Obrázek 26</i> Experiment na principu DDT pomocí jamkového nanášení; v místech s naneseným roztokem nejsou pozorovatelné inhibiční zóny	49
<i>Obrázek 27</i> Inhibiční zóny vytvořené na Petriho misce s narostlou bakteriální kulturou [46].	49
<i>Obrázek 28</i> <i>Micrococcus luteus</i> na Petriho miskách diluční metodou.	50
<i>Obrázek 29</i> Petriho misky se vzorky č. 6 a 3; ABÚ = 100 %	51
<i>Obrázek 30</i> Inokulované Erlenmayerovy baňky při experimentu dle Českého lékopisu.	52
<i>Obrázek 31</i> Experiment DDT s filtračním papírem a bakterií <i>B. subtilis</i> ; vzorky č. 3, 5, 6, 9 a 10	66
Obrázek 32 Experiment DDT s filtračním papírem a bakterií <i>M. Luteus</i> ; vzorky č. 1, 2, 3, 4, 7, 8, 9 a 10	66
<i>Obrázek 33</i> Experiment DDT se sterilní gázou a bakterií <i>M. luteus</i> ; vzorky č. 1, 2, 4, 7, 8, 9 a 10	67
<i>Obrázek 34</i> Experiment DDT jamkovým nanášením, vzorky č. 1, 7 a 9	67

Obrázek 35 Experiment diluční metodou pomocí B. Subtilis, vzorky č. 2, 3, 6, 9 a 10..... 67

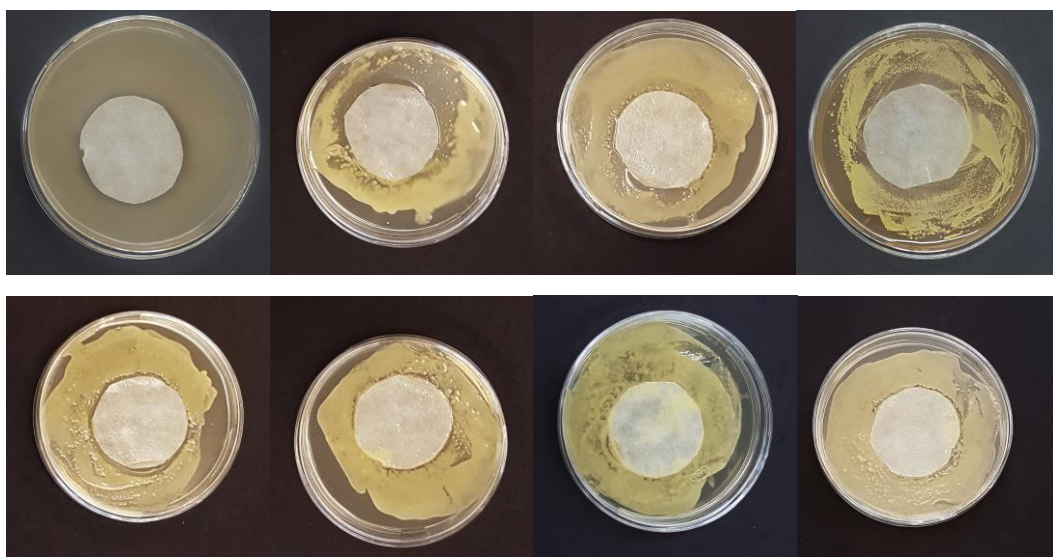
Seznam tabulek

<i>Tabulka 1 Přehled antibiotik a spektrum jejich působení</i>	16
<i>Tabulka 2 Antibiotika užívaná k léčbě bakteriální keratitidy.</i>	24
<i>Tabulka 3 Běžně užívané materiály pro výrobu kontaktních čoček a jejich charakteristiky.</i> [15]	29
<i>Tabulka 4 Vybrané multifunkční roztoky a jejich složení.</i> [15].....	33
<i>Tabulka 5 Interpretace inhibičních zón.</i> [54].....	36
<i>Tabulka 6 Složení půdy z hydrolyzátů sóji a kaseinu při pH po sterilizaci $7,3 \pm 0,2$</i> [39].	38
<i>Tabulka 7 Výsledky testu DDT s filtračním papírem</i>	45
<i>Tabulka 8 Výsledky DDT pomocí výseče z filtračního papíru pomocí <i>Bacillus subtilis</i>.</i>	46
<i>Tabulka 9 Výsledku testu DDT se sterilní gázou a bakterií <i>Micrococcus luteus</i>.</i>	47
<i>Tabulka 10 Výsledky testu DDT se sterilní gázou a bakterií <i>Bacillus subtilis</i>.</i>	48
<i>Tabulka 11 Výsledky experimentu diluční metodou s bakterií <i>Bacillus subtilis</i>.</i>	50
<i>Tabulka 12 Výsledky experimentu podle Českého lékopisu.</i>	52

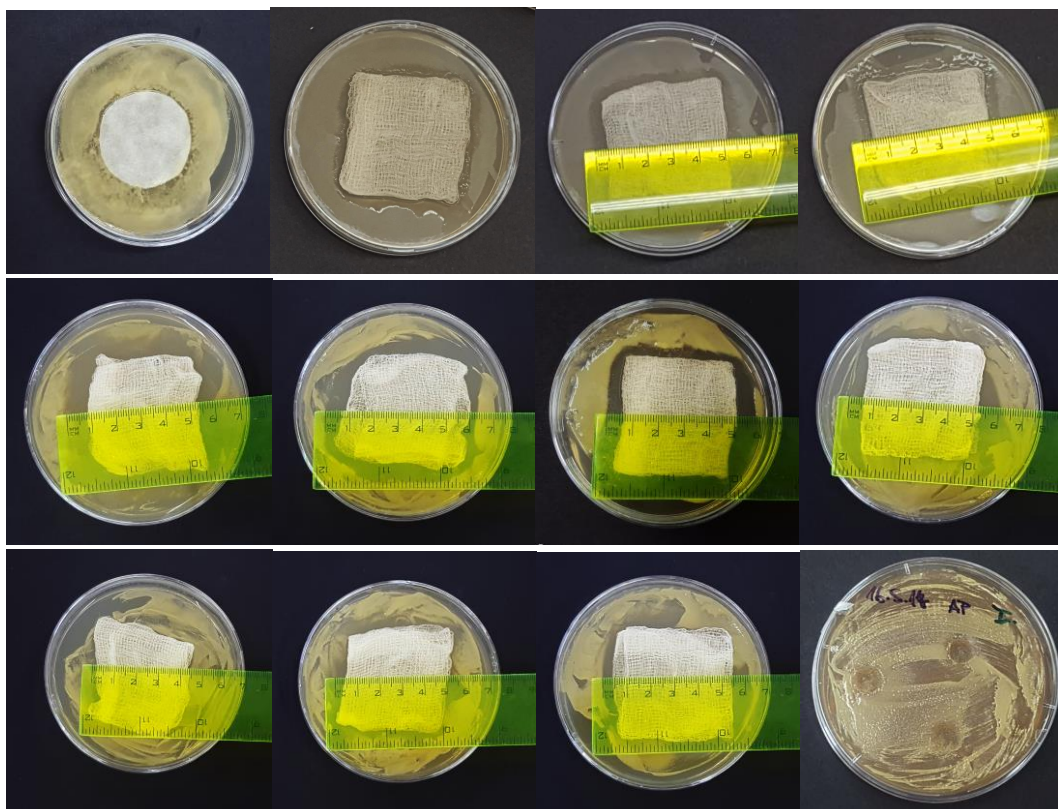
Seznam příloh



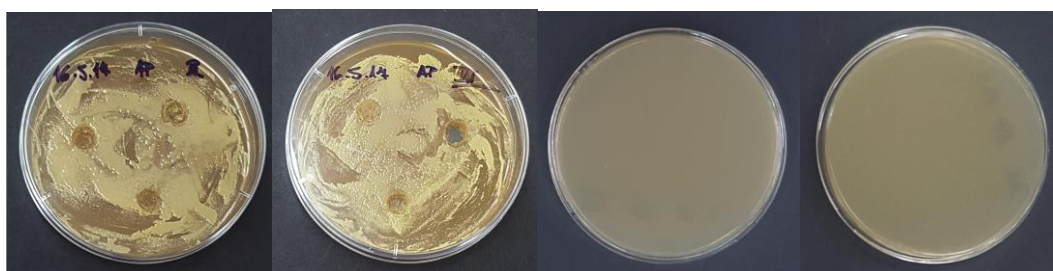
Obrázek 30 Experiment DDT s filtračním papírem a bakterií *B. subtilis*; vzorky č. 3, 5, 6, 9 a 10



Obrázek 31 Experiment DDT s filtračním papírem a bakterií *M. luteus*; vzorky č. 1, 2, 3, 4, 7, 8, 9 a 10



Obrázek 32 Experiment DDT se sterilní gázou a bakterií *M. luteus*; vzorky č. 1, 2, 4, 7, 8, 9 a 10



Obrázek 33 Experiment DDT jamkovým nanášením, vzorky č. 1, 7 a 9



Obrázek 34 Experiment diluční metodou pomocí *B. Subtilis*, vzorky č. 2, 3, 6, 9 a 10