

UNIVERZITA KARLOVA
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
KATEDRA BIOLOGICKÝCH A LÉKAŘSKÝCH VĚD



DIPLOMOVÁ PRÁCE

**POKROČILÉ METODY TESTOVÁNÍ ANTIMIKROBNÍ
AKTIVITY**

DAGMAR DOLINSKÁ

Vedoucí diplomové práce: PharmDr. Ondřej Jand'ourek, Ph.D.

HRADEC KRÁLOVÉ, 2018

Poděkování

Ráda bych poděkovala vedoucímu mé diplomové práce PharmDr. Ondřeji Jand'ourkovi, Ph.D. za jeho ochotu, rady a čas, který mi během vypracování věnoval. Dále bych chtěla poděkovat paní laborantce Idě Dufkové za pomoc v laboratoři a také prof. PharmDr. Martinovi Doležalovi, Ph.D. a PharmDr. Martě Kučerové, Ph.D. za syntézu testovaných sloučenin. V neposlední řadě bych ráda poděkovala mé drahé matce za poskytnutí stravy a přístřeší a mé báječné přítelkyni Denise za neutuchající morální podporu a jazykovou korekturu.

„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci jsou řádně citovány. Práce nebyla použita k získání jiného nebo stejného titulu.“

V Hradci Králové 22. 8. 2018

ABSTRAKT

Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra biologických a lékařských věd

Kandidát: Dagmar Dolinská

Školitel: PharmDr. Ondřej Jandourek, Ph.D.

Název práce: Pokročilé metody testování antimikrobní aktivity

Cíl práce: Cílem práce bylo v teoretické části shrnout aktuální metody testování antimikrobních sloučenin se zaměřením na antimykotika a v praktické části vyhodnotit antifungální aktivitu u 47 testovaných látek pomocí mikrodiluční bujónové metody.

Metody: Látky byly testovány kvantitativní mikrodiluční bujónovou metodou na osmi kmenech kvasinek a vláknitých hub. Jednalo se o kmeny *Candida albicans*, *Candida krusei*, *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus flavus*, *Absidia corymbifera* a *Trichophyton interdigitale*.

Výsledky: Nejvyšší antimykotickou aktivitu projevila látka Ac-0a, u které jsme po 24hodinové inkubaci zaznamenali aktivitu proti všem osmi kmenům. U tří kmenů však již nebyla schopná zastavit růst po 48hodinové inkubaci, jednalo se o kmeny *Candida parapsilosis*, *Aspergillus fumigatus* a *Aspergillus flavus*. Další vzorky, u kterých byla zjištěna aktivita, byly CI-2, kde byla aktivita zaznamenána u kmenů *Candida krusei*, *Aspergillus fumigatus* a *Trichophyton interdigitale*, CI-3 u všech kmenů kromě *Aspergillus flavus* a *Absidia corymbifera* a poslední aktivní CI-10 – zde se aktivita projevila u kmenů *Candida albicans*, *Candida krusei*, *Candida parapsilosis* a *Trichophyton interdigitale*. Ostatní látky aktivitu neprojevily. Nejcitlivější byl kmen *Trichophyton interdigitale*, naopak nejrezistentnější byly *Aspergillus flavus* a *Absidia corymbifera*.

Závěr: Aby mohly být testované látky s prokázaným antimykotickým účinkem (CI-2, CI-3, CI-10, Ac-0a) využity v klinické praxi, bylo by zapotřebí provést ještě řadu dalších testů a klinických studií.

Klíčová slova: vláknité houby, kvasinky, antimykotika, rezistence, minimální inhibiční koncentrace

ABSTRACT

Charles University, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Biological and Medical Sciences

Candidate: Dagmar Dolinská

Supervisor: PharmDr. Ondřej Jand'ourek, Ph.D.

Work title: Advanced methods for testing antimicrobial activity

Goal: The aim of the work in the theoretical part was to summarize methods of antimicrobial screening focusing on antimycotics and in the practical part to evaluate the antifungal activity of 47 tested substances using the microdilution broth method.

Methods: The substances were tested using quantitative microdilution broth method on eight strains of yeast and fibrous fungi. These were *Candida albicans*, *Candida krusei*, *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus flavus*, *Absidia corymbifera* and *Trichophyton interdigitale*.

Results: The highest antimycotic activity was demonstrated by compound Ac-0a, where we recorded after 24 hours of incubation activity against all eight strains. However, it was not able to stop the growth of three strains after 48 hours of incubation, the strains concerned were *Candida parapsilosis*, *Aspergillus fumigatus* and *Aspergillus flavus*. Other samples which have shown activity were Cl-2, where activity was observed for *Candida krusei*, *Aspergillus fumigatus* and *Trichophyton interdigitale* strains, Cl-3 for all strains except *Aspergillus flavus* and *Absidia corymbifera* and the last active substance Cl-10, where the activity was recorded for *Candida albicans*, *Candida krusei*, *Candida parapsilosis* and *Trichophyton interdigitale* strains. Other substances have shown no activity. The most sensitive strain was *Trichophyton interdigitale*, on the other hand the most resilient strains were *Aspergillus flavus* and *Absidia corymbifera*.

Conclusion: In order to tested substances with proven antimycotic effect (Cl-2, Cl-3, Cl-10, Ac-0a) to be used in clinical practice, further testing and clinical trials would be needed.

Key words: fibrous fungi, yeast, antimycotic drugs, resistance, minimal inhibitory concentrations

Obsah

| | |
|---|----|
| 1. ÚVOD..... | 8 |
| 2. ZADÁNÍ – CÍL PRÁCE | 9 |
| 3. TEORETICKÁ ČÁST..... | 10 |
| 3.1 Obecná charakteristika hub | 10 |
| 3.2 Charakteristika testovaných kmenů..... | 11 |
| 3.2.1 Rod <i>Candida</i> | 11 |
| 3.2.2 Non-albicans <i>Candida</i> | 14 |
| 3.2.3 Rod <i>Aspergillus</i> | 21 |
| 3.2.4 Rod <i>Absidia</i> | 26 |
| 3.2.5 Rod <i>Trichophyton</i> | 27 |
| 3.3 Základní rozdělení antimykotik | 30 |
| 3.3.1 Polyenová antimykotika | 30 |
| 3.3.2 Azolová antimykotika | 31 |
| 3.3.3 Echinokandiny | 33 |
| 3.3.4 Allylaminy | 34 |
| 3.3.5 Antimetabolity | 35 |
| 3.3.6 Ostatní antimykotika | 36 |
| 3.3.7 Nеспецифická antimykotika | 37 |
| 3.3.8 Antimykotika v preklinickém a klinickém výzkumu | 37 |
| 3.4 Rezistence antimykotik | 42 |
| 3.4.1 Definice rezistence | 42 |
| 3.4.2 Mechanismy rezistence..... | 43 |
| 3.5 Metody testování citlivosti kvasinek a vláknitých hub..... | 46 |
| 3.5.1 Standardizované metody | 46 |
| 3.5.2 Komerční soupravy..... | 51 |
| 4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST | 55 |
| 4.1 Použitý materiál | 55 |
| 4.2 Testované látky | 56 |
| 4.2.1 Deriváty <i>N'</i> -acetoxy-5-alkylpyrazin-2-karboximidamidu a deriváty 5-alkyl- <i>N'</i> - (pivaloyloxy)pyrazin-2-karboximidamidu..... | 57 |
| 4.2.2 Deriváty <i>N</i> -hydroxypyrazin-2-karbimidoyl chloridu | 59 |
| 4.2.3 Deriváty pyrazin-2-karboxylové kyseliny..... | 60 |

| | | |
|-------|---|----|
| 4.2.4 | <i>N</i> -aryls substituované deriváty 3-(pyrazin-2-yl)urey a <i>N</i> -alkyls substituované deriváty 3-(pyrazin-2-yl)urey..... | 61 |
| 4.2.5 | Ostatní sloučeniny..... | 63 |
| 4.3 | Postup práce | 64 |
| 4.3.1 | Příprava růstového média..... | 64 |
| 4.3.2 | Příprava suspenzí testovaných kmenů..... | 64 |
| 4.3.3 | Příprava ředicí řady testované látky..... | 64 |
| 4.3.4 | Výpočet objemu DMSO | 65 |
| 4.3.5 | Pipetování do destičky | 66 |
| 5. | VÝSLEDKY..... | 67 |
| 6. | DISKUSE | 74 |
| 7. | ZÁVĚR | 77 |
| 8. | POUŽITÉ ZKRATKY..... | 78 |
| 9. | SEZNAM TABULEK | 80 |
| 10. | SEZNAM OBRÁZKŮ | 81 |
| 11. | POUŽITÁ LITERATURA..... | 82 |

1. ÚVOD

I přes velké pokroky ve vývoji nových antifungálních látek jsou mykotické infekce způsobené různými druhy kvasinek a vláknitých hub velice časté. Běžné infekce většinou člověka na životě neohrožují, nicméně invazivní systémové mykotické infekce mohou být pro člověka velmi nebezpečné. Hlavní rizikovou skupinou jsou v tomto případě imunokompromitovaní pacienti – např. pacienti s HIV, AIDS, neutropenií a jinými onemocněními postihujícími imunitu. Zvýšenému riziku podléhají také pacienti s poruchami metabolismu, jako jsou např. diabetes mellitus, Addisonova choroba, hypotyreóza apod. Mezi další faktory přispívající k rozvoji mykotických infekcí patří transplantace, léčba širokospektrými antimykotiky, chemoterapie, imunosupresivní léčba a spousta dalších.

Především kvůli špatnému používání antimykotik je významným problémem také rozvoj rezistence. Ta může omezit možnosti terapie. Je proto vhodné provádět testy citlivosti před nasazením léčby.

V posledních letech došlo k rapidnímu zvýšení výskytu mykóz u vážně nemocných pacientů, což vedlo k rozvoji oblasti vývoje nových léčiv, ale také oblasti testování citlivosti. Nicméně vývoj nových antimykotik a cesta ke konečnému účinnému a bezpečnému léku je dlouhá. Je nutné, aby léčiva prošla řadou testů a klinických studií. K rozvoji a standardizaci metod dochází také v oblasti testování citlivosti vůči antimykotikům, která dlouho zaostávala za vývojem v oblasti testování citlivosti k antibiotikům především z důvodu nižší četnosti mykotických infekcí. (Mallátová a kol. 2011)

2. ZADÁNÍ – CÍL PRÁCE

Cílem teoretické části bylo shrnutí metod testování se zaměřením na mykotické infekce. Cílem praktické části práce bylo stanovit antimykotickou aktivitu testovaných látek syntetizovaných na Katedře farmaceutické chemie a farmaceutické analýzy Farmaceutické fakulty Univerzity Karlovy v Hradci Králové za pomoci kvantitativní mikrodiluční bujónové metody. Testování jsme prováděli na osmi kmenech kvasinek a vláknitých hub v laboratoři Katedry biologických a lékařských věd pod vedením paní laborantky Idy Dufkové.

- rešerše literatury,
- zvládnutí základních mikrobiologických technik v laboratoři,
- vypracování pracovních postupů,
- vlastní experimenty,
- zpracování výsledků,
- vyhodnocení výsledků, jejich interpretace a diskuze s využitím teoretických a praktických znalostí dané problematiky.

3. TEORETICKÁ ČÁST

3.1 Obecná charakteristika hub

Houby tvoří samostatnou říši v systému organismů nazývaní se *Fungi*. Jedná se o eukaryotické organismy, jsou to především destruenti organické hmoty. Buňky hub mají organely shodné s rostlinami kromě plastidů, charakteristickou buněčnou stěnu, vakuoly a produktem metabolismu a zásobní látkou je glykogen stejně jako u živočichů. Další znaky společné s živočichy jsou lyzomy, které obvykle chybí u rostlin, a heterotrofní výživa, kdy zdrojem uhlíku a zároveň energie jsou organické látky. Jen u malé části se vyvinul parazitický způsob života. (Obecná mykologie [online]; Votava a kol. 2010, Buchta 1998)

Hlavními rozdíly mezi buňkami hub, bakterií a savčích buněk je buněčná stěna z chitinu neobsahující peptidoglykany. Buněčná stěna naopak obsahuje β -glukany a místo cholesterolu se v ní nachází ergosterol. Právě ergosterol je často cílem antimykotické léčby. Nejrizikovější skupinou, kterou postihují mykotické infekce, jsou pacienti s poškozenou imunitou. (Obecná mykologie [online]; Biologie [online])

Houby mají schopnost rozmnožovat se jak pohlavně, tak nepohlavně. Nepohlavní rozmnožování je zejména u parazitických hub, a to několikrát během vegetačního období. Existuje několik forem nepohlavního rozmnožování hub. Nejjednodušším způsobem je fragmentace, k níž dochází u vláknitých hub – části vláken se oddělují od mycelia a prorůstají substrátem. Možností je také přehrádečné dělení, kdy se mateřská buňka rozdělí na dvě dceřiné. Pro kvasinky je typickým způsobem rozmnožování pučení. Z mateřské buňky vyroste buňka dceřiná, jádro mateřské buňky se přitom rozdělí a jedno přejde do buňky dceřiné. Takto dělicí se buňka zahyne po několika děleních. Nejrozšířenější způsob je však tvorba výtrusů (nepohlavní spory tzv. mitospor). (Obecná mykologie [online]; Biologie [online])

Pohlavní rozmnožování se pak uskutečňuje zpravidla jednou ročně na podzim a sestává ze tří fází. První fází je plazmogamie, kdy se dvě pohlavně různá haploidní jádra dostávají do společné cytoplasmy. V další fázi tzv. karyogamii dochází ke splynutí obou jader v jedno, to má v důsledku dvojnásobný počet chromozomů, je diploidní. Třetí fáze meióza znamená redukční dělení, sníží se počet chromozomů a opět se

obnoví haploidní stav. Takto vznikají tzv. meiospory. (Obecná mykologie [online]; Biologie [online])

Fáze rozmnožování, při které houba tvoří pohlavní meiospory, je stádium perfektní, stádium nepohlavních mitospor pak nazýváme imperfektní. (Obecná mykologie [online])

3.2 Charakteristika testovaných kmenů

3.2.1 Rod *Candida*

Mykoorganismy rodu *Candida* jsou jedny z nejčastějších původců povrchových i systémových mykóz na celém světě. Známe okolo 150 druhů kandid, ale jen některé jsou lidskými patogeny. Rod zahrnuje druhy saprofytické i potenciálně patogenní způsobující mykotická onemocnění u člověka i zvířat. Kandidy jsou bifazické, dimorfní houby, což znamená, že se projevují dvěma formami růstu, a to buď kvasinkovou formou růstu jako kulovité buňky (blastospory nebo chlamydostry), nebo vláknitou formou jako tubulární buňky, které jsou nazývány hyfy nebo pseudohyfy a charakterizují plísňovou, myceliální formu. Pigmentace obvykle chybí. (Zazula a kol. 2006; Bednář a kol. 1996; Klaban 2005; Haber 1995; Mycology Adelaide 2017 [online])

Kandidy zkvašují cukry, čehož se využívá k určování druhu. Kandidy můžeme také rozlišit podle jejich schopnosti využít cukry a dusíkaté látky, a to pomocí tzv. auxanogramů. (Bednář a kol. 1996)

Dle klinické manifestace a rozsahu infekce lze kandidózy rozdělit do dvou skupin. První forma je lokální (mukokutánní) bez invaze do tkání. Nejčastěji se jedná o kožní kandidózu, orofaryngeální kandidózu, ezofageální kandidózu a vulvovaginální kandidózu. Druhou formou je potom systémová kandidóza charakterizovaná invazivní infekcí s postižením orgánů. Mezi nejzávažnější orgánové postižení patří kandidóza plic, jater, sleziny, oka a centrální nervové soustavy. (Zazula a kol. 2006)

Kandidy jsou nejčastějšími původci nosokomiálních infekcí. Pravděpodobnost nákazy zvyšují věk pacienta, imunodeficity a dlouhodobá neutropenie. Příčinou vzniku kandidémie bývají kontaminované venózní katétry nebo infuzní roztoky, při operaci očí mohou vznikat endoftalmitidy, jejichž častou příčinou bývají implantované materiály. Jsou zaznamenány případy, kdy byly příčinou infekce kontaminované nápoje. Hlavním

původcem NN je *C. albicans*, ale objevují se i nákazy způsobené jinými druhy kandid. (Bednář a kol. 1996)

3.2.1.1 *Candida albicans*

Candida albicans je vůbec nejčastějším původcem kandidózy. Kvasinkové buňky nazýváme blastokonidie. V přírodě se nachází hlavně v půdě a zvířecích exkrementech. U člověka pak na kůži, v ústní dutině, ve sputu, ve vaginálních sekretech, v moči, stolici a jinde. Jsou oválné nebo kulaté, velikost je 3–5 mikrometrů. Blastokonidie vytvářejí pseudohyfy v podobě větvených řetízků. Mohou tvořit také pravé hyfy, které jsou složeny z více buněk. (Bednář a kol. 1996; Klaban 2005)

Charakteristickou vlastností *C. albicans* je germinace – tvorba zárodečných klíčků. Jedná se o vlákénka, která vyrůstají z blastokonidií, z nichž pak mohou vznikat pravé hyfy. (Bednář a kol. 1996; Klaban 2005)

Kandidy jsou aerobní a růstově málo náročné. Rostou dobře na Sabouraudově glukózovém agaru, na bakteriologických půdách i na krevním agaru při teplotě 27–37 °C, kolonie vyrostou za 24 až 48 hodin. *C. albicans* vytváří dva typy kolonií. Z klinického materiálu izolované kandidy vytvářejí smetanově bílé, hladké, vypouklé, mazlavé kolonie. (Bednář a kol. 1996; Greenwood a kol. 1999; Klaban 2005)

Kandidóza se vyskytuje převážně jako nemoc sekundární vznikající u osob se sníženou obranyschopností. Roste ale také výskyt primární formy u zdravých lidí infikovaných virulentními kmeny *C. albicans*. (Bednář a kol. 1996)

Příčiny sekundární kandidózy mohou být jak vnější, tak vnitřní. Endogenní příčiny oslabují pacienta a snižují jeho obranyschopnost, jedná se např. o maligní tumory a jiná celková onemocnění. Dalšími predispozičními faktory mohou být metabolická onemocnění (DM), nutriční karence, věk a jiné. Důležitou roli hrají poruchy specifické i přirozené imunity (neutropenie, defekty ve fagocytóze). (Bednář a kol. 1996)

Primární nákaza často souvisí s léčebnými nebo diagnostickými zásahy. Kandidóza je častou komplikací léčby kortikoidy, imunosupresivy a cytostatiky, které zhoršují již oslabenou imunitu, dále širokospektrými antibiotiky porušujícími přirozenou mikroflóru sliznic. Kandidy se mohou do krevního oběhu dostat i cévními

katétry nebo kontaminovanými infuzemi, právě ty jsou často zdrojem nosokomiálních nákaz. (Bednář a kol. 1996)

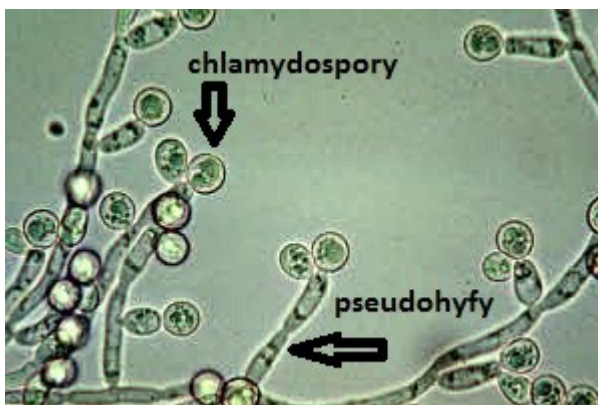
Lehčí forma kandidózy je superficiální mykóza kůže a sliznice. Je obvyklým původcem dermatomykóz a onychomykóz. Často se také můžeme setkat s kandidózou dutiny ústní (soor neboli moučnivka), jež je hlavní manifestací kandidózy u nemocných s AIDS. U gravidních žen nebo při diabetu je poměrně častá vulvovaginitida. (Bednář a kol. 1996)

Nejzávažnější formy jsou diseminované a orgánové kandidózy. Krevní cestou se houba dostává do plic, bronchů, gastrointestinálního traktu, ledvin a dalších orgánů. (Bednář a kol. 1996)



Obrázek 1: Kolonie *Candida albicans* kultivované na Sabouraudově glukosovém agaru

Zdroj: *Candida albicans*. In: *Microbiologyinpictures* [online]. Microbiologyinpictures. [citováno 18. 8. 2018]. Dostupné z: <https://www.microbiologyinpictures.com/bacteria-photos/candida-albicans-photos/candida-albicans-sabouraud.html>



Obrázek 2: Mikroskopický vzhled *Candida albicans*, 400x

Zdroj: *Candida albicans*. In: *Klinik Utama Gracia* [online]. Klinik Utama Gracia. [citováno 18. 8. 2018]. Dostupné z: <http://klinikjakartapusat.net/images/candida-albicans.jpg>



Obrázek 3: *Candida albicans* – mikroskopický pohled na zárodečné klíčky, 400x

Legenda: Zárodečný klíček (germ tube) typický pro *Candida albicans* vznikající z mateřské buňky (yeast cell)

Zdroj: *Candida albicans*. In: Thunderhouse [online]. Fun with Microbiology. [citováno 18. 8. 2018]. Dostupné z: <http://thunderhouse4-yuri.blogspot.com/search?q=candida+albicans>

3.2.2 Non-albicans *Candida*

Druhy non-albicans způsobují většinu všech kandidémií. Obecně se vyskytují častěji u pacientů s nádorovým onemocněním, zejména při hematologických malignitách

a při transplantaci kostní dřeně (40–70 %). Naopak méně časté jsou mezi pacienty jednotek intenzivní péče a chirurgie (35–55 %), u dětí (1–35 %) nebo HIV pozitivních pacientů (0–33 %). Podíl non-albicans druhů kandid se zvětšuje. Nejčastějšími druhy jsou *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. krusei* a *C. glabrata*. (Krcmery a kol. 2002)

3.2.2.1 *Candida krusei*

C. krusei je celosvětově rozšířená kvasinka. Je možné ji izolovat z velkého množství přírodních stanovišť, jako jsou atmosféra, ovoce, odpadní vody, siláže, půda, potraviny (mléčné, masné výrobky, potraviny na bázi cukru a sirupu), dále z piva a vína. V přírodě je široce distribuovaná, je považována za fakultativního saprofyta (organismus žijící většinu života jako parazit; nastane-li nedostatek živých hostitelů, přechází na saprofytický způsob života). Nachází se také u kuřat a racků. Všeobecně je vztah *C. krusei* a člověka považován za přechodně komenzální. Z kandid přenášených orálně je pátým nejvíce dominantním druhem způsobujícím infekce, před ní jsou *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis* a *C. parapsilosis*. Pátá nejčastější příčina lidských mykotických infekcí na celém světě. Nejčastější kombinací kvasinek izolovaných

z perorálních vzorků jsou kombinace *C. albicans* s jednou nebo více z těchto kvasinek: *C. krusei*, *C. tropicalis* a *C. glabrata*. Závažný je její výskyt u hematologických pacientů, kde může způsobit těžkou diseminovanou fungemii s vysokou úmrtností. (Samaranayake a kol. 1994)

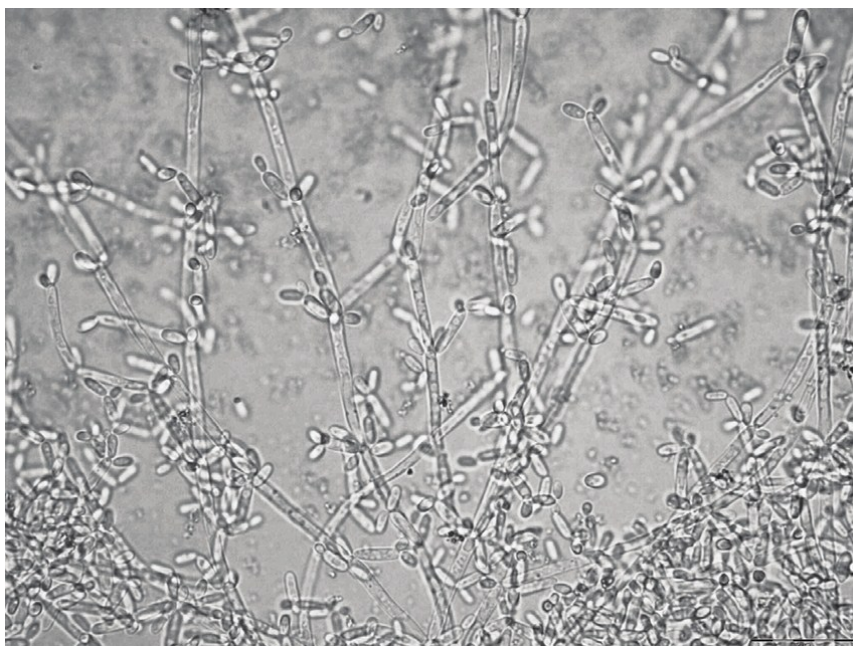
Na rozdíl od většiny kandid má *C. krusei* elipsoidní až válcovitý tvar s rozměry 2,2–5,6 x 4,3–15,2 μm . Kolonie na Sabouraudově agaru jsou hladké a matné s vroubkovaným nebo laločnatým okrajem, barva je bílá až šedá. Jedná se o jediný druh kandidy, který může růst na agaru bez vitamínů. (Leading international fungal education [online]; MiniAtlas mikroorganismů [online]; Samaranayake a kol. 1994)

Candida krusei je potenciální houbový patogen rezistentní vůči více antifungálním látkám, a to především díky své vnitřní flukonazolové rezistenci kombinované se sníženou citlivostí na amfotericin B a flucytosin. Získaná rezistence byla zaznamenána u některých azolových léčiv jako je itrakonazol a vorikonazol. *C. krusei* je citlivá k echinokandinům se vzácným výskytem získané rezistence. (Leading international fungal education [online]; Pfaller a kol. 2005)



Obrázek 4: Kolonie *Candida krusei* kultivované na Sabouraudově glukosovém agaru

Zdroj: *Candida krusei*. In: *Postgraduální medicína* [online]. Postgraduální medicína. [citováno 18. 8. 2018]. Dostupné z: <http://img.mf.cz/317/064/1-54a.jpg>



Obrázek 5: Mikroskopický vzhled *Candida krusei*

Zdroj: *Candida krusei*. In: *ResearchGate* [online]. Research Gate. [citováno 18. 8. 2018]. Dostupné z: <https://bit.ly/2BzJYsJ>

3.2.2.2 *Candida parapsilosis*

Candida parapsilosis je lidský patogen, jehož výskyt se v posledních dvou desetiletích dramaticky zvýšil. Dnes je tato kandida jednou z hlavních příčin invazivních kandidóz. Zprávy říkají, že je dokonce druhým nejčastěji izolovaným druhem kandid v některých evropských, asijských a jihoamerických nemocnicích. Mezi jedince s vyšším rizikem závažné infekce patří novorozenci a pacienti na jednotkách intenzivní péče. U dětí s nízkou porodní hmotností a těžce nemocných způsobuje více než čtvrtinu ze všech invazivních plísňových infekcí ve Velké Británii a až třetinu v Severní Americe. Obecně je *C. parapsilosis* sice méně virulentní než *C. albicans*, ale má vynikající schopnost přilnout k materiálům, vytvářet biofilmy a šířit tak infekci prostřednictvím kontaminovaných katétrů a jiných zdravotnických prostředků. (Trofa a kol. 2008)

Před rokem 2005 byla *C. parapsilosis* rozdělena do tří skupin: *C. parapsilosis*, *C. orthopsilosis*, *C. metapsilosis*. Nicméně *C. parapsilosis* je zodpovědná za 92 % infekcí. (Leading international fungal education [online]; Trofa a kol. 2008)

Buňky mají oválný, kulatý nebo válcovitý tvar. Kolonie rostoucí na Sabouraudově agaru jsou bílé až krémové, povrch je lesklý a hladký. (Leading international fungal education [online]; Miniatlask mikroorganismů [online])

C. parapsilosis je druhou nejčastější příčinou invazivní kandidózy (fungémie), zejména u pacientů se sníženou imunitou. (Trofa a kol. 2008)

Může se také manifestovat jako endokarditida. Houbové endokarditidy představují 1,3 až 6 % všech případů infekční endokarditidy. Z toho druhu *Candida* představují 94,1 % případů, *C. parapsilosis* je spojena se 17 %, čímž se po *C. albicans* řadí na druhé místo. Velmi často je parapsilózní endokarditida spojena s injekčním užíváním drog. Další významné predispoziční faktory jsou parenterální výživa, protetické ventily, abdominální zákroky, imunosuprese, léčba širokospektrými antibiotiky a předchozí chlopňové onemocnění. Rizikový faktor je i fungémie, poškozené tkáně jsou tak totiž náchylnější k infekci. (Trofa a kol. 2008)

U pacientů s renálním onemocněním představuje *C. parapsilosis* riziko vzplanutí houbové peritonitidy. (Trofa a kol. 2008)

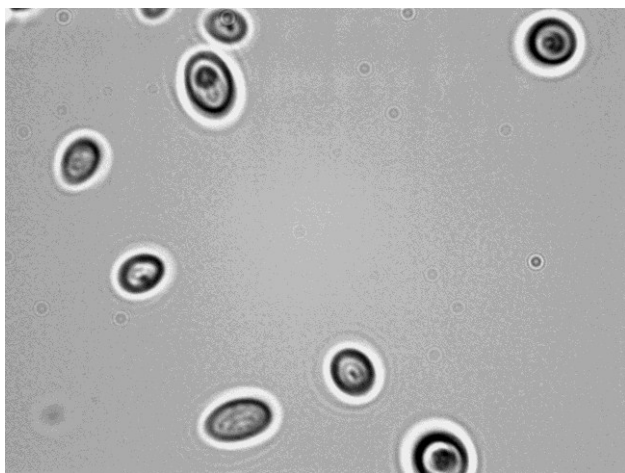
Další možné klinické manifestace *C. parapsilosis* jsou oční infekce, ušní mykózy, onychomykózy, vulvovaginitidy a spíše výjimečně infekce močového měchýře. (Trofa a kol. 2008)

Candida parapsilosis (nikoliv však *C. orthopsilosis* ani *C. metapsilosis*) je méně citlivá na kaspofungin a mikafungin. Zaznamenána byla značná získaná rezistence k azolovým antimykotikům jako je flukonazol a vorikonazol. Tyto látky je vhodné používat jen po předchozím laboratorním průkazu citlivosti. Tvorba odolného biofilmu přispívá k rozvoji multirezistence. (Leading international fungal education [online])



Obrázek 6: Kolonie *Candida parapsilosis* kultivované na maltózovém agaru

Zdroj: *Candida parapsilosis*. In: BRC Microbe Division [online]. Japan Collection of Microorganism. [citováno 18. 8. 2018]. Dostupné z: http://www.icm.riken.jp/cgi-bin/icm/icmimg_view?icm=5941&fid=A



Obrázek 7: Mikroskopický vzhled *Candida parapsilosis*, 400x

Zdroj: *Candida parapsilosis*. In: Viticulture & Enology [online]. Viticulture & Enology. [citováno 18. 8. 2018]. Dostupné z: <https://bit.ly/2OSzQNx>

3.2.2.3 *Candida tropicalis*

Candida tropicalis je nejčastější celosvětově rozšířený patogenní druh kvasinek z druhů *non-albicans*. Představuje asi 4 % ze všech kvasinek získaných z mořské vody, mořských sedimentů, bahenních ploch, střev mořských ryb, krevet a mořských řas, což dokazuje její širokou distribuci v tropickém a subtropickém mořském prostředí. Je možné ji také získat z různých druhů ovoce, z půdy a stolice. U lidí se vyskytuje jako všeobecný komenzál v ústech, trávicím ústrojí, plicích, vagíně a na pokožce. (Leading

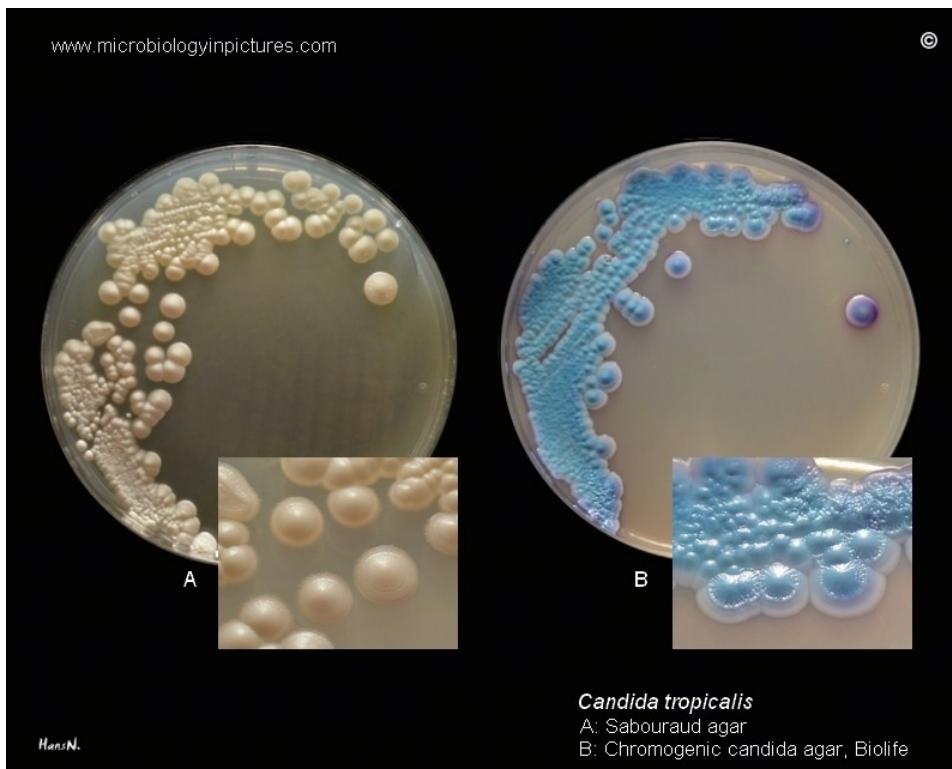
international fungal education [online]; Kothavade a kol. 2010; MiniAtlas mikroorganismů [online])

Vyznačuje se kulovitými buňkami, mezi nimi se ale nachází i cylindrické a protáhnuté buňky jako články pseudomycelia. Rozměry buněk jsou 4,3–7,2 x 5,8–10,8 μm. Kvasinka vytváří měkké, krémovité, hladké i zvrásněné kolonie, mnohdy radiálně pásované. Kolonie jsou od ostatních kandid těžko odlišitelné, nicméně *C. tropicalis* nevytváří na rozdíl od *C. albicans* chlamydostry. (MiniAtlas mikroorganismů [online]; Leading international fungal education [online])

Candida tropicalis je jedním ze tří nejčastěji izolovaných druhů non-*Candida albicans* (NCA). Počet infekcí způsobených touto kvasinkou se stále zvyšuje. Hlavními důvody jsou nadměrné používání antifungální léčby, větší počet pacientů s oslabenou imunitou, dlouhodobé používání katétrů, používání širokospektrých antibiotik a další. (Kothavade a kol. 2010)

Ze studie profesora Kontoyiannise z roku 2001 vyplývá, že je *C. tropicalis* významnou příčinou fungémie především u pacientů s hematologickými malignitami (hlavně leukémie) a u pacientů s neutropenií. Dále bylo zjištěno, že ve srovnání s *C. albicans* je *C. tropicalis* více patogenní ve střevě, a to především u onkologických pacientů. Také morbidita a mortalita je vyšší. (Kothavade a kol. 2010; Kontoyiannis a kol. 2001; Silva a kol. 2012)

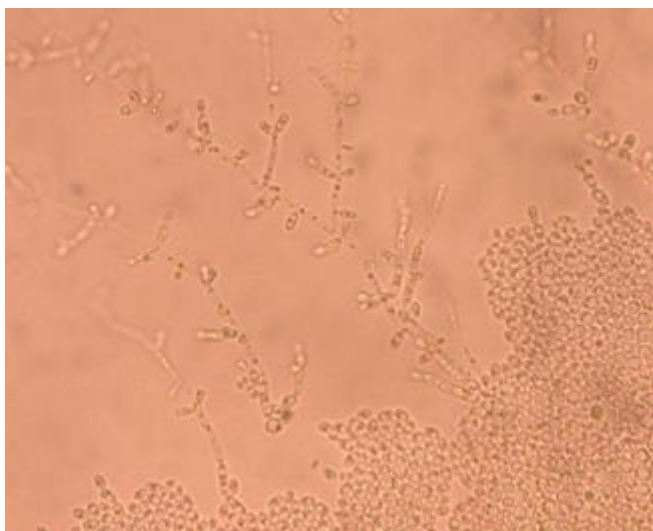
Izolované kvasinky jsou obecně náchylné ke všem antifungálním látkám. Nicméně obecně rostoucí používání flukonazolu vede ke zvýšenému riziku rezistence, je proto vhodné provádět test citlivosti kmenů. Vzácně byly popsány případy rezistence na echinokandin a amfotericin B. (Leading international fungal education [online]; Kothavade a kol. 2010)



Obrázek 8: Kolonie *Candida tropicalis* kultivovaná na Sabouraudově glukosovém agaru a chromogenním kandidovém agaru (Biolife)

Zdroj: *Candida tropicalis*. In: *Microbiologyinpictures* [online]. Microbiologyinpictures. [citováno 18. 8. 2018].

Dostupné z: <https://bit.ly/2o4uPWW>



Obrázek 9: Mikroskopický vzhled *Candida tropicalis*

Zdroj: *Candida tropicalis*. In: *Life-worldwide* [online]. Leading international fungal education. [citováno 18. 8. 2018].

Dostupné z: <http://www.life-worldwide.org/assets/uploads/images/Candida%20tropicalis.jpg>

3.2.3 Rod *Aspergillus*

Zástupci rodu *Aspergillus* jsou celosvětově rozšířené (hojněji v subtropických a tropických oblastech), všudypřítomné a vzduchem šířitelné saprofytické houby. Hrají významnou roli při recyklaci environmentálního uhlíku a dusíku. Lidé a zvířata konstantně inhalují několik stovek konidií této houby denně. Vyskytují se téměř všude, od travních porostů až po vysokohorská stanoviště, v půdě, vodě, ovzduší a také v kontaminovaných potravinách. Často bývá izolován z burských oříšků a cereálií. Rod *Aspergillus* zahrnuje téměř 200 druhů, z toho méně než dvacet může způsobovat onemocnění člověka. (Latgé 1999; Dagenais a kol. 2009; Miniatlas mikroorganismů [online])

Houby kmene *Aspergillus* způsobují širokou škálu lidských onemocnění v závislosti na imunitním stavu hostitele. Primárním lidským patogenem z rodu *Aspergillus* je *A. fumigatus*, dalšími významnými lidskými patogeny jsou *A. flavus*, *A. terreus*, *A. niger*. (Latgé 1999; Dagenais a kol. 2009)

3.2.3.1 *Aspergillus fumigatus*

Aspergillus fumigatus je termofilní organismus schopný růstu i při 55 °C, přičemž optimum pro jeho růst je okolo 40 °C. (Miniatlas mikroorganismů [online]; Latgé 1999)

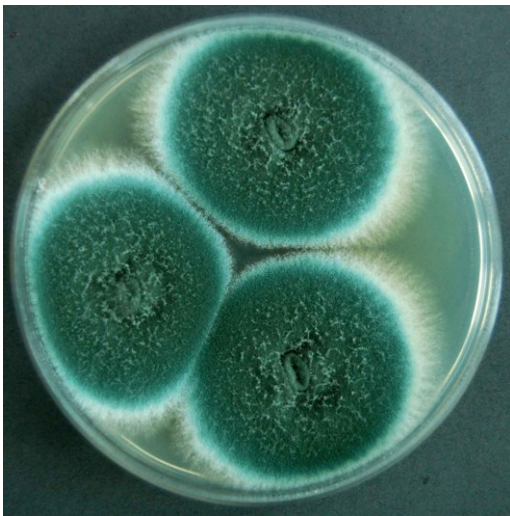
Identifikace *A. fumigatus* je založena hlavně na morfologii konidií a konidioforů. Konidiofory jsou zhruba 200–400 µm dlouhé s hladkou stopkou. Měchýřek je hruškovitého nebo kyjovitého tvaru o průměru 20–30 µm. Konidie mají zhruba 2,5–3,5 µm v průměru, jsou kulovité, jemně bradavičnaté. U starších konidioforů bývají konidie slepeny do sloupců. Pro houbu jsou typické modrozelené sametové kolonie. (Miniatlas mikroorganismů [online]; Latgé 1999)

A. fumigatus produkuje množství mykotoxinů, např. fumitremorginy, verruculogen a gliotoxin (imunosupresivní účinky). (Miniatlas mikroorganismů [online])

Infekce, tzv. aspergilózy, způsobené touto houbou zasahují zejména plíce, ty jsou také hlavním vstupem houby do organismu. Nerespirační infekce jako infekce kůže, peritonea, ledvin či kostí nejsou příliš obvyklé. Rizikovou skupinou jsou především imunodeficientní jedinci. Nejvíce ohroženi jsou pacienti s hematologickými

malignitami, po transplantacích, s prodlouženou terapií kortikosteroidy a geneticky podmíněnou imunodeficiencí. Míra úmrtnosti se pohybuje od 40 % do 90 % u vysoce rizikových pacientů. (Latgé 1999; Dagenais a kol. 2009)

Byla zaznamenána rezistence vůči itrakonazolu. Podle studie vedené Susan J. Howardovou z roku 2009 se výskyt rezistence po roce 2008 výrazně zvýšil, do roku 2004 byla zaznamenána s četností 1 %, po roce 2008 se pak jednalo o 8 %. Zkřížená rezistence existuje mezi vorikonazolem a posakonazolem. Vzácná je pak rezistence vůči echinokandinům. (Leading international fungal education [online]; Howard a kol. 2009)



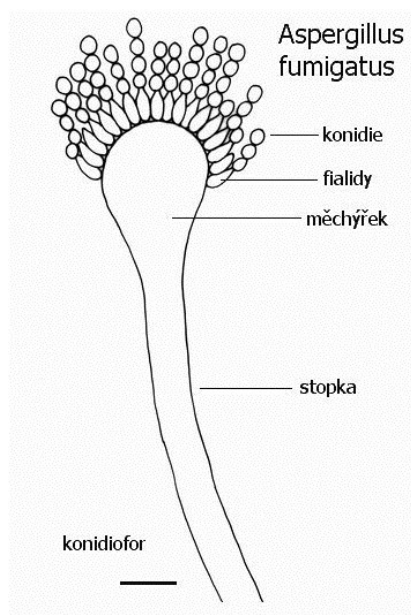
Obrázek 10: Kolonie *Aspergillus fumigatus* kultivované na CY-agaru

Zdroj: *Aspergillus fumigatus*. In: *Fungi and Lichens of Great Britain and Ireland* [online]. Fungi and Lichens of Great Britain and Ireland. [citováno 18. 8. 2018]. Dostupné z: <http://fungi.myspecies.info/file-colorboxed/941>



Obrázek 11: Mikroskopický vzhled *Aspergillus fumigatus*, 400x

Zdroj: *Aspergillus fumigatus*. In: Thunderhouse [online]. Fun with Microbiology. [citováno 18. 8. 2018]. Dostupné z: <https://bit.ly/2LpvKu7>



Obrázek 12: *Aspergillus fumigatus* – popis konidioforu

Zdroj: *Aspergillus fumigatus*. In: *MiniAtlas Mikroorganismů* [online]. Vysoká škola chemicko-technologická v Praze [citováno 18. 8. 2018]. Dostupné z: <https://bit.ly/2NhSkXz>

3.2.3.2 *Aspergillus flavus*

Aspergillus flavus tvoří rychle rostoucí žlutozelené až hnědé sametové kolonie se zlatým červenohnědým okrajem. Od jiných druhů jej odlišuje spektrum produkovaných sekundárních metabolitů. (Leading international fungal education [online], Hedayati a kol. 2009)

Konidofory se vyznačují bradavičnatou stopkou a délkou 400–1000 µm. Známé konidiofory uniseriální, na jejichž měchýřku vyrůstá pouze jedna vrstva fialid a biseriální, kde je měchýřek pokryt vrstvou metul a vrstvou fialid. Měchýřek je kulovitý, o velikosti 25–45 µm, asi ze tří čtvrtin je pokryt vrstvou metul a fialid. Konidie jsou kulovité, jemně bradavičnaté, ve velikosti 3,5–5 µm. (Leading international fungal education [online])

Opět se jedná o termofilní organismus tentokrát s teplotním optimem okolo 33 °C, růst je možný až do teplot okolo 50 °C. (Leading international fungal education [online])

A. flavus produkuje mykotoxiny nazývané aflatoxiny. Nejvýznamnější jsou aflatoxin B1, B2, G1 a G2. Aflatoxiny jsou nebezpečné pro svoji akutní toxicitu, karcinogenitu, mutagenitu a teratogenní vlastnosti. Pořadí toxicity je AFB1 > AFG1 > AFB2 > AFG2. Obzvláště důležitý je pak aflatoxin B1, a to pro svou silnou hepatokarcinogenitu. Za zmínku stojí i produkce kyseliny cyklopiazonové, která může poškozovat gastrointestinální trakt, ledviny, játra i další orgány. (Toxikon [online]; Hedayati a kol. 2009)

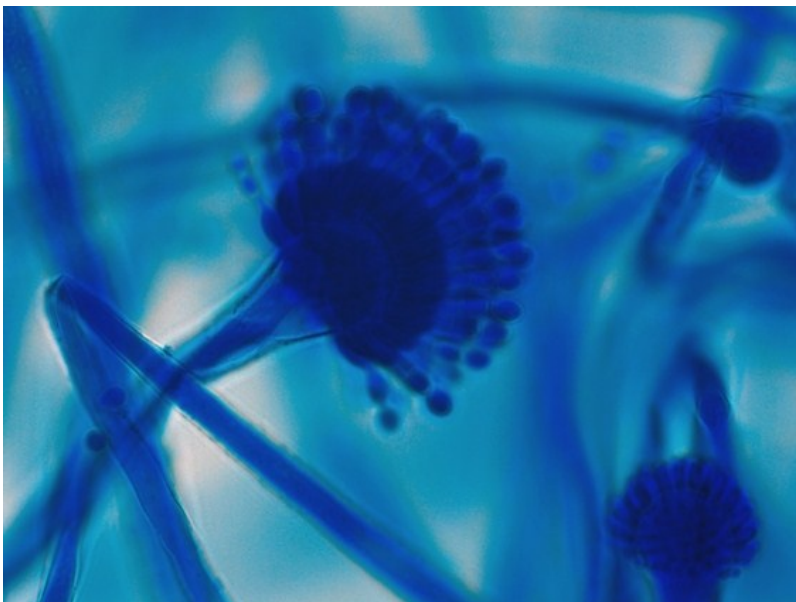
A. flavus je druhou nejčastější příčinou aspergilózy po *A. fumigatus*. *A. flavus* oproti *A. fumigatus* uvolňuje spory větší velikosti, což podporuje jejich ukládání v horních cestách dýchacích. (Hedayati a kol. 2009)

Stále častěji se setkáváme se získanou rezistencí na amfotericin B. Izoláty jsou však většinou citlivé k echinokandinům a triazolovým antimykotikům. Ačkoliv i zde byly zaznamenány případy rezistence, procento těchto případů zatím zůstává nízké. (Leading international fungal education [online])



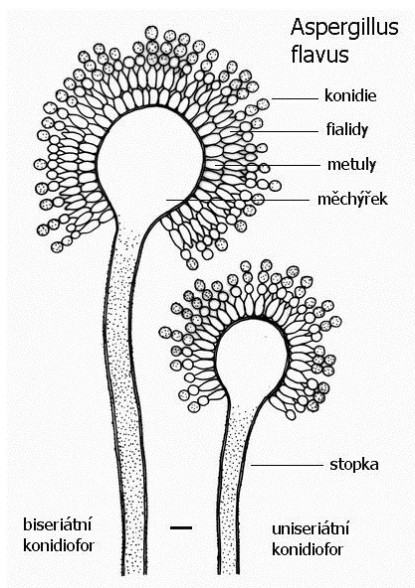
Obrázek 13: Kolonie *Aspergillus flavus* kultivované na CY-agaru

Zdroj: *Aspergillus flavus*. In: *Fungi and Lichens of Great Britain and Ireland* [online]. Fungi and Lichens of Great Britain and Ireland. [citováno 18. 8. 2018]. Dostupné z: <http://fungi.myspecies.info/file-colorboxed/937>



Obrázek 14: Mikroskopický vzhled *Aspergillus flavus*, 1000x

Zdroj: *Aspergillus flavus*. In: *Thunderhouse* [online]. Fun with Microbiology. [citováno 18. 8. 2018]. Dostupné z: <https://bit.ly/2MxGQCS>



Obrázek 15: *Aspergillus flavus* – popis konidioforu

Zdroj: *Aspergillus flavus*. In: *Miniatlas Mikroorganismů* [online]. Vysoká škola chemicko-technologická v Praze [citováno 18. 8. 2018]. Dostupné z: <https://bit.ly/2wnXJoD>

3.2.4 Rod *Absidia*

3.2.4.1 *Absidia corymbifera*

Absidia corymbifera je také známá pod názvem *Lichtheimia corymbifera*. Jedná se o celosvětově rozšířený druh. Najít ji můžeme hlavně v půdě, kde rozkládá zbytky rostlin a potravin. (Leading international fungal education [online])

Kolonie rychle rostou, mohou dosahovat výšky až 1,5 cm. Nejdříve jsou bílé, později šedé. (Mycology Adelaide 2017 [online])

Vyvolává infekci zvanou mukormykóza (zygomykóza). Jedná se o oportunní infekci s vysokou mírou mortality (až 80 %). Infekcí jsou ohroženi především imunosuprimovaní pacienti s hematologickým onemocněním a pacienti s diabetickou ketoacidózou. Infekce je přenášena zejména respirační cestou, příp. kožní cestou u traumatických poranění. (Paterson a kol. 2000; Leading international fungal education [online])

Existuje hned několik forem mukormykózy. Rhinocerebrální forma postihuje především diabetiky s acidózou, pulmonální forma je pak nebezpečná pro pacienty s hematologickými malignitami, po transplantaci kostní dřeně a po dlouhodobé léčbě kortikosteroidy. Spíše vzácná je gastrointestinální forma u nedonošených dětí

a podvyživených pacientů. (Paterson a kol. 2000; Leading international fungal education [online])

Plíseň má přirozenou rezistenci vůči flukonazolu, ketokonazolu, vorikonazolu a echinokandinům. Je citlivá vůči amfotericinu B a posakonazolu. (Leading international fungal education [online])



Obrázek 16: Kolonie *Absidia corymbifera* kultivované na Sabouraudově glukosovém agaru

Zdroj: *Absidia corymbifera*. In: Thunderhouse [online]. Fun with Microbiology. [citováno 18. 8. 2018]. Dostupné z: <http://thunderhouse4-yuri.blogspot.com/2012/02/absidia-corymbifera-lichtheimia.html>



Obrázek 17: Mikroskopický vzhled *Absidia corymbifera*, 400x

Zdroj: *Absidia corymbifera*. In: Thunderhouse [online]. Fun with Microbiology. [citováno 18. 8. 2018]. Dostupné z: <https://bit.ly/2BwRN2i>

3.2.5 Rod *Trichophyton*

Zástupce rodu *Trichophyton* řadíme mezi dermatofyty. Jeho přirozeným stanovištěm je půda, člověk a zvířata jako kočky, psi a krysy. Právě podle prostředí, ve

kterém se nachází, můžeme rod rozdělit na antropofilní (*T. rubrum*, *T. interdigitale*, *T. tonsurans*), zoofilní (*T. verrucosum*), geofilní (*T. ajelloi*, *flavescens*, *gloriae*) a kosmopolitní druhy. (MSGERC Doctor Fungus [online]; Leading international fungal education [online])

3.2.5.1 *Trichophyton interdigitale*

Trichophyton interdigitale je keratofilní vláknitá houba. Společně se zástupci rodů *Epidermophyton* a *Microsporum* způsobují infekce zvané dermatofytózy. *T. interdigitale* je druhou nejčastější příčinou dermatofytózy po *T. rubrum*. Hlavním mechanismem virulence tohoto druhu hub je schopnost napadnout keratinizované tkáně jako jsou vlasy, kůže a nehty a následně je rozkládat. Mimo jiné tak připravují vhodné prostředí pro jiné houby, které samy tuto schopnost nemají. (MSGERC Doctor Fungus [online]; Leading international fungal education [online]; Živa [online])

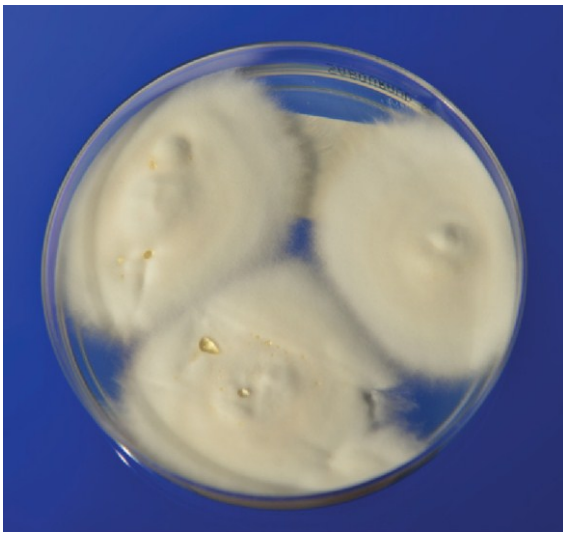
Z hlediska epidemiologického nejvíce dermatomykózy způsobují dermatofyty. Dermatomykózy způsobené nedermatofytickými houbami tvoří v ČR asi jen jednu desetinu ze všech povrchových mykóz. Výskyt dermatofytóz v České republice je okolo 30 %, u osob starších 65 let je pak dokonce přes 60 %. Původci onemocnění se v regionech liší, nicméně hlavně ve velkých městech převládají infekce způsobené *T. rubrum*. V zemědělských oblastech je druhové spektrum rozmanitější. Jednoznačně nejvíce nákaz způsobují druhy antropofilní, nicméně část infekcí mají na svědomí i dermatofyty zoofilní a geofilní. Zoofilní dermatofyty se na člověka nejčastěji přenáší z domácích a hospodářských zvířat, méně často je pak můžeme získat od zvířat volně žijících. Hlavním zdrojem nákazy jsou pes, kočka a hlodavci (morče, činčila, křeček). Zoofilní dermatofyty u člověka způsobují výraznou zánětlivou reakci a léze mívají kulatý tvar. (Živa [online])

Trichophyton interdigitale tvoří obvykle ploché, bílé až krémové kolonie se žlutým pigmentem a povrchem práškového vzhledu. Spodní strana je oranžová až žlutá. (MSGERC Doctor Fungus [online]; Leading international fungal education [online])

Morfologicky je pro rod *Trichophyton* typický vývoj makro- a mikrokonidií s hladkými stěnami. Makrokonidie mají rozměry 4–8 x 8–50 µm a zpravidla jsou neseny bočně přímo na hyfách nebo na krátkých pediklech. Makrokonidie u mnoha druhů

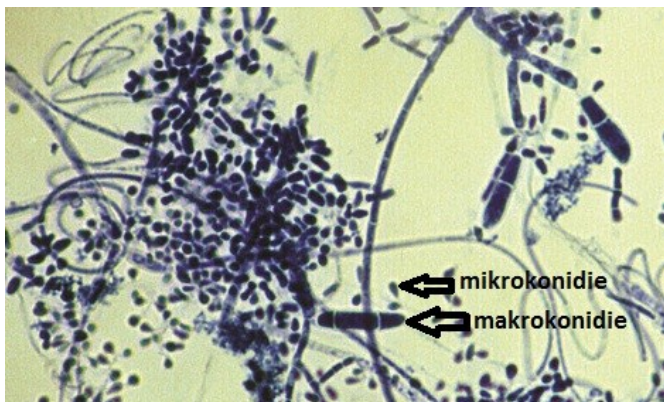
chybí nebo je jich málo. Mikrokonidie jsou sférického, hruškovitého nebo nepravidelného tvaru s rozměry 2–3 x 2–4 μm. Prostřednictvím konidií je možno rozlišit jednotlivé druhy hub. Přítomnost mikrokonidií odlišuje rod *Trichophyton* od rodu *Epidermophyton*. Hladká, přisedlá makrokonidie jej odlišuje mimo jiné od rodu *Microsporum*. (Mycology Adelaide 2017 [online])

Trichophyton interdigitale je rezistentní vůči působení flukonazolu. Za optimální terapeutický prostředek je považován terbinafin. *T. interdigitale* je citlivý i vůči dalším antimykotikům jako ketokonazol, klotrimazol, itrakonazol, naftifin a amorolfin. (Leading international fungal education [online])



Obrázek 18: Kolonie *Trichophyton interdigitale* kultivované na Sabouradově dextrosovém agaru

Zdroj: *Trichophyton interdigitale*. In: Semantic Scholar [online]. Semantic Scholar. [citováno 18. 8. 2018]. Dostupné z: <https://bit.ly/2LeEumE>



Obrázek 19: Mikroskopický vzhled *Trichophyton interdigitale*, 400x

Zdroj: *Trichophyton interdigitale*. In: *Mycology Adelaide* [online]. The University of Adelaide. [citováno 18. 8. 2018].

Dostupné z: <https://mycology.adelaide.edu.au/images/trich-int-micro1.jpg>

3.3 Základní rozdělení antimykotik

Antimykotika jsou látky specificky působící na houbové organismy – kvasinky a vláknité houby. Jejich původ může být mikrobiální i syntetický. Doposud bylo popsáno přibližně sto tisíc druhů kvasinek a hub, z nich je pro člověka patogenních asi 300. Kvůli tomu, že buňky hub jsou eukaryotní, zaostává významně výzkum antifungálních sloučenin za antibakteriálními. Většina antimykotik má široké spektrum účinku, často zasahující i některé bakterie. Kromě níže zmíněného dělení dle struktury, můžeme antimykotika rozdělit také dle způsobu aplikace na systémová a lokální. (Doležal a kol. 2006; Diamantová 2003)

3.3.1 Polyenová antimykotika

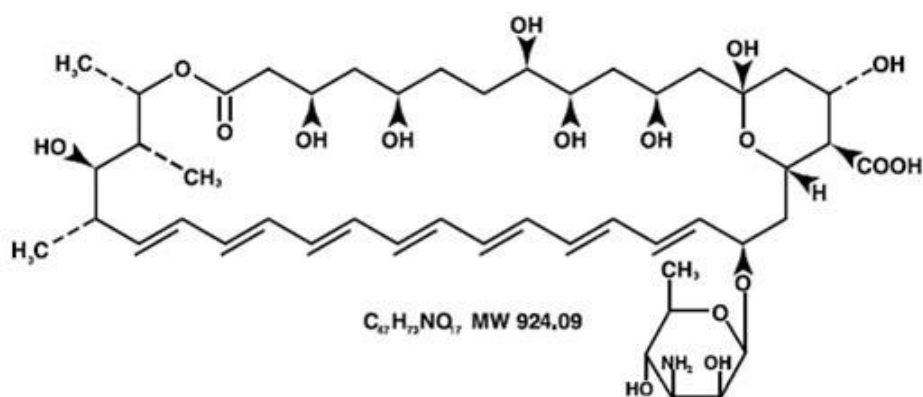
Polyenová antimykotika jsou produktem vláknitých hub rodu *Streptomyces*. Na konci 50. let minulého století byla uvedena do praxe jako vůbec první systémová antimykotika. Mechanismus účinku těchto látek spočívá ve vazbě 26–40členného makrocyclického laktonového kruhu na ergosterol membrány. Vytvoří spolu komplex, následně pak dochází ke vzniku „póru“, čímž je narušena bariérová funkce membrány a dojde ke ztrátě sacharidů, bílkovin, nukleotidů a iontů. Makrocyclický laktonový kruh je tvořen hydrofilním polyhydroxylovým řetězcem a lipofilním „polyenovým“ uhlovodíkovým fragmentem. Podle velikosti konjugovaného systému dvojných vazeb (chromofor) rozděluje skupinu na tetraeny (nystatin, natamycin), pentaeny, hexaeny a heptaeny (amfotericin B). Hydrofilní část molekuly je tvořena glykosidicky navázaným aminocukrem (mykosamin), dále obsahuje volnou karboxylovou skupinu. Přesto jsou tato antimykotika téměř nerozpustná ve vodě. (Doležal a kol. 2006; Buchta a kol. 1998)

Tyto látky mají vůbec nejširší spektrum účinnosti, zahrnují všechny významné zástupce patogenních hub, dále také některé prvoky (*Naegleria*, *Leishmania*). Po perorálním podání se nevstřebávají a po parenterálním jsou značně toxická. Mohou způsobovat alergie, anémie a v neposlední řadě poruchy funkce jater a ledvin. Řadíme sem nystatin, natamycin, amfotericin B. (Doležal a kol. 2006; Buchta a kol. 1998)

Amfotericin B se jako jediný z polyenů používá jako systémové antimykotikum. Dodnes se jedná o tzv. zlatý standard u život ohrožujících mykóz – aspergilózy, mukormykózy, kryptokokózy a endemické mykózy. Používá se často jako úvod do terapie ještě před výsledky kultivačních testů. Další možnost použití je jako profylaxe u pacientů s narušeným imunitním systémem (neutropenie, imunosuprese). (Doležal a kol. 2006; Buchta a kol. 1998)

Hlavní nevýhodou intravenózní formy amfotericinu B je poměrně vysoká toxicita. Jednak s infuzí spojené projevy akutní toxicity – horečka, zimnice, spasmy, hypotenze, ale především toxicita chronická v podobě rizika poškození ledvin či anémie. Nežádoucím účinkům se lze vyhnout použitím lékových forem amfotericinu B na lipidovém nosiči v podobě liposomálního amfotericinu B, lipidového komplexu, nebo koloidní disperze. Nicméně problémem tohoto řešení jsou vysoké náklady na léčbu. (Rozsypal 2008; Doležal a kol. 2006)

Nystatin (produkt kmene *Streptomyces noursei*) a natamycin (produkt aktinomycety *Streptomyces natalensis*) se používají topicky. Nystatin nachází uplatnění především v terapii povrchové slizniční a kožní kandidózy, vaginální kandidové infekce, střevní a ústní kandidózy (soor). Natamycin se pak používá při léčbě keratomykóz, zánětu vnějšího zvukovodu a angulární cheilitidy. (Doležal a kol. 2006)



Obrázek 20: Amfotericin B

Zdroj: Amfotericin B. In: *Drugs* [online]. Micromedex. [citováno 18. 8. 2018]. Dostupné z: <https://bit.ly/2MuMk1e>

3.3.2 Azolová antimykotika

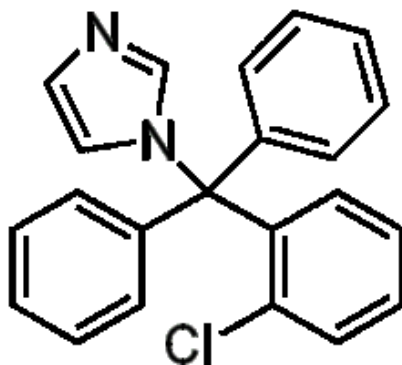
Azolová antimykotika jsou syntetické deriváty s širokým fungistatickým spektrem účinku. Jednotlivé látky mají podobný farmakologický profil a často i

podobný terapeutický efekt. Podle počtu atomů dusíku v heterocyklu je dělíme na imidazoly (dva dusíky) a triazoly (tři dusíky). Novější triazoly mají vyšší stupeň specifity, širší spektrum, vyšší potenci a méně nežádoucích účinků. Mechanismus účinku spočívá v zablokování demethylace lanosterolu na ergosterol inhibicí mykotického P450 enzymu 14- α -demethylasy. Díky tomu se sníží tvorba ergosterolu a naruší se funkce membrán, což vede k zástavě růstu buněk. (Buchta a kol. 2008, Horák 2011, Lincová a kol. 2007)

Spektrum účinku je velmi široké a zahrnuje: plísně – *Aspergillus* sp.; kvasinky – *Candida* sp., *Cryptococcus neoformans*, *Mallasezia*; dimorfní houby – *Histoplasma*, *Blastomyces*; dermatofyty – *Epidermophyton*, *Microsporum*, *Trichophyton*. Dále je lze použít na *Plasmodium falciparum*, *Leishmania* spp., *Trypanosoma cruzii* a byla zjištěna i účinnost na některé grampozitivní bakterie a enterokoky. (Buchta a kol. 2008, Horák 2011, Lincová a kol. 2007)

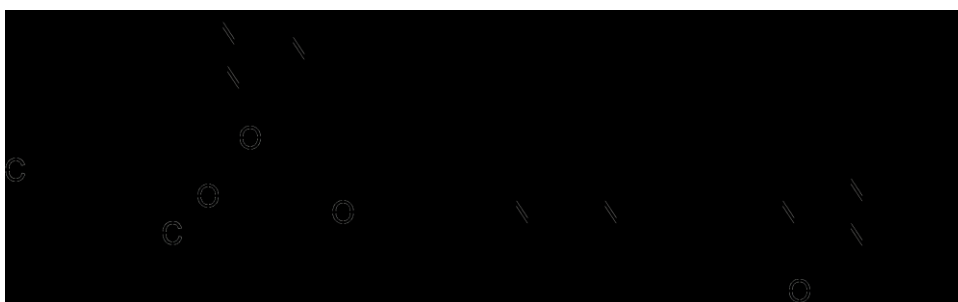
Azoly se používají lokálně i systémově. Všechny imidazoly (klotrimazol, bifonazol, mikonazol, ekonazol) kromě ketokonazolu se používají lokálně. Triazolové deriváty (itrafonazol, flukonazol, vorikonazol, posakonazol, terkonazol) se s výjimkou terkonazolu aplikují systémově – perorálně nebo intravenózně. (Rozsypal 2008)

S užíváním azolových antimykotik jsou spojeny i některé nežádoucí účinky. Obecně se jedná o hepatotoxicitu a teratogenitu, dále byl u ketokonazolu při dlouhodobém užívání zaznamenán antiandrogenní efekt a z něj plynoucí gynekomastie, snížené libido, impotence a poruchy menstruace. Itrakonazol prodlužuje QT interval a může tak při kombinaci s léky s obdobným účinkem způsobit až srdeční selhání. U vorikonazolu může dojít k poruchám zraku. Itrakonazol a flukonazol jsou inhibitory cytochromu P450, s čímž je nutno počítat při terapii polymorbidních pacientů. (Rozsypal 2008)



Obrázek 21: Klotrimazol

Zdroj: Klotrimazol. In: *Wikipedia* [online]. Wikipedia. [citováno 18. 8. 2018]. Dostupné z: <https://bit.ly/2PAKfhZ>



Obrázek 22: Itrakonazol

Zdroj: Itrakonazol. In: *Wikipedia* [online]. Wikipedia. [citováno 18. 8. 2018]. Dostupné z: <https://bit.ly/2P4o6rk>

3.3.3 Echinokandiny

Echinokandiny jsou nejnovější skupinou antimykotik. Vyznačují se širokým spektrem účinku a dobrou tolerancí. Dnes máme k dispozici tři látky – kaspofungin, anidulafungin a mikafungin, které jsou získávány semisynteticky z produktů fermentace mikroskopických hub *Glarea lozoyensis* (kaspofungin), *Coleophama empedri* (mikafungin) a *Aspergillus nidulans* (anidulafungin). (Haber a kol. 1995; Rozsypal 2008)

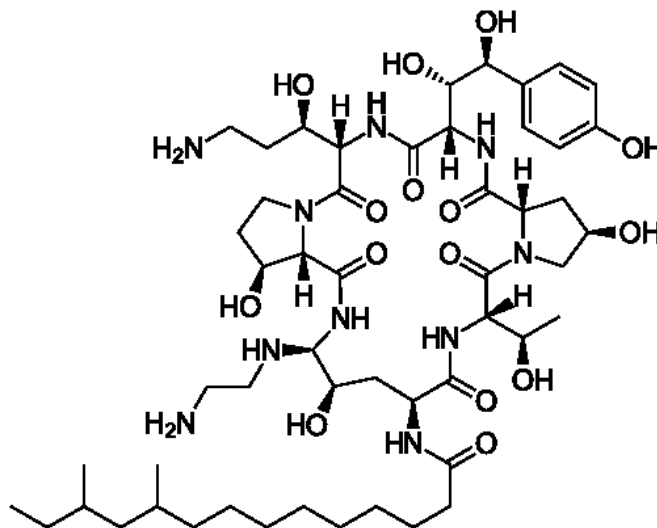
Jedná se o lipoproteiny s velkou molekulovou hmotností lišící se od sebe strukturou postranního řetězce, a právě ta je stěžejní pro jejich antifungální aktivitu (tvoří interkalační vazby s fosfolipidovou dvojvrstvou buněčné membrány). Po chemické stránce mluvíme o cyklických hexapeptidech s *N*-acyl lipidovým postranním řetězcem. Mechanismus účinku vychází ze zablokování β -1,3-*D*-glukan syntasy (kódované FKS genem), což vede k inhibici syntézy buněčné stěny, narušení její

funkce a ke smrti buňky. Účinek je u kandid fungicidní, u plísní fungistatický. (Haber a kol. 1995; Rozsypal 2008)

Spektrum účinku je široké. Patří do něj kandidy včetně kandid rezistentních na triazoly, aspergily, cystická forma *Pneumocystis jiroveci*, nejsou ale účinné proti *Cryptococcus neoformans* a zygomycetám, které neobsahují zásadní β -1,3-*D*-glukan. Echinokandiny jsou schopné zabránit tvorbě biofilmu (tvořen zpravidla *Candida albicans* a *Candida parapsilosis*), čímž jsou schopny zabránit kolonizaci zavedených katétrů, chlopní a jiných umělých povrchů. (Haber a kol. 1995)

Kvůli velké molekulární hmotnosti jsou echinokandiny podávány intravenózně. Mají dlouhý biologický poločas, který umožňuje jejich podání jednou denně. (Haber a kol. 1995)

Z pohledu terapeutického využití se jedná o antimykotika druhé řady, což v praxi znamená jejich podání až při selhání předchozí léčby nebo intoleranci amfotericinu B či azolů. Indikací jsou invazivní kandidóza, kandidémie, profylaxe kandidových infekcí (při transplantaci kostní dřeně), invazivní aspergilóza. Výhodou je nízký výskyt nežádoucích účinků. (Haber a kol. 1995)



Obrázek 23: Caspofungin

Zdroj: Caspofungin. In: *Wikipedia* [online]. Wikipedia. [citováno 18. 8. 2018]. Dostupné z: <https://bit.ly/2MvLAsv>

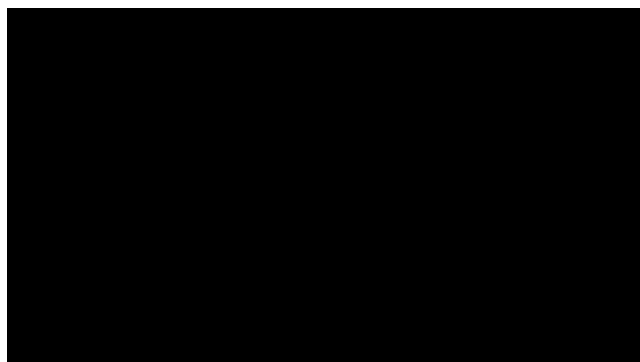
3.3.4 Allylaminy

Jedná se o syntetické látky, skupina zahrnuje terbinafin a naftifin. Mechanismus účinku vychází z narušení syntézy ergosterolu, a to v dřívější fázi než je tomu u azolů.

Dochází k inhibici skvalenepoxidasy a akumulaci skvalenu, sníží se produkce ergosterolu – to má za následek toxický účinek na mykotické buňky. (Rozsypal 2008; Buchta a kol. 1998)

Allylaminy působí fungicidně na dermatofyty – *Trichophyton* sp., *Epidermophyton floccosum*, *Microsporum*. Fungistaticky pak působí na kvasinky – *Candida* sp., *Malassezia* sp. Nežádoucí účinky se projeví jen u malého množství pacientů. Mezi běžné patří nauzea a dyspepsie. Z vážnějších pak může dojít k poškození nebo ztrátě chuti. Vzácné jsou hepatální léze, trombocytopenie, granulocytopenie. (Rozsypal 2008, Buchta a kol. 1998)

Terbinafin je používán v systémové léčbě onychomykóz. Topicky se používají oba preparáty zejména k léčbě tinea pedis a onychomykóz. (Hendrychová a kol. 2011)



Obrázek 24: Terbinafin

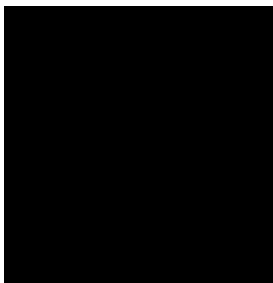
Zdroj: Terbinafin. In: *Wikipedia* [online]. Wikipedia. [citováno 18. 8. 2018]. Dostupné z: <https://bit.ly/2BEsR99>

3.3.5 Antimetabolity

Mezi antimetabolity řadíme fluorovaný pyrimidinový derivát flucytosin. Flucytosin byl původně vyvinut jako antineoplastikum. Jeho účinná forma je 5-fluorouracil, ten vzniká konverzí flucytosinu v houbové buňce a působí jako falešná base při výstavbě nefunkční nukleové kyseliny. Flucytosin působí fungistaticky. (Rozsypal 2008, Doležal a kol. 2006)

Má úzké spektrum účinku zasahující především kandidy a kryptokoky, částečně působí i na aspergily a některé původce subkutánních mykóz. Problémem je snadný vývoj rezistence, proto je kontraindikován v monoterapii. Používá se v kombinaci s amfotericinem B nebo triazoly. (Rozsypal 2008, Doležal a kol. 2006)

Výhodou flucytosinu je dobrá absorpce po perorálním podání a dobrá distribuce do tkání. Používá se k léčbě systémových mykóz v kombinacích s dalšími antimykotiky. Existuje zde synergismus s amfotericinem B a azoly. Aktuálně není v České republice registrován. (Rozsypal 2008; Buchta a kol. 2008)



Obrázek 25: Flucytosin

Zdroj: Flucytosin. In: *Wikipedia* [online]. Wikipedia. [citováno 18. 8. 2018]. Dostupné z: <https://bit.ly/2OZpU4N>

3.3.6 Ostatní antimykotika

Obecně sem můžeme zařadit tolnaftát, tolciklát, amorolfin, ciklopirox. (Buchta a kol. 2008)

Tolnaftát a tolciklát řadíme k thiokarbamátovým derivátům. Jedná se o léky používané topicky. V praxi se používají již několik desetiletí. Působí převážně proti dermatofytům, nicméně nedosahují léčebného efektu azolových antimykotik. Představují však levnou variantu zejména u nekomplikovaných t. pedis. Můžeme je najít ve sprejích k ochraně nohou a obuvi. (Buchta a kol. 2008; Doležal a kol. 2006)

Derivát *N*-hydroxypyridonu, ciklopirox, je látka s poměrně širokým spektrem účinku. Mechanismus účinku spočívá v zablokování proteosyntézy, čímž mění permeabilitu membrány a narušuje transport bílkovin do buňky. Má účinek i na některé grampozitivní bakterie, proto je vhodný zejména u chorob se smíšenou etiologií. (Buchta a kol. 2008; Doležal a kol. 2006)

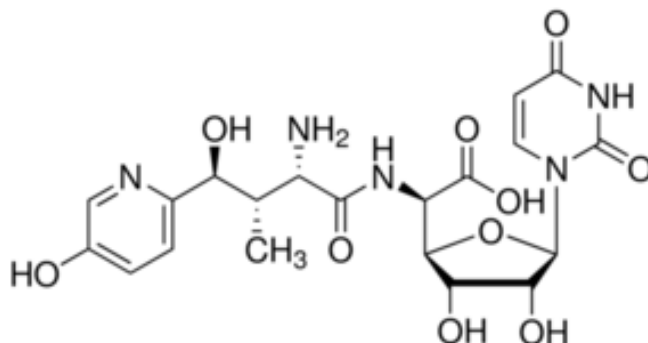
Morfolinový derivát amorolfin je širokospektré chemoterapeutikum působící fungistatickým účinkem. Ten je v tomto případě založen na narušení biosyntézy ergosterolu. Spektrum antimykotického účinku je tvořeno dermatofyty, kvasinkami, dimorfními houbami, z bakterií jsou to aktinomycety. Používá se především k léčbě onychomykóz, vhodné jsou také kombinace se systémovými antimykotiky. (Buchta a kol. 2008; Doležal a kol. 2006)

3.3.7 Nespecifická antimykotika

Tyto látky nezasahují na konkrétním místě metabolismu hub, ale mají obecně fungistatický účinek. Nejčastějším mechanismem účinku je denaturace bílkovin. Jedná se o kyselinu undecylenovou v indikaci kožních mykóz, jod-povidon k léčbě plísňí, tetraboritan sodný působící proti vaginálním kandidózám, benzydamin na záněty dutiny ústní, při orální infekci *C. albicans* chlorhexidin, u slizničních kandidóz potom borax-glycerin nebo genciánová violeť. (Hendrychová a kol. 2011)

3.3.8 Antimykotika v preklinickém a klinickém výzkumu

Polyoxiny a nikkomyliny jsou příbuzné látky typu peptidových nukleosidů. Jsou produktem rodu *Streptomyces*. Mechanismem účinku je kompetitivní inhibice isoenzymu chitinsynthasy. Polyoxiny jsou cyklické dipeptidy nebo tripeptidy, nikkomyliny jsou necyklické peptidové nukleosidy. Nadějnou látkou pro zavedení do praxe je nikkomylin Z. (Doležal 2002.; Doležal a kol. 2006)



Obrázek 26: Nikkomycin Z

Zdroj: Nikkomycin Z. In: *Sigma-Aldrich* [online]. Sigma-Aldrich. [citováno 18. 8. 2018]. Dostupné z: <https://bit.ly/2OVVPmC>

Sordariny jsou látky izolované z kmene *Sordaria araneosa*. Z chemického hlediska se jedná o tetracyklický diterpenický aglykon sordaricin, jednotlivé látky se od sebe liší složením sacharidové části molekuly. Mechanismus účinku spočívá v inhibici translace u hub. Mají vysokou fungicidní aktivitu proti dimorfním endemickým patogenům, především *Histoplasma capsulatum*. (Doležal 2002.; Doležal a kol. 2006)

Nevýhodou echinokandinů je možné snížení citlivosti k nim způsobené mutací ve dvou specifických oblastech FKS genů známých jako „hot spots“ (HS) 1 a 2. Dochází tak k alteraci v afinitě k 1,3- β -glukan syntase. Užívání také omezuje nutnost denního

intravenózního podání. Jistou nadějí zde představuje látka enfumifungin objevená společností Merck. Podobně jako echinokandiny je inhibítoem 1,3- β -glukan syntasy (GS) buněčné stěny, nicméně strukturou se obě látky liší. Jedná se o triterpenický glykosid izolovaný při fermentaci *Hormonema* sp. s potenciální aktivitou vůči rodu *Candida* spp. a *Aspergillus* spp. Jeho polysyntetický perorálně dostupný derivát MK-3118 se nyní nachází ve třetí fázi klinického testování. Účinnost MK-3118 vůči kmenům s rezistencí na echinokandiny zprostředkovanou mutací FKS genů (především kmeny *Candida albicans* a *Candida glabrata*) mimo jiné potvrzuje i studie Cristiny Jiménez-Ortigosa publikovaná v roce 2013 v New Jersey. (Jiménez-Ortigosa a kol. 2014, Roemer a kol. 2014; Clinical Trials 2018 [online])

S možným řešením problému každodenního injekčního podání echinokandinů přišla společnost Cidara Therapeutics (USA), která vyvinula echinokandin CD101 (biafungin, dříve SP3025) se strukturální modifikací poskytující poločas rozpadu přesahující 80 hodin. To umožňuje méně časté intravenózní podání, např. jen jednou týdně. Studie *in vitro* prokázaly silnou aktivitu proti *Candida* spp. a *Aspergillus* spp. s nízkou četností mutace v FKS1 a FKS2 ve srovnání např. s kaspofunginem. Látka se prozatím dostala do fáze II klinických studií účinnosti proti invazivní kandidóze. (Wiederhold 2017; Clinical Trials 2018 [online])

Další inhibitor 1,3- β -glukan syntasy, který je v současné době vyvinut pro orální a intravenózní podání, je SCY-078. Mechanismus působení SCY-078 je stejný jako u echinokandinů a CD101, nicméně strukturně jsou tyto sloučeniny odlišné. Látka se absorbuje z trávicího traktu, poskytuje tedy výhodu perorálního podávání. Byla prokázána *in vitro* aktivita proti různým druhům *Candida* spp., včetně některých izolátů s mutacemi v genu FKS1 a FKS2, stejně jako proti izolátům rezistentním na flukonazol. I tato látka má za sebou druhou fázi klinického testování u invazivní kandidózy a také druhou fázi klinických studií zaměřenou na zhodnocení bezpečnosti, snášenlivosti, účinnosti a farmakokinetiky SCY-078 ve srovnání s flukonazolem u kandidózní vulvovaginitidy. (Wiederhold, 2017; Clinical Trials 2018 [online])

Dalšími identifikovanými inhibitory GS jsou piperazin-pyridazinové deriváty SCH A–D. Zde za zmínku stojí SCH C, u něj byla *in vitro* prokázána účinnost proti *Candida* spp. i *Aspergillus* spp., stejně tak byla zaznamenána aktivita proti *Cryptococcus*

spp. a dermatofytům. Také u SCH B bylo na infekčním modelu *Candida glabrata* u myši dosaženo účinnosti. (Walker a kol. 2011; Roemer a kol. 2014)

Mezi nadějně látky pro terapii patří také inhibitory biosyntézy glykosylfosfatidylinositolu (GPI) nezbytného pro stavbu buněčné stěny a udržení homeostázy buňky. Proteiny zakotvené v GPI umožňují mikroorganismům přilnout k povrchu mukózy a epitelu hostitele. První inhibitory biosyntézy GPI byly objeveny laboratoří Tsukuba, postupnou optimalizací molekuly byla získána látka E1210 na bázi pyridin-2-aminu. U E1210 byla prokázána aktivita proti *Candida* spp., *Aspergillus* spp. a plísním *Fusarium* a *Scedosporium*. V roce 2012 byla identifikována další struktura s aktivitou proti GPI – fenoxycetanilid. (Roemer a kol. 2014; Tsukahara a kol. 2003)

Další látkou inhibující inositol acyltransferázu a tím zabraňující dozrávání proteinů zakotvených v GPI, tudíž adhezi houby k hostiteli, je AX001 vyvinutá Amplyx Pharmaceuticals (USA). Účinnost *in vitro* byla hlášena proti širokému spektru hub, včetně kvasinek (tj. druhů *Candida*) a plísní (tj. druhů *Aspergillus*, *Fusarium* a *Scedosporium*). (Wiederhold 2017; Chaffin a kol. 2008)

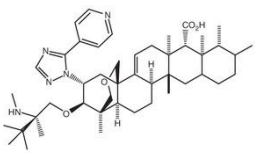
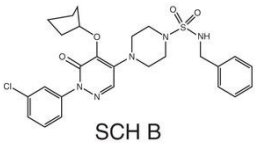
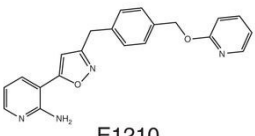
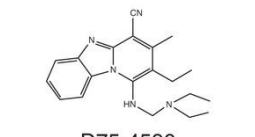
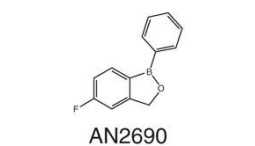
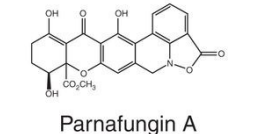
Další třídou molekul cílících na buněčnou stěnu jsou inhibitory syntézy β -1,6-glukanu. GPI spojené proteiny buněčné stěny bývají zesíťovány právě přes β -1,6-glukan. Zde můžeme zmínit látku D75-4590, kde je základem struktury pyridobenzimidazol. Spektrum není tak široké jako u E1210, v podstatě je omezeno pouze na *Candida* spp. (Roemer a kol. 2014; Bräse a kol. 2013; Jiang a kol. 2008)

Strukturou isoxazolidinu se vyznačuje skupina parnafunginů. Tyto přírodní látky inhibují poly(A)polymerasu a tím i syntézu mRNA. Parnafunginy se vyznačují širokospektrální aktivitou proti všem klinicky relevantním druhům *Candida* spp. (včetně izolátů rezistentních na azoly a echinokandiny), působí také proti *Aspergillus* spp. Velmi důležitá je terapeutická účinnost u modelu myši nakažené kandidózou, a to bez jakýchkoliv projevů cytotoxicity. (Roemer a kol. 2014; Bräse a kol. 2013; Jiang a kol. 2008)

AN 2690 je členem nové třídy širokospektrých antifungálních látek benzoxaboroly, které ve své struktuře obsahují neobvyklý prvek – atom bóru. Jedná se o látku inhibující aminoacyl-tRNA syntetasy (AARSs). AARSs hrají klíčovou úlohu při překladu genetického kódu katalyzováním připojení správné aminokyseliny k její příbuzné tRNA. Aminoacylační reakce probíhá ve dvou krocích: tvorbou enzymu

vázaného k aminoacyladenylátu, následným přenosem této aktivované aminokyseliny na 2'- nebo 3'-hydroxyskupinu na 3'-koncovém adenosinu tRNA. Přesnost aminoalkylační reakce tRNA je rozhodující pro zajištění věrnosti genetického kódu. Pro dosažení této přesnosti má mnoho enzymů AARS mechanismus opravy, který hydrolyzuje tRNA aminoacylované nesprávnou aminokyselinou. Leucyl-tRNA syntetasa (LeuRS) je korektura AARS, která má odlišná syntetická (aminoacylační) a opravná aktivní místa. AN2690 inhibuje LeuRS zachycením tRNA^{Leu} v opravném aktivním místě. (Roemer a kol. 2014)

AN 2690 vykazuje vysokou selektivitu vůči *Trichophyton* spp. V současné době má tato látka za sebou již třetí fázi klinického testování. (Roemer a kol. 2014)

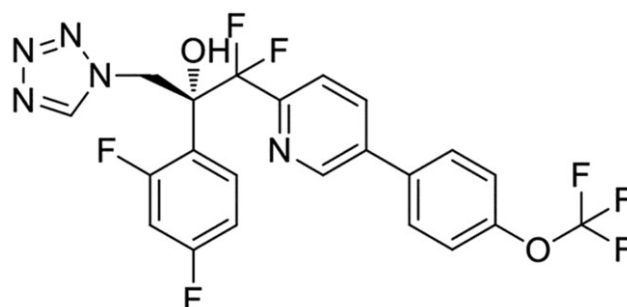
| Structure | Screening method | Mechanism of action | Spectrum of activity |
|--|---|------------------------------------|--|
|  MK-3118/ Enumafungin | Chemical-induced haploinsufficiency screen with <i>S. cerevisiae</i> glucan synthase mutant (<i>fks1Δ/FKS1</i>) | 1,3-β-Glucan synthase inhibitor | <i>Candida</i> spp. <i>Aspergillus</i> spp. |
|  SCH B | Screen of <i>S. cerevisiae</i> strain with efflux pump and cell wall mutations | 1,3-β-Glucan synthase inhibitor | <i>Candida</i> spp. <i>Aspergillus</i> spp. <i>C. neoformans</i> <i>Fusarium</i> <i>Trichophyton</i> |
|  E1210 | Screen of <i>S. cerevisiae</i> for inhibitors of GPI-reporter protein localization | GPI-linked protein acyltransferase | <i>Candida</i> spp. <i>Aspergillus</i> spp. <i>Fusarium</i> <i>Scedosporium</i> |
|  D75-4590 | Screen of <i>S. cerevisiae</i> for inhibitors of GPI-reporter protein localization | 1,6-β-Glucan synthase inhibitor | <i>Candida</i> spp. |
|  AN2690 | Growth-based screen of focused library derived from parent molecule against <i>C. albicans</i> | Leucyl tRNA synthetase inhibitor | <i>Candida</i> spp. <i>Aspergillus</i> spp. <i>C. neoformans</i> <i>Dermatophytes</i> |
|  Parnafungin A | Growth-based screen natural products followed by <i>C. albicans</i> fitness test | Poly(A) polymerase inhibitor | <i>Candida</i> spp. <i>Aspergillus</i> spp. |



Obrázek 27: Struktura, spektrum účinku a mechanismus účinku látek: MK-3118, SCH B, E1210, D75-4590, AN2690 a Parnafunginu A

Zdroj: MK-3118, SCH B, E1210, D75-4590, AN2690, Parnafungin A. In: *Cold Spring Harbor, Perspectives in Medicine* [online]. Cold Spring Harbor, Perspectives in Medicine. [citováno 18. 8. 2018]. Dostupné z: <https://bit.ly/2Nba1Bn>

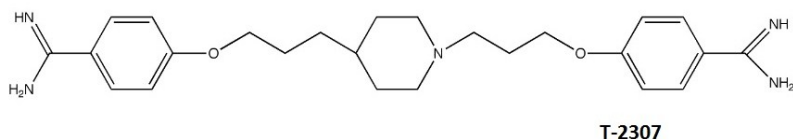
Klinickým omezením azolové řady antimykotik jsou četné interakce mezi látkami vyplývající z inhibice cytochromu P450. CYP450 je metabolizátorem řady léčiv, mimo to je taky řada azolů substrátem enzymu CYP450, proto mohou léčiva inhibující nebo aktivující tento enzym vést ke klinicky významným změnám v koncentraci azolů. S možným řešením tohoto problému přišla společnost Viamet Pharmaceuticals (USA), která nahradila ve struktuře triazol tetrazolem, který se méně váže na aktivní místo enzymu CYP450 a zároveň modifikuje část tohoto enzymu, jež je rozpoznávána substrátem. Do předklinických studií byly zařazeny sloučeniny VT-1129, VT-1161 a VT-1598, z nichž látka VT-1129 dospěla do fáze II klinického zkoušení účinnosti proti kryptokokové meningitidě. (Wiederhold 2017; New drug approvals 2018 [online])



Obrázek 28: VT-1129

Zdroj: VT-1129. In: *New Drug Approvals* [online]. New Drug Approvals. [citováno 18. 8. 2018]. Dostupné z: <https://i2.wp.com/aac.asm.org/content/60/4/2528/F1.large.jpg>

Za zmínku stojí také akrylamid T-2307 strukturálně podobný aromatickým diaminům. Tato látka poškozuje mitochondriální membránu buněk hub. Díky tomu, že je látka přednostně absorbována buňkami hub ve srovnání s buňkami savců, může T-2307 nabízet bezpečnostní výhody oproti jiným aromatickým diaminům. Zaznamenána byla *in vitro* aktivita proti *Candida* spp. včetně izolátů *Candida albicans* a *Candida glabrata* rezistentních na azoly a echinokandiny. Účinnost *in vitro* a účinnost *in vivo* byly také hlášeny proti *Cryptococcus* spp. a *Aspergillus* spp. (Wiederhold 2017; Mitsuyama a kol. 2008; Shibata a kol. 2012)



Obrázek 29: T-2307

Zdroj: T-2307. In: *Aspergillus Et Aspergillosis Website* [online]. Aspergillus Et Aspergillosis Website. [citováno 18. 8. 2018]. Dostupné z: <https://bit.ly/2Leo3Xv>

3.4 Rezistence antimykotik

I přes značné pokroky v diagnóze a terapii jsou invazivní mykotické infekce u pacientů s oslabenou imunitou příčinou významné morbidity a mortality. Právě antifungální rezistence je v terapii těchto vysoce rizikových pacientů velkým problémem. Pro efektivní a rychlou terapii je zásadní správná diagnostika, ale také znalost mechanismů a klinického dopadu rezistence na antimykotika. (Kanafani a kol. 2008; Srinivasan a kol. 2014)

3.4.1 Definice rezistence

Pojem rezistence popisuje necitlivost mikroba k antimikrobiálnímu léčivu ve srovnání s jinými izoláty stejného druhu. Rozlišujeme rezistenci klinickou a laboratorní. Z hlediska klinického o rezistenci mluvíme v případě perzistence nebo progresu infekce navzdory vhodné farmakoterapii. V laboratorním prostředí je rezistence charakterizována prostřednictvím stanovení MIC (minimal inhibitory concentration, minimální inhibiční koncentrace), kdy je sledována inhibice patogenu léčivem v určité koncentraci po stanovenou dobu podle standardních protokolů. MIC je obecně definována jako nejnižší koncentrace, která inhibuje růst patogenu. Ke stanovení MIC se využívají kvantitativní metody stanovení citlivosti, nicméně ne vždy tyto metody korespondují s odpovědí patogenu *in vivo*. Stanovení MIC však nezohledňuje další faktory přispívající k rezistenci jako např. farmakokinetiku, interakce hostitel–patogen, mikrobiální interakce a vliv environmentálních faktorů. (Loeffler a kol. 2003, Shapiro a kol. 2011)

Rezistenci můžeme dále rozdělit na primární a sekundární. Primární neboli přirozená (vnitřní) rezistence je popisována u organismů, které v daném hostiteli ještě

nebyly vystaveny léku. Jako příklad můžeme uvést rezistenci *Candida krusei* na flukonazol a *Cryptococcus neoformans* na echinokandiny. Naproti tomu sekundární rezistence, označovaná také jako získaná, vzniká teprve po opakovaném vystavení dříve citlivých mikroorganismů léčivu. Příkladem je vývoj rezistence vůči flukonazolu u kmenů *Candida albicans* a *Cryptococcus neoformans*. (Kanafani a kol. 2008; Loeffler a kol. 2003)

Vývoj rezistence léčiv lze v reálném čase sledovat dvěma způsoby. První postup zkoumá v průběhu času houbové populace shromážděné od pacienta podstupujícího antifungální léčbu. Klinický přínos tohoto postupu je významný, protože umožňuje identifikaci mutací, které se hromadí v patogenu při výběru léku *in vivo*. Omezením metody je obtížné sledování populační dynamiky, genotypově odlišných infekcí a variabilního selekčního tlaku. (Shapiro a kol. 2011)

Druhá možnost je sledování vývoje rezistence léku u umělých populací v reálném čase. Pozitivem tohoto přístupu je, že experimentální parametry mohou být nastaveny a kontrolovány, experimenty tak mohou být replikovány. Nevýhodou je ale snížený klinický význam těchto populací, protože byly vytvořeny za zjednodušených laboratorních podmínek. Každý z přístupů má v rozpoznávání molekulárních mechanismů vývoje rezistence proti houbám odlišnou roli, nicméně oba jsou pro tuto činnost zásadní. (Shapiro a kol. 2011)

3.4.2 Mechanismy rezistence

3.4.2.1 Polyeny

Příčinou rezistence vůči polyenům je významná změna složení lipidů v plazmatické membráně. Zásadní je funkční změna ve struktuře ergosterolu, kvůli mutaci genů ERG3 a ERG6 dochází ke snížení až úplné absenci ergosterolu. To vede ke snížení afinity amfotericinu B k plazmatické membráně v důsledku nedostatku vazebných míst. (Loeffler a kol. 2003; Mayers a kol. 2009)

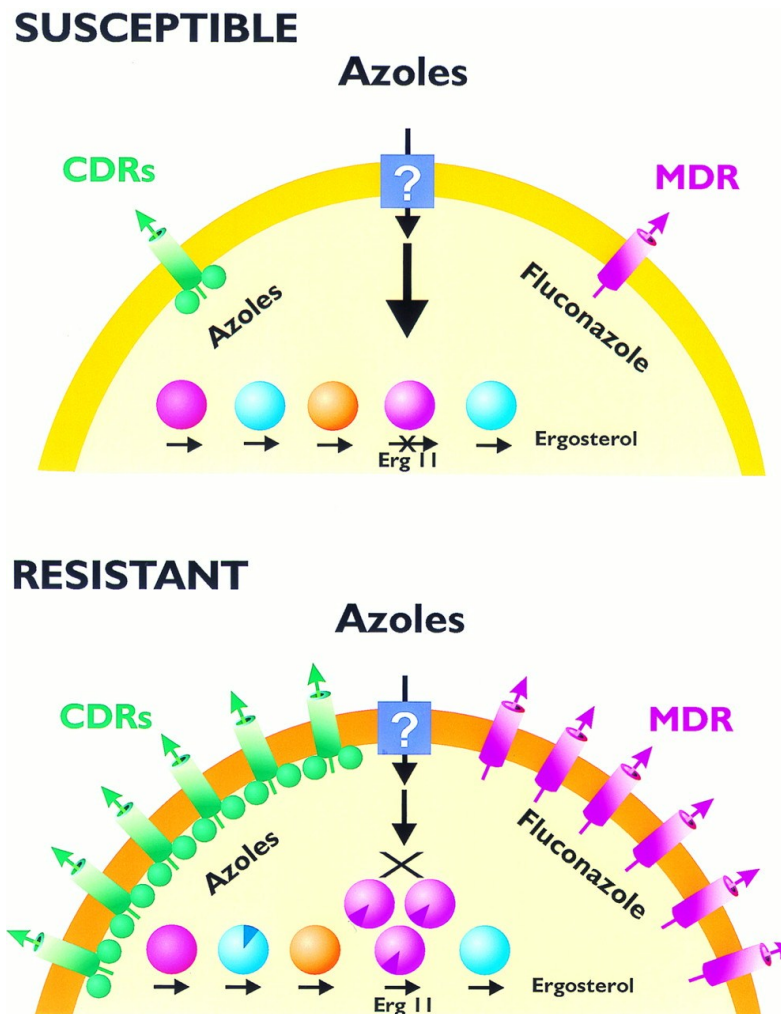
Dalším důvodem vzniku rezistence může být změněný obsah β -1,3-glukanů v buněčné stěně hub. Ty zvyšují stabilitu buněčné stěny a ovlivňují přístup velkých molekul (např. amfotericinu B) k plazmatické membráně. (Seo a kol. 1999; Loeffler a kol. 2003)

3.4.2.2 Azoly

Jedním z mechanismů rezistence k azolům je aktivace a zvýšená exprese efluxních pump označovaných jako tzv. multidrug-transportéry (geny CDR a MDR). U eukaryotické buňky existují hlavní dva typy efluxních pump (transportních proteinů), které jsou také odpovědné za vývoj antimykotické rezistence. Jedná se o ABC transportéry (ATP-binding cassette) a MFS transportéry (major facilitator superfamily). ABC transportéry jsou primární aktivní transmembránové přenašeče, které jsou schopny přenášet různé látky (sacharidy, aminokyseliny, lipidy, ionty, peptidy i proteiny, toxiny a léčivé látky včetně antimykotik) přes membránu dovnitř a ven. ABC transportéry jsou kódovány geny CDR (*Candida* drug resistance), za rezistencí vůči azolům stojí zejména geny CDR1 a CDR2. MFS transportéry jsou sekundární aktivní transportéry, které využívají místo ATP jako zdroj energie elektrochemický gradient protonů přes membránu a jsou spojovány s přenosem relativně hydrofobních molekul. Příkladem genu kódujícího transportér tohoto typu je MDR1 (multi-drug resistance), který je zodpovědný za azolovou rezistenci izolátů *Candida albicans*. (White a kol. 1998; Vandeputte a kol. 2012; Loeffler a kol. 2003)

Azoly působí jako inhibitory syntézy ergosterolu vazbou na lanosterol-14- α -demethylasu. Gen kódující tento protein je označen ERG11 a enzym jako CYP51A1. Změny enzymu způsobené mutacemi ERG11 vedou ke snížení afinity mezi enzymem a azolem a tím ke vzniku rezistence. (Loeffler a kol. 2003; Wiederhold 2017)

Dalším vysvětlením rezistence vůči azolům je změna sterolové Δ (5,6) desaturasy. U kmenů citlivých na azoly dochází po jejich použití k hromadění 14-methyl-3,6-diolu, což vede k fungistatickému účinku. U kmenů s mutací genu ERG3 Δ (5,6) desaturasy se kumuluje 14-methylfecosterol, což naopak může podpořit růst houbových buněk. (Loeffler a kol. 2003; Vandeputte a kol. 2012)



Obrázek 30: Molekulární mechanismus rezistence vůči azolům

Legenda: Do citlivé buňky vstupují azoly neznámým mechanismem, pravděpodobně pasivní difúzí. Azoly následně inhibují ERG11 (fialový kruh) a tím blokuje tvorbu ergosterolu. Do buňky rezistentní vstupují azoly stejným způsobem, nicméně nedochází k tak výrazné inhibici ERG11, a to z důvodu nadměrné exprese enzymu a modifikace enzymu specifickými bodovými mutacemi (tmavé řezy ve fialových kruzích), které snižují afinitu azolu k enzymu. Modifikovány jsou i sterolové složky plazmatické membrány (tmavší oranžová membrána). Díky nadměrné expresi CDR a MDR genů jsou azoly odebírány z buňky ve větší míře než u buňky vůči nim citlivé. Geny CDR přenášejí mnohé léky struktury azolu, MDR geny jsou pak specifické pro flukonazol. (White a kol. 1998)

Zdroj: Molekulární mechanismus rezistence vůči azolům. In: *American Society for Microbiology* [online]. American Society for Microbiology. [citováno 18. 8. 2018]. Dostupné z: <https://cmr.asm.org/content/11/2/382.long>

3.4.2.3 Flucytosin

Pro flucytosin jsou známy dva základní mechanismy vzniku rezistence. První možností je genově podmíněná enzymatická modifikace v podobě defektu v cytosin-permease, ten vede ke snížení absorpce nebo konverze léčiva. Druhým případem je

ztráta aktivity uracil fosforibosyltransferasy, enzymu zodpovědného za konverzi 5-fluorouracilu. (Loeffler a kol. 2003; Vandeputte a kol. 2012; Wiederhold 2017)

3.4.2.4 Echinokandiny

Již zmíněným mechanismem vzniku rezistence je bodová mutace na genech FKS1 a FKS2, která vede ke změně afinity echinokandinů k β -1,3-glukan syntetase. (Loeffler a kol. 2003; Roemer a kol. 2014)

3.5 Metody testování citlivosti kvasinek a vláknitých hub

S narůstající frekvencí systémových mykóz, zejména u imunodeficitních pacientů predisponovaných k rozvoji závažných mykotických infekcí, dochází od 90. let ke značnému rozšíření palety antifungálních léčiv. V důsledku jejich užívání se ale také zvyšuje výskyt rezistence v populaci mikromycet. To vedlo k rozvoji a standardizaci metodik pro testování kvasinek a vláknitých hub. (Mallátová a kol. 2011)

Testy citlivosti se provádějí zejména na houbách způsobujících relapsující invazivní infekci, nebo pokud dochází k selhání nasazené léčby, dále pokud je zde možnost rezistence (umožní odhalit rezistentní kmen včas), případně pokud není možno spolehlivě stanovit léčbu pouze z identifikace druhu. Mimo to má testování citlivosti význam pro epidemiologické studie a při srovnávání *in vitro* aktivity antimykotik. (EUCAST 2015 [online])

3.5.1 Standardizované metody

Vývoj standardních metodik pro testování citlivosti mikromycet k antimykotikům dlouhou dobu značně pokulhával. Přelomovým rokem pro vznik standardní metodiky se stal rok 1982, kdy byla tehdejší americkým Národním výborem pro klinické laboratorní standardy (NCCLS, nyní Ústav pro klinické a laboratorní standardy – CLSI) vytvořena komise pro testování citlivosti k antimykotikům. Ta se později zasloužila o vznik dokumentu M27 popisující diluční bujónovou metodu testování citlivosti kvasinek. Později pak vznikly další tři dokumenty – M38 pro testování vláknitých hub diluční metodou, M44 a M51 pro stanovení

kvasinek, resp. hyfomycet (s výjimkou dermatofytů), difúzní diskovou metodou. (Mallátová a kol. 2011)

Dalším významným milníkem byl rok 1997 a založení Evropské komise pro testování antimikrobiální citlivosti (EUCAST), v jejímž rámci vznikla komise pro testování antifungální citlivosti (AFST). EUCAST harmonizovala hraniční hodnoty MIC a všechny evropské země se nyní řídí jejími pokyny, mimo to je dodržují i mnohé mimoevropské země. (Mallátová a kol. 2011; EUCAST 2015 [online])

3.5.1.1 Standardizované diluční metody

Jedná se o kvantitativní metody používané ke stanovení minimální inhibiční koncentrace (MIC), čímž je myšlena nejnižší testovaná koncentrace dané antimikrobiální látky, která inhibuje viditelný růst mikroorganismů. Tyto referenční metody pro testování antimikrobiální citlivosti se používají pro stanovení aktivity nových látek, k potvrzení citlivosti organismu (při nejasných výsledcích běžných testů) a pro stanovení citlivosti hub. (Bursová a kol. 2014; EUCAST 2015 [online])

MIC se vyjadřuje v mg.l^{-1} nebo v $\mu\text{g.ml}^{-1}$. Zjištěné hodnoty se porovnávají s interpretačními kritérii a testovaný organismus se označí jako citlivý (S), intermediálně rezistentní (I), nebo rezistentní (R) k danému antimykotiku. (Bursová a kol. 2014)

Nejpoužívanější metody jsou agarová diluční metoda a diluční mikrometoda. (Bursová a kol. 2014)

3.5.1.1.1 Agarová diluční metoda

Jedná se o referenční metodu stanovení citlivosti mikroorganismů k antimikrobiálním látkám. Používá se také pro ověření spolehlivosti jiných metod. (Bursová a kol. 2014)

Živné médium představuje agar, který obsahuje testovanou antimikrobiální látku. Antimikrobiální látka se nejdříve naředí, zpravidla se připravuje 12–15 koncentrací jednoho antimykotika řaděných dvojnásobně geometrickou řadou. Dále jsou jednotlivé koncentrace přidány k agaru, jenž je rozlit do Petriho misek ve vrstvě 3–4 mm. (Bursová a kol. 2014)

Houbové inokulum (suspenze vyšetřovaného mikroorganismu) se naočkuje na povrch agaru a nechá se inkubovat. Nakonec se přistupuje k vyhodnocení – odečtou se hodnoty MIC pro každý testovaný kmen. (Bursová a kol. 2014; Votava a kol. 2000).

Mezi hlavní výhody této metody patří vysoká standardizovanost – lze vyšetřit velký soubor kmenů za standardních podmínek – a v porovnání s diluční mikrometodou lépe zjišťuje kontaminaci kmenů a odhaluje heterorezistenci. Bohužel je však tato metoda velmi pracná a také finančně a časově náročná, z toho důvodu není příliš praktická pro rutinní provoz. (Bursová a kol. 2014; Jílek a kol. 2002)

3.5.1.1.2 Diluční mikrometoda

Dříve užívaná makrodiluční metoda využívající k bujónovému testu zkumavky se dnes již nepoužívá a je nahrazena mikrometodou v mikrotitračních destičkách. (Bursová a kol. 2014)

Antimykotikum je ředěno dvojkovou ředící řadou v tekuté živné půdě (bujónu), ta je následně rozplňována do jamek mikrotitrační destičky (96 jamek s kulatým nebo kónickým dnem) v objemu 100 µl na jamku. Mikrodiluční destička má 8 řad a 12 sloupců, to znamená, že se na jedné destičce testuje 8 koncentrací jednoho antimykotika ve dvojkové řadě a vyšetřuje se MIC 12 antimykotik na jeden kmen. Do jedné jamky se záměrně nepřidává antimykotikum ke kontrole růstu testovaného kmene, nebo se do jamky vůbec neočkuje a slouží potom jako kontrola kontaminace bujónu. (Bursová a kol. 2014)

Po naočkování standardním inokulem testovaného kmene se přechází k inkubaci. Hodnota MIC se odečítá vizuálně (nárůst se projeví zákalem), nebo za použití čtečky, která změří absorbanci v každé jamce. (Bursová a kol. 2014)

Příprava této metody je poměrně snadná, je možné si vyrobit velké množství destiček s různými půdami, antimykotiky a jejich koncentracemi; ty se potom dají uchovávat až měsíc při teplotě -20 °C, aniž by došlo ke snížení jejich kvality. Za další výhody můžeme označit jednoduchost a možnost automatizace odečítání výsledků. Metoda je v praxi používána častěji. (Bursová a kol. 2014)

3.5.1.2 Standardizované difúzní metody

3.5.1.2.1 Disková difúzní metoda

Jedná se o semikvantitativní metodu používanou hlavně pro vyšetření citlivosti nenáročných rychle rostoucích bakterií. Základem metody je tvorba inhibičních zón okolo disků s antimikrobiální látkou. (Bursová a kol. 2014)

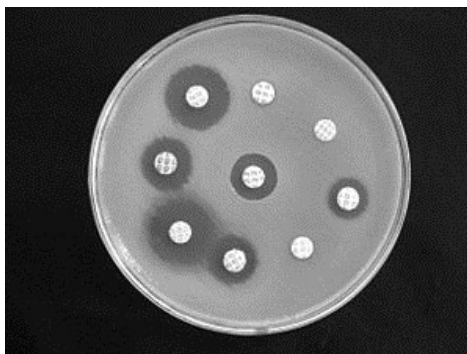
Popis standardizované validní metody pro testování mikromycet (kvasinky rodu *Candida*) je k nalezení v dokumentu CLSI M44-A a metodika vhodná pro testování citlivosti vláknitých hub s výjimkou dermatofyt pak v dokumentu M51-P. Pro úspěšné testování je nutno dodržet standardní metodiku. CLSI doporučuje pro kultivaci použít MHA (Mueller-Hintonův agar), který je v případě kandid obohaceny 2% glukózou a metylenovou modří. Nutné je také udržovat pH v rozmezí 7,2–7,4 a disky s obsahem antimykotika skladovat dle pokynů výrobce. (Mallátová a kol. 2011)

Principem stanovení citlivosti je měření inhibiční zóny. K tomu se využívají agar naočkovaný testovaným kmenem a papírové disky napuštěné testovanou látkou o definovaném množství. Na agar se ve směru hodinových ručiček aplikují disky. Antimykotikum začne ihned difundovat do agaru, přítomné kmeny se množí do té doby, než začne působit antimykotikum. Kolem disku se začne tvořit tzv. inhibiční zóna, a to do vzdálenosti, do které je antimykotikum schopno zastavit množení testovaného kmene. (Bursová a kol. 2014; Mallátová a kol. 2011)

Difúzní koeficient antimykotika ovlivňuje jeho molekulová hmotnost, dále velikost, iontový náboj či rozpustnost ve vodě, viskozita a výška agaru, teplota a další inkubační podmínky. Na růst mikroorganismu má vliv především dostupnost živin, hustota populace, růstová fáze inokula a inkubační teplota. (Bursová a kol. 2014; Mallátová a kol. 2011)

Test se hodnotí změřením průměru inhibiční zóny i s diskem a porovnáním této velikosti s referenční zónou. K hodnocení můžeme využít i automatizované systémy jako např. ADAGIO firmy BioRad Laboratories z Francie, nebo BIOMIC firmy Giles Scientific z USA. Dle velikosti inhibiční zóny můžeme jednotlivé kmeny mikroorganismů rozdělit do kategorií citlivý (S), intermediálně rezistentní (I) – kmeny na rozmezí mezi citlivými a rezistentními, a rezistentní (R) k dané antimikrobiální látce. (Bursová a kol. 2014; Mallátová a kol. 2011; Jílek a kol. 2002; Votava a kol. 2010)

Hlavní výhodou metody je jednoduché provedení bez nutnosti náročného vybavení, snadná změna spektra vyšetřované látky a cena. Za nevýhodu pak můžeme označit časovou náročnost přípravy agarových ploten a manuálního odečítání inhibičních zón. I tak má disková difúzní metoda v klinické praxi významnou roli. (Bursová a kol. 2014)



Obrázek 31: Disková difúzní metoda

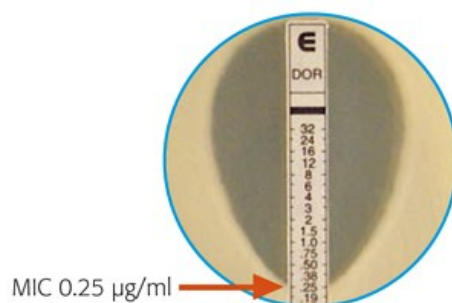
Legenda: Uprostřed vidíme referenční zónu. Pokud je velikost inhibiční zóny menší než referenční rozmezí, kmen je k antimykotiku rezistentní. Pokud je zóna naopak větší než referenční rozmezí, kmen je k antimykotiku citlivý. V případě, že zóna nevzniká vůbec, kmen je také rezistentní.

Zdroj: Disková difúzní metoda. In: Wikiskripta [online]. Wikipedia. [citováno 18. 8. 2018]. Dostupné z: https://www.wikiskripta.eu/w/Testov%C3%A1n%C3%AD_citlivosti_na_antibiotika

3.5.1.2.2 E-test (Epsilometer-test)

E-test je technika testování vyvinutá ve Švédsku. Jedná se o modifikaci diskové difúzní a agarové diluční metody. Je to diagnostický plastový proužek s kontinuálním koncentračním gradientem antimikrobiálního činidla naneseným na jednu stranu pásku. Koncentrační gradient je stupnice nejméně patnácti dvojkových ředění a hodnoty odpovídají MIC. (Baker a kol. 1991; Bursová a kol. 2014)

Test se provádí stejným způsobem jako diskový difúzní test. Proužek se umístí na Petriho misku, dochází k uvolňování antimykotika do agaru a pod proužkem se objeví inhibiční zóna ve tvaru kapky. V místě, kde kapka protíná diagnostický proužek, odečteme hodnotu MIC. Na trhu jsou diagnostické pásky se všemi významnými systémovými antimykotiky (flukonazolem, ketokonazolem, itrakonazolem, vorikonazolem, amfotericinem B, flucytosinem, posakonazolem, kaspofunginem, anidulafunginem i mikafunginem), metoda je vhodná pro kvasinkové i vláknité houby. (Bursová a kol. 2014; Mallátová a kol. 2011)



Obrázek 32: Způsob odečtu MIC u E-testu

Zdroj: E-test. In: *Biomérieux* [online]. Biomérieux. [citováno 18. 8. 2018]. Dostupné z: <https://bit.ly/2MlrQ4m>



Obrázek 33: Způsob umístění E-testu na agarovou plotnu

Zdroj: E-test. In: *Biomérieux* [online]. Biomérieux. [citováno 18. 8. 2018]. Dostupné z: <https://bit.ly/2MEi3fz>

E-test je velmi rychlá a jednoduchá metoda, nicméně jejímu většímu rozšíření brání vysoká cena. (Bursová a kol. 2014)

3.5.2 Komerční soupravy

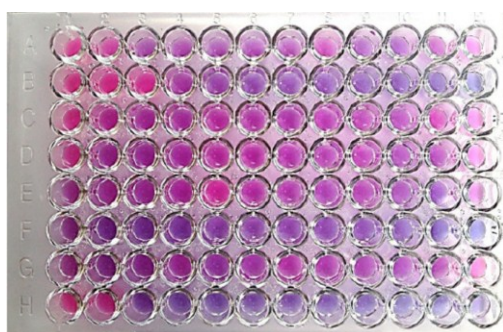
Komerční soupravy principiálně vycházejí z výše uvedených standardizovaných metod. I zde rozlišujeme soupravy fungující na principu dilučním a difúzním. V praxi jsou upřednostňovány zejména pro jejich jednoduchost, cenovou dostupnost a flexibilitu. Tyto soupravy není nutno připravovat, již hotové se objednávají u výrobce. (Cuenca-Estrella a kol. 2010; Mallátová a kol. 2011)

Dle zkušeností z posledních let se z komerčně dostupných testů doporučuje ke stanovení MIC u kandid (a kryptokoků) Sensititre YeastOne, u vláknitých hub a dalších rodů kvasinek E-test. (Mallátová a kol. 2011)

3.5.2.1 Diluční komerční soupravy

3.5.2.1.1 Sensititre YeastOne

Jeden z nejčastěji používaných mikrodilučních testů pro kvantitativní stanovení je kolorimetrický Sensititre YeastOne. Mikrodiluční destička obsahuje antimykotika v ředění odpovídajícím standardu a kolorimetrický indikátor *Alamar blue* ve vysušeném stavu, díky němuž se růst mikromycet projeví barevnou změnou v jamce (přechází z modré na růžovou). MIC se stanovuje jako nejnižší koncentrace antimykotika se zachovaným modrým zbarvením. Test je jednoduchý, spolehlivý a také respektující standardní metodiku CLSI. Velkým pozitivem je jeho jednoznačnost při odečtu výsledků a jejich mezilaboratorní reprodukovatelnost. (Mallátová a kol. 2011)



Obrázek 34: Sensititre YeastOne

Zdroj: Sensititre YeastOne. In: *ResearchGate* [online]. Research Gate. [citováno 18. 8. 2018]. Dostupné z: <https://bit.ly/2vZuHwc>

3.5.2.1.2 Fungitest

Fungitest je na rozdíl od Sensititre YeastOne určen pouze pro semikvantitativní stanovení citlivosti. Každá 16jamková mikrotitrační destička obsahuje dvě negativní (modré), dvě pozitivní (růžové) kontrolní jamky a dvanáct jamek obsahujících léčivo. Vyhodnocení MIC probíhá na základě barevné změny indikátoru. Je-li růst kvasinek inhibován, jamka zůstane modrá. Takto je možno hodnotit citlivost kvasinek k šesti antimykotikům – flukonazolu, itrakonazolu, amfotericinu B, ketokonazolu, mikonazolu a flucytosinu. Léčiva jsou poskytována ve dvou koncentracích v dehydratované formě. Metoda je vhodná zejména k testování druhů *Candida* spp. a *Cryptococcus neoformans*. (Davey a kol. 1998; Mallátová a kol. 2011)



Obrázek 35: Fungitest

Zdroj: Fungitest. In: *Bio-Rad* [online]. Bio-Rad. [citováno 18. 8. 2018]. Dostupné z: <https://bit.ly/2BvtS3p>

3.5.2.1.3 ATB Fungus

Jedná se o plastové mikrodestičky s turbidimetrickým vyhodnocením. Na trhu je již třetí generace – ATB Fungus 3. Skládá se z šestnácti párů jamek včetně dvou jamek pro kontrolu růstu. Pomocí ATB Fungus 3 je možno stanovit MIC omezeného spektra systémových antimykotik, konkrétně těchto pět látek: flucytosin, amfotericin B, flukonazol, itrakonazol a vorikonazol. Souprava neobsahuje echinokandiny ani posakonazol. Omezené spektrum antimykotik je společně s nejednoznačností vizuálního hodnocení hlavní nevýhodou této metody. (Mallátová a kol. 2011; Li Zhang a kol. 2014)

3.5.2.1.4 VITEK 2 AST-YS

VITEK 2 je plně automatizovaná spektrofotometrická metoda umožňující současně identifikaci kvasinek a stanovení MIC. Systém obsahuje karty VITEK 2, které umožňují identifikaci druhu porovnáním biochemického profilu s rozsáhlou databází. Součástí je také karta AST-YS01, ta je určena k testování citlivosti amfotericinu B, flukonazolu, flucytosinu a vorikonazolu. Karta AST-YS01 je miniaturní verze mikrodiluční techniky pro stanovení MIC. Je složena z 64 jamek obsahujících vybraná ředění pro jednotlivé antifungální látky. Systém je plně automatizovaný. Po vložení karty do přístroje probíhá naočkování karty pomocí vakuově plnicího procesu, následuje zapečení a automatické vložení do čtecího inkubátoru. Hodnoty MIC odečte integrovaný softwarový program. Ve srovnání s ostatními metodami vyhodnocuje MIC velmi rychle. Nevýhody metody jsou omezené spektrum antimykotik, omezený počet

testovaných koncentrací a insuficientní růst některých druhů v tomto systému. (Cuence-Estrella a kol. 2010; Mallátová a kol. 2011)



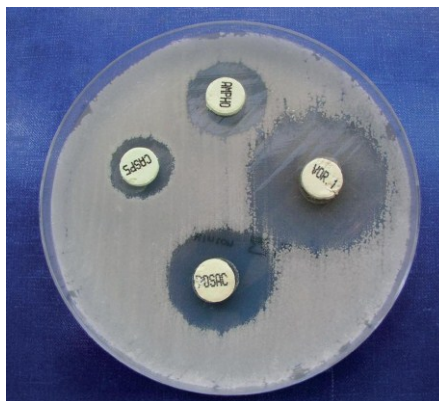
Obrázek 36: VITEK 2 AST-YS

Zdroj: E-test. In: *Biomérieux* [online]. Biomérieux. [citováno 18. 8. 2018]. Dostupné z: <https://bit.ly/2MsgCdW>

3.5.2.2 Difúzní komerční soustavy

3.5.2.2.1 Neo-Sensitabs

Místo disků u diskové difúzní metody popisované výše je možné použít tablety se standardizovaným obsahem antimykotik – systém Neo-Sensitabs. Existují tablety s obsahem systémových antimykotik amfotericinu B, flucytosinu, flukonazolu, ketokonazolu, itrakonazolu, posakonazolu, vorikonazolu a kaspofunginu. Tato metoda je celosvětově uznávaná a doporučovaná k testování citlivosti kvasinek i vláknitých hub. (Mallátová a kol. 2011)



Obrázek 37: Neo-Sensitabs

Zdroj: Neo-Sensitabs. In: *Postgraduální medicína* [online]. Postgraduální medicína. [citováno 18. 8. 2018]. Dostupné z: <https://img.mf.cz/365/955/1-56a.jpg>

4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

Testování vzorků potenciálně antifungálních látek bujónovou mikrodiluční metodou. Zadavatelem vzorků byla Katedra Farmaceutické chemie a Farmaceutické analýzy Farmaceutické fakulty UK v HK, konkrétně prof. M. Doležal a Dr. M. Kučerová. Kmeny použité k testování byly zakoupeny z České sbírky mikroorganismů (Czech Collection of Microorganisms, CCM) nebo z Americké sbírky typových kultur (American Type Cultures Collection, ATCC)

4.1 Použitý materiál

Přístroje a chemikálie

Laminární box, termostat, densitometr, vortex, ultrazvuková lázeň, autokláv, dimethylsulfoxid (DMSO), sterilní voda, NaOH.

Růstová média

RPMI 1640 (5x koncentrované definované růstové médium) s glutaminem, 2% glukózou a pH 7,0 + pufr MOPS (3-[*N*-morfolino]propansulfonová kyselina); Sabouraudův agar.

Pomůcky

Sterilní mikrotitrační destičky s plochým dnem a víčky, mikropipety, 12kanálové pipety, sterilní špičky, 12jamkový rezervoár na médium, sterilní zkumavky, stojánky na zkumavky, očkovací kličky.

Testované koncentrace

500; 250; 125; 62,5; 31,25; 15,62; 7,81; 3,9; 1,95; 0,98 a 0,49 $\mu\text{mol.l}^{-1}$

Testované kmeny kvasinek a vláknitých hub

Candida albicans **CA1**, ATCC 24433, CCM 8320

Candida krusei **CK**, ATCC 6258, CCM 8271

Candida parapsilosis **CP**, ATCC 22019, CCM 8260

Candida tropicalis **CT**, ATCC 750, CCM 8264

Aspergillus fumigatus **AF**, ATCC 204305

Aspergillus flavus **AFla**, CCM 8363

Absidia corymbifera **AC**, CCM 8077

Trichophyton interdigitale **TI**, CCM 8377

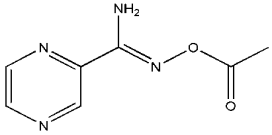
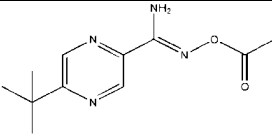
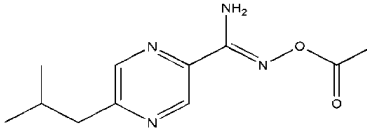
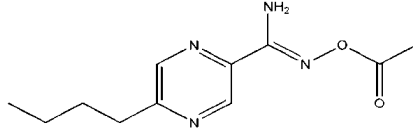
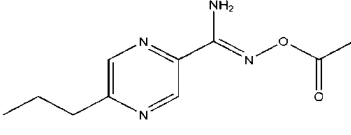
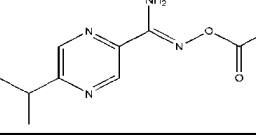
4.2 Testované látky

Testovali jsme 47 látek, které jsme podle struktury rozdělili do 5 chemických skupin:

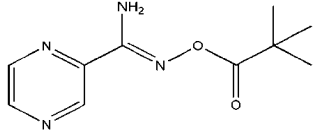
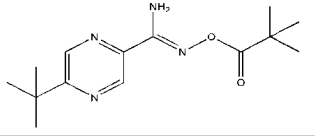
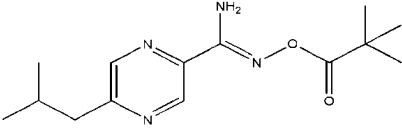
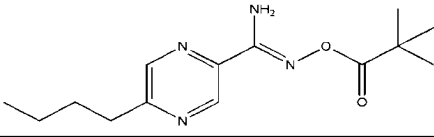
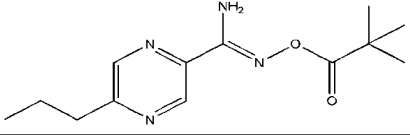
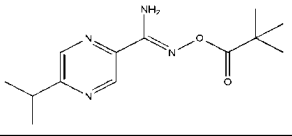
- deriváty *N'*-acetoxy-5-alkylpyrazin-2-karboximidamidu a deriváty 5-alkyl-*N'*-(pivaloyloxy)pyrazin-2-karboximidamidu,
- deriváty *N*-hydroxypyrazin-2-karbimidoyl chloridu,
- deriváty pyrazin-2-karboxylové kyseliny,
- *N*-arylsubstituované deriváty 3-(pyrazin-2-yl)urey a *N*-alkylsubstituované deriváty 3-(pyrazin-2-yl)urey,
- ostatní struktury.

4.2.1 Deriváty *N'*-acetoxy-5-alkylpyrazin-2-karboximidamidu a deriváty 5-alkyl-*N'*-(pivaloyloxy)pyrazin-2-karboximidamidu

Tabulka 1: Deriváty *N'*-acetoxy-5-alkylpyrazin-2-karboximidamidu

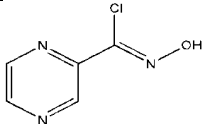
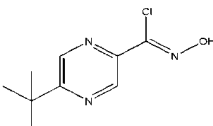
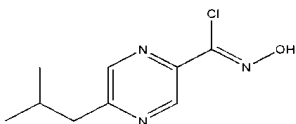
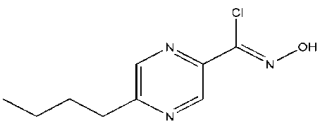
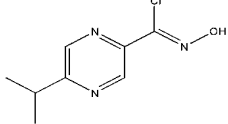
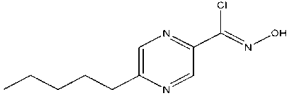
| KÓD | VZOREC | NÁZEV | M _w | NAVÁŽKA (mg) |
|-------|---|--|----------------|--------------|
| E-0a |  | (Z)- <i>N'</i> -acetyloxypyrazin-2-karboximidamid | 180,17 | 8,3 |
| E-1a |  | (Z)- <i>N'</i> -acetoxy-5-(tert-butyl)pyrazin-2-karboximidamid | 236,28 | 11,7 |
| E-2a |  | (Z)- <i>N'</i> -acetoxy-5-isobutylpyrazin-2-karboximidamid | 236,28 | 11,1 |
| E-3a |  | (Z)- <i>N'</i> -acetoxy-5-butylpyrazin-2-karboximidamid | 236,25 | 10,3 |
| E-4a |  | (Z)- <i>N'</i> -acetoxy-5-propylpyrazin-2-karboximidamid | 222,25 | 9,6 |
| E-10a |  | (Z)- <i>N'</i> -acetoxy-5-isopropylpyrazin-2-karboximidamid | 222,25 | 10,4 |

Tabulka 2: Deriváty 5-alkyl-*N'*-(pivaloyloxy)pyrazin-2-karboximidamidu

| KÓD | VZOREC | NÁZEV | Mw | NAVÁŽKA (mg) |
|-------|---|---|--------|--------------|
| E-0b |  | (Z)- <i>N'</i> -(pivaloyloxy)pyrazin-2-karboximidamid | 222,25 | 10 |
| E-1b |  | (Z)-5-(<i>tert</i> -butyl)- <i>N'</i> -(pivaloyloxy)pyrazin-2-karboximidamid | 278,36 | 12,7 |
| E-2b |  | (Z)-5-isobutyl- <i>N'</i> -(pivaloyloxy)pyrazin-2-karboximidamid | 278,36 | 14,9 |
| E-3b |  | (Z)-5-butyl- <i>N'</i> -(pivaloyloxy)pyrazin-2-karboximidamid | 278,36 | 12,7 |
| E-4b |  | (Z)- <i>N'</i> -(pivaloyloxy)-5-propylpyrazin-2-karboximidamid | 264,33 | 12,4 |
| E-10b |  | (Z)-5-isopropyl- <i>N'</i> -(pivaloyloxy)pyrazin-2-karboximidamid | 264,33 | 11,8 |

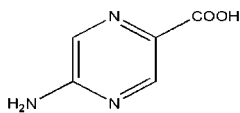
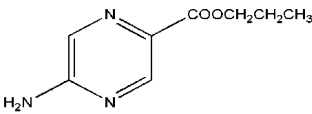
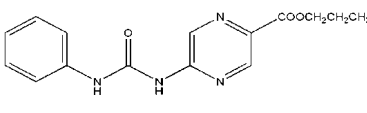
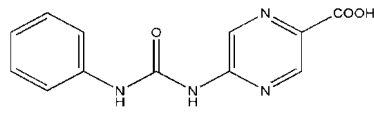
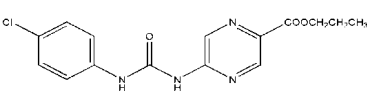
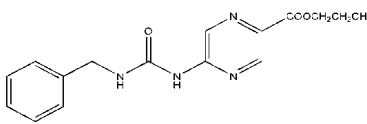
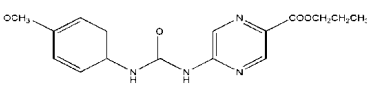
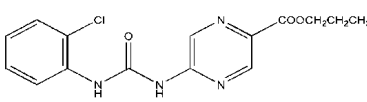
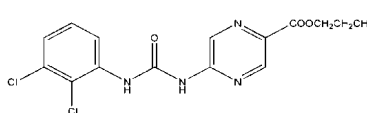
4.2.2 Deriváty *N*-hydroxypyrazin-2-karbimidoyl chloridu

Tabulka 3: Deriváty *N*-hydroxypyrazin-2-karbimidoyl chloridu

| KÓD | VZOREC | NÁZEV | Mw | NAVÁŽKA (mg) |
|-------|---|---|--------|--------------|
| Cl-0 |  | (Z)- <i>N</i> -hydroxypyrazin-2-karbimidoyl chlorid | 157,56 | 9 |
| Cl-1 |  | (Z)-5-(<i>tert</i> -butyl)- <i>N</i> -hydroxypyrazin-2-karbimidoyl chlorid | 213,67 | 8,8 |
| Cl-2 |  | (Z)- <i>N</i> -hydroxy-5-isobutylpyrazin-2-karbimidoyl chlorid | 213,67 | 10,1 |
| Cl-3 |  | (Z)-5-butyl- <i>N</i> -hydroxypyrazin-2-karbimidoyl chlorid | 213,67 | 10 |
| Cl-10 |  | (Z)- <i>N</i> -hydroxy-5-isopropylpyrazin-2-karbimidoyl chlorid | 199,64 | 8,9 |
| Cl-13 |  | (Z)- <i>N</i> -hydroxy-5-pentylpyrazin-2-karbimidoyl chlorid | 227,69 | 9,6 |

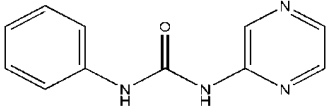
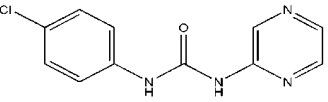
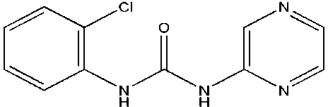
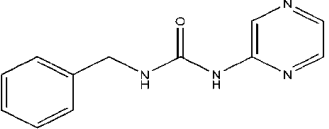
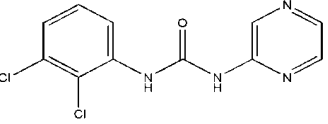
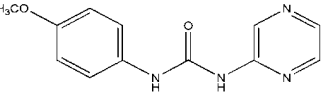
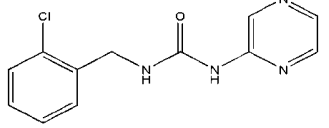
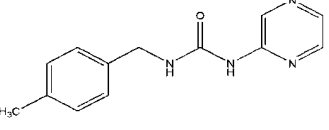
4.2.3 Deriváty pyrazin-2-karboxylové kyseliny

Tabulka 4: Deriváty pyrazin-2-karboxylové kyseliny

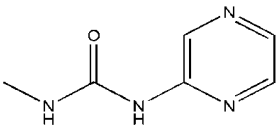
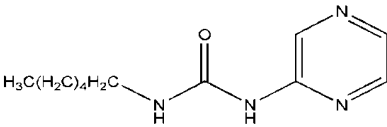
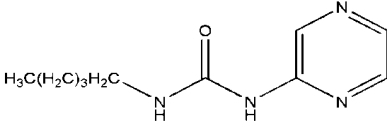
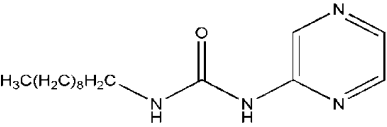
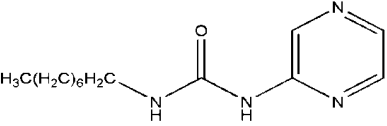
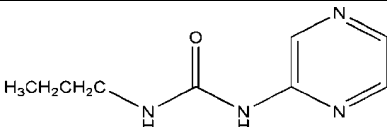
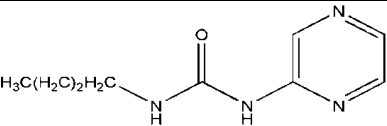
| KÓD | VZOREC | NÁZEV | Mw | NAVÁŽKA (mg) |
|---------|---|--|--------|--------------|
| F.B.S.A |  | 5-aminopyrazin-2-karboxylová kyselina | 139,11 | 8,4 |
| F.B.S.E |  | propyl 5-aminopyrazin-2-karboxylát | 181,2 | 13,2 |
| F.B.2 |  | propyl 5-(3-fenylureido)pyrazin-2-karboxylát | 300,32 | 12,4 |
| F.B.2.H |  | propyl 5-(3-(4-chlorofenyl)ureido)pyrazin-2-karboxylát | 258,24 | 11,1 |
| F.B.5 |  | propyl 5-(3-(4-chlorofenyl)ureido)pyrazin-2-karboxylát | 334,76 | 15,4 |
| F.B.1 |  | propyl 5-(3-benzylureido)pyrazin-2-karboxylát | 314,35 | 12,9 |
| F.B.3 |  | propyl 5-(3-(4-methoxyfenyl)ureido)pyrazin-2-karboxylát | 330,34 | 13,7 |
| F.B.4 |  | propyl 5-(3-(2-chlorofenyl)ureido)pyrazin-2-karboxylát | 334,76 | 13,9 |
| F.B.6 |  | propyl 5-(3-(2,3-dichlorofenyl)ureido)pyrazin-2-karboxylát | 369,2 | 15 |

4.2.4 N-arylsubstituované deriváty 3-(pyrazin-2-yl)urey a N-alkylsubstituované deriváty 3-(pyrazin-2-yl)urey

Tabulka 5: N-arylsubstituované deriváty 3-(pyrazin-2-yl)urey

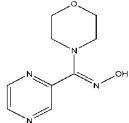
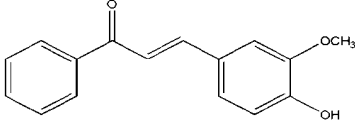
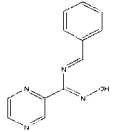
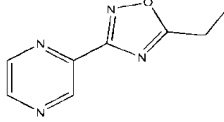
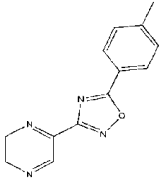
| KÓD | VZOREC | NÁZEV | Mw | NAVÁŽKA (mg) |
|-------|---|---|--------|--------------|
| M.J.1 |  | 1-fenyl-3-(pyrazin-2-yl)urea | 214,23 | 9 |
| M.J.2 |  | 1-(4-chlorfenyl)-3-(pyrazin-2-yl)urea | 248,67 | 12,2 |
| M.J.3 |  | 1-(2-chlorfenyl)-3-(pyrazin-2-yl)urea | 248,67 | 11,8 |
| M.J.4 |  | 1-benzyl-3-(pyrazin-2-yl)urea | 228,26 | 9,6 |
| M.J.5 |  | 1-(2,3-dichlorfenyl)-3-(pyrazin-2-yl)urea | 283,11 | 11,9 |
| M.J.6 |  | 1-(4-methoxyfenyl)-3-(pyrazin-2-yl)urea | 244,25 | 9,9 |
| M.J.7 |  | 1-(2-benzyl)-3-(pyrazin-2-yl)urea | 262,7 | 11,2 |
| M.J.8 |  | 1-(4-methylbenzyl)-3-(pyrazin-2-yl)urea | 242,28 | 11,5 |

Tabulka 6: N-alkylsubstituované deriváty 3-(pyrazin-2-yl)urey

| KÓD | VZOREC | NÁZEV | Mw | NAVÁŽKA (mg) |
|-------|---|-------------------------------|--------|--------------|
| P.N.1 |  | 1-methyl-3-(pyrazin-2-yl)urea | 152,16 | 7,3 |
| P.N.2 |  | 1-hexyl-3-(pyrazin-2-yl)urea | 222,29 | 9,6 |
| P.N.3 |  | 1-pentyl-3-(pyrazin-2-yl)urea | 208,27 | 8,7 |
| P.N.4 |  | 1-decyl-3-(pyrazin-2-yl)urea | 278,4 | 12,7 |
| P.N.6 |  | 1-oktyl-3-(pyrazin-2-yl)urea | 250,35 | 11,2 |
| P.N.7 |  | 1-propyl-3-(pyrazin-2-yl)urea | 180,21 | 7,4 |
| P.N.8 |  | 1-butyl-3-(pyrazin-2-yl)urea | 194,24 | 8 |

4.2.5 Ostatní sloučeniny

Tabulka 7: Ostatní sloučeniny

| KÓD | VZOREC | NÁZEV | Mw | NAVÁŽKA (mg) |
|----------|---|--|--------|--------------|
| MOR-T |  | (Z)-morpholino(pyrazin-2-yl)methanon oxim | 208,22 | 9 |
| Ac-0a |  | (E)-3-(4-hydroxy-3-methoxyfenyl)-1-fenylprop-2-en-1-on | 254,29 | 16,8 |
| OXDI-0b3 |  | N-benzyliden-N'-hydroxypyrazine-2-karboximidamid | 226,24 | 9,4 |
| OX-0c |  | 5-ethyl-3-(pyrazin-2-yl)-1,2,4-oxadiazol | 176,18 | 11,6 |
| OXDI-T2 |  | 3-(pyrazin-2-yl)-5-(p-tolyl)-1,2,4-oxadiazol | 238,25 | 9,7 |

4.3 Postup práce

4.3.1 Příprava růstového média

1. Ke čtyřem dílům MOPS s obsahem 2% glukózy jsme přidali jeden díl RPMI 1640 (např. k 80 ml MOPS přidáme 20 ml RPMI 1640 – objem růstového média záleží na předpokládané spotřebě, resp. na počtu kmenů použitých k testování).
2. Pro úpravu pH do rozmezí 6,5–7,9 jsme použili několik kapek NaOH. Původně žlutý roztok změnil barvu na oranžovočervenou.

4.3.2 Příprava suspenzí testovaných kmenů

1. Osm sterilních zkumavek jsme popsali zkratkami testovaných kmenů CA1, CK, CP, CT, AF, AFla, AC a TI.
2. Do každé ze zkumavek jsme napipetovali 3 ml sterilní vody.
3. Z jednotlivých kultur hub, které jsme si nechali narůst na Sabouraudově glukózovém agaru, jsme odebrali malou část kolonie a rozsuspendovali ji do sterilní vody ve zkumavce s příslušnou zkratkou. Řádně jsme promíchali na vortexu a několikrát změřili na denzitometru hustotu suspenze, která odpovídala 1 dle stupnice McFarlanda.

4.3.3 Příprava ředící řady testované látky

Testované látky byly dodány společně s informací o navážce a molekulové hmotnosti.

1. Navážku látky jsme rozpustili v příslušném objemu DMSO (objem DMSO jsme vypočítali dle vzorce uvedeného níže) tak, aby první testovaná koncentrace byla $500 \mu\text{mol.l}^{-1}$ a zároveň koncentrace DMSO v jamce nepřesáhla 1 %. Poté jsme důkladně promíchali na vortexu.
2. Podle toho, jestli se testovaná látka rozpouštěla, nebo vytvářela homogenní suspenzi, jsme přešli k dalšímu kroku. Pokud se látka nerozpustila nebo vysrážela, přidávali jsme druhý případně třetí ekvivalent DMSO. V tomto případě pak bylo nutno počítat s posunutím testované koncentrace o jedno ředění dozadu (z $500 \mu\text{mol.l}^{-1}$ na $250 \mu\text{mol.l}^{-1}$ atd.).

3. Dále jsme si do sterilní zkumavky označené číslem 1 napipetovali 1,98 ml růstového média, k tomu jsme následně přidali 20 µl rozpuštěné testované látky.
4. Zkontrolovali jsme, jestli se látka v růstovém médiu nevysrážela a podle toho přistoupili k dalšímu kroku, nebo přidali druhý příp. třetí ekvivalent růstového média. Opět je zde nutno počítat se změnou koncentrace o jedno ředění dozadu (z 500 µmol.l⁻¹ na 250 µmol.l⁻¹ atd.).
5. Tímto jsme získali roztok první testované koncentrace, ten jsme pak přesunuli do první jamky 12jamkového rezervoáru.
6. Do deseti sterilních skleněných zkumavek (označených 2–11) jsme si připravili dvojkovou ředící řadou testované látky v DMSO. Postup byl takový, že jsme nejdříve do každé zkumavky napipetovali 0,2 ml DMSO. Do první zkumavky označené číslem 2 jsme napipetovali 0,2 ml testované látky v DMSO (připravené v kroku číslo 1), promíchali a 0,2 ml přenesli do druhé zkumavky označené číslem 3, opět jsme promíchali a 0,2 ml ze zkumavky 3 přenesli do zkumavky 4. Tímto způsobem jsme pokračovali až k poslední zkumavce 11.
7. Do jamek s čísly 2–12 jsme napipetovali 1,98 ml růstového média. Dále jsme přidávali do jednotlivých jamek rezervoáru 20 µl ředěné testované látky z ředící řady ve skleněných zkumavkách (tzn. ze zkumavky 2 do jamky 2, ze zkumavky 3 do jamky 3 atd.). Do poslední dvanácté jamky jsme přidali 20 µl samotného DMSO – tato jamka sloužila ke kontrole, jestli samotné DMSO neovlivňuje růst.
8. Testované koncentrace látek byly 500; 250; 125; 62,5; 31,25; 15,62; 7,81; 3,9; 1,95; 0,98 a 0,49 µmol.l⁻¹.

4.3.4 Výpočet objemu DMSO

$$V(\text{DMSO}) = \frac{m * 10^6 \text{ (převod na } \mu\text{l)}}{c * M * 100 \text{ (zakoncentrování)}} = x \mu\text{l DMSO}$$

m navážka (g)

c první testovaná koncentrace = 500 µmol.l⁻¹ = 0,0005 mol.l⁻¹

M molární hmotnost

4.3.5 Pipetování do destičky

1. Sterilní mikrotitrační destičku jsme si řádně označili číslem, kódem testované látky, datem a zkratkou příslušného kmene.
2. Pomocí 12kanálové pipety jsme napipetovali 200 μ l zásobního roztoku do řádků A–H. Řádek F zůstane prázdný, protože TM se testuje zvlášť na mikrotitrační destičce. Z toho vyplývá, že jedna mikrotitrační destička odpovídala jedné testované látce.
3. Do každého řádku A až H jsme napipetovali 10 μ l připravené suspenze testovaných kmenů. V jednom řádku byl tedy jeden příslušný testovaný kmen.
4. Destičku jsme přiklopili víčkem a inkubovali v termostatu při teplotě 35 °C. Odečet jsme provedli za 24 a 48 hodin, u TI pak za 72 a 120 hodin.
5. Hodnocení jsme provedli vizuálně po ukončení inkubace vyhodnocením MIC.

5. VÝSLEDKY

Testovali jsme 47 látek. Látky pod kódy F.B.1, F.B.3, F.B.4, F.B.6 a M.J.5 nebylo možné otestovat, protože se buď nerozpustily v DMSO, nebo se vysrážely v růstovém médiu. Výsledky testování jsou uvedeny níže v tabulkách. Znaménko „>“ uvedené před číslem v tabulkách říká, že ani v této nejvyšší koncentraci nebyla látka schopna zabránit růstu kvasinek nebo vláknitých hub v takovém rozsahu, aby bylo možné odečtení MIC. Dále jsou tučně znázorněny hodnoty MIC, při kterých došlo k zastavení růstu.

Z níže uvedených dvanácti látek (viz. *Tabulka č. 8 a 9*), pod kódy E-0a, E-1a, E-2a, E-3a, E-4a, E-10a, E-0b, E-1-b, E-2b, E-3b, E-4b a E-10b nebyla u žádné testované látky prokázána antimykotická aktivita a to ani po 24hodinové, ani po prodloužené 48hodinové inkubaci (resp. ani po 72hodinové, ani po prodloužené 120hodinové inkubaci). Látky E-0a, E-1a, E-2a, E-3a, E-0b a E-1-b byly testovány v nejvyšší koncentraci 500 $\mu\text{mol.l}^{-1}$. Látky E-4a, E-10a, E-2b, E-4b a E-10b v 250 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ a zbylé látky potom v koncentraci 125 $\mu\text{mol.l}^{-1}$.

Tabulka 8: Výsledky testování derivátů *N'*-acetoxy-5-alkylpyrazin-2-karboximidamidu a derivátů 5-alkyl-*N'*-(pivaloyloxy)pyrazin-2-karboximidamidu

| KMEN (kód) | | TESTOVANÁ LÁTKA (kód) - MIC ($\mu\text{mol.l}^{-1}$) | | | | | | | | | |
|------------|------|--|------|------|------|------|-------|------|------|------|------|
| | | E-0a | E-1a | E2-a | E-3a | E-4a | E-10a | E-0b | E-1b | E-2b | E-3b |
| CA | 24h | >500 | >500 | >500 | >500 | >250 | >250 | >500 | >500 | >250 | >125 |
| | 48h | >500 | >500 | >500 | >500 | >250 | >250 | >500 | >500 | >250 | >125 |
| CK | 24h | >500 | >500 | >500 | >500 | >250 | >250 | >500 | >500 | >250 | >125 |
| | 48h | >500 | >500 | >500 | >500 | >250 | >250 | >500 | >500 | >250 | >125 |
| CP | 24h | >500 | >500 | >500 | >500 | >250 | >250 | >500 | >500 | >250 | >125 |
| | 48h | >500 | >500 | >500 | >500 | >250 | >250 | >500 | >500 | >250 | >125 |
| CT | 24h | >500 | >500 | >500 | >500 | >250 | >250 | >500 | >500 | >250 | >125 |
| | 48h | >500 | >500 | >500 | >500 | >250 | >250 | >500 | >500 | >250 | >125 |
| AF | 24h | >500 | >500 | >500 | >500 | >250 | >250 | >500 | >500 | >250 | >125 |
| | 48h | >500 | >500 | >500 | >500 | >250 | >250 | >500 | >500 | >250 | >125 |
| AF1a | 24h | >500 | >500 | >500 | >500 | >250 | >250 | >500 | >500 | >250 | >125 |
| | 48h | >500 | >500 | >500 | >500 | >250 | >250 | >500 | >500 | >250 | >125 |
| AC | 24h | >500 | >500 | >500 | >500 | >250 | >250 | >500 | >500 | >250 | >125 |
| | 48h | >500 | >500 | >500 | >500 | >250 | >250 | >500 | >500 | >250 | >125 |
| TI | 72h | >500 | >500 | >500 | >500 | >250 | >250 | >500 | >500 | >250 | >125 |
| | 120h | >500 | >500 | >500 | >500 | >250 | >250 | >500 | >500 | >250 | >125 |

Z další skupiny struktur pod kódy CI-0, CI-1, CI-2, CI-3, CI-10 a CI-13 (Tabulka č. 9) vykazovaly antimykotickou aktivitu tři látky – CI-2, CI-3, CI-10, a to po 24 i 48 hodinách inkubace (u TI šlo o 72 a 120 hodin). Látka CI-2 dokázala zastavit růst kmenů CK, AF a TI, a to v koncentracích pro TI 250 a pro AF 500 $\mu\text{mol.l}^{-1}$. Látka CI-3 při koncentraci 250 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ zastavila růst kmenů CA, CK, CP, CT, AF a TI. Třetí účinná

pak byla sloučenina CI-10, která zastavila růst kmenů CA, CK, CP a TI. Koncentrace CI-10 použitá pro CA a CP byla 250, pro CK 125 a pro TI 500 $\mu\text{mol.l}^{-1}$. Všechny tři látky vykazovaly aktivitu při poměrně vysokých koncentracích.

Tabulka 9: Výsledky testování derivátů 5-alkyl-N¹-(pivaloyloxy)pyrazin-2-karboximidamidu a derivátů N-hydroxypyrazin-2-karbimidoyl chloridu

| KMEN (kód) | | TESTOVANÁ LÁTKA (kód) - MIC ($\mu\text{mol.l}^{-1}$) | | | | | | | |
|------------|------|--|-------|------|------|------------|------------|------------|-------|
| | | E-4b | E-10b | CI-0 | CI-1 | CI-2 | CI-3 | CI-10 | CI-13 |
| CA | 24h | >250 | >250 | >500 | >500 | >500 | 250 | 250 | >500 |
| | 48h | >250 | >250 | >500 | >500 | >500 | 250 | 250 | >500 |
| CK | 24h | >250 | >250 | >500 | >500 | 250 | 250 | 125 | >500 |
| | 48h | >250 | >250 | >500 | >500 | 250 | 250 | 125 | >500 |
| CP | 24h | >250 | >250 | >500 | >500 | >500 | 250 | 250 | >500 |
| | 48h | >250 | >250 | >500 | >500 | >500 | 250 | 250 | >500 |
| CT | 24h | >250 | >250 | >500 | >500 | >500 | 250 | >500 | >500 |
| | 48h | >250 | >250 | >500 | >500 | >500 | 250 | >500 | >500 |
| AF | 24h | >250 | >250 | >500 | >500 | 500 | 250 | >500 | >500 |
| | 48h | >250 | >250 | >500 | >500 | 500 | 250 | >500 | >500 |
| AFla | 24h | >250 | >250 | >500 | >500 | >500 | >500 | >500 | >500 |
| | 48h | >250 | >250 | >500 | >500 | >500 | >500 | >500 | >500 |
| AC | 24h | >250 | >250 | >500 | >500 | >500 | >500 | >500 | >500 |
| | 48h | >250 | >250 | >500 | >500 | >500 | >500 | >500 | >500 |
| TI | 72h | >250 | >250 | >500 | >500 | 250 | 250 | 500 | >500 |
| | 120h | >250 | >250 | >500 | >500 | 250 | 250 | 500 | >500 |

Z derivátů pyrazin-2-karboxylové kyseliny v *Tabulce č. 10* neprojevila ani jedna antifungální aktivitu. Všechny kromě F.B.2 a F.B.5 ($125 \mu\text{mol.l}^{-1}$) byly testovány od nejvyšší koncentrace $500 \mu\text{mol.l}^{-1}$.

Tabulka 10: Výsledky testování derivátů pyrazin-2-karboxylové kyseliny

| KMEN (kód) | | TESTOVANÁ LÁTKA (kód) - MIC ($\mu\text{mol.l}^{-1}$) | | | | |
|------------|------|--|---------|-------|---------|-------|
| | | F.B.S.A | F.B.S.E | F.B.2 | F.B.2.H | F.B.5 |
| CA | 24h | >500 | >500 | >125 | >500 | >125 |
| | 48h | >500 | >500 | >125 | >500 | >125 |
| CK | 24h | >500 | >500 | >125 | >500 | >125 |
| | 48h | >500 | >500 | >125 | >500 | >125 |
| CP | 24h | >500 | >500 | >125 | >500 | >125 |
| | 48h | >500 | >500 | >125 | >500 | >125 |
| CT | 24h | >500 | >500 | >125 | >500 | >125 |
| | 48h | >500 | >500 | >125 | >500 | >125 |
| AF | 24h | >500 | >500 | >125 | >500 | >125 |
| | 48h | >500 | >500 | >125 | >500 | >125 |
| AFla | 24h | >500 | >500 | >125 | >500 | >125 |
| | 48h | >500 | >500 | >125 | >500 | >125 |
| AC | 24h | >500 | >500 | >125 | >500 | >125 |
| | 48h | >500 | >500 | >125 | >500 | >125 |
| TI | 72h | >500 | >500 | >125 | >500 | >125 |
| | 120h | >500 | >500 | >125 | >500 | >125 |

Taktěž u struktur M.J.1, M.J.2, M.J.4, M.J.6, M.J.7 a M.J.8. (*Tabulka č. 11*) jsme ani při nejvyšší koncentraci 500 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ nezaznamenali žádnou antifungální aktivitu. M.J.3 byla testována při koncentraci 125 $\mu\text{mol.l}^{-1}$, taktěž bez aktivity.

Tabulka 11: Výsledky testování derivátů N-arylsubstituované 3-(pyrazin-2-yl)urey

| KMEN (kód) | | TESTOVANÁ LÁTKA (kód) - MIC ($\mu\text{mol.l}^{-1}$) | | | | | | |
|------------|------|--|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | | M.J.1 | M.J.2 | M.J.3 | M.J.4 | M.J.6 | M.J.7 | M.J.8 |
| CA | 24h | >500 | >500 | >125 | >500 | >500 | >500 | >500 |
| | 48h | >500 | >500 | >125 | >500 | >500 | >500 | >500 |
| CK | 24h | >500 | >500 | >125 | >500 | >500 | >500 | >500 |
| | 48h | >500 | >500 | >125 | >500 | >500 | >500 | >500 |
| CP | 24h | >500 | >500 | >125 | >500 | >500 | >500 | >500 |
| | 48h | >500 | >500 | >125 | >500 | >500 | >500 | >500 |
| CT | 24h | >500 | >500 | >125 | >500 | >500 | >500 | >500 |
| | 48h | >500 | >500 | >125 | >500 | >500 | >500 | >500 |
| AF | 24h | >500 | >500 | >125 | >500 | >500 | >500 | >500 |
| | 48h | >500 | >500 | >125 | >500 | >500 | >500 | >500 |
| AFla | 24h | >500 | >500 | >125 | >500 | >500 | >500 | >500 |
| | 48h | >500 | >500 | >125 | >500 | >500 | >500 | >500 |
| AC | 24h | >500 | >500 | >125 | >500 | >500 | >500 | >500 |
| | 48h | >500 | >500 | >125 | >500 | >500 | >500 | >500 |
| TI | 72h | >500 | >500 | >125 | >500 | >500 | >500 | >500 |
| | 120h | >500 | >500 | >125 | >500 | >500 | >500 | >500 |

Poslední skupina látek v *Tabulce č. 12* se zkratkami P.N.1, P.N.2, P.N.3, P.N.4, P.N.6, P.N.7 a P.N.8 taktéž nevykazovala žádnou aktivitu ani při nejvyšší koncentraci 500 $\mu\text{mol.l}^{-1}$.

Tabulka 12: Výsledky testování derivátů N-alkylsubstituované 3-(pyrazin-2-yl)urey

| KMEN (kód) | | TESTOVANÁ LÁTKA (kód) - MIC ($\mu\text{mol.l}^{-1}$) | | | | | | |
|------------|------|--|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | | P.N.1 | P.N.2 | P.N.3 | P.N.4 | P.N.6 | P.N.7 | P.N.8 |
| CA | 24h | >500 | >500 | >500 | >250 | >500 | >500 | >500 |
| | 48h | >500 | >500 | >500 | >250 | >500 | >500 | >500 |
| CK | 24h | >500 | >500 | >500 | >250 | >500 | >500 | >500 |
| | 48h | >500 | >500 | >500 | >250 | >500 | >500 | >500 |
| CP | 24h | >500 | >500 | >500 | >250 | >500 | >500 | >500 |
| | 48h | >500 | >500 | >500 | >250 | >500 | >500 | >500 |
| CT | 24h | >500 | >500 | >500 | >250 | >500 | >500 | >500 |
| | 48h | >500 | >500 | >500 | >250 | >500 | >500 | >500 |
| AF | 24h | >500 | >500 | >500 | >250 | >500 | >500 | >500 |
| | 48h | >500 | >500 | >500 | >250 | >500 | >500 | >500 |
| AFla | 24h | >500 | >500 | >500 | >250 | >500 | >500 | >500 |
| | 48h | >500 | >500 | >500 | >250 | >500 | >500 | >500 |
| AC | 24h | >500 | >500 | >500 | >250 | >500 | >500 | >500 |
| | 48h | >500 | >500 | >500 | >250 | >500 | >500 | >500 |
| TI | 72h | >500 | >500 | >500 | >250 | >500 | >500 | >500 |
| | 120h | >500 | >500 | >500 | >250 | >500 | >500 | >500 |

Ze skupiny látek uvedených v *Tabulce č. 13* a označených OXDI-0b3, OX-0c, OXDI-T2, MOR-T, Ac-0a byla účinná pouze jedna látka – Ac-0a. V koncentraci 500 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ po 24- i 48hodinové inkubaci zastavila růst kmenů CA, CK a CT. U kmenů CP a Afla došlo k zastavení růstu při koncentraci 500 $\mu\text{mol.l}^{-1}$, ale pouze po 24hodinové

inkubační době, po 48 hodinách již látka Ac-0a růst zastavit nedokázala. Zastavit se také podařilo růst kmenů CP a AF při koncentraci Ac-0a 250 $\mu\text{mol.l}^{-1}$, nicméně oba kmeny pouze při inkubační době 24 hodin, po 48 hodinách k zastavení nedošlo. Účinek u výše zmíněných kmenů byl při poměrně vysokých koncentracích. U kmene TI však došlo k zastavení růstu při výrazně nižší koncentraci 31,25 $\mu\text{mol.l}^{-1}$.

Tabulka 13: Výsledky testování ostatních látek

| KMEN (kód) | | TESTOVANÁ LÁTKA (kód) - MIC ($\mu\text{mol.l}^{-1}$) | | | | |
|------------|------|--|-------|---------|-------|--------------|
| | | OXDI-0b3 | OX-0c | OXDI-T2 | MOR-T | Ac-0a |
| CA | 24h | >500 | >500 | >500 | >500 | 500 |
| | 48h | >500 | >500 | >500 | >500 | 500 |
| CK | 24h | >500 | >500 | >500 | >500 | 500 |
| | 48h | >500 | >500 | >500 | >500 | 500 |
| CP | 24h | >500 | >500 | >500 | >500 | 500 |
| | 48h | >500 | >500 | >500 | >500 | >500 |
| CT | 24h | >500 | >500 | >500 | >500 | 500 |
| | 48h | >500 | >500 | >500 | >500 | 500 |
| AF | 24h | >500 | >500 | >500 | >500 | 250 |
| | 48h | >500 | >500 | >500 | >500 | >500 |
| AFla | 24h | >500 | >500 | >500 | >500 | 500 |
| | 48h | >500 | >500 | >500 | >500 | >500 |
| AC | 24h | >500 | >500 | >500 | >500 | 250 |
| | 48h | >500 | >500 | >500 | >500 | 500 |
| TI | 72h | >500 | >500 | >500 | >500 | 31,25 |
| | 120h | >250 | >500 | >500 | >500 | 31,25 |

6. DISKUSE

V průběhu posledních let došlo k rapidnímu zvýšení výskytu mykotických infekcí. Zejména se jedná o invazivní systémové infekce, které mohou být v konečném důsledku pro člověka velmi nebezpečné. Kromě obecného zvýšení incidence mykotických infekcí je výrazným problémem podíl těchto onemocnění na mortalitě a morbiditě imunosuprimovaných pacientů. Jedná se o pacienty trpící chorobami spojenými s poruchou imunity jako např. HIV, AIDS a neutropenií, dále s metabolickými poruchami jako např. diabetes mellitus nebo Addisonova choroba. Mezi další faktory přispívající k rozvoji infekcí patří transplantace, léčba širokospektrými antimykotiky, chemoterapie, katetrizace, imunosupresivní léčba a spousta dalších. (Buchta a Doležal 2006).

Velkým klinickým problémem komplikujícím terapii je antimykotická rezistence. Ta společně s rostoucím počtem invazivních systémových infekcí omezuje použití běžných antimykotik. Tyto důvody vedly k rozvoji vývoje nových léčiv a také k potřebě reprodukovatelného a klinicky relevantního testování antimykotické citlivosti. (Mallátová a kol. 2011)

Jelikož je mykotická buňka stejně jako buňka savčí eukaryotická, není snadné nalézt struktury, které by účinně ničily mykotické buňky a zároveň nepoškozovaly buňky lidské. (Mallátová a kol. 2011)

Vývoj nových antimykotik je tedy velmi náročný a Farmaceutická fakulta Univerzity Karlovy v Hradci Králové je jedním z pracovišť, která se touto problematikou intenzivně zabývají.

Cílem mé práce bylo pomocí mikrodiluční bujónové metody otestovat celkem 47 látek syntetizovaných na Katedře farmaceutické chemie a farmaceutické analýzy Farmaceutické fakulty Univerzity Karlovy v Hradci Králové. Pro všechny struktury je společný pyrazinový kruh. Aktivita byla testována celkem na 8 různých druzích kvasinek a vláknitých hub. Jednalo se o kmeny *Candida albicans*, *Candida krusei*, *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus flavus*, *Absidia corymbifera* a *Trichophyton interdigitale*. Látky pod kódy F.B.1, F.B.3, F.B.4, F.B.6 a M.J.5 nebylo možné otestovat, protože se buď nerozpustily v DMSO, nebo se vysrážely v růstovém médiu.

První skupinu látek tvořily deriváty *N*'-acetoxy-5-alkylpyrazin-2-karboximidamidu a deriváty 5-alkyl-*N*'-(pivaloyloxy)pyrazin-2-karboximidamidu. Z těchto struktur pod kódy E-0a, E-1a, E-2a, E-3a, E-4a, E-10a, E-0b, E-1-b, E-2b, E-3b, E-4b a E-10b nebyla u žádné testované látky prokázána antimykotická aktivita. Jednotlivé struktury se lišily alkylovým substituentem v poloze 5 pyrazinového kruhu.

Z další skupiny derivátů *N*-hydroxypyrazin-2-karbimidoyl chloridu pod kódy Cl-0, Cl-1, Cl-2, Cl-3, Cl-10 a Cl-13 vykazovaly antimykotickou aktivitu tři látky – Cl-2, Cl-3 a Cl-10. Všechny látky z této skupiny vykazovaly aktivitu jen při vysokých koncentracích. Účinnost na nejvíce kmenů byla zaznamenána u struktury Cl-3. Jednotlivé struktury se lišily alkylovým zbytkem v poloze 5, potenciálně nejúčinnější Cl-3 měla v této poloze nerozvětvený butylový zbytek. Látka Cl-3 při koncentraci 250 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ zastavila růst kmenů CA, CK, CP, CT, AF a TI. Druhá v pořadí pak byla struktura Cl-10 v poloze 5 s isopropyllovým zbytkem, ta zastavila růst kmenů CA, CK, CP a TI. Poslední nejméně účinná Cl-2 s isobutylem v poloze 5 byla schopná zastavit růst kmenů CK, AF a TI.

Ze skupiny derivátů pyrazin-2-karboxylové kyseliny nebyla aktivita zjištěna u žádné struktury, stejně tak jsme aktivitu nezaznamenali ani u derivátů *N*-arylsubstituované 3-(pyrazin-2-yl)urey a *N*-alkylsubstituované 3-(pyrazin-2-yl)urey.

Z poslední skupiny látek, označených jako „ostatní“, byla aktivita zaznamenána pouze u jedné struktury, a to u látky Ac-0a – ta byla schopná za různých podmínek zastavit růst u všech kmenů. V koncentraci 500 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ zastavila růst kmenů CA, CK a CT. U kmenů CP a Afla došlo k zastavení růstu při koncentraci 500 $\mu\text{mol.l}^{-1}$, ale pouze po 24hodinové inkubační době, po 48 hodinách již látka Ac-0a růst zastavit nedokázala. Zastavit se také podařilo růst kmenů CP a AF při koncentraci Ac-0a 250 $\mu\text{mol.l}^{-1}$, nicméně oba kmeny pouze při inkubační době 24 hodin, po 48 hodinách k zastavení nedošlo. Účinek u výše zmíněných kmenů byl při poměrně vysokých koncentracích. U kmene TI však došlo k zastavení růstu při výrazně nižší koncentraci, a to 31,25 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ po 72hodinové i 120hodinové inkubaci.

Nejcitlivější byl kmen *Trichophyton interdigitale*, u něhož v případě látky Ac-0a došlo k zastavení růstu při nejnižší koncentraci ze všech testovaných látek

(31,25 $\mu\text{mol.l}^{-1}$). Naopak na pozoru bychom měli být u kmenů *Aspergillus flavus* a *Absidia corymbifera*, které vykazovaly nejvyšší odolnost vůči zkoušeným látkám.

Cesta od objevení nadějně struktury ke konečnému účinnému a bezpečnému léčivu je velmi dlouhá a nákladná. Z námi testovaných 47 látek projevíly aktivitu zmíněné 4, z toho 3 při poměrně vysokých koncentracích; poslední struktura 3-(4-hydroxy-3-methoxyfenyl)-1-fenylprop-2-en-1-on pak ve srovnání s nimi v koncentraci mnohem nižší. Je možné, že by tyto látky mohly mít antifungální aktivitu, především tedy Ac-0a, nicméně nemůžeme vyloučit ani vznik chyby při prvotním testování nebo možnou kontaminaci. Proto by mělo dojít k opakovanému stanovení MIC a potvrzení stanovených výsledků a následně případně přistoupit k dalšímu testování. Kvůli malému počtu účinných látek nebylo možno stanovit závislost aktivity na struktuře.

7. ZÁVĚR

Prostřednictvím mikrodiluční bujónové metody jsme testovali celkem 47 látek syntetizovaných na Katedře farmaceutické chemie a farmaceutické analýzy Farmaceutické fakulty Univerzity Karlovy v Hradci Králové.

Testované látky jsme rozdělili do 5 skupin dle jejich chemické struktury. Z testovaných látek projevily antifungální aktivitu 4 struktury – Ac-0a, Cl-2, Cl-3 a Cl-10. Ostatní látky aktivitu neprojevily.

Vůbec nejvyšší aktivitu jsme zaznamenali u struktury Ac-0a vůči kmenu *Trichophyton interdigitale*. Nejcitlivější byl kmen *Trichophyton interdigitale*, naopak nejrezistentnější byly *Aspergillus flavus* a *Absidia corymbifera*. Látky pod kódy F.B.1, F.B.3, F.B.4, F.B.6 a M.J.5 nebylo možné otestovat, protože se buď nerozpustily v DMSO, nebo se vysrážely v růstovém médiu.

8. POUŽITÉ ZKRATKY

| | |
|---------------------|---|
| AARS | aminoacyl-tRNA syntetasa |
| AC | <i>Absidia corymbifera</i> |
| AF | <i>Aspergillus fumigatus</i> |
| AFB1 | Aflatoxin B1 |
| AFB2 | Aflatoxin B2 |
| AFG1 | Aflatoxin G1 |
| AFG2 | Aflatoxin G2 |
| AFla | <i>Aspergillus flavus</i> |
| AFST | Antifungal susceptibility testing |
| ATC | American Type Cultures Collection |
| ATP | adenosine triphosphate, adenosintrifosfát |
| CA | <i>Candida albicans</i> |
| CCM | Czech Collection of Microorganisms |
| CDR | <i>Candida</i> drug resistance |
| CK | <i>Candida krusei</i> |
| CLSI | The Clinical & Laboratory Standards Institute |
| CP | <i>Candida parapsilosis</i> |
| CT | <i>Candida tropicalis</i> |
| CYP450 | cytochrom P450 |
| CYP51A1 | gen kódující enzym z rodiny cytochromu P-450 |
| DM | diabetes mellitus |
| DMSO | dimethylsulfoxid |
| HIV | Human Immunodeficiency Virus |
| ERG3 / ERG6 / ERG11 | ETS (erythroblast transformation-specific) related gene, geny z genové rodiny ERG |

| | |
|-------------|---|
| EUCAST | The European Committee of Antimicrobial Susceptibility Testing, Evropský výbor pro testování antimikrobiální citlivosti |
| FKS1 / FKS2 | geny kódující 1,3- β -glukan syntasu |
| GPI | glykosylfosfatidylinositolu |
| GS | 1,3- β -glukan syntasa |
| HS | hot spots |
| I | intermediate, intermediálně citlivý |
| LeuRS | Leucyl-tRNA syntetasa |
| MDR | Multi drug resistance |
| MFS | Major facilitator superfamily |
| MHA | Mueller-Hintonův agar |
| MIC | Minimální inhibiční koncentrace |
| MOPS | (3-[<i>N</i> -morfolino]propansulfonová kyselina) |
| NaOH | hydroxid sodný |
| NCA | Non-candida albicans |
| NCCLS | <i>National Committee for Clinical Laboratory Standards</i> |
| R | resistant, rezistentní |
| RNA | ribonucleic acid, ribonukleová kyselina |
| RPMI | Roswell Park Memorial Institute medium |
| S | susceptible, citlivý |
| TI | <i>Trichophyton interdigitale</i> |
| USA | United States of America, Spojené státy americké |

9. SEZNAM TABULEK

| | |
|---|----|
| Tabulka 1: Deriváty N'-acetoxy-5-alkylpyrazin-2-karboximidamidu | 57 |
| Tabulka 2: Deriváty 5-alkyl-N'-(pivaloyloxy)pyrazin-2-karboximidamidu | 58 |
| Tabulka 3: Deriváty N-hydroxypyrazin-2-karbimidoyl chloridu | 59 |
| Tabulka 4: Deriváty pyrazin-2-karboxylové kyseliny | 60 |
| Tabulka 5: N-arylsubstituované deriváty 3-(pyrazin-2-yl)urey | 61 |
| Tabulka 6: N-alkylsubstituované deriváty 3-(pyrazin-2-yl)urey | 62 |
| Tabulka 7: Ostatní sloučeniny | 63 |
| Tabulka 8: Výsledky testování derivátů N'-acetoxy-5-alkylpyrazin-2-karboximidamidu a derivátů 5-alkyl-N'-(pivaloyloxy)pyrazin-2-karboximidamidu | 68 |
| Tabulka 9: Výsledky testování derivátů 5-alkyl-N'-(pivaloyloxy)pyrazin-2-karboximidamidu a derivátů N-hydroxypyrazin-2-karbimidoyl chloridu | 69 |
| Tabulka 10: Výsledky testování derivátů pyrazin-2-karboxylové kyseliny | 70 |
| Tabulka 11: Výsledky testování derivátů N-arylsubstituované 3-(pyrazin-2-yl)urey | 71 |
| Tabulka 12: Výsledky testování derivátů N-alkylsubstituované 3-(pyrazin-2-yl)urey | 72 |
| Tabulka 13: Výsledky testování ostatních látek | 73 |

10. SEZNAM OBRÁZKŮ

| | |
|---|----|
| Obrázek 1: Kolonie <i>Candida albicans</i> kultivované na Sabouraudově glukosovém agaru | 13 |
| Obrázek 2: Mikroskopický vzhled <i>Candida albicans</i> , 400x | 13 |
| Obrázek 3: <i>Candida albicans</i> – mikroskopický pohled na zárodečné klíčky, 400x | 14 |
| Obrázek 4: Kolonie <i>Candida krusei</i> kultivované na Sabouraudově glukosovém agaru | 15 |
| Obrázek 5: Mikroskopický vzhled <i>Candida krusei</i> | 16 |
| Obrázek 6: Kolonie <i>Candida parapsilosis</i> kultivované na maltózovém agaru | 18 |
| Obrázek 7: Mikroskopický vzhled <i>Candida parapsilosis</i> , 400x | 18 |
| Obrázek 8: Kolonie <i>Candida tropicalis</i> kultivovaná na Sabouraudově glukosovém agaru a chromogenním kandidovém agaru (Biolife) | 20 |
| Obrázek 9: Mikroskopický vzhled <i>Candida tropicalis</i> | 20 |
| Obrázek 10: Kolonie <i>Aspergillus fumigatus</i> kultivované na CY-agaru | 22 |
| Obrázek 11: Mikroskopický vzhled <i>Aspergillus fumigatus</i> , 400x | 23 |
| Obrázek 12: <i>Aspergillus fumigatus</i> – popis konidioforu | 23 |
| Obrázek 13: Kolonie <i>Aspergillus flavus</i> kultivované na CY-agaru | 25 |
| Obrázek 14: Mikroskopický vzhled <i>Aspergillus flavus</i> , 1000x | 25 |
| Obrázek 15: <i>Aspergillus flavus</i> – popis konidioforu | 26 |
| Obrázek 16: Kolonie <i>Absidia corymbifera</i> kultivované na Sabouraudově glukosovém agaru.... | 27 |
| Obrázek 17: Mikroskopický vzhled <i>Absidia corymbifera</i> , 400x | 27 |
| Obrázek 18: Kolonie <i>Trichophyton interdigitale</i> kultivované na Sabouradově dextrosovém agaru | 29 |
| Obrázek 19: Mikroskopický vzhled <i>Trichophyton interdigitale</i> , 400x | 29 |
| Obrázek 20: Amfotericin B | 31 |
| Obrázek 21: Klotrimazol | 33 |
| Obrázek 22: Itrakonazol | 33 |
| Obrázek 23: Kaspofungin | 34 |
| Obrázek 24: Terbinafin | 35 |
| Obrázek 25: Flucytosin | 36 |
| Obrázek 26: Nikkomycin Z | 37 |
| Obrázek 27: Struktura, spektrum účinku a mechanismus účinku látek: MK-3118, SCH B, E1210, D75-4590, AN2690 a Parnafunginu A | 40 |
| Obrázek 28: VT-1129 | 41 |
| Obrázek 29: T-2307 | 42 |
| Obrázek 30: Molekulární mechanismus rezistence vůči azolům | 45 |
| Obrázek 31: Disková difúzní metoda | 50 |
| Obrázek 32: Způsob odečtu MIC u E-testu | 51 |
| Obrázek 33: Způsob umístění E-testu na agarovou plotnu | 51 |
| Obrázek 34: Sensititre YeastOne | 52 |
| Obrázek 35: Fungitest | 53 |
| Obrázek 36: VITEK 2 AST-YS | 54 |
| Obrázek 37: Neo-Sensitabs | 54 |

11. POUŽITÁ LITERATURA

- 1) BEDNÁŘ, M., FRAŇKOVÁ, V., SCHINDLER, J., SOUČEK, A., VÁVRA, J. *Lékařská mikrobiologie*. Praha: Marvil, 1996.
- 2) BIOLOGIE, e-learning jako vzdělávací nástroj školy 3. tisíciletí, In: *Biologie, e-learning jako vzdělávací nástroj školy 3. tisíciletí* [online]. EDUCAnet – Soukromé gymnázium Ostrava, s.r.o. [cit. 2018-08-18]. Dostupné z: <https://bit.ly/2OYGEcA>
- 3) BUCHTA, V., JÍLEK, P., HORÁČEK, J., HORÁK, V. *Základy mikrobiologie a parazitologie pro farmaceuty*. Praha: Karolinum, 1998. ISBN 80-7184-565-5.
- 4) BUCHTA, V., SLEZÁK, R., ŠPAČEK, J., KOŠTÁLOVÁ, M., VEJSOVÁ, M., DOLEŽAL, M. Současné možnosti léčby kožních a slizničních mykóz. In: *Klinická farmakologie a farmacie* [online]. 2008, Vol. 22, No. 2, pp. 72-75. ISSN 1803-5353 [cit. 2018-08-18]. Dostupné z: <http://www.klinickafarmakologie.cz/pdfs/far/2008/02/06.pdf>
- 5) BURSOVÁ, Š., DUŠKOVÁ, M., NECIDOVÁ, L., KARPÍŠKOVÁ, R., MYŠKOVÁ, P. *Mikrobiologické laboratorní metody* Vyd.1, Brno: Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, 2014. ISBN 978-80-7305-676-6.
- 6) BRÄSE, S., GLÄSER, F., KRAMER, C., LINDNER, S., LINSSENMEIER, A. M., MASTERS, K., MEISTER, A. C., RUFF, B. M., ZHONG, S. *The Chemistry of Mycotoxins*. Wien: Springer, 2013. ISBN 978-3-7091-1311-0.
- 7) Clinical Trials. In: *Clinical Trials* [online]. U. S. National Library of Medicine [cit. 2018-08-18]. Dostupné z: <https://clinicaltrials.gov/ct2/home>
- 8) CUENCA-ESTRELLA, M., GOMEZ-LOPEZ, A., ALASTRUEY-IZQUIERDO, A., BERNAL-MARTINEZ, L., CUESTA, I., BUITRAGO, M. J., RODRIGUEZ-TUDELA, J. L. Comparison of the Vitek 2 Antifungal Susceptibility System with the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) and European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) Broth Microdilution Reference Methods and with the Sensititre YeastOne and Etest Techniques for In Vitro Detection of Antifungal Resistance in Yeast Isolates. *Journal of Clinical Microbiology* [online]. 2010, **48**(5), 1782-1786 [cit. 2018-08-18]. DOI: 10.1128/JCM.02316-09. ISSN 0095-1137. Dostupné z: <http://jcm.asm.org/cgi/doi/10.1128/JCM.02316-09>

- 9) DAGENAIS, T., KELLER, N. P. Pathogenesis of *Aspergillus fumigatus* in Invasive Aspergillosis. In: *Clinical Microbiology Reviews* [online]. 2009, Vol. 22, No. 3, pp. 447-465. ISSN 1098-6618 [cit. 2018-08-18]. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2708386/>
- 10) DIAMANTOVÁ, D. Léčba mykóz. In: *Interní medicína – mezioborové přehledy* [online]. 2003, Vol. 5, pp. 8-10 [cit. 2018-08-18]. Dostupné z: <http://www.internimedicina.cz/pdfs/int/2003/10/14.pdf>
- 11) DOLEŽAL, M. (2002): Pokroky ve vývoji antifungálních léčiv. In: *Česká a slovenská farmacie*, 10/2010, s. 226-235. Dostupné z: https://www.researchgate.net/profile/Martin_Dolezal/publication/11056550_Advances_in_the_development_of_antifungal_agents/links/56272b3a08ae4d9e5c4d4d25/Advances-in-the-development-of-antifungal-agents.pdf
- 12) DOLEŽAL, M., BUCHTA, V. Aktuální pohled na skupiny antimykotik. In: *Praktické lékárenství* [online]. 2006, Vol. 1, pp. 10-14. ISSN 1803-5329 [cit. 2018-08-18]. Dostupné z: <http://www.praktickelekarenstvi.cz/pdfs/lek/2006/01/02.pdf>
- 13) EUCAST [online]. [cit. 2018-08-18]. Dostupné z: www.eucast.org
- 14) Fungal infections. In: *Life-worldwide* [online]. Leading international fungal education [cit. 2018-08-18]. Dostupné z: <http://www.life-worldwide.org/fungal-diseases/yeasts>
- 15) GREENWOOD, D., SLACK, R. C. B., PEUTHERER, S. F. *Lékařská mikrobiologie*. Praha: Grada Publishing, 1999. ISBN 80-7169-365-0.
- 16) HABER, J. Echinokandiny – nová skupina antimykotik. In: *Remedia* [online]. 2008, Vol. 18, No. 4, pp. 297-309. ISSN 2336-3541 [cit. 2018-08-18]. Dostupné z: <http://www.remédia.cz/Okruhy-temat/Mikrobiologie-a-infekcni-choroby/Echinokandiny-novaskupina-antimykotik/8-1c-jH.magarticle.aspx>
- 17) HABER, J. a kol. *Systémové mykózy a jejich léčba*. Praha: Galen, 1995. ISBN: 80-85824-16-7.
- 18) HEDAYATI, M. T., PASQUALOTTO, A. C, WARN, P. A., BOWYER, P., DENNING, D. W. *Aspergillus flavus*: human pathogen, allergen and mykotoxin

- producer. *Microbiology* [online]. 2007, **153**(6), 1677-1692 [cit. 2018-08-18]. DOI: 10.1099/mic.0.2007/007641-0. ISSN 1350-0872. Dostupné z: <http://mic.microbiologyresearch.org/content/journal/micro/10.1099/mic.0.2007/007641-0>
- 19) HENDRYCHOVÁ, T., MALÝ, J. Volně prodejná antimykotika. In: *Praktické lékárenství* [online]. 2011, Vol. 7, No. 3, pp. 132-137. ISSN 1803-5329 [cit. 2018-08-18]. Dostupné z: <http://www.praktickelekarenstvi.cz/pdfs/lek/2011/03/09.pdf>
- 20) HORÁK, P. Specifická antimykotika a jejich použití u vybraných patologických stavů. In: *Interní medicína pro praxi* [online]. 2011, Vol. 13, No. 4, pp. 171-175. ISSN 1803-5256 [cit. 2018-08-18]. Dostupné z: <http://www.internimedicina.cz/pdfs/int/2011/04/06.pdf>
- 21) HOWARD, S. J., CERAR, D., ANDERSON, M. J., ALBARRAG, A., FISHER, M. C., PASQUALOTTO, A. C., LAVERDIERE, M., ARENDRUP, M. C., PERLIN, D. S., DENNING, D. S. Frequency and Evolution of Azole Resistance in *Aspergillus fumigatus* Associated with Treatment Failure¹. *Emerging Infectious Diseases* [online]. 2009, **15**(7), 1068-1076 [cit. 2018-08-18]. DOI: 10.3201/eid1507.090043. ISSN 1080-6040. Dostupné z: http://wwwnc.cdc.gov/eid/article/15/7/09-0043_article.htm
- 22) HUBKA, V., MALLÁTOVÁ, N. (2012): Vlákňité houby z povrchu lidského těla. *Živa*, 3/2012, Praha, s. 107-110.
- 23) CHAFFIN, W. L. *Candida albicans* Cell Wall Proteins. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* [online]. 2008, **72**(3), 495-544 [cit. 2018-07-24]. DOI: 10.1128/MMBR.00032-07. ISSN 1092-2172. Dostupné z: <http://mibr.asm.org/cgi/doi/10.1128/MMBR.00032-07>
- 24) JIANG, B., DEMING, X., ALLOCCO, J., PARISH, C., DAVISON, J., VEILLETTE, K., SILLAOTS, S., HU, W., RODRIGUEZ-SUAREZ, R., TROSOK, S., ZHANG, L., LI, Y., RAHKHOODAE, F., RANSOM, T., MARTEL, N., WANG, H., GAUVIN, D., WILTSIE, J., ROEMER, T. PAP Inhibitor with In Vivo Efficacy Identified by *Candida albicans* Genetic Profiling of Natural Products. *Chemistry & Biology* [online]. 2008, **15**(4),

- 363-374 [cit. 2018-07-24]. DOI: 10.1016/j.chembiol.2008.02.016. ISSN 10745521. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1074552108001026>
- 25) JÍLEK, P., BUCHTA, V., KUBANOVÁ, P., FORSTL, M. *Úvod do mikrobiologických vyšetřovacích metod ve zdravotnictví*. Praha: Karolinum, 2002. ISBN 80-246-0459-0.
- 26) JIMÉNEZ-ORTIGOSA, C., PADERU, P., MOTYL, M. R., PERLIN, D. S. Enfumafungin Derivative MK-3118 Shows Increased In Vitro Potency against Clinical Echinocandin-Resistant *Candida* Species and *Aspergillus* Species Isolates. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* [online]. 2014, **58**(2), 1248-1251 [cit. 2018-07-24]. DOI: 10.1128/AAC.02145-13. ISSN 0066-4804. Dostupné z: <http://aac.asm.org/lookup/doi/10.1128/AAC.02145-13>
- 27) KANAFANI, Z. A., PERFECT, J. R. Resistance to Antifungal Agents: Mechanisms and Clinical Impact. *Clinical Infectious Diseases* [online]. 2008, **46**(1), 120-128 [cit. 2018-07-24]. DOI: 10.1086/524071. ISSN 1058-4838. Dostupné z: <https://academic.oup.com/cid/article-lookup/doi/10.1086/524071>
- 28) KLABAN, V. *Ilustrovaný mikrobiologický slovník*. Praha: Galén, 2005. ISBN 80-7262-341-9.
- 29) KONTOYIANNIS, D. P., VAZIRI, I., HANNA, H. A., BOKTOUR, M., THORNBY, J., HACHEM, R., BODEY, G. P., RAAD, I. I. Risk Factors for *Candida tropicalis* Fungemia in Patients with Cancer. *Clinical Infectious Diseases* [online]. 2001, **33**(10), 1676-1681 [cit. 2018-07-24]. DOI: 10.1086/323812. ISSN 1058-4838. Dostupné z: <https://academic.oup.com/cid/article-lookup/doi/10.1086/323812>
- 30) KOTHAVADE, R. J., KURA, M. M., VALAND, A.G., PANTHAKI, M. H.. *Candida tropicalis*: its prevalence, pathogenicity and increasing resistance to fluconazole. *Journal of Medical Microbiology* [online]. 2010, **59**(8), 873-880 [cit. 2018-07-24]. DOI: 10.1099/jmm.0.013227-0. ISSN 0022-2615. Dostupné z: <http://jmm.microbiologyresearch.org/content/journal/jmm/10.1099/jmm.0.013227-0>

- 31) KRČMERY, V., BARNES, A. J. Non-albicans *Candida* spp. causing fungaemia: pathogenicity and antifungal resistance. *Journal of Hospital Infection* [online]. 2002, **50**(4), 243-260 [cit. 2018-07-24]. DOI: 10.1053/jhin.2001.1151. ISSN 01956701. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S019567010191151X>
- 32) KUKLOVÁ, I. Naftifin v léčbě kožních mykóz. In: *Dermatologie pro praxi* [online]. 2015, Vol. 9, No. 2, pp. 73-76. ISSN 1803-5337 [cit. 2018-08-18]. Dostupné z: <http://www.dermatologiepropraxi.cz/pdfs/der/2015/02/07.pdf>
- 33) LATGÉ, J-P. *Aspergillus fumigatus* and Aspergillosis. *Clinical Microbiology Reviews*. 1999;12(2):310-350.
- 34) LOEFFLER, J., STEVENS, D. A. Antifungal Drug Resistance. *Clinical Infectious Diseases* [online]. 2003, **36**(Supplement_1), S31-S41 [cit. 2018-07-24]. DOI: 10.1086/344658. ISSN 1537-6591. Dostupné z: http://academic.oup.com/cid/article/36/Supplement_1/S31/302495/Antifungal-Drug-Resistance
- 35) MALLÁTOVÁ, N., HAMAL, P., KOČMANOVÁ, I., BUCHTA, V., MENCL, K. Testování citlivosti mikromycet k antimykotikům in vitro u imunosuprimovaných pacientů – doporučení odborníků s podporou CELL a SML ČLS JEP. In: *Postgraduální medicína* [online]. Příloha 5/2011. ISSN 1212-4184 [cit. 2018-08-18]. Dostupné z: <https://bit.ly/2PuYNja>
- 36) Miniatlás mikroorganismů. In: Miniatlás mikroorganismů [online] [cit. 2018-08-18]. Dostupné z: <http://old.vscht.cz/obsah/fakulty/fpbt/ostatni/miniatlas/mikr.htm>
- 37) MAYERS, D. Antimicrobial Drug Resistance: Mechanism of Drug Resistance. Vyd. 1. Berlin: Springer Science & Business Media, 2009, 9781597451802.
- 38) MITSUYAMA, J., NOMURA, N., HASHIMOTO, K., YAMADA, E., NISHIKAWA, H., KAERIYAMA, M., KIMURA, A., TODO, Y., NARITAIN, H. *In Vitro* and *In Vivo* Antifungal Activities of T-2307, a Novel Arylamidine. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* [online]. 2008, **52**(4), 1318-1324 [cit. 2018-07-24]. DOI:

- 10.1128/AAC.01159-07. ISSN 0066-4804. Dostupné z:
<http://aac.asm.org/cgi/doi/10.1128/AAC.01159-07>
- 39) MSGERC Doctor Fungus. In: *MSGERC Doctor Fungus* [online] [cit. 2018-08-18].
Dostupné z: <https://drfungus.org/knowledge-base/trichophyton-species/>
- 40) Mycology online. In: *Mycology Adelaide* [online]. The University of Adelaide [cit. 2018-08-18].
Dostupné z: http://www.mycology.adelaide.edu.au/Fungal_Descriptions/
- 41) New Drug Approvals. In: *New Drug Approvals* [online] [cit. 2018-08-18].
Dostupné z: <https://newdrugapprovals.org/>
- 42) Obecná mykologie. In: *Obecná mykologie* [online]. Masarykova univerzita, Přírodovědecká fakulta, Ústav botaniky a zoologie [cit. 2018-08-18]. Dostupné z:
<http://www.sci.muni.cz/botany/mycology/mykolog.htm>
- 43) PATERSON, P. J., MARSHAL, S. R., SHAW, B., KENDRA, J. R., ETHEL, M., KIBBLER, C. C., PRENTICE, H. G., POTTER, M. Fatal invasive cerebral *Absidia corymbifera* infection following bone marrow transplantation. In: *Bone Marrow Transplantation* [online]. 2000, Vol. 26, No. 6, pp. 701-703. ISSN 1476-5365. Citováno [19. 2. 2016]. Dostupné z: <https://www.nature.com/articles/1702575>
- 44) PRENTICE, H. G., POTTER, M. Fatal invasive cerebral *Absidia corymbifera* infection following bone marrow transplantation. In: *Bone Marrow Transplantation* [online]. 2000, Vol. 26, No. 6, pp. 701-703. ISSN 1476-5365 [cit. 2018-08-18]. Dostupné z: <http://www.nature.com/bmt/journal/v26/n6/full/1702575a.html>
- 45) PFALLER, M. A., DIEKEMA, D. J., GIBBS, D. L., NEWELL, V. A., NAGY, E., DOBIASOVA, S., RINALDI, M., BARTON, R., VESELOV, A. *Candida krusei*, a Multidrug-Resistant Opportunistic Fungal Pathogen: Geographic and Temporal Trends from the ARTEMIS DISK Antifungal Surveillance Program, 2001 to 2005. *Journal of Clinical Microbiology* [online]. 2008, **46**(2), 515-521 [cit. 2018-07-24]. DOI: 10.1128/JCM.01915-07. ISSN 0095-1137. Dostupné z:
<http://jcm.asm.org/cgi/doi/10.1128/JCM.01915-07>
- 46) ROEMER, T., KRYSAN, D. J. Antifungal Drug Development: Challenges, Unmet Clinical Needs, and New Approaches. *Cold Spring Harbor Perspectives in*

- Medicine* [online]. 2014, **4**(5), a019703-a019703 [cit. 2018-07-24]. ISSN 2157-1422. Dostupné z: <http://perspectivesinmedicine.cshlp.org/lookup/doi/10.1101/cshperspect.a019703>
- 47) ROZSYPAL, H. Systémová antimykotika. In: *Klinická farmakologie a farmacie* [online]. 2008, Vol. 22, No. 1, pp. 40-44. ISSN 1803-5353 [cit. 2018-08-18]. Dostupné z: <http://www.klinickafarmakologie.cz/pdfs/far/2008/01/09.pdf>
- 48) SAMARANAYAKE, Y. H., SAMARANAYAKE, L. P. *Candida krusei*: biology, epidemiology, pathogenicity and clinical manifestations of an emerging pathogen. *Journal of Medical Microbiology* [online]. 1994, **41**(5), 295-310 [cit. 2018-07-24]. DOI: 10.1099/00222615-41-5-295. ISSN 0022-2615. Dostupné z: <http://jmm.microbiologyresearch.org/content/journal/jmm/10.1099/00222615-41-5-295>
- 49) SEO, K., AKIYOSHI, H., OHNISHI, Y. Alteration of Cell Wall Composition Leads to Amphotericin B Resistance in *Aspergillus flavus*. *Microbiol. Immunol.* [online]. 1999, **43**(11), 1017-1025 [cit. 2018-07-24]. Dostupné z: https://www.jstage.jst.go.jp/article/mandi1977/43/11/43_11_1017/_pdf/-char/ja
- 50) SHAPIRO, R. S., ROBBINS, N., COWEN, L. E. Regulatory Circuitry Governing Fungal Development, Drug Resistance, and Disease. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* [online]. 2011, **75**(2), 213-267 [cit. 2018-08-18]. DOI: 10.1128/MMBR.00045-10. ISSN 1092-2172. Dostupné z: <http://mmb.asm.org/cgi/doi/10.1128/MMBR.00045-10>
- 51) SHIBATA, T., TAKAHASHI, T., YAMADA, E., KIMURA, A., NISHIKAWA, H., HAYAKAWA, H., NOMURA, N., MITSUYAMA, J. T-2307 Causes Collapse of Mitochondrial Membrane Potential in Yeast. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* [online]. 2012, **56**(11), 5892-5897 [cit. 2018-07-24]. DOI: 10.1128/AAC.05954-11. ISSN 0066-4804. Dostupné z: <http://aac.asm.org/lookup/doi/10.1128/AAC.05954-11>

- 52) SILVA, S., NEGRI, M., HENRIQUES, M., OLIVEIRA, R., WILLIAMS, D. W., AZEREDO, J. *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis*: biology, epidemiology, pathogenicity and antifungal resistance. *FEMS Microbiology Reviews*[online]. 2012, **36**(2), 288-305 [cit. 2018-07-24]. DOI: 10.1111/j.1574-6976.2011.00278.x. ISSN 1574-6976. Dostupné z: <https://academic.oup.com/femsre/article-lookup/doi/10.1111/j.1574-6976.2011.00278.x>
- 53) SRINIVASAN, A., LOPEZ-RIBOT, J. L., RAMASUBRAMANIAN, A. K. Overcoming antifungal resistance. *Drug Discovery Today: Technologies* [online]. 2014, **11**, 65-71 [cit. 2018-07-24]. DOI: 10.1016/j.ddtec.2014.02.005. ISSN 17406749. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1740674914000067>
- 54) Toxikon. In: *Toxikon* [online] [cit. 2018-08-18]. Dostupné z: <http://www.biotox.cz/toxikon/mikromycety/aflatox.php>
- 55) TROFA, D., GACSER, A., NOSANCHUK, J. D. *Candida parapsilosis*, an Emerging Fungal Pathogen. *Clinical Microbiology Reviews* [online]. 2008, **21**(4), 606-625 [cit. 2018-07-24]. DOI: 10.1128/CMR.00013-08. ISSN 0893-8512. Dostupné z: <http://cmr.asm.org/cgi/doi/10.1128/CMR.00013-08>
- 56) TSUKAHARA, K., HATA, K., NAKAMOTO, K., SAGANE, K., WATANABE, N., KUROMITSU, J., KAI, J., TSUCHIYA, M., OHBA, F., JIGAMI, Y., YOSHIMATSU, K., NAGASU, T. Medicinal genetics approach towards identifying the molecular target of a novel inhibitor of fungal cell wall assembly. *Molecular Microbiology* [online]. 2003, **48**(4), 1029-1042 [cit. 2018-07-24]. DOI: 10.1046/j.1365-2958.2003.03481.x. ISSN 0950382X. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1046/j.1365-2958.2003.03481.x>
- 57) VANDEPUTTE, P., FERRARI, S., COSTE, A. T. Antifungal Resistance and New Strategies to Control Fungal Infections. *International Journal of Microbiology* [online]. 2012, **2012**, 1-26 [cit. 2018-07-24]. DOI: 10.1155/2012/713687. ISSN 1687-918X. Dostupné z: <http://www.hindawi.com/journals/ijmicro/2012/713687/>

- 58) VOTAVA, M., OBDRŽÁLEK, V., ONDROVČÍK, P., RŮŽIČKA, F., ZAHRADNÍČEK, O., WOZNICOVÁ, V. Lékařská mikrobiologie II. Přehled vyšetřovacích metod v lékařské mikrobiologii. 1. vyd. Brno: Masarykova univerzita. Lékařská fakulta, 2000. 309 s. ISBN 80-210-2272-8.
- 59) WALKER, S. S., XU, Y., TRIANTAFYLLOU, I., WALDMAN, M. F., MENDRICK, C., BROWN, N., MANN, P., CHAU, A., PATEL, R., BAUMAN, N., NORRIS, CH., ANTONACCI, B., GURNANI, M., CACCIAPUOTI, A., MCNICHOLAS, P. M., WAINHAUS, S., HERR, R. S., KUANG, R., ASLANIAN, R. G., TING, P. C., TODD, A. Discovery of a Novel Class of Orally Active Antifungal β -1,3-d-Glucan Synthase Inhibitors. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* [online]. 2011, **55**(11), 5099-5106 [cit. 2018-07-24]. DOI: 10.1128/AAC.00432-11. ISSN 0066-4804. Dostupné z: <http://aac.asm.org/lookup/doi/10.1128/AAC.00432-11>
- 60) WHITE, T. C., MARR, K. A., BOWDEN, R. A. Clinical, Cellular and Molecular Factors That Contribute to Antifungal Drug Resistance. *Journal of Clinical Microbiology* [online]. 1998, **11**(2), 382-402 [cit. 2018-07-24]. Dostupné z: <http://cmr.asm.org/content/11/2/382.long>
- 61) WIEDERHOLD, N. Antifungal resistance: current trends and future strategies to combat. *Infection and Drug Resistance* [online]. 2017, **10**, 249-259 [cit. 2018-07-24]. DOI: 10.2147/IDR.S124918. ISSN 1178-6973. Dostupné z: <https://www.dovepress.com/antifungal-resistance-current-trends-and-future-strategies-to-combat-peer-reviewed-article-IDR>
- 62) ZAZULA, R., SCHINDLER, I., SPÁLENÝ, A., VAŠÁKOVÁ, M., DUTKA, J. Současný pohled na mykotické plicní infekce. *Interní Med.*, 2006/01/01 2005, vol. 7, no. 7, p. 349-353.
- 63) ZHANG, L., WANG, H., XIAO, M., KUDINHA, T., MAO, L., ZHAO, H., KONG, F., XU, Y. The Widely Used ATB FUNGUS 3 Automated Readings in China and Its Misleading High MICs of *Candida* spp. to Azoles: Challenges for Developing Countries' Clinical Microbiology Labs. *PLoS ONE* [online]. 2014, **9**(12) [cit. 2018-07-24]. DOI: 10.1371/journal.pone.0114004. ISSN 1932-6203. Dostupné z: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0114004>