

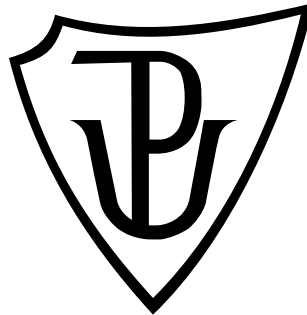
Univerzita Palackého v Olomouci

Bakalářská práce

Olomouc 2013

Michaela Kreplová

**Univerzita Palackého v Olomouci
Přírodovědecká fakulta
Katedra buněčné biologie a genetiky**



Standardizované metody testování citlivosti k antimykotikům

Bakalářská práce

Michaela Kreplová

Studijní program: Biologie
Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie
Forma studia: prezenční

Olomouc 2013

Vedoucí práce: Doc. MUDr. Petr Hamal, Ph.D.

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně pod vedením doc. MUDr. Petra Hamala, Ph.D.

Podpis:
(Michaela Kreplová)

Ráda bych tímto poděkovala svému vedoucímu doc. MUDr. Petru Hamalovi, Ph.D. za ochotu a cenné rady při zpracování bakalářské práce a také MDDr. Lucii Svobodové za pomoc při provedení experimentální části.

Tato práce byla podpořena grantovým projektem č. LF_2013_012 IGA UP v Olomouci.

Souhrn

V úvodní části práce jsou charakterizována mykotická onemocnění a jejich původci. Mezi kvasinkami dominuje rod *Candida* s nejčastějším druhem *C. albicans*. Z vláknitých hub jsou u nás s nejvyšší frekvencí zachycována dermatofyta, napadající kůži a její adnexa a způsobující tak lokální formy infekce. Zástupci jsou řazeni do rodů *Trichophyton*, *Epidermophyton* a *Microsporum*. V nemocničním prostředí ohrožují pacienty zejména vláknité houby rodu *Aspergillus*, případně zygomycety, vzácně i kryptokoky. Mikroskopické houby patří mezi oportunní patogeny, proto k vyvolání infekce vyžadují predispoziční faktory hostitele, nejčastěji imunodeficitní stavy. K léčbě původců mykóz se používá specifická skupina antimikrobiálních látek zvaná antimykotika. Podle způsobu podávání se dělí na lokální a systémová. K nejčastěji podávaným skupinám antifungálních látek patří azoly, polyeny a echinokandiny.

Text této přehledové práce je zaměřen na výčet a charakterizaci metod, které se používají ke zjištění, zda je mikroskopická houba k antimykotikům, zvažovaným k léčbě příslušné mykózy, citlivá. Základním požadavkem objektivního výsledku testování je jeho standardizovaný metodický postup. Postupně byly vypracovány dokumenty, které jednotlivé fáze testování přesně popisují. Prvním z nich byl dokument M27, vypracovaný americkým Ústavem pro klinické a laboratorní standardy (CLSI). Jedná se o kvantitativní diluční postup určený ke stanovení citlivosti kvasinkovitých mikroorganismů. Postupně byly zmíněnou institucí vyvinuty i další dokumenty, zaměřené na diluční testování citlivosti vláknitých hub a později i kvalitativní difúzní metody. V Evropě byly podobné standardy definovány Evropskou komisí pro testování antimikrobiální citlivosti (EUCAST). V další části práce jsou charakterizovány komerční soupravy, vycházející z uvedených standardních metodik. V důsledku průmyslové výroby souprav je jejich výhodou především jednoduchost provedení, což je v laboratorní praxi při každodenním testování poměrně velkého počtu houbových izolátů velmi výhodné. Při interpretaci výsledků testování citlivosti mikromycet k antifungálním přípravkům je nejzásadnějším problémem korelace výsledků získaných v laboratoři *in vitro* s účinností léčby v klinické praxi. I přesto má testování citlivosti houbových agens k antimykotikům důležitou roli, v současné době zejména při léčbě rezistentních forem infekcí a při zjišťování epidemiologické situace v rezistenci ke zmíněným přípravkům určeným k léčbě systémových mykóz v jednotlivých, především velkých nemocnicích.

Summary

The initial part of this work describes fungal diseases and pathogens that cause them. Yeasts are dominated by the genus *Candida*, with the most frequent species *C. albicans*. The most frequent filamentous fungi in this country are dermatophytes that attack the skin and adnexa, causing local forms of infections. These are represented by the genera *Trichophyton*, *Epidermophyton* and *Microsporum*. In the hospital setting, patients are mainly threatened by filamentous fungi of the genus *Aspergillus*, less frequently by zygomycetes and rarely by cryptococci. Microscopic fungi are opportunistic pathogens. Therefore, to cause infection, predisposing host factors are required, most frequently immunodeficiencies. Fungal diseases are treated with antifungals, a specific group of antimicrobial agents. Based on their effect, antifungals are classified as local or systemic. The most frequently administered groups of antifungals are azoles, polyenes and echinocandins.

The main part of this review is concerned with listing and describing methods used to determine whether a microscopic fungus is susceptible to antifungals considered to treat the relevant fungal diseases. The key requirement for objective results of a test is the use of standardized methods. Gradually, documents accurately describing individual phases of testing have been created. The first one was M27 produced by the US Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). It is a quantitative dilution procedure to determine the susceptibility of yeast microorganisms. Then the institute prepared other documents aimed at dilution susceptibility testing of filamentous fungi and, later, qualitative diffusion methods. In Europe, similar standards were defined by the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). The next part of this work describes commercial kits to be used with the above standard methods. The advantage of such manufactured kits is their simple design convenient for everyday testing of relatively large numbers of fungal isolates in laboratory practice. When interpreting results of testing the susceptibility of microscopic fungi to antifungal agents, the crucial problem is to correlate results obtained *in vivo* in the laboratory with treatment outcomes in clinical practice. Yet tests of fungal pathogen susceptibility to antifungals play an important role. At present, these are mainly used in the treatment of resistant forms of infections and to define the epidemiological situation concerning resistance to the above agents used to treat systemic fungal diseases in individual, mainly large, hospitals.

Obsah

1. Úvod	8
1.1. Mykózy a jejich původci.....	8
1.1.1. Infekce způsobené kandidami.....	9
1.1.2. Infekce způsobené aspergily.....	9
1.2. Antimykotika.....	10
1.2.1. Azoly.....	11
1.2.2. Echinokandiny.....	11
1.2.3. Polyeny.....	12
1.1.1. Antimetabolity.....	12
2. Cíl.....	14
3. Metody testování citlivosti	15
3.1. Vývoj standardizovaných metodik.....	15
3.1.1. Standardizované diluční metody.....	15
3.1.2. Standardizované difúzní metody.....	17
3.2. Komerční soupravy.....	18
3.2.1. Diluční.....	19
3.2.2. Difúzní.....	22
4. Experimentální část.....	24
4.1. Materiál a metodika.....	24
4.2. Výsledky.....	26
4.3. Závěr.....	29
5. Literatura.....	30

1. Úvod

1.1. Mykózy a jejich původci

Mykózy jsou onemocnění vyvolané mikroskopickými houbami charakterizované tím, že při nich původce invaduje do tkání. Podle míry invaze je rozdělujeme na lokální a systémové. Mezi lokální řadíme dermatomykózy, které napadají kůži a její adnexa a subkutánní infikující podkoží. Systémové mykózy postihují vnitřní orgány a orgánové systémy (Hamal et Svobodová, 2011; Otčenášek et al, 1990).

Dermatomykózy vyvolává především skupina hub souborně označovaná jako dermatofyta, která metabolicky využívá keratin přítomný v rohové vrstvě epidermis. Řadíme mezi ně rody *Trichophyton*, *Epidermophyton* a *Microsporum* (Hamal et Svobodová, 2011; Karaca et Koç, 2004). Kromě nich mohou lokální mykózy způsobit také kandidy, aspergily, kryptokoky a další mikromycety. Subkutánní mykózy vyvolává například *Sporothrix schenckii*, zástupci rodů *Cladosporium*, *Acremonium*, *Madurella* a další (Otčenášek et al, 1990). Systémová (invazivní) onemocnění jsou nejzávažnější formou mykotických infekcí a jsou vyvolány nejčastěji kandidami a aspergily. Vznik a rozvoj systémových mykóz je podmíněn predispozicí hostitele. Nejrizikovější skupinu tvoří těžce imunokompromitovaní pacienti, například trpící leukémií, zejména po transplantaci kostní dřeně, krevetvorných kmenových buněk, pacienti infikovaní virem lidské imunodeficiencie (HIV), nebo se solidními nádory a předčasně narozené děti. Rizikovými faktory jsou také pokročilý věk, větší chirurgické zákroky a intenzivní chemoterapeutická nebo jiná imunosupresivní léčba (Morschhäuser, 2012; Tani et al, 2012). Významný predispoziční faktor pro rozvoj mykotické infekce představují také žilní katétry (Schutze, 2001).

Způsob získání nákazy může být exogenní (z okolního prostředí), kdy v nemocnicích může být zdrojem infekce vzduch, kůže a sliznice infikovaných pacientů, kontaminované roztoky nebo různé předměty. K endogenní nákaze dochází při aktivaci latentní infekce či přemnožení mykotických agens, přítomných na sliznicích původně jako součást běžné mikroflóry, které se mohou u těžce imunokompromitovaných pacientů dostat až do krevního oběhu a šířit se tak do celého organismu. Základem obrany proti houbovým infekcím je buněčný typ imunity, především fagocyty a T-lymfocyty (Jedličková, 2006).

Na základě buněčné morfologie rozdělujeme mikromycety na dva základní typy, kvasinkovité a vláknité houby. Nejdůležitějšími lékařsky významnými kvasinkami jsou zástupci rodu *Candida*. Dále k nim patří například rody *Trichosporon*, *Malassezia* a *Cryptococcus neoformans*. Nejčastějšími vláknitými houbami infikujícími člověka

v komunitě jsou dermatofyty. V nemocnicích ohrožují život pacientů především aspergily a zygomycety (Hajdu *et al*, 2009).

1.1.1. Infekce způsobené kandidami

Nejčastější mykotickou infekcí u lidí je kandidóza. Způsobují ji kvasinky rodu *Candida*. Nejčastější je *Candida albicans*, která způsobuje přibližně okolo 50 % onemocnění. Dalšími častými druhy jsou *Candida glabrata*, *Candida tropicalis*, *Candida krusei*, *Candida parapsilosis* a *Candida lusitanae*. Někdy se tyto druhy označují jako non-*albicans* (Chow *et al*, 2008; Klepser, 2011). Kandidy představují u většiny populace součást normální mikroflóry lidského organismu, ale při narušení funkce imunitního systému dochází ke vzniku opakovaných povrchových infekcí nebo systémových mykóz (Tani *et al*, 2012). Infekce mají většinou endogenní charakter.

Podle klinických projevů rozlišujeme lokální (slizniční nebo kožní) a systémové formy infekce (Haber *et al*, 1995). Lokální postihují nejčastěji ústní a poševní sliznici. Nejznámější formu orální kandidózy představuje akutní pseudomembranózní forma známá jako soor (moučnivka). Nejčastější je však chronická atrofická kandidóza, častá u pacientů se zubní protézou nebo ortodontickými přístroji. Mezi lokální infekce patří dále vaginální kandidóza, intertrigo (kožní infekce v místech vlhké zapáčky), parochynium (zánět nehtového lůžka) a onychomykóza (postižení nehtové ploténky) (Hamal *et Svobodová*, 2011). Na rozdíl od lokálních představují systémové kandidózy život ohrožující onemocnění. Jejich frekvence se za poslední čtyři desetiletí významně zvýšila (Schuster *et al*, 2013). Jsou při nich napadány různé orgány a orgánové systémy, nejčastěji plíce, slezina, játra, ledviny, oko a centrální nervová soustava. Nejzávažnější variantou systémové infekce je kandidémie. Dochází při ní k invazi kvasinek do krevního řečiště. Jejím důsledkem může být vznik diseminované kandidózy, kdy dochází k invazi do různých vnitřních tkání a orgánů (Haber *et al*, 1995).

1.1.2. Infekce způsobené aspergily

V nemocničním prostředí představují druhou nejčastější infekci (Maertens, 2006). Primární cestou jejího získání je vdechnutí spor, které se dostávají do dolní části dýchacích cest. U většiny jedinců jsou odstraněny činností řasinkového epitelu. Problém ale nastává u těžce imunokompromitovaných pacientů, kdy dochází k průniku spor do plicního parenchymu, což vede ke vzniku invazivní aspergilózy (VandenBergh *et al*, 1999).

Invazivní aspergilóza je významnou příčinou onemocnění a smrti imunokompromitovaných pacientů, zejména osob s hematologickými malignitami, neutropenií, jedinců po transplantaci kostní dřeně nebo orgánů a pacientů s AIDS. Vysoká

úmrtnost souvisí s tím, že onemocnění není včas detekováno a také s menším počtem dostupných systémových antimykotik v porovnání s antibiotiky, jejich toxicitou, lékovými interakcemi a farmakokinetickými problémy (Maertens, 2006). Invazivní aspergilózu vyvolává v 80 % případů *Aspergillus fumigatus*. Mezi další původce patří *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus terreus*, *Aspergillus nidulans* a *Aspergillus ustus* (Klepser, 2011). *A. fumigatus*, ale i jiné druhy způsobují kromě invazivní plicní aspergilózy také tzv. bronchopulmonální aspergilózu, postihující pacienty s cystickou fibrózou a jinými degenerativními onemocněními plic. Jsou rovněž zodpovědné za vznik aspergilomu, kdy dochází ke kolonizaci preexistujících plicních dutin u jedinců, kteří byli úspěšně vyléčeni např. z tuberkulózy (Alcazar-Fuoli *et al*, 2008; Kessler *et al*, 2002).

1.2. Antimykotika

K terapii mykotických onemocnění se používá skupina antiinfekčních léčiv zvaná antimykotika. Podle léčebného rozsahu je dělíme na dvě skupiny, lokální a systémová. Mezi lokální řadíme například klotrimazol, ekonazol, nystatin a další (Haber *et al*, 1995). Tato práce se soustřeďuje spíše na systémová antimykotika, která podle struktury a mechanismu účinku dělíme do následujících čtyř skupin: azoly, echinokandiny, polyeny a antimetabolity, jak je přehledně demonstrováno v tabulce I. Výběr vhodné antimykotické léčby je závislý na druhu houbového původce, formě onemocnění, stavu pacienta a jeho imunitě (Hajdu *et al*, 2009).

Tabulka I. Rozdělení antimykotik

Antimykotikum	Mechanismus účinku	Zástupci
Azoly	inhibice syntézy ergosterolu reverzibilní inhibicí lanosterolu 14- α -demetylázy	mikonazol, ketokonazol, itrakonazol, flukonazol, vorikonazol, posakonazol
Echinokandiny	inhibice biosyntézy buněčné stěny prostřednictvím inhibice 1,3- β -D-glukan syntázy	kaspofungin, mikafungin, anidulafungin
Polyeny	vazba ergosterolu v houbové plazmatické membráně	amfotericin B, nystatin
Antimetabolity	inhibice syntézy houbových nukleových kyselin	flucytozin

1.2.1. Azoly

Jejich účinek spočívá v inhibici syntézy ergosterolu (Klepser, 2011; Tani *et al*, 2012). Ergosterol tvoří jednu z nejdůležitějších komponent houbové buněčné membrány a podílí se mnoha biologických vlastnostech, a to na regulaci fluidity membrány, aktivitě a distribuci integrálních proteinů a kontrole buněčného cyklu. Ergosterol a jeho biosyntetická dráha jsou nezbytné pro růst hub i jejich přežití (Alcazar-Fuoli *et al*, 2008). Inhibice syntézy ergosterolu spočívá v reverzibilní kompetitivní inhibici lanosterolu 14- α -demetylázy závislé na cytochromu P450, představující klíčový enzym biosyntézy sterolů (Che *et al*, 2009; Tani *et al*, 2012), zodpovědný za konverzi lanosterolu na ergosterol (Maertens, 2006). Při jeho inhibici dochází ke snížení množství ergosterolu, což vede k narušení membrány i její funkce, zastaví se růst hub a morfogeneze (Keady *et Thacker*, 2005). Na kvasinky působí fungistaticky, proti vláknitým houbám fungicidně.

Azolová antimykotika dělíme podle chemické struktury na imidazolová a triazolová. Mezi imidazoly patří mikonazol a ketokonazol. Triazoly dělíme na dvě generace. První generaci představují itrakonazol, flukonazol, druhou vorikonazol a posakonazol (Jedličková, 2006; Tani *et al*, 2012). Mikonazol se v dnešní době kvůli své toxicitě v systémové léčbě již nepoužívá (Haber *et al*, 1995). Ketokonazol je málo účinný, resp. neúčinný proti aspergilům a zygomycetám, lze jej však použít proti kvasinkám, dermatofytům a dimorfním houbám. Itrakonazolem je možné léčit infekce vyvolané vláknitými houbami, rezistentní jsou však zygomycety (Jedličková, 2006). Indikací pro použití flukonazolu jsou především kvasinky (kandidy a kryptokoky), rezistentní je však *C. krusei* a část kmenů *C. glabrata* (Yang *et al*, 2005). Rovněž není vhodný při léčbě aspergilových infekcí a zygomykóz (Jedličková, 2006). Vorikonazol je v současné době považován za lék volby u invazivní aspergilózy (Keady *et Thacker*, 2005; Jedličková, 2006). Posakonazol má poměrně široké spektrum účinnosti, specifická je jeho antifungální aktivita proti zygomycetám, dále působí na kandidy, aspergily a kryptokoky (Jedličková, 2006).

Obecně jsou triazoly v současné době používány proti velkému počtu různých druhů mikromycet, přičemž jsou málo toxické a mají velmi dobrý farmakodynamický účinek (Che *et al*, 2009). Další preparáty této skupiny (ravukonazol, isavukonazol) jsou nyní ve fázi klinických zkoušek.

1.2.2. Echinokandiny

Další skupinou antimykotik jsou cyklické lipopeptidy echinokandiny. Jejich účinek spočívá v inhibici syntézy houbové buněčné stěny nekompetitivní inhibicí 1,3- β -D-glukan syntázy, enzymu zodpovědného za výrobu 1,3- β -D-glukanu, který

je nezbytnou složkou houbové buněčné stěny. Snížení množství obsahu glukanu v buněčné stěně vede k jejímu oslabení, osmotickému šoku, lýze a smrti buňky (DiNubile *et al*, 2004; Maertens, 2006; Perlin, 2007). Na většinu kvasinek echinokandiny působí fungicidně, na vláknité houby fungistaticky (Klepser, 2011).

Mezi zástupce echinokandinových antimykotik patří kaspofungin, mikafungin a anidulafungin (Klepser, 2011; Tani *et al*, 2012). Pro klinické použití byl jako první licencován kaspofungin. Spektrum antimykotické aktivity echinokandinů zahrnuje kandidy, včetně druhů rezistentních k flukonazolu, a aspergily. Nejsou účinné proti *Cryptococcus neoformans* (DiNubile *et al*, 2004). Malá účinnost je pozorována rovněž vůči zygomycetám a fuzariím (Perlin, 2007).

1.2.3. Polyeny

Tato antimykotika váží ergosterol v houbové cytoplazmatické membráně, což vede k jejímu narušení, vzniku pórů a zvýšené propustnosti následované buněčnou smrtí (Hąc-Wydro *et Dynarowicz-Łątka*, 2006; Klepser, 2011; Jedličková, 2006). Jejich toxicita souvisí s vazbou na cholesterol buněčných membrán v savčích buňkách, avšak účinek na cholesterol je výrazně nižší, než na ergosterol.

Mezi polyeny patří zejména amfotericin B a nystatin. Amfotericin B objevila Elisabeth Hazen a izolovala Rachel Brown ze *Streptomyces nodosus* (Hąc-Wydro *et Dynarowicz-Łątka*, 2006; Jedličková, 2006). Používá se jako konvenční deoxycholát nebo ve formě lipidových substancí (Haber *et al*, 1995; Jedličková, 2006).

Proti kvasinkám i vláknitým houbám působí fungicidně. Ze srovnání amfotericinu B-deoxycholátu s lipidovými formami vyplývá, že posledně jmenované jsou lépe tolerovány a mohou být podávány ve vyšších dávkách (Klepser, 2011). Amfotericin B má velmi široké antimykotické spektrum zahrnující zygomycety, aspergily, dále kandidy kryptokoky i rezistentní rhodotoruly. Necitlivé jsou k amfotericinu B zástupci rodu *Scedosporium*, *Aspergillus terreus* a údajně i část kmenů *Candida lusitanae* (Klepser, 2011; Yang *et al*, 2005). Dalším zástupcem skupiny je nystatin, produkovaný různými kmeny rodu *Streptomyces* (Hąc-Wydro *et Dynarowicz-Łątka*, 2006). V současné době se používá jako součást přípravků k lokální aplikaci. Podobně jako amfotericin B je účinný proti poměrně širokému spektru patogenních hub (Hamal *et Svobodová*, 2011).

1.1.1. Antimetabolity

Jediným představitelem této skupiny je flucytozin. Jedná se o fungistatický preparát, syntetizovaný původně jako cytostatikum. Jeho mechanismus účinku spočívá

v blokádě proteosyntézy vestavěním fluorouracilu místo uracilu do ribozomální a transferové RNA.

Má poměrně úzké spektrum účinku, zaměřené na kvasinky a kryptokoky. Jeho nevýhodou je rychlý vznik rezistence. Velmi výhodné je jeho použití v kombinaci s amfotericinem B při léčbě mykotických meningitid. Nejvýznamnějším nežádoucím účinkem je negativní působení na kostní dřeň s následnou granulocytopenií (Haber *et al*, 1995; Schutze, 2001)

2. Cíl

Hlavním cílem této bakalářské práce je vypracování přehledu současného stavu testovacích metod určených ke stanovení citlivosti k antimykotikům.

Jako dílčí cíle byly stanoveny:

- shromáždění dostupných literárních zdrojů
- přehled vývoje standardizovaných postupů
- charakterizace a hodnocení standardizovaných metodik a současných komerčních produktů
- získání praktických zkušeností s využitím jedné z komerčních souprav pro testování klinických izolátů kandid a aspergilů.

3. Metody testování citlivosti

Testy určené pro stanovení citlivosti k antimykotikům jsou zaměřeny na houby, které mohou způsobit onemocnění, zejména na druhy rezistentní k běžným antimykotickým přípravkům (EUCAST, 2008). Stanovení citlivosti mikromycet k antimykotikům se zavádí kvůli zvyšující se frekvenci systémových mykóz u imunosuprimovaných pacientů a zvyšujícímu se výskytu rezistentních kmenů mikromycet. Díky testování citlivosti můžeme včas detekovat rezistenci mikromycet k některým druhům antimykotik před zahájením léčby a zabránit tak smrti pacienta (Mallátová *et al*, 2011). Kromě stanovení rezistence má testování citlivosti význam pro epidemiologické studie a srovnání *in vitro* aktivity nových a stávajících antimykotik (EUCAST, 2008).

3.1. Vývoj standardizovaných metodik

První institucí, která se zabývala standardizací testování citlivosti k antimykotikům, byl americký Národní výbor pro klinické laboratorní standardy (National Committee for Clinical Laboratory Standards - NCCLS) (Mallátová *et al*, 2011), přejmenovaný v roce 2005 na Ústav pro klinické a laboratorní standardy (Clinical and Laboratory Standards Institute - CLSI) (NCCLS, 2005). Tento ústav vytvořil Subkomisi pro testování citlivosti pro antimykotika v roce 1982. Výslednou prací subkomise byla metodika určená pro kvasinky a vláknité houby.

V Evropě se problematikou testování antimikrobiální citlivosti zabývá Evropská společnost klinické mikrobiologie a infekčního lékařství (European Society of Clinical Microbiology and Infectious - ESCMID). V rámci této společnosti je vytvořena Evropská komise pro testování antimikrobiální citlivosti (The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing - EUCAST). V roce 1982 v rámci ní byla vytvořena Subkomise pro testování antifugální citlivosti (Antifungal susceptibility testing - AFST). Výsledkem její práce jsou standardizované dokumenty k testování citlivosti u kvasinek a vláknitých hub (Mallátová *et al*, 2011).

3.1.1. Standardizované diluční metody

Používají se k určení minimálních inhibičních koncentrací (MIC) antimykotických látek. Sleduje se schopnost hub viditelně růst na mikrotitrační destičce, ta obsahuje živné médium a sériové ředění antimykotik. MIC je definována jako nejnižší koncentrace antimykotika způsobující inhibici růstu hub. Referenční diluční metody pro testování

antimikrobiální citlivosti se využívají pro stanovení aktivity nového antimykotika, k potvrzení citlivosti organismu, u kterého rutinní testy dávají nejasné výsledky a pro stanovení citlivosti hub, kde běžné diluční testy nemusejí podávat spolehlivé výsledky (EUCAST, 2008).

Prvním výsledkem Subkomise pro testování citlivosti pro antimykotika (CLSI) byl v roce 1992 dokument M27 nazvaný Referenční metoda pro antifungální testování citlivosti kvasinek bujónovou diluční metodou, jeho nejaktuálnější verzí je dokument M27-A3 z roku 2008. V roce 1998 byla vydána Referenční metoda pro testování citlivosti konidiogenních vláknitých hub bujónovou diluční metodou, dokument M38. Nejnovější variantu představuje dokument M38-A2 vydaný v roce 2008 (Guinea et al, 2007; Mallátová et al, 2011).

Subkomise pro testování antifungální citlivosti (EUCAST – AFST) vydala standardizovaný dokument EDef 7.1 Metoda pro stanovení citlivosti k antifungálním látkám pro fermentující kvasinky bujónovou diluční metodou roku 2008, revidován byl 2012 (EDef 7.2). Později byl vytvořen dokument i pro vláknité houby EDef 9.1 Metoda pro stanovení minimálních inhibičních koncentrací antifungálních látek konidiogenních vláknitých hub diluční bujónovou metodou (Arendrup et al, 2012; Mallátová et al, 2011). Vývoj uvedených metodik je uveden v Tabulce II.

Metodický postup obou standardizovaných metod je velmi podobný, přesto existuje několik rozdílů. Například pro kvasinky jsou rozdíly v metodice následující: dno jamek mikrotitrační destičky CLSI kulaté, EUCAST rovné; obsah glukózy v médiu RPMI 1640 CLSI 0,2 %, EUCAST 2,0 %; denzita inokula CLSI $0,5-2,5 \times 10^3$ cfu/ml, EUCAST $0,5-2,5 \times 10^5$ cfu/ml; doba inkubace CLSI 24 a 48 hodin, EUCAST 24 hodin; vyhodnocení hodnoty MIC houbových patogenů CLSI vizuálně, zatímco podle dokumentu EUCAST fotometricky. Výsledné hodnoty MIC získané podle postupů v dokumentech CLSI a EUCAST přitom vykazují vysokou korelaci, až 95 % (Mallátová et al, 2011; Pfaller et al, 2010).

Problémem této metody je obtížná dostupnost čistých forem antimykotických přípravků přímo od výrobce (přípravky určené ke klinickému použití nesmí být testovány) a také technicky náročné provedení metodiky. Antimykotika se musí skladovat v desikátoru, většinou při -20 °C, aby nedošlo ke ztrátě jejich účinnosti. K rozpuštění se u flucytozinu, flukonazolu, kaspofunginu, mikafunginu používá voda a pro amfotericin B, ketokonazol, itrakonazol, vorikonazol, posakonazol a anidulafungin dimetylsulfoxid (DMSO). Jako živnou půdu je příhodné použít médium RPMI 1640 s glutaminem, bez obsahu bikarbonátů a s fenolovou červení jako barevným indikátorem pH. Růst kolonií v jamkách lze vyhodnotit vizuálně.

Kontrola správného průběhu výsledků metody se provádí pomocí kmenů ke kontrole kvality (quality kontrol – QC), nejčastěji pochází z Americké sbírky typových kultur (ATCC) a dodávají se v lyofilizovaném stavu. Metodika CLSI používá kmeny *Candida parapsilosis* ATCC 22019, *Candida krusei* ATCC 6258, *Paecilomyces variotii* ATCC MYA-3630 a EUCAST *Candida Albicans* ATCC F8555, *Candida krusei* CL 3403, *Aspergillus fumigatus* ATCC 204305, *Aspergillus fumigatus* F 6919, *Aspergillus flavus* CM 1813 (EUCAST, 2008; Mallátová et al, 2011).

Tabulka II. Vývoj standardizovaných metodik.

	CLSI			EUCAST		
	Typ metody	Číslo dokumentu	Rok vydání	Typ metody	Číslo dokumentu	Rok vydání
Kvasinky	diluční	M27-P	1992	diluční	EDis 7.1	2002
	diluční	M27-T	1995	diluční	EDef 7.1	2008
	diluční	M27-A	1997	diluční	EDef 7.2	2012
	diluční	M27-A2	2002			
	diluční	M27-A3	2008			
	difúzní	M44-P	2003			
	difúzní	M44-A	2004			
	difúzní	M44-A2	2009			
Vláknité houby	diluční	M38-P	1998	diluční	EDef 9.1	2008
	diluční	M38-A	2002			
	diluční	M38-A2	2008			
	difúzní	M51-P	2009			
	difúzní	M51-A	2010			

CLSI = Clinical and Laboratory Standards Institute; EUCAST = The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing

Dokumenty: P = proposed (navrhovaný), T = tentative (zkusmý), A = approved (schválený)

3.1.2. Standardizované difúzní metody

Disková difúzní metoda představuje jednoduchou, flexibilní a cenově dostupnou alternativu k mikrodiluční metodice (Espinell-Ingroff, 2007). Princip metody spočívá v měření zón inhibice růstu mikromycet. Inhibiční zóna vzniká v důsledku difúze

antimikrobiálních látek z disků napuštěných přesně určenou koncentrací antimikrobiální látky na agarové plotně, ty jsou před vlastním položením impregnovaných disků inokulovány testovaným organismem. Vyhodnocení spočívá ve změření velikosti inhibičních zón. Doba inkubace se odvíjí v závislosti na druhu mikroorganismu (McGill *et al*, 2009).

Metodiky testování citlivosti jsou uvedeny v dokumentech CLSI M44 a M51. Dokument M44 je určen k testování citlivosti kvasinek difúzní diskovou metodou, nejnovější verzí je dokument M44-A2. Dokument M51, nyní verze M51-A, zahrnuje metodiku pro testování vláknitých hub, ale není určen pro dermatofyta. Výsledky uvedených standardizovaných difúzních metod poskytují hodnoty srovnatelné s hodnotami získanými dilučními technikami.

Postupy pro testování vláknitých hub a kvasinek se od sebe liší v několika bodech. Vláknité houby se kultivují na Mueller-Hinton agaru. Při přípravě média pro kvasinky se k tomuto agaru přidává ještě 2% glukóza a metylénová modř, které zlepšují růst kvasinek a poskytují ostřejší inhibiční zóny kolem disků. Disky mají přesně stanovené množství antimykotik, které se vzájemně liší, obvykle v souvislosti s jejich schopností difúze. Denzita inokula se v případě vláknitých hub upravuje na hodnotu $0,4-5 \times 10^6$ cfu/ml, pro kandidy $1-5 \times 10^6$ cfu/ml. U vláknitých hub se denzita upravuje pomocí spektrofotometru, u kandid vizuálně podle stupnice McFarlanda. Inkubační doba je různá, specifická pro jednotlivé druhy mikromycet (Espinel-Ingroff, 2007; Mallátová *et al*, 2011).

Podle průměru inhibiční zóny je testovaný kmen zařazen do kategorie citlivý, citlivý v závislosti na dávce, intermediární, rezistentní, či necitlivý. Výhodami této metody jsou jednoduchost provedení a nízká cena, lze ji proto s výhodou použít v rutinní laboratorní diagnostice. Jediným problémem je její kvalitativní charakter, proto by u zjištěných rezistentních a málo citlivých kmenů měla být stanovena kvantitativní metodou hodnota MIC (Mallátová *et al*, 2011).

3.2. Komerční soupravy

V rutinní diagnostické praxi jsou vesměs upřednostňovány komerční soupravy, které z výše uvedených standardizovaných metod vycházejí. Jejich hlavní výhodou je, že se nemusí připravovat, ale objednájí se přímo u výrobce. I když jde o cenově nákladnější přístup, je vyvážen značnou časovou úsporou, ta je při zpracovávání velkého množství vzorků v běžné diagnostické laboratoři zásadní (Cuenca-Estrella, 2010).

Existuje řada souprav od různých výrobců založená na kvalitativním i kvantitativním principu. Na základě nedávného doporučení odborníků je k testování kandid a kryptokoků nejvhodnější Sensititre YeastOne, zatímco k testování vláknitých hub a ostatních druhů kvasinek je nejvhodnější E-test (Mallátová *et al*, 2011).

3.2.1. Diluční

Sensititre YeastOne

Mikrodiluční kolorimetrický test Sensititre YeastOne (TREK Diagnostic Systems) patří mezi kvantitativní metody. Umožňuje snadnou identifikaci rezistentních kmenů mikromycet vůči vybraným druhům antimykotik (Mallátová *et al*, 2011).

Souprava je primárně určena k testování kvasinek. V současné době je však výrobcem doporučena i k testování aspergilů. Jednotlivé jamky mikrotitrační destičky obsahují kolorimetrický indikátor pH Alamar blue a dvojnásobně se zvyšující koncentrace antimykotik ve vysušeném stavu (Carrillo-Muñoz *et al*, 2003). Souprava se vyrábí v několika variantách, většinou obsahuje: flukonazol, itrakonazol, ketokonazol, posakonazol, vorikonazol, flucytozin, amfotericin B a kaspofungin. Antimykotika jsou v jamkách mikrotitrační destičky nejčastěji v 11- nebo 12-násobných koncentracích. Proces přípravy antimykotik se technologicky shoduje s dokumentem CLSI M27. K rehydrataci vysušených antimykotik dochází přidáním 100 μ l houbového inokula do každé z jamek mikrotitrační destičky. Příprava a konečná koncentrace inokula je pro kvasinky a vláknité houby odlišná. U aspergilů se přidává k 11 ml inokulačního bujónu YeastOne obsahujícího médium RPMI 1640 (je součástí soupravy) 20 μ l spor rozpuštěných v destilované vodě, konečná koncentrace je pak $0,4-5 \times 10^4$ cfu/ml. U kvasinek se denzita suspenze upravuje na hodnotu odpovídající rozmezí $0,5-2,5 \times 10^3$ cfu/ml. Množství buněk se měří a kontroluje za použití spektrofotometru při vlnové délce 530 nm. Při růstu mikromycet dochází k barevné změně, obsah jamky z původní modré barvy zružoví. V negativním případě zůstává obsah modrý. Vyhodnocení destiček se provádí po inkubaci při 35°C u kvasinek po 24 hodinách, u vláknitých hub po 48 až 72 hodinách a u kryptokoků za 72 hodin, nejlépe s pomocí čtecího zrcátka.

Výhodou testu je jeho spolehlivost a dále v porovnání se standardizovanými dilučními metodikami i jednoduchost a rychlost provedení. Dá se použít pro rutinní laboratorní testování (Mallátová *et al*, 2011, Carrillo-Muñoz *et al*, 2003).

V praxi tuto metodu použili Carrillo-Muñoz *et al* (2003) k testování 100 druhů oportunních vláknitých hub (*Aspergillus* spp., *Fusarium* spp., *Scedosporium* spp.), kdy potvrdili spolehlivost a vhodnost techniky při rutinním laboratorním testování. Bertout *et al*

(2011) srovnávali Sensititre YeastOne s referenční metodikou CLSI (M27-A3) s použitím 102 kandid a kryptokoků, kdy byla také prokázána dobrá shoda výsledků.

V České republice je k dispozici analogický panel Micronaut-AM (Merliné). Vyrábí se ve dvou variantách: k testování jednoho kmene kvasinek s širším spektrem a větším počtem ředění antimykotik (celkem 9 druhů) a dvou kmenů ke stanovení MIC 6 antifungálních látek.

Fungitest

Uvedená souprava firmy Bio-Rad Laboratories slouží na rozdíl od Sensititre YeastOne pouze k semikvantitativnímu stanovení citlivosti a je rovněž založená na mikrodiluční metodě. Je vhodná zejména pro testování druhů *Candida* spp. a *Cryptococcus neoformans*. Testuje citlivost k hraničním koncentracím antimykotik, proto můžeme zjistit, zdali testovaný kmen je citlivý, citlivý v závislosti na koncentraci antimykotika nebo rezistentní, ale nelze stanovit přesnou hodnotu MIC (Davey *et al*, 1998; Mallátová *et al*, 2011).

Fungitest využívá 6 druhů antimykotik: amfotericin B, flucytozin, mikonazol, ketokonazol, itrakonazol a flukonazol ve dvou různých hraničních koncentracích: amfotericin B 2 a 8 µl/ml, flucytozin 2 a 32 µl/ml, mikonazol 0,5 a 4 µl/ml, ketokonazol 0,5 µl/ml a 4 µl/ml, itrakonazol 0,5 a 4 µl/ml a pro flukonazol 8 a 0,4 µl/ml. Tyto hraniční koncentrace jsou obsaženy v 16jambkové mikrotitrační destičce, přičemž 2 jamky slouží jako pozitivní kontrola, 2 jamky jako negativní kontrola. Zbýlých 12 jamek obsahuje po dvou hraničních koncentracích šesti antimykotik. Postup inokulace je podobný jako u Sensititre YeastOne. Inkubace probíhá při 37 °C po dobu 48 hodin u kandid, 30 °C 72 hodin u kryptokoků. Vyhodnocení MIC se provádí na základě barevné změny (Davey *et al*, 1998; Willinger *et al*, 2002).

Willinger *et al* (2002) na 50 druzích kandid zjistili korelaci výsledků s metodikou CLSI dokumentu M27, dosahovala 96,4 až 100 %. Dobré shody výsledků prokázali i Davey *et al* (1998).

ATB-fungus

Tato souprava firmy bioMérieux, v současné době verze ATB-fungus 3, se vyhodnocuje na rozdíl od předchozích metod turbidimetricky (tj. na základě zakalení), nikoliv kolorimetricky.

Sestává z plastické mikrodestičky obsahující 16 párů jamek. První pár slouží jako kontrola růstu, neobsahuje tedy žádné antimykotikum. Dalších 15 párů jamek obsahuje 4 antimykotika v následujícím, dvojnásobně se zvyšujícím rozmezí koncentrací:

amfotericin B 0,5-16 µg/ml, flukonazol 0,125-4 µg/ml, vorikonazol 0,06-8 µg/ml a flucytozin 4-16 µg/ml. Nevýhodou je úzké spektrum antimykotik (Eraso et al, 2008; Mallátová et al, 2011).

Eraso et al (2008) srovnávali dvě komerční metody, výše zmíněný ATB Fungus a Sensititre YeastOne u 133 kmenů kandid. Hodnoty minimálních inhibičních koncentrací stanovené oběma soupravami se shodovaly v rozsahu 91,2-97,7 %.

VITEK 2 AST-YS

Jedná se o plně automatizovaný komerční spektrofotometrický systém (bioMérieux). Spektrofotometricky určuje růst kvasinek a umožňuje především biochemickou identifikaci kvasinek, ale rovněž stanovení jejich citlivosti k systémovým antimykotikům. Navíc lze stanovit i hodnotu MIC (Mallátová et al, 2011).

Tento systém zahrnuje specifické karty, které umožňují identifikaci druhu na základě srovnání biochemického profilu s rozsáhlou databází. Obsahuje také kartu AST-YS01 umožňující kvantitativní testování citlivosti k amfotericinu B, flukonazolu, flucytozinu, kaspofunginu a vorikonazolu. Představuje v podstatě miniaturizovanou verzi techniky dvojitého ředění používaného pro stanovení MIC. Vzhledem k tomu, že je systém plně automatizovaný, po umístění karty do přístroje není za potřebí další manuální manipulace. Naočkování karty probíhá pomocí vakuově plnicího procesu. Poté dochází k zapečetění a automatickému vložení do čtecího inkubátoru. Hodnoty MIC jsou určeny pomocí integrovaného softwarového programu. Výhodou systému je, že vyhodnocuje MIC velmi rychle ve srovnání s ostatními metodami (Cuenca-Estrella, 2010).

Výsledky získané pomocí uvedeného systému vykazují vysokou korelaci s metodikami CLSI i EUCAST, nezahrnují však pomalu rostoucí druhy. Výhodou je možnost současné identifikace a stanovení citlivosti testovaného kmene, plně automatizovaný postup, rychlost vyhodnocení po 12 až 14 hodinách a možnost určení MIC i pro kombinace systémových antimykotik. Nevýhodami jsou úzké spektrum antimykotik a omezené množství jejich testovaných koncentrací (Cuenca-Estrella, 2010; Mallátová et al, 2011).

V nedávné době Cuenca-Estrella et al (2010) po testování 154 kvasinek dospěli k závěru, že VITEK 2AST-YS představuje rychlou a spolehlivou alternativu technik CLSI nebo EUCAST v klinických laboratořích.

3.2.2. Difúzní

E-test (Epsilometer-test)

Komerční metoda E-test (bioMérieux) principiálně vychází z diskové difúzní metody, ale slouží ke kvantitativnímu hodnocení.

E-test je plastický proužek obsahující gradient antimykotika ve vysušené formě na jeho spodní straně, která se přikládá na povrch média RPMI 1640 s 2% glukózou s testovaným kmenem kvasinek nebo vláknitých hub. Během následné inkubace dochází k difúzi antimikrobiální látky do agaru. Druhá strana proužku obsahuje stupnici zobrazující hodnoty gradientu koncentrace antimykotika. Hodnota MIC odpovídá místu, kde se protíná inhibiční zóna s proužkem. K dispozici jsou proužky obsahující všechny druhy významných systémových antimykotik (Mallátová *et al*, 2011; McGill *et al*, 2009). Vyhodnocení testu se provádí po 24, 48 nebo 72 hodinách v závislosti na druhu testované mikromycety.

E-test je vhodný k testování citlivosti kvasinek i vláknitých hub (Guinea *et al*, 2007). Výhodou je možnost určení hodnoty MIC při velmi jednoduchém technickém provedení (Mallátová *et al*, 2011).

Guinea *et al* (2007) srovnávali E-test s metodikou CLSI M38-A na 283 klinických izolátech druhu *A. fumigatus* pro amfotericin B, itraconazol a vorikonazol. Hodnoty MIC obou metod velmi dobře korelovaly, výjimkou byl amfotericin B, kde byly ve 23 % případů zaznamenány odlišné výsledky.

V současné době nabízí analogický výrobek italská firma Liofilchem pod označením MIC Test strip.

Neo-Sensitabs

Jedná se o kvalitativní systém vycházející ze standardizované difúzní diskové metody CLSI M44 a M51. Obvyklé papírové disky jsou nahrazeny tabletami se standardizovaným množstvím antimykotik (Mallátová *et al*, 2011). Uvedená metoda je vhodná k testování kvasinek i vláknitých hub (Espinel-Ingroff *et Canton*, 2008).

Nevýhodou této metody je kvalitativní charakter, tedy nemožnost určení MIC (Espinel-Ingroff, 2007; Espinel-Ingroff *et Canton*, 2008).

Espinel-Ingroff *et al* (2007) prokázali u kandid vysokou shodu se standardní mikrodiluční technikou M27-A u pěti systémových antimykotik, přičemž celková kategorická shoda (tj. souhlasné zařazení do kategorie citlivý, citlivý v závislosti na dávce, intermediární nebo rezistentní) byla 98,2 %. U vláknitých hub použili tuto metodu

Espinel-Ingroff *et* Canton (2008) rovněž při testování pěti systémových antimykotik, přičemž průměrná shoda s dilučním standardem M38-A byla průměrně 86,6 %.

4. Experimentální část

Cílem této části práce bylo stanovení MIC u vybraných kmenů kvasinek a vláknitých hub k systémovým antimykotikům pomocí soupravy Sensititre YeastOne.

4.1. Materiál a metodika

Testovaný soubor tvořilo po deseti kmenech kandid a aspergilů náhodně vybraných z klinického materiálu. V případě kandid šlo o šest kmenů *Candida utilis* a čtyři *Candida pelliculosa*. Z aspergilů se jednalo o tři kmeny *Aspergillus felis* a *Aspergillus lentulus*, dva *Aspergillus calidoustus* a po jednom *Aspergillus nidulans* a *Aspergillus viridinutans*.

Ke stanovení citlivosti byla použita destička Sensititre YeastOne, varianta YO-9, jejíž spektrum a ředění antimykotik je přehledně demonstrováno v tabulce III.

Tabulka III. Rozložení a koncentrace antimykotik [$\mu\text{g/ml}$] YeastOne.

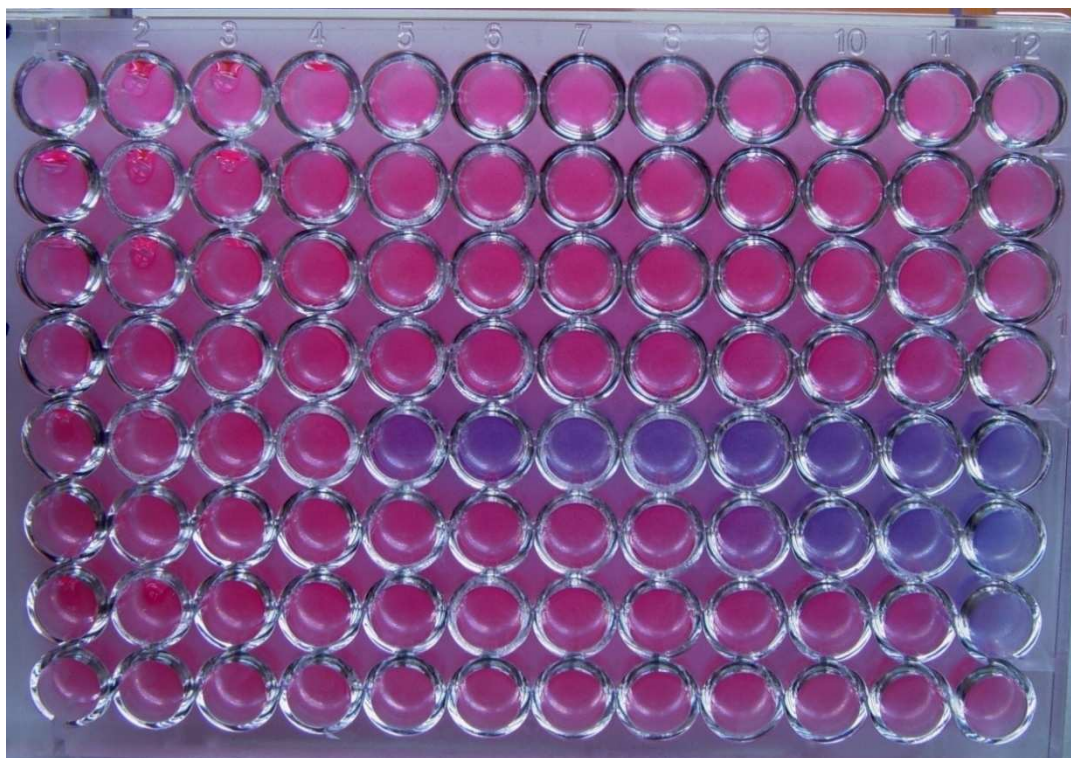
POS	AND 0,015	AND 0,03	AND 0,06	AND 0,12	AND 0,25	AND 0,5	AND 1	AND 2	AND 4	AND 8	AB 0,12
MF 0,008	MF 0,015	MF 0,03	MF 0,06	MF 0,12	MF 0,25	MF 0,5	MF 1	MF 2	MF 4	MF 8	AB 0,25
CAS 0,008	CAS 0,015	CAS 0,03	CAS 0,06	CAS 0,12	CAS 0,25	CAS 0,5	CAS 1	CAS 2	CAS 4	CAS 8	AB 0,5
FC 0,06	FC 0,12	FC 0,25	FC 0,5	FC 1	FC 2	FC 4	FC 8	FC 16	FC 32	FC 64	AB 1
PZ 0,008	PZ 0,015	PZ 0,03	PZ 0,06	PZ 0,12	PZ 0,25	PZ 0,5	PZ 1	PZ 2	PZ 4	PZ 8	AB 2
VOR 0,008	VOR 0,015	VOR 0,03	VOR 0,06	VOR 0,12	VOR 0,25	VOR 0,5	VOR 1	VOR 2	VOR 4	VOR 8	AB 4
IZ 0,015	IZ 0,03	IZ 0,06	IZ 0,12	IZ 0,25	IZ 0,5	IZ 1	IZ 2	IZ 4	IZ 8	IZ 16	AB 8
FZ 0,12	FZ 0,25	FZ 0,5	FZ 1	FZ 2	FZ 4	FZ 8	FZ 16	FZ 32	FZ 64	FZ 128	FZ 256

POS – pozitivní kontrola, AND – anidulafungin, AB – amfotericin B, MF – mikafungin, CAS – kaspofungin, FC – flucytozin, PZ – posakonazol, VOR – vorikonazol, IZ – itraconazol, FZ – flukonazol

Příprava inokula a postup testování byly prováděny podle pokynů výrobce. Stručně, v případě kandidových kultur bylo bakteriologickou kličkou odebráno několik izolovaných kolonií, které byly rozpuštěny ve sterilní vodě. Optická denzita suspenze byla spektrofotometricky upravena na hodnotu odpovídající $0,6-5 \times 10^6$ cfu/ml. 20 μ l suspenze bylo poté přeneseno do 11 ml YeastOne bujónu. Toto inokulum bylo rozpipetováno po 100 μ l do jamek mikrotitrační destičky, která byla poté překryta krycí fólií. Destičky byly umístěny maximálně po třech nad sebou do termostatu a inkubovány 24 až 48 hodin při 35°C.

V případě vláknitých hub byly pomocí vatového tampónu sbírány konidie, které byly přeneseny do fyziologického roztoku s Tweenem 20. Poté z něj byl odebrán supernatant, který byl přenesen do YeastOne bujónu tak, aby vzniklo inokulum o koncentraci $0,5 \times 5 \cdot 10^4$ cfu/ml. Další postup byl shodný s výše uvedeným popisem u kandid. Destičky byly inkubovány 48 až 72 hodin při 35°C.

Vyhodnocení bylo provedeno na základě změny zbarvení z modré (inhibice růstu houby) na růžovou (indikující růst houby). Způsob hodnocení je demonstrován na obrázku 1. MIC byla stanovena jako nejnižší koncentrace antimykotika, u níž zůstalo v jamce modré zbarvení. V testovací destičce byla zařazena kontrola růstu, což byla jamka, která neobsahovala žádné antimykotikum.



Obr. 1. Způsob hodnocení růstu aspergilů v destičkách soupravy Sensititre YeastOne

4.2. Výsledky

Výsledky testování jsou přehledně shrnuty v tabulkách IV a V.

Vyplývá z nich, že hodnoty MIC se lišily v závislosti na době inkubace. U kvasinek byly významně odlišné po 24 a 48 h inkubace, u vláknitých hub po 48 a 72 h. Při porovnávání výsledků byly nakonec u kvasinek využity hodnoty MIC po 48 h a u vláknitých hub po 72 h.

Při porovnávání účinnosti testovaných antimykotik *in vitro* u kvasinek bylo zjištěno, že proti *C. utilis* byl s jedinou výjimkou (kmen 2-38) málo účinný kaspofungin, neboť jeho MIC byla vyšší, než nejvyšší koncentrace uvedeného antimykotika v ředících jamkách. Vyšší hodnoty MIC byly u většiny izolátů zjištěny také v případě flucytosinu (16,0 µg/ml). Vůči ostatním antifungálním látkám byly izoláty *C. utilis* i *C. pelliculosa* poměrně dobře citlivé. Nejširšího rozmezí MIC bylo dosaženo u anidulafunginu (0,03-0,25 µg/ml). V případě žádného antimykotika nebyly zjištěny podstatné rozdíly mezi MIC obou testovaných druhů.

Kmeny aspergilů byly naopak k většině antimykotik rezistentní, což zřejmě souviselo s výběrem druhů, které jsou z hlediska výskytu v klinickém materiálu poměrně vzácné, ale v tomto případě se jednalo o součást specificky zaměřeného výzkumu. Kromě očekávané rezistence k flukonazolu byla naprostá většina izolátů vysoce rezistentní i k echinokandinům, itrakonazolu a flucytozinu, kde byl obvykle zaznamenán růst i v jamkách s nejvyššími koncentracemi antimykotik. Vyšší hodnoty MIC byly zjištěny i v případě amfotericinu B (rozmezí 1,0 – 4,0 µg/ml) a vorikonazolu (s jedinou výjimkou rozmezí 2->8 µg/ml). Nejnižší MIC byly stanoveny u posakonazolu, kde se s výjimkou kmenů *A. calidoustus* pohybovaly v rozmezí 0,12 – 0,5 µg/ml. Z hlediska výsledků MIC všech testovaných antimykotik byl jako nejcitlivější zaznamenán kmen *A. calidoustus* 08.

Tab. IV. Vyhodnocení metody Sensititre YeastOne u kandid.

Antimykotikum	AB	AND	MF	CAS	FC	PZ	VOR	IZ	FZ	AB	AND	MF	CAS	FC	PZ	VOR	IZ	FZ
	MIC/24 hodin [$\mu\text{g/ml}$]									MIC/48 hodin [$\mu\text{g/ml}$]								
CAPE 2-28	0,5	0,06	0,03	0,25	8,0	1,0	0,06	0,5	2	0,5	0,25	0,03	0,5	16,0	2,0	0,06	1,0	4,0
CAPE 2-29	0,5	0,03	0,06	0,12	< 0,06	0,5	0,03	0,25	2,0	1,0	0,12	0,06	0,5	0,12	1,0	0,06	0,5	4,0
CAPE 2-30	0,5	0,12	0,06	0,25	8,0	0,5	0,03	0,5	2,0	1,0	0,12	0,06	0,25	16,0	4,0	0,06	0,5	2,0
CAUT 2-33	0,25	0,03	0,03	0,06	8,0	1,0	0,06	0,5	4,0	1,0	0,12	0,06	>8,0	16,0	1,0	0,06	1,0	4,0
CAUT 2-34	0,5	0,03	0,03	0,06	8,0	1,0	0,06	0,5	2,0	1,0	0,06	0,03	>8,0	16,0	1,0	0,12	0,5	4,0
CAUT 2-35	0,25	0,12	0,06	0,5	< 0,06	0,5	0,03	0,5	2,0	0,5	0,12	0,06	>8,0	0,12	1,0	0,06	1,0	8,0
CAUT 2-36	0,5	0,06	0,06	0,12	8,0	0,5	0,06	0,5	2,0	1,0	0,06	0,06	>8,0	16,0	1,0	0,06	0,5	4,0
CAUT 2-37	0,5	0,03	0,06	0,12	8,0	0,5	0,03	0,25	2,0	1,0	0,06	0,06	>8,0	16,0	1,0	0,06	0,5	4,0
CAUT 2-38	0,25	0,06	0,03	0,06	0,12	0,5	0,03	0,5	2,0	0,5	0,06	0,03	0,12	0,25	1,0	0,06	0,5	2,0
CAPE 3-16	0,25	0,03	0,03	0,06	8,0	1,0	0,06	0,5	2,0	0,5	0,03	0,06	0,5	16,0	1,0	0,12	0,5	4,0

CAPE = *Candida pelliculosa*, CAUT = *Candida utilis*

AB = amfotericin B, AND = anidulafungin, MF = mikafungin, CAS = kaspofungin, FC = flucytozin, PZ = posakonazol, VOR = vorikonazol, IZ = itrakonazol, FZ = flukonazol

Tab. V. Vyhodnocení metody Sensititre YeastOne u aspergilů.

Antimykotikum	AB	AND	MF	CAS	FC	PZ	VOR	IZ	FZ	AB	AND	MF	CAS	FC	PZ	VOR	IZ	FZ
	MIC/48 hodin [µg/ml]									MIC/72 hodin [µg/ml]								
ASCA 03	0,5	<0,015	0,06	0,5	16,0	1,0	1,0	>16,0	>256,0	1,0	>8,0	>8,0	>8,0	64,0	2,0	>8,0	>16,0	>256,0
ASCA 08	1,0	<0,015	0,06	0,5	16,0	1,0	1,0	>16,0	>256,0	1,0	0,25	0,5	8,0	64,0	1,0	1,0	>16,0	128,0
ASFE 04	1,0	>8,0	>8,0	>8,0	>64,0	0,12	4,0	>16,0	>256,0	4,0	>8,0	>8,0	>8,0	>64,0	0,25	4,0	>16,0	>256,0
ASFE 05	2,0	>8,0	>8,0	>8,0	>64,0	0,25	2,0	>16,0	>256,0	4,0	>8,0	>8,0	>8,0	>64,0	0,5	4,0	>16,0	>256,0
ASFE 06	2,0	>8,0	>8,0	>8,0	>64,0	0,25	>4,0	>16,0	>256,0	4,0	>8,0	>8,0	>8,0	>64,0	0,5	>8,0	>16,0	>256,0
ASLE 06	2,0	>8,0	>8,0	>8,0	>64,0	0,12	2,0	>16,0	>256,0	4,0	>8,0	>8,0	>8,0	>64,0	0,12	2,0	>16,0	>256,0
ASLE 08	2,0	>8,0	>8,0	>8,0	>64,0	0,06	2,0	0,12	>256,0	4,0	>8,0	>8,0	>8,0	>64,0	0,12	4,0	>16,0	>256,0
ASLE 09	2,0	>8,0	>8,0	>8,0	>64,0	0,06	1,0	0,12	>256,0	4,0	>8,0	>8,0	>8,0	>64,0	0,12	2,0	>16,0	>256,0
ASNI 45	2,0	>8,0	>8,0	>8,0	>64,0	0,12	4,0	>16,0	>256,0	2,0	>8,0	>8,0	>8,0	>64,0	0,5	4,0	>16,0	>256,0
ASVI 03	2,0	>8,0	>8,0	>8,0	>64,0	0,12	2,0	>16,0	>256,0	2,0	>8,0	>8,0	>8,0	>64,0	0,25	4,0	>16,0	>256,0

ASCA = Aspergillus calidoustus, ASFE = Aspergillus felis, ASLE = Aspergillus lentulus, ASNI = Aspergillus nidulans, ASVI = Aspergillusviridinutans
AB = amfotericin B, AND = anidulafungin, MF = mikafungin, CAS = kaspofungin, FC = flucytozin, PZ = posakonazol, VOR = vorikonazol, IZ = itrakonazol, FZ = flukonazol

4.3. Závěr

Celkově lze konstatovat, že testování citlivosti kvasinek i aspergilů komerční kvantitativní diluční soupravou Sensititre YeastOne je při porovnání se standardizovanými metodikami, popsanými v dokumentech CLSI a EUCAST technicky snadno a rychle proveditelné, navíc zejména na základě nám dostupných literárních údajů poskytuje výsledky velmi dobře korelující se zmíněnými postupy, což z hlediska potřeb rutinní diagnostiky zcela vyvažuje vyšší náklady na pořízení souprav. Navíc není nutný poměrně složitý administrativní postup při získávání čistých substancí antimykotik od farmaceutických firem, což je zmíněnými dokumenty striktně vyžadováno. Proto lze uvedenou soupravu jednoznačně doporučit pro stanovení citlivosti mikromycet k systémovým antifungálním látkám v laboratořích klinické mykologie.

5. Literatura

Alcazar-Fuoli, L., Mellado, E., Garcia-Effron, G., Lopez, J. F., Grimalt, J. O., Cuenca-Estrella, J. M., Rodriguez-Tudela, J. L. (2008): Ergosterol biosynthesis pathway in *Aspergillus fumigatus*. *Steroids*, 73: 339-347.

Arendrup, M. C., Cuenca-Estrella, M., Lass-Flörl, C., Hope, W., EUCAST-AFST (2012): EUCAST technical note on the EUCAST definitive dokument EDef 7.2: method for the determinativ of broth dilution minimum inhibitory concentrations of antifungal agents for yeasts EDef 7.2 (EUCAST-AFST). *Clinical Microbiology and Infection*, 18: E246-E247.

Bertout, S., Dunyach, C., Drakulovski, P., Reynes, J., Mallié, M. (2011): Comparison of the Sensititre YeastOne dilution method with the Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI) M27-A3 microbroth dilution reference method for determining MIC of eight antifungal agents on 102 yeast strains. *Pathologie Biologie*, 59: 48-51.

Carrillo-Muñoz, A. J., Quindós, G., Ruesga, M., Valle, O., Pemán, J., Cantón, E., Hernández-Molina, J. M., Santos, P. (2003): *In vitro* antifungal susceptibility testing of filamentous fungi with Sensititre Yeast One. *Mycoses*, 49: 293-297.

Che, X., Sheng, Ch., Wang, W., Cao, Y., Xu, Y., Ji, H., Dong, G., Miao, Z., Yao, J., Zhang, W. (2009): New azoles with potent antifungal activity: Design, synthesis and molecular doping. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 44: 4218-4226.

Chow, J. K., Golan, Y., Ruthazer, R., Karchmer, A. W., Carmeli, Y., Lichtenberg, D., Chawla, V., Young, J., Hadley, S. (2008): Factors Associated with Candidemia Caused by Non-*albicans Candida* Species Versus *Candida albicans* in the Intensive Care Unit. *Clinical Infectious Diseases*, 46: 1206-1213.

Cuenca-Estrella, M., Gomez-Lopez, A., Alastruey-Izquierdo, A., Bernal-Martinez, L., Cuesta, I., Buitrago, M. J., Rodriguez-Tudela, J. L. (2010): 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*, 48: 1782-1786.

Davey, K. G., Holmes, A. D., Johnson, E. M., Szekely, A., Warnock, D. W. (1998): Comparative Evaluation of FUNGITEST and Broth Microdilution Methods for Antifungal Drug Susceptibility Testing of *Candida* Species and *Cryptococcus neoformans*. *Journal of Clinical Microbiology*, 36: 926-930.

DiNubile, M. J., Motyl, M., Sable, C. A. (2004): Caspofungin: the first licensed antifungal drug of the novel echinocandin class. *Clinical Microbiology Newsletter*, 26: 81-85.

Eraso, E., Ruesga, M., Villar-Vidal, M., Carrillo-Muñoz, A. J., Espinel-Ingroff, A., Quindós, G. (2008): Comparative evaluation of ATB Fungus 2 and Sensititre YeastOne panels for testing in vitro *Candida* antifungal susceptibility. *Revista Iberoamericana de Micología*, 25: 3-6.

Espinel-Ingroff, A. (2007): Standardized disk diffusion method for yeasts. *Clinical Microbiology Newsletter*, 29: 97-100.

Espinel-Ingroff, A., Canton, E. (2008): Comparison of Neo-Sensitabs Tablet Diffusion Assay with CLSI Broth Microdilution M38-A and Disk Diffusion Methods for Testing Susceptibility of Filamentous Fungi with Amphotericin B, Caspofungin, Posaconazole, and Voriconazole. *Journal of Clinical Microbiology*, 46: 1793-1803.

Espinel-Ingroff, A., Canton, E., Gibbs, D., Wang, A. (2007): Correlation of Neo-Sensitabs tablet diffusion assay results on three different agar media with CLSI broth microdilution M27-A2 and disk diffusion M44-A results for testing susceptibilities of *Candida* spp. and *Cryptococcus neoformans* to amphotericin B, caspofungin, fluconazole, itraconazole, and voriconazole. *Journal of Clinical Microbiology*, 45: 858-864.

EUCAST (2008): EUCAST Definitive Document Edef 7.1: method for the determination of broth dilution MIC of antifungal agents for fermentative yeasts. *Clinical Microbiology and Infection*, 14: 398-405.

Guinea, J., Peláez, T., Alcalá, L., Bouza, E. (2007): Correlation between the E test and the M-38A microdilution method to determine the activity of amphotericin B,

voriconazole, and itraconazole against clinical isolates of *Aspergillus fumigatus*. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease, 57: 273-276.

Haber, J., Jesenská, Z., Krčméry, V., Mášová, I. (1995): Systémové mykózy a jejich léčba, Galén, Praha.

Haç-Wydro, K., Dynarowicz-Łątka, P. (2006): Nystatin in Langmuir monolayers at the air/water interface. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 53: 64-71.

Hajdu, S., Obradovic, A., Presterl, E., Vécsei, V. (2009): Invasive mycoses following trauma. Injury, 40: 548-554.

Hamal, P., Svobodová, L. (2011): Mykózy a antimykotika. Interní medicína pro praxi, 13: 445-449.

Jedličková, A. (2006): Systémové mykózy, Maxdorf, Praha.

Karaca, N., Koç, A. N. (2004): In vitro susceptibility testing of dermatophytes: comparison of disk diffusion and reference broth dilution methods. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease, 48: 259-264.

Keady, S., Thacker, M (2005): Voriconazole in the treatment of invasive fungal infection. Intensive and Critical Care Nursing, 21: 370-373.

Kessler, M. M., Willins, D. A., Zeng, Q., Mastro, R. G. D., Cook, R., Doucette-Stamm, L., Lee, H., Caron, A., McClanahan, T. K., Wang, L., Greene, J., Hare, R. S., Cottarel, G., Shimer, G. H. (2002): The use of direkt cDNA selection to rapidly and effectively identify genes in the fungus *Aspergillus fumigatus*. Fungal Genetics and Biology, 36: 59-70.

Klepser, M. (2011): The value of amphotericin B in the treatment of invasive fungal infections. Journal of Critical Care, 26: 225.e1-225.e10.

Mallátová, N., Hamal, P., Kocmanová, I., Buchta, V., Menci, K. (2011): Testování citlivosti mikromycet k antimykotikům *in vitro* u imunosuprimovaných pacientů - doporučení odborníků s podporou CELL a SLM ČLS JEP. Postgraduální medicína, 13: 51-65.

Maertens, J. (2006): Caspofungin: an advanced treatment approach for suspected or confirmed invasive aspergillosis. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 27: 457-467.

McGill, K., Kelly, L., Madden, R. H., Moran, L., Carroll, C., O'Leary, A., Moore, J. E., McNamara, E., O'Mahony, M., Fanning, S., Whyte, P. (2009): Comparison of disc diffusion and epsilometer (E-test) testing techniques to determine antimicrobial susceptibility of *Campylobacter* isolates of blood and human clinical origin. *Journal of Microbiological Methods*, 79: 238-241.

Morschhäuser, J. (2010): Regulation of multidrug resistance in pathogenic fungi. *Fungal Genetics and Biology*, 47: 94-106.

NCCLS (2005): NCCLS changes name to Clinical and Laboratory Standards Institute. *Clinical Microbiology Newsletter*, 27: 113.

Otčenášek, M., Hejtmánek, M., Manych, J., Tomšíková, A. (1990): *Vyšetřovací metody při mykotických onemocněních*, Avicenum, Praha.

Perlin, D. S. (2007): Resistance to echinocandin-class antifungal drugs. *Drug Resistance Updates*, 10: 121-130.

Pfaller, M. A., Andes, D., Diekema, D. J., Espinel-Ingroff, A., Sheehan, D. (2010): Wild-type MIC distributions, epidemiological cutoff values and species-specific clinical breakpoints for fluconazole and *Candida*: Time for harmonization of CLSI and EUCAST broth microdilution methods. *Drug Resistance Updates*, 13: 180-195.

Schuster, M. G., Meibohm, A., Lloyd, L., Strom, B. (2013): Risk factors and outcomes of *Candida krusei* bloodstream infection: A matched, case-control study. *Journal of Infection*, 66: 278-284.

Schutze, G. E. (2001): Antifungal agents for the treatment of systematic mycoses. *Seminars in Pediatric Infectious Diseases*, 12: 246-253.

Tani, N., Rahnasto-Rilla, M., Wittekindt, C., Salminen, K. A., Ritvanen, A., Ollakka, R., Koskiranta, J., Raunio, H., Juvonen, R. O. (2012): Antifungal activities of novel non-azole molecules against *S. cerevisiae* a *C. albicans*. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 47: 270-277.

VandenBergh, M. F. Q., Verweij, P. E., Voss, A. (1999): Epidemiology of nosocomial fungal infection: invasive aspergillosis and the environment. *Diagnostic –microbiology and Infectious*, 34: 221-227.

Willinger, B., Engelmann, E., Hofmann, H., Metzger, S., Apfalter, P., Hirschl, A. M., Makristathis, A., Rotter, M., Raddatz, B., Seibold, M. (2002): Multicenter comparison of Fungitest for susceptibility testing of *Candida* species. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 44: 253-257.

Yang, Y-L., Li, S-Y., Cheng, H-H., Lo, H-J. (2005): Susceptibilities to amphotericin B and fluconazole of *Candida* species in TSARY 2002. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 51: 179-183.