

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

2. LÉKAŘSKÁ FAKULTA

Ústav lékařské mikrobiologie

Petra Vitáčková

**Průkaz rezistence na echinokandinová
antimykotika u *Candida* sp., pomocí
molekulárně biologických metod**

bakalářská práce

Praha 2014

Autor práce: **Petra Vitáčková**

Vedoucí práce: **MUDr. Vanda Chrenková**

Oponent práce: **MUDr. Otakar Nyč, Ph.D.**

Datum obhajoby: **2014**

Bibliografický záznam

VITÁČKOVÁ, Petra. *Průkaz rezistence na echinokandinová antimykotika u Candida sp., pomocí molekulárně biologických metod*. Praha: Univerzita Karlova, 2. lékařská fakulta, Ústav lékařské mikrobiologie, 2014. 51 s. Vedoucí diplomové práce MUDr. Vanda Chrenková.

Anotace

Invazivní infekce vyvolané rodem *Candida*, zvláště pak jeho nejvýznamnějším zástupcem *C. albicans*, patří mezi vážné komplikace, zejména u imunokompromitovaných pacientů. Případný výskyt rezistence k jednotlivým antimykotikům značně komplikuje terapii invazivních mykóz a zvyšuje morbiditu a mortalitu u těchto pacientů. Cílem této práce bylo zavedení rychlé metody detekce rezistence na kaspofungin prostřednictvím hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF.

Testování bylo prováděno na referenčním kmenu *C. albicans* CCM8261 a kmenu *C. albicans* M30 s prokázanou rezistencí na echinokandiny. K měření bylo použito dvou různých nastavení přístroje a pro následné vyhodnocení získaných spekter byla využita korelační a shluková analýza (dendrogram).

V průběhu analýzy bylo zjištěno, že publikované nastavení měření nelze aplikovat, neboť pro každý hmotnostní spektrometr je vždy nutno pracovat s nastavením od výrobce. Pomocí shlukové analýzy se podařilo odlišit citlivý a rezistentní kmen. Kvalita získaných spekter byla relativně nízká, což mohlo být způsobeno použitím nevhodného kultivačního média.

Shluková analýza prokázala možnost stanovení citlivosti pomocí hmotnostní spektrometrie, nicméně další pokusy zohledňující poznatky získané v této studii budou nutné pro případné zavedení metody do rutinní praxe.

Klíčová slova

Kvasinky, *Candida albicans*, kaspofungin, rezistence na echinokandinová antimykotika, MALDI-TOF

Annotation

Invasive diseases due to *Candida sp.*, especially by *C. albicans*, represent very severe complication in immunocompromised patients. More over the presence of antifungal resistance leads to delay of targeted antifungal therapy and increases morbidity and mortality in this group of patients. Therefore the aim was to introduce a rapid method of caspofungin resistance detection by the mass spectrometry MALDI-TOF.

The tests were performed by the use of reference strain *C. albicans* CCM8261 and caspofungin resistant strain *C. albicans* M30. Different settings of mass spectrometer were used for the measuring. The obtained spectra were evaluated by correlation and cluster analysis (dendrogram).

By cluster analysis it was possible to differentiate the susceptible and the resistant strain.

During the analysis we have found, that mass spectrometer settings are unique for each machine and we cannot use the published data. We did not succeed to determine the similarity by correlation analysis. The quality of obtained spectra was quite poor, probably because of non-suitable culture medium used in the test

The cluster analysis confirmed the possibility of resistance detection by mass spectrometry; nevertheless more testing profiting from current experience is needed for introduction of this test in routine.

Keywords

Yeasts, *Candida albicans*, caspofungin, resistance to echinocandins, MALDI-TOF

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci zpracovala samostatně pod vedením MUDr. Vandy Chrenkové, uvedla všechny použité literární a odborné zdroje a dodržovala zásady vědecké etiky. Dále prohlašuji, že stejná práce nebyla použita k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze 20.5.2014

Petra Vitáčková

Poděkování

Především děkuji své školitelce MUDr. Vandě Chrenkové, za vlídné a odborné vedení, cenné konzultace a velkou míru trpělivosti při zpracování této práce. Dále děkuji Bc. Karlovi Bubeníčkoví, Mgr. Ondrejovi Šedovi za pomoc a cenné rady. Poděkovat chci také všem ostatním pracovníkům na Ústavu lékařské mikrobiologie ve FN Motol za jejich přátelské přijetí a ochotu kdykoli pomoci. V neposlední řadě děkuji i své rodině a přátelům za podporu při mém studiu.

Obsah

SEZNAM ZKRATEK	9
ÚVOD	10
1 KVASINKY (KVASINKOVITÉ MIKROMYCETY)	11
1.1 OBECNÉ VLASTNOSTI KVASINEK – DEFINICE, ZAŘAZENÍ.....	11
1.2 MORFOLOGIE A ROZMNOŽOVÁNÍ KVASINEK	12
1.2.1 Struktura kvasinkové buňky.....	13
1.3 NEJVÝZNAMNĚJŠÍ RODY KVASINEK	15
1.3.1 Candida albicans	15
1.4 STANOVENÍ CITLIVOSTI K ANTIMYKOTIKŮM	19
1.4.1 Kvalitativní metody.....	20
1.4.2 Kvantitativní metody.....	20
2 ECHINOKANDINOVÁ ANTIMYKOTIKA	23
2.1 KASPOFUNGIN	24
2.1.1 Fyzikální a chemické vlastnosti	24
2.1.2 Mechanismus účinku.....	24
2.1.3 Spektrum účinku a terapeutická indikace	25
2.1.4 Mechanismus rezistence	25
3 HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIE MALDI-TOF	26
3.1 HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIE	27
3.2 IONIZAČNÍ METODA MALDI.....	28
4 CÍL	29
5 MATERIÁL	30
5.1 TESTOVANÉ KMENY	30
5.2 KULTIVAČNÍ PŮDY	30
5.3 CHEMIKÁLIE PRO MIKRODILUČNÍ METODU	30
5.4 CHEMIKÁLIE PRO EXTRAKCI	30
6 METODY	31
6.1 KULTIVACE	31
6.2 DETEKCE REZISTENCE NA ECHINOKANDINY	31
6.2.1 Ředění antimykotika	31
6.2.2 Mikrodiluční metoda.....	31
6.2.3 Extrakce	33
6.2.4 Měření	33
6.2.5 Vyhodnocení.....	34
7 VÝSLEDKY	36
7.1 SROVNÁNÍ METOD MĚŘENÍ.....	36
7.2 VYHODNOCENÍ POMOCÍ CCI.....	37

7.2.1	Referenční kmen <i>C. albicans</i> CCM 8261	38
7.2.2	Rezistentní kmen <i>Candida albicans</i> M30	40
7.3	VYHODNOCENÍ POMOCÍ DENDROGRAMU	42
7.3.1	Referenční kmen <i>C. albicans</i> CCM 8261 – metoda <i>Caspofungin</i>	42
7.3.2	Referenční kmen <i>C. albicans</i> CCM 8261 – metoda <i>MBT.FC.par</i>	42
7.3.3	Rezistentní kmen <i>C. albicans</i> M30 – metoda <i>Caspofungin</i>	43
7.3.4	Rezistentní kmen <i>C. albicans</i> M30 – metoda <i>MBT.FC.par</i>	43
8	DISKUZE	44
	ZÁVĚR	45
	REFERENČNÍ SEZNAM	46

SEZNAM ZKRATEK

MALDI-TOF – *Matrix-assisted laser desorption/ionization Time of Flight*

DIC – *Differential Interference Contrast*

BAT – bronchoalveolární tekutina

CLSI – *Clinical and Laboratory Standards Institute*

EUCAST – *The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*

MIC – *Minimal Inhibitory Concentration*

CSF – *caspofungin* (kaspofungin)

CCI – *Composite Correlation Index*

RPMI-1640 – *Roswell Park Memorial Institute-1640 medium*

ÚVOD

Kvasinkovité mikroorganismy jsou stále významnější příčinou infekcí u pacientů v těžkém stavu, zejména u pacientů s nějakou formou imunodeficitu. Výskyt neobvyklé rezistence u takových pacientů může znamenat zpoždění v nasazení účinné terapie a zapříčinit až nenávratné poškození zdraví pacienta.

Zvolila jsem si proto jako téma své bakalářské práce zavedení rychlé metody detekce rezistence na echinokandiny pomocí hmotnostní spektrometrie na principu MALDI-TOF. Tato metoda by mohla být následně zařazena i do běžných diagnostických postupů v mykologické laboratoři.

1 Kvasinky (kvasinkovité mikromycety)

1.1 Obecné vlastnosti kvasinek – definice, zařazení

Kvasinky jsou eukaryotní organismy, spadající říše hub (*Fungi, Mycetes*), dále však již netvoří samostatnou taxonomickou skupinu, a proto je nelze jednotně definovat. Jedná se o houby mikroskopických rozměrů, a proto se můžeme v některé literatuře setkat i s označením kvasinkovité mikromycety. Český název „kvasinky“ je pak odvozen od schopnosti většiny druhů těchto mikroorganismů zkvašovat některé sacharidy, čehož se už po staletí využívá nejen k přípravě alkoholických nápojů a kynutého pečiva, ale také jsou na této schopnosti založeny i některé identifikační metody v mykologii [1, 2, 3].

Dříve se houbovité organismy řadily do říše rostlin. Zjistilo se ale, že houby mají určité specifické vlastnosti, díky kterým byly následně z rostlinné říše vyčleněny a dnes tvoří samostatný celek, představující jakýsi „přechod“ mezi říší rostlinnou a živočišnou [1, 2].

Od rostlin se houby odlišují zejména tím, že v jejich těle není přítomen chlorofyl, a nejsou tedy schopné procesu fotosyntézy. S tím souvisí i způsob jejich výživy. Houby totiž řadíme do skupiny tzv. heterotrofních organismů, stejně tak jako třeba živočichy. A pro tyto organismy, resp. pro organismy s tímto typem metabolismu je charakteristické, že jako zdroj uhlíku využívají organické látky [1].

Další vlastností hub, kterou se naopak liší od zástupců živočišné říše, je přítomnost buněčné stěny. Tato struktura má navíc odlišné chemické složení v porovnání s buněčnou stěnou rostlin i bakterií [3].

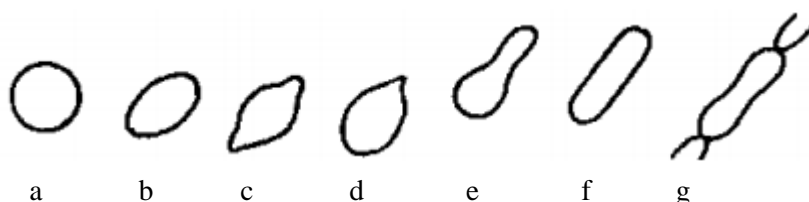
Houbovité organismy, a potažmo tedy i kvasinky se dále vyznačují poněkud odlišným složením cytoplazmatické membrány. Rozdíl je v zastoupení látek steroidní povahy. Zatímco u zástupců živočišné říše dominuje zejména cholesterol, v membránách hub nacházíme jinou, ale strukturně velmi podobnou látku, zvanou ergosterol. Tohoto poznatku využívají i některá antimykotika, jejichž mechanismus účinku je založen buď na vazbě tohoto sterolu, nebo na inhibici jeho syntézy [2, 4].

1.2 Morfologie a rozmnožování kvasinek

Pokud bychom chtěli nějak jednoduše morfologicky popsat organismy řadící se mezi kvasinky, tak bychom mohli říci, že se jedná o jednobuněčné mikroorganismy, rozmnožující se převážně pučením. Tato charakteristika však není zcela striktní [3, 5].

Za normálních podmínek se většinou kvasinky vyskytují právě jako samostatné buňky, kterým říkáme blastospory (blastokonidie). Tyto buňky jsou zřetelně větší než buňky bakteriální (3-15 μm). Jejich tvary bývají opravdu rozmanité. Za základní tvar je považován rotační elipsoid, běžné jsou též buňky kulatého či protáhlého tvaru [2, 3, 5]. (**Obr. 1**)

Tvar buněk je dán zejména rodovou příslušností, ale ovlivňují je i kultivační podmínky. Vhodným příkladem toho, jak může způsob kultivace významně ovlivnit tvar buněk je rod *Trigonopsis*, u kterého za některých kultivačních podmínek můžeme pozorovat dokonce buňky trojúhelníkovitého tvaru [3].



a) kulaté; b) oválné, elipsoidní; c) citronkovité; d) ogivální; e) lahvovitě; f) protáhlé; g) vláknité

Obr. 1. Rozmanité tvary buněk kvasinek

(Kocková-Kratochvílová, 1982, upraveno)

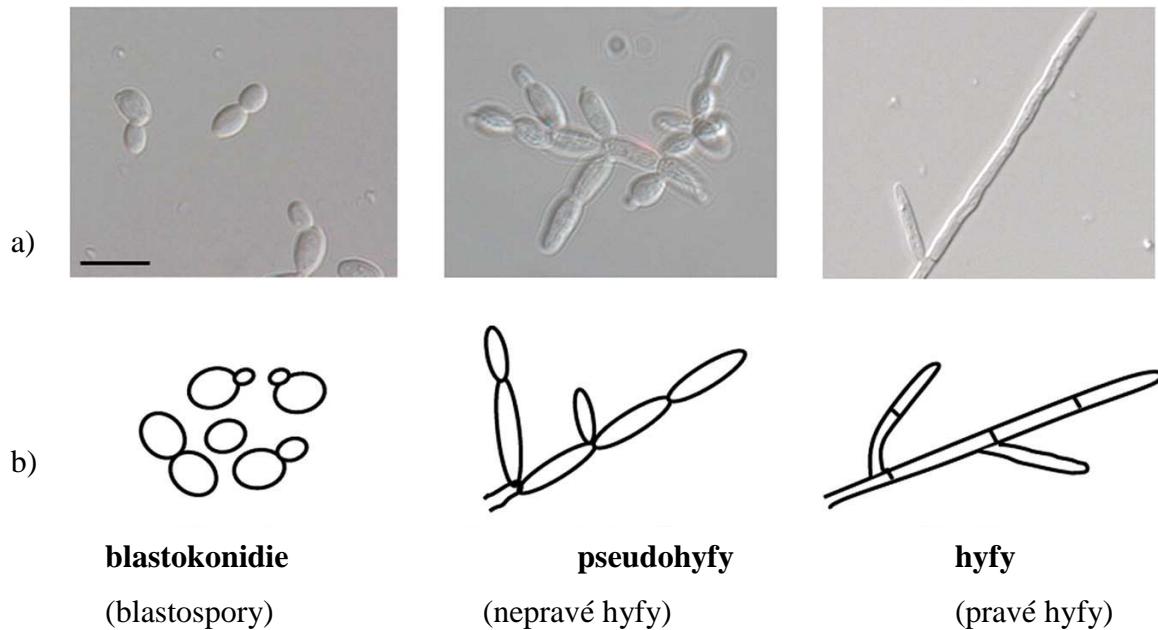
Na tvaru kvasinkových buněk se určitou měrou podílí i způsob jejich rozmnožování. Kvasinkovité mikroorganismy se mohou rozmnožovat, jak vegetativně (nepohlavně), tak i pohlavním způsobem [6].

Zpravidla se buňky kvasinek rozmnožují nepohlavně jednoduchým pučením. Při tomto ději se na mateřské buňce vytváří pupen, který se postupně zvětšuje. V podstatě se jedná o budoucí dceřinou buňku, která se poté co zcela doroste, oddělí od buňky mateřské [3, 6].

Ovšem, ne každý pučící proces musí nutně skončit úplným oddělením a vznikem dvou samostatně existujících buněk. Za určitých podmínek, obvykle při nedostatečném přísunu živin, mohou buňky zůstat spojeny, protahují se a postupně tak vytváří různě dlouhá zaškrcovaná vlákna. Takovéto buňky označujeme jako tzv. pseudohyfy či nepravé hyfy, protože svým protáhlým tvarem připomínají pravé hyfy (vlákna). Soubor pseudohyf se pak nazývá pseudomycelium. Tvorbu pseudomycelia můžeme často pozorovat například u kvasinek rodu *Candida* nebo *Trichosporon* [3, 6].

Zástupci některých rodů, příkladem může být opět rod *Candida*, jsou schopni vytvářet i tzv. pravé mycelium, které vzniká příčným dělením protáhlých buněk. Vzniká tak různě dlouhé vlákno s buňkami jednotné šířky a bez zaškrčení. Buňky jsou vzájemně oddělené septy, ve kterých jsou póry zajišťující mezibuněčnou komunikaci [3, 6, 7].

Pokud tuto morfologickou charakteristiku shrneme, tak můžeme říct, že kvasinky se mohou vyskytovat ve třech základních podobách. (**Obr. 2**)



Obr. 2. Hlavní morfologické jednotky kvasinkovitých mikromycet.

Snímky *C. albicans* vizualizované pomocí DIC (diferenciální interferenční kontrast) mikroskopie (a), schématické znázornění jednotlivých morfologických jednotek (b) (Thompson, 2011, upraveno)

1.2.1 Struktura kvasinkové buňky

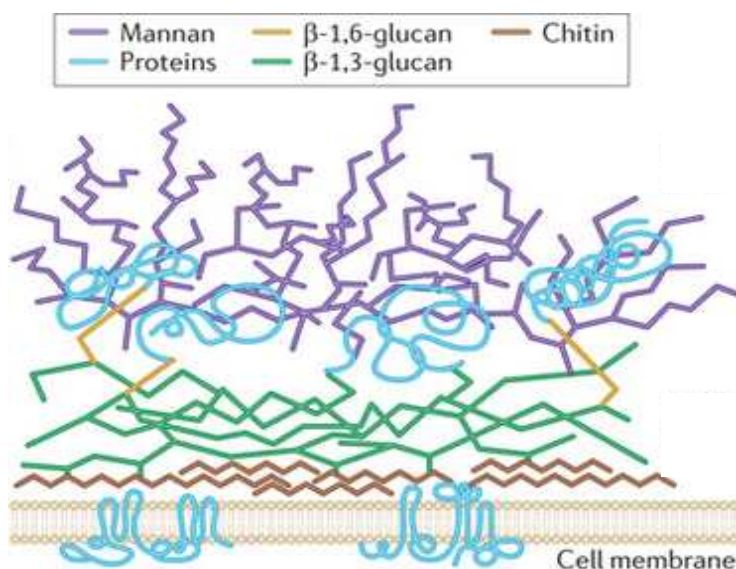
Kvasinkové buňky řadíme k buňkám eukaryotního typu. Jak známo eukaryotní buňky jsou větší a hlavně podstatně složitější než buňky prokaryot. Obsahují „pravé“ jádro, které je od okolní cytoplazmy odděleno membránou, a ve které je uložena rozsáhlá genetická výbava v podobě lineárních molekul DNA, jež jsou rozčleněny do většího počtu chromozomů. Další významnou charakteristikou pro tento typ buněk je obsah řady membránou ohraničených organel v cytoplazmě.

V této podkapitole, však rozhodně není cílem zabírat se podrobným popisem eukaryotické buňky. Zde chci pouze vyzdvihnout tu buněčnou strukturu, jež je významná z hlediska rezistence k echinokandinovým antimykotikům, tedy buněčnou stěnu.

1.2.1.1 Buněčná stěna

Buněčná stěna kvasinek je silná, pevná a elastická struktura, jež chrání buňku před mechanickými i osmotickými vlivy a udává její tvar. Mimoto se podílí na vzájemné adhezi buněk a funguje i jako selektivní bariéra [6, 8, 9, 10].

Buněčná stěna představuje podstatnou část hmotnosti kvasinkové buňky (až 25 % její suché váhy) a její velikost, resp. tloušťka se pohybuje mezi 150 – 400 nm. Ke specifickým buněčné stěny kvasinek, patří především odlišnost jejího chemického složení ve srovnání s buněčnou stěnou rostlin i bakterií, a také přítomnost jizev, jež vznikají následkem pučení. Struktura i chemické složení buněčné stěny byly doposud nejlépe prostudovány u kvasinky *Saccharomyces cerevisiae*. Pomocí elektronové mikroskopie bylo zjištěno, že se její buněčná stěna skládá ze tří vrstev (vnitřní, střední a vnější), z nichž každá disponuje odlišným chemickým složením [3, 6, 8, 9, 10].



Obr. 3 Schématická struktura buněčné stěny *C. albicans* [11]

Buněčná stěna kvasinek se skládá převážně z polysacharidů a proteinů. Nejhojněji jsou v buněčné stěně zastoupeny glukany (polymery glukózy). U kvasinek existují dva typy glukánů, fibrilární β -1,3-glukan a amorfní β -1,6-glukan. Fibrilární glukany zajišťují mechanickou pevnost buněčné stěny a společně s chitinem vytváří její vnitřní vrstvu, která přiléhá k plazmatické membráně. V následující střední vrstvě pak nacházíme amorfní glukany. Vnější vrstva buněčné stěny je tvořena glykosylovanými proteiny mannany (mannoproteiny), které díky svému uspořádání zajišťují selektivní permeabilitu buněčné stěny a také určují antigenní vlastnosti kvasinky [3, 8, 9, 10, 12].

1.3 Nejvýznamnější rody kvasinek

Do skupiny kvasinkovitých mikromycet se řadí hned několik rodů, z nichž nejdůležitější jsou rod *Candida*, *Cryptococcus*, *Trichosporon*, *Malassezia*, *Hansenula*, *Geotrichum*, *Rhodotorula* a *Saccharomyces* [2].

Vůbec nejvýznamnější je však rod *Candida*. Kvasinky tohoto rodu nalézáme v klinických materiálech nejčastěji [2]. A jelikož jsme v rámci naší experimentální práce využívali k testování pouze zástupce tohoto rodu, bude následující text zaměřen právě na tento rod, resp. na jeho nejvýznamnějšího představitele *C. albicans*.

1.3.1 *Candida albicans*

C. albicans představuje nejčastějšího původcem tzv. kandidóz, tedy infekcí zapříčiněných organismy patřících do rodu *Candida*. Jedná se o oportunní patogen, který je běžnou součástí fyziologické flóry. Avšak za určitých okolností, zejména při poruchách imunity pacienta, může dojít k omezení normální flóry, ke kolonizaci kvasinkami a následnému rozvoji kvasinkové infekce. Kandidózy jsou tedy prakticky vždy endogenního původu [2, 5, 13, 14, 15].

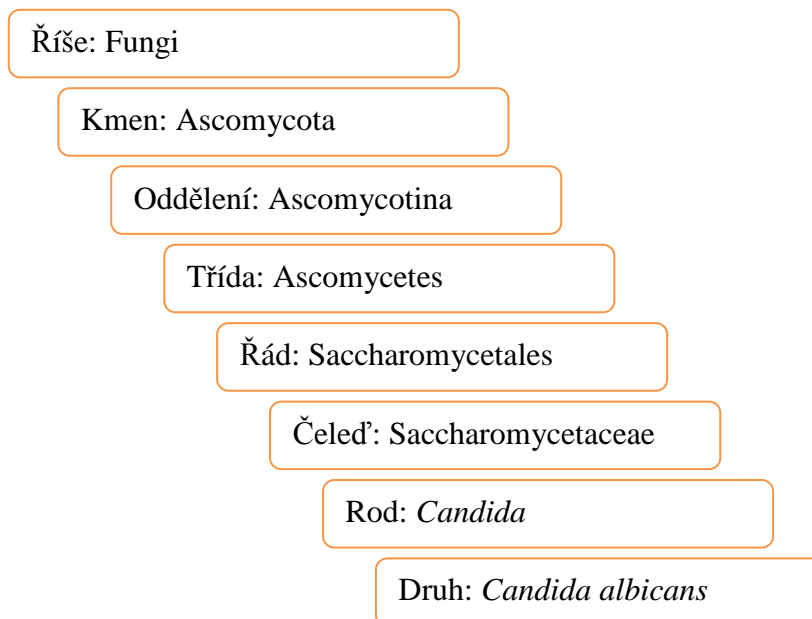
Podle nedávné studie [16] vyplývá, že mezi nejčastěji izolovanými kvasinkami u pacientů s hematologickou malignitou je právě *C. albicans*, společně s *C. glabrata* (ze 63 izolátů od 61 pacientů bylo v 28 % zastoupena *C. albicans* a 19 % *C. glabrata*), resp. v případě, že vyloučíme izoláty z bronchoalveolární tekutiny (BAT), jakožto pro tento typ infekce nevýznamný materiál. Získáme pozměněné procentuální zastoupení, kdy tentokrát se společně s *C. albicans* dostává na pomyslný vrchol *C. parapsilosis* (ze 63 izolátů 25 %, resp. 10 %).

1.3.1.1 Historie

Již ve 4. století př. n. l. řecký lékař Hippokrates popsal ve svých textech první případy orální kandidózy (moučnivky) u oslabených pacientů. Nicméně původce tohoto onemocnění byl definován mnohem později, a to až v polovině 19. století [5, 17, 18].

První kdo objevil původce tohoto onemocnění, byl roku 1839 Langenbeck, který u pacienta s tyfoidní horečkou našel kvasinky v lézích dutiny ústní. Bohužel však tyto mikroorganismy mylně označil za původce tyfu. A tak až v roce 1853 Robin, odhalil patogen vyvolávající moučnivku a nazval jej *Oidium albicans*. Dalších několik desítek let pak docházelo k různým taxonomickým přesunům a změnám v názvosloví, až nakonec v roce 1923 Berkhout navrhl pro tuto kvasinku název *Candida albicans*, jež je odvozen z latinského *toga candica* (výraz pro bílou róbu členů římského senátu) a *albicare* (v překladu být bílý, bělat) [5, 17, 18, 19, 20].

1.3.1.2 Taxonomické zařazení

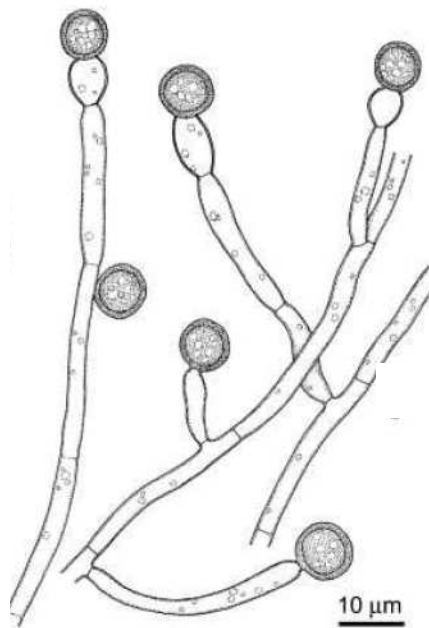


Obr. 4 Taxonomické zařazení *C. albicans*.

Text převzat z: http://www.doctorfungus.org/Thefungi/Candida_spp.php

1.3.1.3 Morfologie

C. albicans podle podmínek prostředí, ve kterém se nachází je schopna vytvářet různé fenotypické formy: blastospory (blastokonidie), pseudohyfy i pravé hyfy. Typická je pro ni i tvorba chlamydospor (chlamydokonidií) (**Obr. 4**), kulatých silnostěnných útvarů, vznikajících v průběhu (interkalární chlamydospory) nebo na koncích (terminální chlamydospory) hyf i pseudohyf. A dále tvorba tzv. zárodečných klíčků (angl. *germ tubes*), tenkých výběžků vyrůstajících z kvasinkových buněk při kultivaci v čerstvém séru [2, 7, 21].



Obr. 5 Kresba znázorňující tvorbu terminálních chlamydospor u *C. albicans*. [22]

1.3.1.4 Kultivace

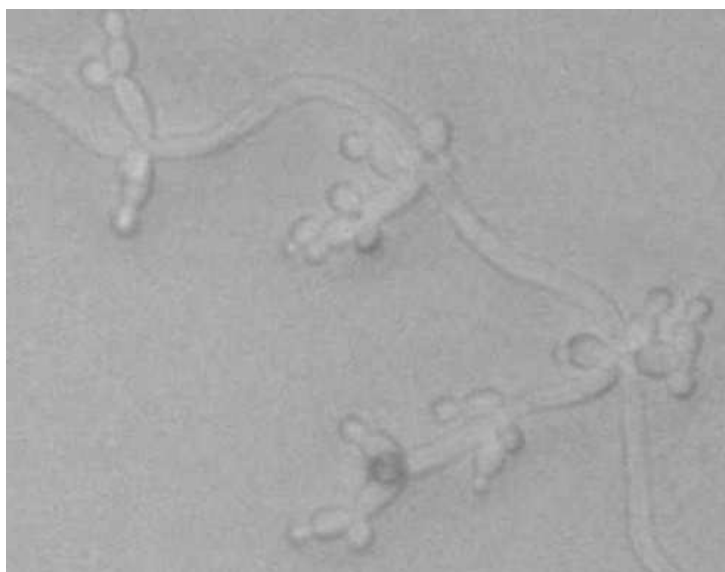
C. albicans je nutričně nenáročná kvasinka, která dobře roste na většině běžných kultivačních půd. Základní a nejčastěji používanou mykologickou půdou je Sabouraudův agar s 2 – 4 % glukózy, obvykle doplněný antibiotiky (např. chloramfenikol) pro potlačení růstu doprovodné bakteriální flóry. Doporučená vhodná teplota pro kultivaci kandid je 36 ± 1 °C. V průběhu 24 – 48 hodin narostou na Sabouraudově agaru velké, krémově zbarvené, hladké a neprůhledné kolonie, s typickou vůní po chlebu či po ovoci [2, 5, 14, 21, 23, 24, 25, 26].



Obr. 6 Kolonie *C. albicans* na Sabouraudově agaru.

(Ústav lékařské mikrobiologie FN Motol)

Pro odlišení *C. albicans* od ostatních druhů kandid lze využít hned několik postupů. Asi nejčastěji se k tomuto účelu využívají chromogenní agary (např. CandiSelect), na kterých lze kvasinky identifikovat na základě odlišného zbarvení kolonií. Vedle chromogenních půd se využívají další testy, které jsou založené na odhalování významných morfologických vlastností, jež jsou více či méně pro danou kvasinku charakteristické. Příkladem je kultivace na nutričně chudém rýžovém agaru (**Obr. 6**), kde se sleduje schopnost *C. albicans* tvořit pseudomycelia, nebo test tvorby zárodečných klíčků (tzv. germ-tube test) [14, 21, 25].



Obr. 7 *C. albicans* rostoucí na rýžovém agaru.

(Ústav lékařské mikrobiologie FN Motol)

1.3.1.5 Klinický význam

Infekce vyvolané *C. albicans* lze z klinického hlediska, podle manifestace a rozsahu rozdělit do dvou skupin: lokální či povrchové (mukokutánní) mykózy a systémové (orgánové) mykózy. V některé literatuře se ještě uvádí jako samostatná skupina – kandidémie. Mukokutánní mykózy jsou lokalizovány na kůži a na sliznicích, a představují nejběžnější formu. Patří sem kandidózy orofaryngeální, ezofageální, anální, genitální, vulvovaginální a samozřejmě kožní. Mezi systémové formy jsou řazeny např. kandidózy hepatosplenické, kandidóza ledvin a močových cest, plicní kandidóza, kandidová endokarditida, kandidová peritonitida, kandidová endoftalmitida, a další. Nejzávažnější formou je ovšem kandidémie, která je definována jako horečnatý stav, při kterém jsou v krvi přítomny kvasinky. Kandidémie může být často (až v 50 %) pouze přechodná v důsledku infekce dlouhodobě zavedeného žilního katétru [14].

1.4 Stanovení citlivosti k antimykotikům

Vývoj standardizovaných postupů k testování citlivosti kvasinek, resp. mikromycet k antimykotikům, v minulosti značně zaostával za rozvojem stejně zaměřených metodik u bakterií. Důvodem toho je značný nepoměr v četnosti bakteriálních a mykotických infekcí a také fakt, že v minulosti existovalo jen velmi omezené spektrum systémových antimykotik. Proto nástup nových skupin antifungálních látek, přinesl nejen větší možnosti na poli antimykotické terapie, ale byl tím odstartován i rozvoj a standardizace nových metod k testování citlivosti mikromycet [27].

Stanovení citlivosti mikromycet k antimykotikům je esenciální pro detekci případné rezistence, a provádí se obdobným způsobem jako u bakterií. V nabídce je tedy jak kvalitativní diskový difúzní test, tak i spolehlivější kvantitativní metody, zahrnující mikrodiluční metodu či E-test [21, 27].

Při naší experimentální práci byla k detekci rezistence využita modifikovaná forma mikrodiluční metody, z tohoto důvodu je této metodě v následujícím textu věnována o něco větší pozornost.

1.4.1 Kvalitativní metody

1.4.1.1 Diskový difúzní test

Tato kvalitativní metoda má spíše orientační význam, ale díky své jednoduchosti, rychlosti a finanční dostupnosti se stala vhodnou volbou pro rutinní diagnostiku. Hodí se ke screeningovému testování kvasinek, zachycených z méně závažných materiálů. Princip metody je stejný jako v případě testování citlivosti k antibiotikům. Hodnotí se velikostí inhibičních zón kolem papírových disků obsahujících určité koncentrace antimykotik. Pro kultivaci se používá Mueller-Hinton agar s přídavkem glukózy a methylenové modři [21, 27].

K vzhledem již zmíněné orientační povaze tohoto testu je nutné, aby rezistence a snížené citlivosti byly ověřeny spolehlivější kvantitativní metodikou [27].

1.4.2 Kvantitativní metody

Pro kvantitativní stanovení existují referenční metodiky vydané americkým CLSI (Ústav pro klinické a laboratorní standardy) i evropským EUCAST (Evropská komise pro testování antimikrobiální citlivosti). Tyto standardy však nejsou vhodné pro běžný laboratorní provoz. Pro rutinní použití jsou doporučovány odvozené metody [27].

1.4.2.1 Mikrodiluční metoda

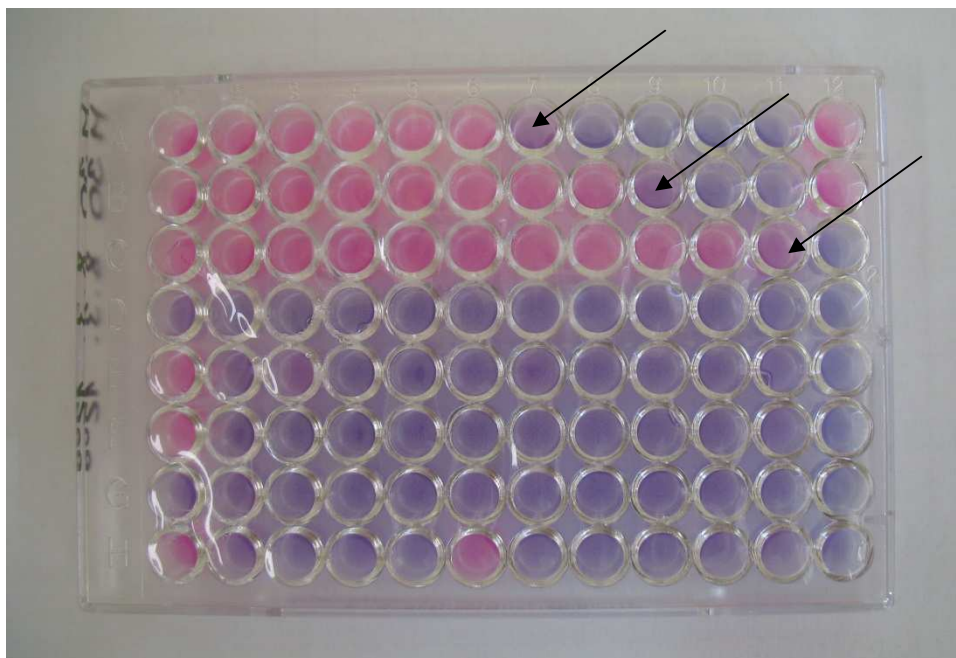
Mikrodiluční metoda se využívá tehdy, kdy je potřeba spolehlivěji a přesněji stanovit citlivost izolovaného kmene k antimykotikům. Používá se k testování izolátů z klinicky závažných materiálů, jako jsou hemokultury či likvor. Podstatou této metody je stanovení MIC (minimální inhibiční koncentrace), tedy stanovení nejnižší koncentrace antimykotika, která je ještě schopná zastavit (inhibovat) růst testovaného kmene [21].

Metoda se provádí tzv. mikrodilucí, v komerčně připravených mikrotitračních destičkách. Obecně doporučenou metodou pro rutinní stanovení MIC u kvasinek je komerční metoda Sensititre YeastOne (TREK Diagnostic Systems) (**Obr. 8**). V jamkách mikrodiluční destičky, jsou již od výrobce nadávkována různá lyofilizovaná antimykotika v různých koncentracích. K nim se během testování přidá suspenze kvasinek a po inkubaci se provede odečet [27].

Při odečtu se hodnotí to, zda v určité jamce došlo, resp. nedošlo k barevné změně. Výchozí zbarvení je dáno modře zbarveným indikátorem, pokud však v jamce kmen naroste,

způsobí změnu zbarvení z modré na růžovou. Cílem testu je stanovit MIC, ta odpovídá jamce s nejnižší koncentrací antimykotika, kde je zachováno původní modré zbarvení [27].

Výhodou mikrodilučních metod je jejich přesnost při odečítání, na druhé straně jsou však tyto metodiky pracnější [14].



Obr. 8 Kmen *C. albicans* M30 s prokázanou rezistencí na echinokandinová antimykotika

Jamka A1 – pozitivní kontrola, A2-11 anidulafungin MIC (0,5 mg/l), B1-11 mikafungin (MIC 2 mg/l), C1-11 kaspofungin (MIC 8 mg/l).

(Ústav lékařské mikrobiologie FN Motol)

1.4.2.2 E-test

Další kvantitativní metodikou je E-test. Podstatou tohoto testu je stanovení MIC pomocí difúzní metody [27].

E-test je komerčně připravený plastový proužek, který na jedné straně obsahuje exponenciální gradient koncentrací určitého antimykotika, a na druhé straně je opatřen stupnicí. Proužek se aplikuje na naočkovanou půdu a po inkubaci, se stejně jako v případě diskového difúzního testu vytváří kolem proužku inhibiční zóna, která má však v tomto případě elipsoidní tvar. V místě kde okraj této elipsy protíná proužek, lze odečíst ze stupnice hodnotu MIC [21, 27].

K testování jsou dnes k dispozici proužky se všemi významnými systémovými antimykotiky, včetně echinokandinů. E-testem je možné testovat jak kvasinky, tak i vláknité mikromycety [27].

2 Echinokandinová antimykotika

Obecně lze antimykotika definovat jako antibiotika či chemoterapeutika, jež se využívají k léčbě lokálních i celkových mykotických infekcí. Echinokandinová antimykotika, či zkráceně jen echinokandiny představují novou skupinu antifungálních látek, které disponují širokým spektrem účinku a minimálními nežádoucími účinky [28, 29].

První látkou řadící se do této skupiny antimykotik byl cilofungin, avšak z důvodů nežádoucích účinků byl jeho výzkum přerušen již v prvotních fázích klinických studií. Nicméně v průběhu několika dalších let byly vyvinuty nové echinokandiny druhé generace. A při jejich následném klinickém testování se zjistilo, že se vyznačují nejen širším spektrem účinku, ale že jsou též příznivější z hlediska bezpečnosti užívání a farmakokinetických vlastností [15, 29, 30, 31].

Ještě donedávné doby bylo možno k léčbě mykóz využít pouze jediného zástupce těchto nových echinokandinů – kaspofungin. Dnes jsou však k dispozici další dva nové echinokandiny, a to anidulafungin a mikafungin. Všechny tyto preparáty mají obdobné farmakokinetické a farmakodynamické vlastnosti. [15, 29, 31, 32].

Protože při experimentální části této práce byl využit pouze jeden zástupce těchto antimykotických látek, bude se následující text věnovat pouze jemu.

Generický název	Firemní název	Sumární vzorec	Molekulová hmotnost	Původ molekuly	Rok uvedení do klinické praxe v ČR
kaspofungin	Cancidas	$C_{52}H_{88}N_{10}O_{15}$	1213,42 Da	<i>Glarea lozoyensis</i>	2002
anidulafungin	Ecalta	$C_{58}H_{73}N_7O_{17}$	1140,30 Da	<i>Aspergillus nidulans</i>	2008
mikafungin	Mycamine	$C_{56}H_{71}N_9O_{23}S$	1292,26 Da	<i>Coleophama empedri</i>	2008

Tab. 1 Základní informace o jednotlivých echinokandinech.

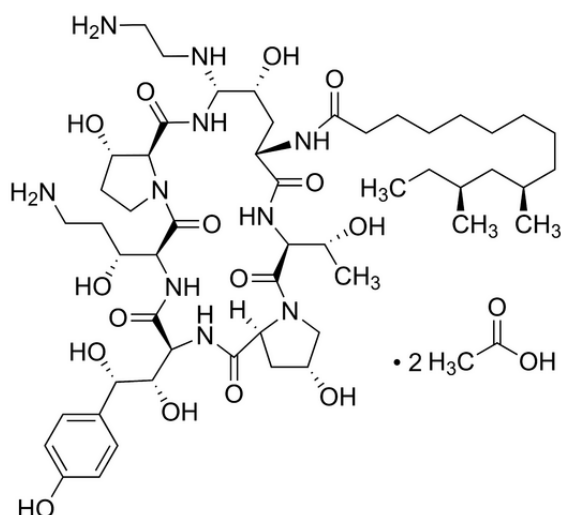
(Haber, 2008, modifikováno)

2.1 Kaspofungin

Kaspofungin je první zástupce echinokandinů, jež byl schválen pro klinické použití, a proto jsou s ním také doposud největší zkušenosti. Je určen, stejně jako zbývající dva preparáty, k léčbě závažných systémových mykóz [29, 32].

2.1.1 Fyzikální a chemické vlastnosti

Kaspofungin, stejně jako celá skupina echinokandinů, je semisyntetický amfifilní lipopeptid s velkou molekulovou hmotností, skládající se z cyklického hexapeptidového jádra a postranního lipidového řetězce. Jedná se o derivát pneumokandinu B₀, jež je produktem fermentace mikroskopické houby *Glarea lozoyensis*. Celý chemický název této sloučeniny je 1-[(4R,5S)-5-[(2-aminoethyl)amino]-N2-(10,12-dimethyl-1-oxotetrahydroxy-L-ornithine)]-5-[(3R)-3-hydroxy-L-ornithine] pneumokandin B₀ diacetát [13, 29, 31, 32, 33].



Obr. 9 Strukturální vzorec kaspofunginu. [34]

2.1.2 Mechanismus účinku

Mechanismus účinku kaspofunginu, podobně jako u ostatních echinokandinů, spočívá v nekompetitivní inhibici syntézy β -1,3-glukanu, jakožto jedné z hlavních složek buněčné stěny většiny houbových patogenů. Cílovou strukturou je transmembránový enzymatický komplex β -1,3-glukansyntetáza. Echinokandiny se váží na tento komplex a brání tak v polymeraci glukanu. Výsledkem je narušení osmotické integrity a následná lýze fungální buňky [13, 15, 29, 31, 32, 34, 35, 36, 37].

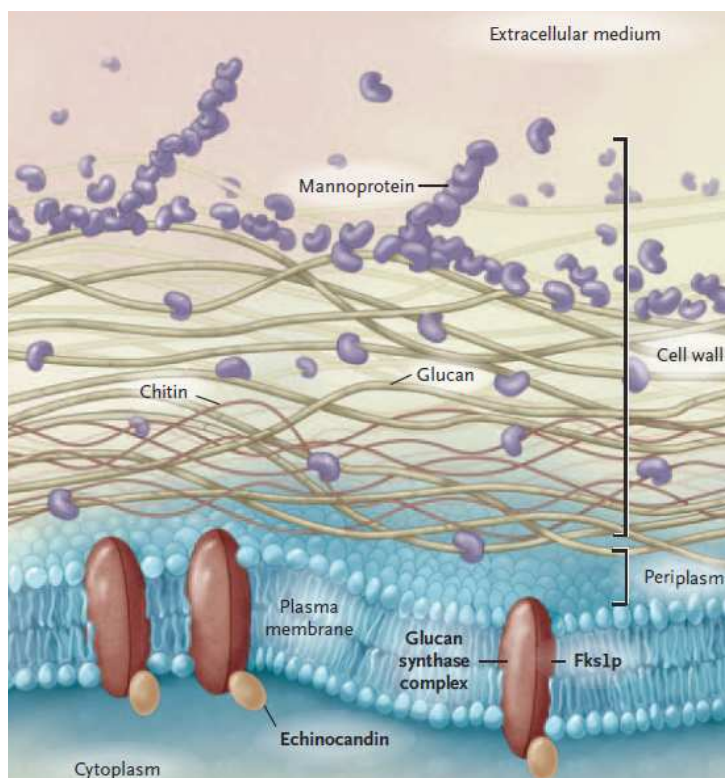
2.1.3 Spektrum účinku a terapeutická indikace

Široké spektrum kaspofunginu zahrnuje kvasinky rodu *Candida*, včetně rezistentních na flukonazol, amfotericin B a 5-flucytosin, a vláknité houby rodu *Aspergillus*. Proti *Candida* spp. vykazuje fungicidní účinek, zatímco proti *Aspergillus* spp. působí fungistaticky. Kaspofungin je vhodný k léčbě invazivních kandidózy a kandidémie. Také je lékem 2. volby pro invazivní aspergilózu [13, 15, 29, 31, 32, 35, 37, 38].

2.1.4 Mechanismus rezistence

Stav snížené citlivosti k působení echinokandinových antimykotik je u kvasinek rodu *Candida* spp. velmi vzácný, a u izolátů rodu *Aspergillus* spp. dokonce ještě nebyl popsán žádný případ rezistence [35, 37]. Přesto jsou občas zaznamenány i kazuistiky [39], kde rezistence k echinokandinům značně zkomplikovala léčbu a stav pacienta.

Rezistence ke kaspofunginu, resp. ke všem echinokandinům, vzniká zpravidla následkem bodové mutace v genu FKS1. Tento gen kóduje protein Fks1p, jež je katalytickou podjednotkou již zmíněného enzymatického komplexu β -1,3-glukansyntetázy. Nicméně předpokládá se, že na vzniku rezistence se mohou podílet i jiné mutace [29, 31, 32, 35, 37].

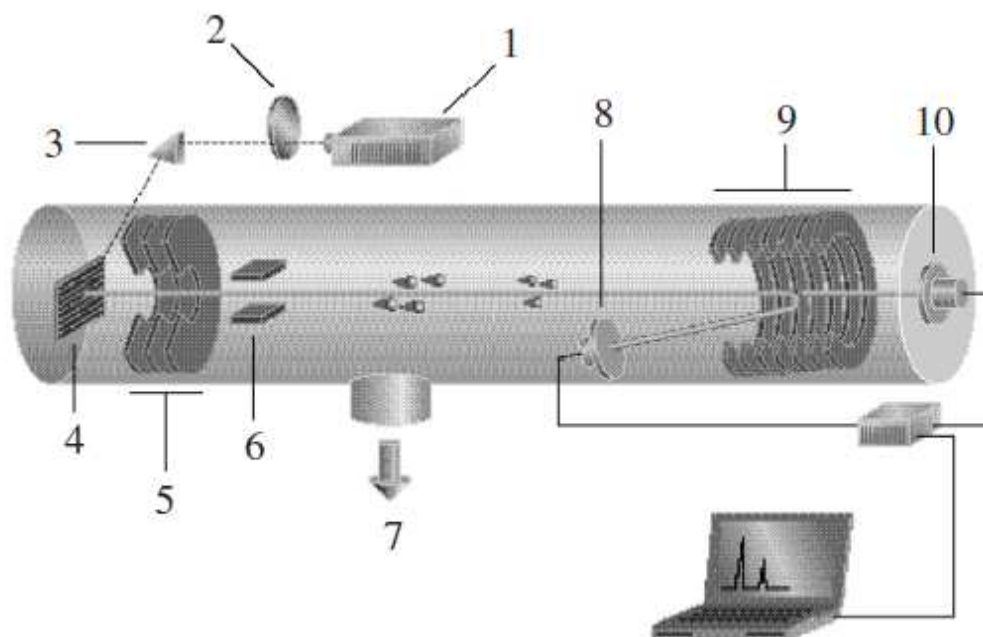


Obr. 10 Schéma buněčné stěny *C. albicans*, se znázorněným působením echinokandinů. [40]

3 Hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF

Teprve poměrně nedávno, v 80. letech minulého století, byla vyvinuta ionizační metoda MALDI, která umožňuje velmi rychlou a přesnou analýzu proteinů a jiných makromolekulárních látek [41].

Využití této techniky v mikrobiologii, bylo ještě do nedávné doby omezeno pouze na výzkumné laboratoře. Ovšem v posledních několika letech se dostupnost a relativní jednoduchost podílely na tom, že se tato zařízení dostala i do rutinních mikrobiologických laboratoří, kde významně přispěla k identifikaci patogenů. Pro hmotnostní spektrometrii MALDI-TOF, můžeme v mikrobiologické laboratoři najít uplatnění i jinde, než při klasické identifikaci. Lze ji například, právě jako v našem případě, využít k detekci rezistence na antimikrobiální látky [42, 43].



Obr. 11 Schéma MALDI-TOF hmotnostního spektrometru. [44]

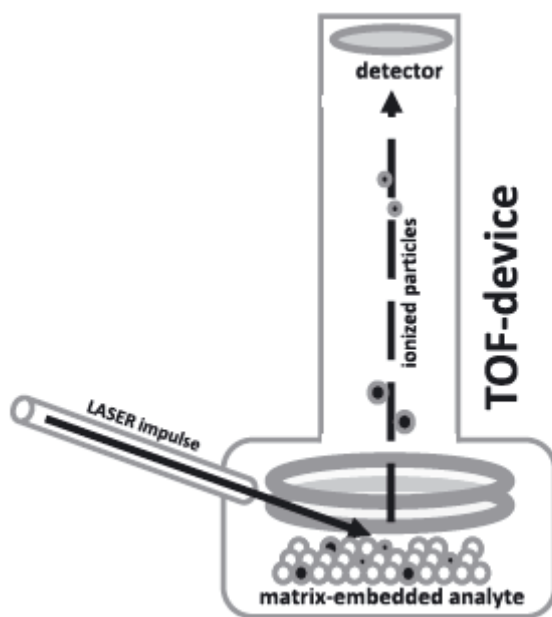
- 1 – laser, 2 – regulační filtr, 3 – optický hranol, 4 – destička se vzorkem,
- 5 – urychlovač napětí, 6 – deflektor, 7 – vakuové pumpy, 8 – reflektorový detektor,
- 9 – reflektor, 10 – lineární detektor

3.1 Hmotnostní spektrometrie

Hmotnostní spektrometrie je separační metoda, jež slouží k převedení vzorku na ionty v plynné fázi, které rozdělí podle hodnoty podílu jejich hmotnosti a náboje m/z . Výsledkem je hmotnostní spektrum, jež graficky znázorňuje závislost intenzity iontového proudu (četnosti iontů) na podílu m/z . Každý hmotnostní spektrometr se skládá ze tří základních částí: iontový zdroj, hmotnostní analyzátor a detektor částic [41, 45, 46].

Iontový zdroj, je ta část spektrometru, kde se z neutrálních molekul analytu vytváří ionty v plynné fázi, tj. dochází zde k ionizaci. A podle toho jak silná je tato ionizace, resp. podle toho kolik množství energie je při ionizaci dodáno molekulám analytu, rozlišuje dvě skupiny ionizačních technik, a to tzv. „měkké“ a „tvrdé“. MALDI ionizační metoda je příkladem té první skupiny ionizačních technik, neboť v tomto případě je k ionizaci dodáváno méně energie, než by tomu bylo tak v případě použití „tvrdé“ ionizační techniky [41].

Další součástí spektrometru je hmotnostní analyzátor, zde za vysokého vakua dochází k separaci iontů podle poměru hmotnosti a náboje (m/z). Existuje několik typů analyzátorů. V případě této techniky se využívá tzv. průletového analyzátoru (TOF, *Time Of Flight*). Celý vzorek iontů je najednou akcelerován do evakuované letové trubice (tj. průletového analyzátoru), na jejímž konci je umístěn detektor, který měří čas letu každého iontů. Jelikož je všem částicím na začátku dodána stejná kinetická energie, separace se uskutečňuje pouze na základě jejich hmotnosti (lehké ionty pohybují analyzátozem rychleji než ty těžké) [41, 44, 45].



Obr. 12 Princip hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF. [43]

3.2 Ionizační metoda MALDI

Přeložením zkratky MALDI odvozené z anglického názvu Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization, získáme základní charakteristiku této metody. Můžeme tedy říct, že se jedná o desorpční ionizaci vzorku laserem za asistence matrice. Pro tuto techniku se připravuje vzorek, tak že se smíchá analyt s tzv. matricí, zpravidla slabou organickou kyselinou (např. α -kyano-4-hydroxyskořicová kyselina). Matrice silně absorbuje laserové záření, což vede k jejímu zahřívání a následnému odpařování. Společně s matricí přechází do plynné fáze i analyt. Absorpcí záření navíc dochází k rozkladu matrice, která takto ionizuje molekuly analytu. Funguje tedy i jako ionizační činidlo [41, 44].

4 Cíl

Hlavním cílem této bakalářské práce je literární rešerše zabývající se zejména rodem *Candida* a s ním spojenou problematikou rezistence k echinokandinovým antimykotikům a zavedení metody detekce rezistence na echinokandinová antimykotika, pomocí hmotnostní spektrometrie na principu MALDI-TOF.

5 Materiál

5.1 Testované kmeny

- Referenční kmen *Candida albicans* CCM 8261
- Kmen s prokázanou rezistencí na echinokandiny *Candida albicans* M30 [39]

5.2 Kultivační půdy

- Sabouraudův agar s gentamicinem a chloramfenikolem (Oxoid, Brno, ČR)
- Columbia krevní agar (Oxoid, Brno, ČR)
- CHROMagar (Trios, Olomouc, ČR)

5.3 Chemikálie pro mikrodiluční metodu

- Caspofungin diacetate 5 mg (Sigma-Aldrich, Praha, ČR)
- Aqua pro injectione (B. Braun Medical s.r.o., Praha, ČR)
- Fyziologický roztok
- RPMI-1640 medium [s L-glutaminem a NaHCO₃] (Sigma-Aldrich, Praha, ČR)
- RPMI-1640 medium [s 20 mM HEPES a L-glutaminem, bez NaHCO₃] (Sigma-Aldrich, Praha, ČR)

5.4 Chemikálie pro extrakci

- Voda LC-MS CHROMASOLV (Sigma-Aldrich, Praha, ČR)
- Ethanol abs. (PENTA, Praha, ČR)
- 70% kyselina mravenčí (Sigma-Aldrich, Praha, ČR)
- 100% acetonitril (Sigma-Aldrich, Praha, ČR)
- Matrice pro MALDI-tof MS [nasycený roztok α -kyano-4-hydroxyskořicové kyseliny v 50% acetonitrilu a 25% trifluoroctové kyselině] (Bruker, Brno, ČR)

6 Metody

6.1 Kultivace

Testované kmeny byly naočkovány na komerčně připravený Sabouraudův agar s gentamicinem a chloramfenikolem, Columbia krevní agar a na CHROMagar. Naočkované půdy byly inkubovány v termostatu při teplotě 35°C po dobu 48 hodin.

6.2 Detekce rezistence na echinokandiny

6.2.1 Ředění antimykotika

Pro přípravu roztoku antimykotika o požadované koncentraci bylo na analytických vahách naváženo příslušné množství lyofilizovaného kaspofunginu (CSF), které bylo doplněno potřebným objemem rozpouštědla (voda pro injekce).

6.2.2 Mikrodiluční metoda

1. Rekonstituovaný roztok CSF byl využit pro přípravu zásobní řady o 12-ti různých koncentracích (*Tab. 2*) [25].

Číslo zkumavky	Koncentrace CSF [μg/ml]
1	640
2	320
3	160
4	80
5	40
6	20
7	10
8	5
9	2,5
10	1,25
11	0,625
12	0,3125

Tab. 2 Zásobní řada s jednotlivými koncentracemi kaspofunginu (CSF).

2. Pro každý kmen byla připravena řada mikrozkušavek, do kterých bylo napipetováno po 240 μl RPMI.
3. K mediu bylo následně přidáno po 60 μl příslušné koncentrace CSF ze zásobní řady. Do mikrozkušavek s koncentrací 0 $\mu\text{g/ml}$ bylo přidáno 60 μl RPMI. Tímto postupem bylo dosaženo finální koncentrace CSF. (**Tab. 3**)

Číslo zkumavky	Koncentrace CSF [$\mu\text{g/ml}$]
1	64
2	32
3	16
4	8
5	4
6	2
7	1
8	0,5
9	0,25
10	0,125
11	0,0625
12	0,03125
13	0

Tab. 3 Finální koncentrace kaspofunginu (CSF).

4. Ředění kvasinek:
 - a) Nejprve byla z každého kmene připravena suspenze ve fyziologickém roztoku o zákalu 0,5 McFarlanda,
 - b) Do mikrozkušavek bylo napipetováno 980 μl RPMI, ke kterému bylo poté přidáno 20 μl příslušné zhomogenizované suspenze kvasinky.
 - c) Nato bylo do dalších mikrozkušavek napipetováno 1900 μl RPMI, k němuž bylo následně přidáno 100 μl naředěné suspenze.
5. Do mikrozkušavek bylo poté napipetováno 100 μl antimykotika o příslušné koncentraci a 100 μl naředěného roztoku kvasinky.
6. Nakonec byly všechny mikrozkušavky promíchány vortexováním a daly se inkubovat do termostatu při teplotě 35 $^{\circ}\text{C}$ na 15 hodin.

6.2.3 Extrakce

Pro následnou extrakci byl využit lehce modifikovaný postup [47, 48].

Postup:

- 1) Po inkubaci byly všechny mikroskopické centrifugovány při maximálních otáčkách (14 000 rpm) po dobu 2-4 minut.
- 2) Vzniklý pelet byl následně dvakrát promyt vodou.
- 3) Po promytí byl pelet resuspendován ve 300 μ l vody a 900 μ l ethanolu a důkladně promíchán vortexováním.
- 4) Mikroskopické centrifugovány při maximálních otáčkách po dobu 2 minut, následně byl slit supernatant a opět byly mikroskopické centrifugovány.
- 5) Po druhé centrifugaci byl zbývající ethanol opatrně odsán pipetováním a pelet byl ponechán několik minut k uschnutí při laboratorní teplotě.
- 6) Po uschnutí bylo k peletu přidáno 50 μ l 70% kyseliny mravenčí a důkladně promícháno pipetováním a vortexováním.
- 7) Poté bylo přidáno ještě stejné množství 100% acetonitrilu a opět důkladně promícháno.
- 8) Mikroskopické centrifugovány naposledy centrifugovány při maximálních otáčkách po dobu 2 minut.
- 9) Na čistou MALDI destičku bylo poté v duplikátu nakapáno 1 μ l supernatantu.
- 10) Ihned po zaschnutí byl supernatant překryt 1 μ l roztoku MALDI matrice.
- 11) Po zaschnutí matrice byla nakonec MALDI destičku vložena do přístroje a bylo zahájeno měření.

6.2.4 Měření

Měření bylo prováděno na hmotnostním spektrometru MALDI Biotyper (Bruker s.r.o., Brno, ČR) pomocí programu flexControl. K měření bylo využito jak nastavení od výrobce (metoda *MBT.FC.par*), tak i modifikované nastavení (metoda *Caspofungin*), které bylo popsáno v publikaci [49], ze které jsme v naší práci vycházeli. Rozdíly mezi jednotlivými nastaveními jsou patrné v tabulce č. 4. (**Tab. 4**)

Jednotlivá spektra byla získávána jako sumy po 40 laserových zásazích na 8 různých pozicích, tedy 320 zásahů na jeden terčik. Získaná spektra byla následně upravena v programu flexAnalysis 3.4.

	MBT.FC.par	Caspofungin
Frekvence laseru	60 Hz	20 Hz
Mass range	1960 – 20000 Da	3000 – 8000 Da
Ion source 1	20 kV	20 kV
Ion source 2	18 kV	16,7 kV
Lens	6 kV	8,5 kV

Tab. 4 Srovnání parametrů použitých metod měření.

6.2.5 Vyhodnocení

Vyhodnocení získaných spekter bylo prováděno v programu MALDI Biotyper OC 3.1., pomocí dvou statistických metod.

6.2.5.1 CCI (*Composite Correlation Index*) analýza

CCI analýza představuje metodu využívající se pro statistickou analýzu vztahů mezi spektry. Jednoduše řečeno jde o metodu, pomocí níž lze srovnat, jak jsou si spektra vzájemně podobná pomocí korelačních koeficientů. Nejvíce podobná spektra jsou ta, jejichž CCI je roven 1 (kompletní korelace), zatímco hodnota 0 znamená, že mezi těmito spektry není žádný vzájemný vztah (žádná korelace). Tato metoda má grafickou podobu. Jde o barevnou tabulku tzv. teplotní mapu (heat map), kde teplé barvy představují úzce příbuzná spektra a barvy studené naopak ty spektra, která nejsou příbuzná [49, 50, 51].

Jako v publikované práci [49] byly vybrány hmotnostní spektra vzorků s koncentrací minimální (0 µg/ml), maximální (32 µg/ml) a s koncentrací blízkou nule (0,03125 µg/ml). CCI těchto vybraných spekter byly následně porovnány.



Obr. 13 Schématické znázornění porovnání CCI

Kmen byl hodnocený jako citlivý v případě, že hodnota CCI získaná při porovnání spekter maximální a zvolená koncentrace byla vyšší než CCI hodnota, získaná při porovnání s minimální koncentrací (tj. CCI 0,03125 versus CCI 32 $\mu\text{g/ml}$ > CCI 0,03125 versus 0 $\mu\text{g/ml}$). V opačném případě (tj. CCI 0,03125 versus CCI 32 $\mu\text{g/ml}$ < CCI 0,03125 versus 0 $\mu\text{g/ml}$), byl takovýto kmen hodnocen jako rezistentní. (**Obr. 12**)

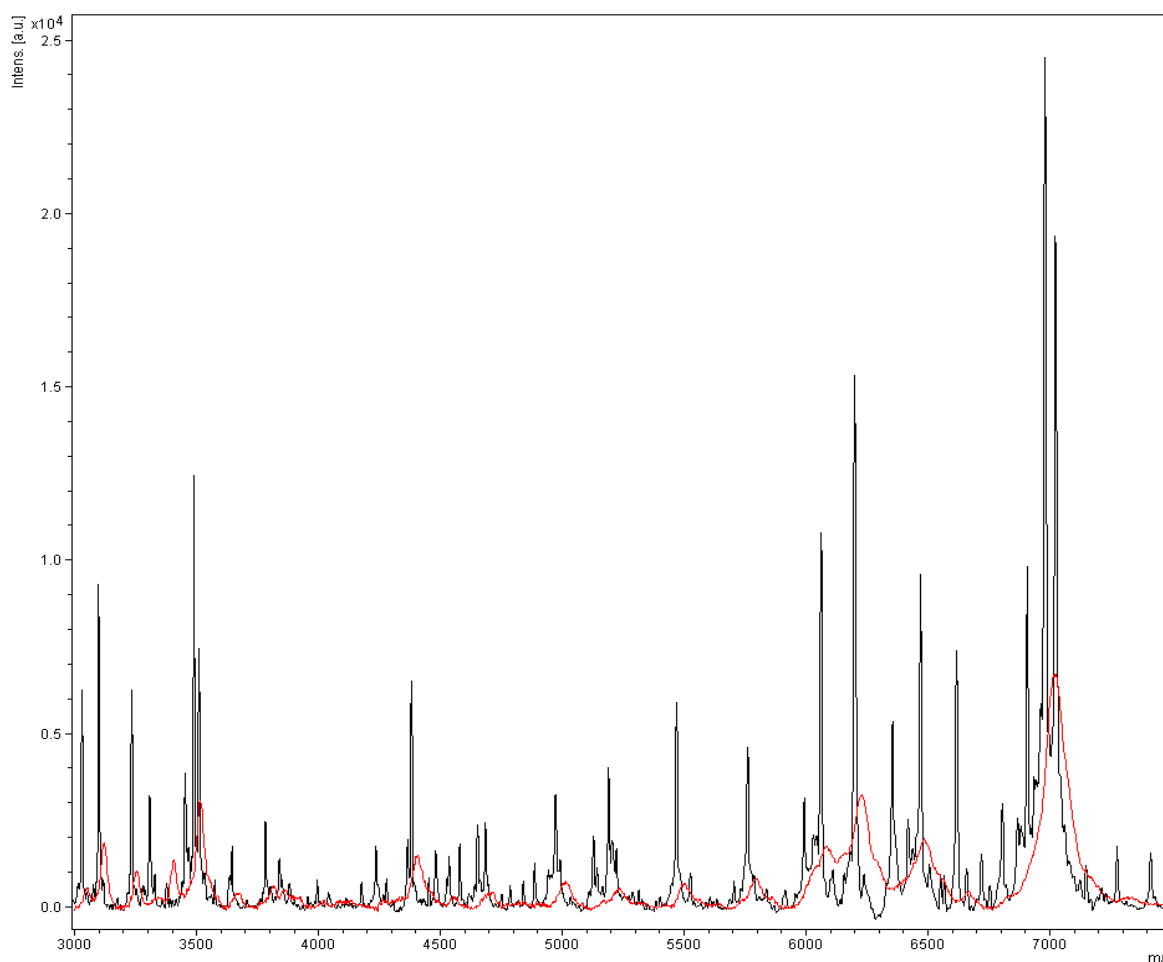
6.2.5.2 Shluková analýza (Cluster analysis)

„Analýza shluků patří mezi metody, které se zabývají vyšetřováním podobnosti vícerozměrových objektů (tj. objektů, u nichž je změřeno větší množství proměnných) a jejich klasifikací do tříd čili shluků [52].“ Proces shlukování lze pak graficky vyjádřit pomocí dendrogramu. Tato technika nám, stejně jako v případě porovnávání korelačních koeficientů, umožňuje odhalit, jak silně spolu jednotlivé proměnné (spektra) korelují, tedy jaký je mezi nimi vzájemný vztah [51, 52].

7 Výsledky

7.1 Srovnání metod měření

Níže uvedená spektra znázorňují rozdíl mezi metodami měření, jež byly při naší experimentální práci využívány. Černé spektrum představuje referenční kmen *C. albicans* naměřené klasickým nastavením od výrobce (metoda *MBT.FC.par*). Červeně zbarvené spektrum bylo naměřené při modifikovaném nastavení (metoda *Caspofungin*).



Obr. 14 Srovnání kvality spekter *C. albicans*

7.2 Vyhodnocení pomocí CCI

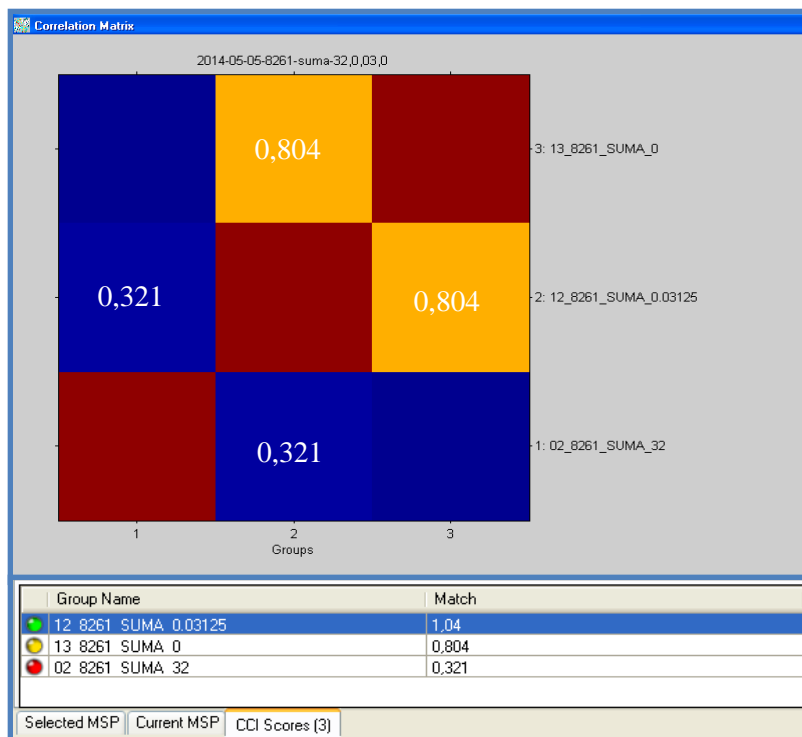
Dále uvedené CCI tabulky (tzv. CCI matrix) graficky znázorňují vztah mezi spektry vybraných koncentrací CSF u citlivého referenčního kmene *C. albicans* CCM 8261 a u kmene *C. albicans* M30 s prokázanou rezistencí na echinokandiny.

Ke srovnání byly využity CCI hodnoty tří koncentrací – minimální (0 $\mu\text{l/ml}$), maximální (32 $\mu\text{l/ml}$) a vybrané koncentrace blízké nule (0,03125 $\mu\text{l/ml}$). Spektra, jež byla využita k tomuto vyhodnocení, byla naměřena, jak modifikovanou metodu Caspofungin, tak i pomocí metody nastavené od výrobce.

K CCI matrix je pro větší přehlednost připojena tabulka s výslednými hodnotami CCI.

7.2.1 Referenční kmen *C. albicans* CCM 8261

7.2.1.1 Metoda *Caspofungin*

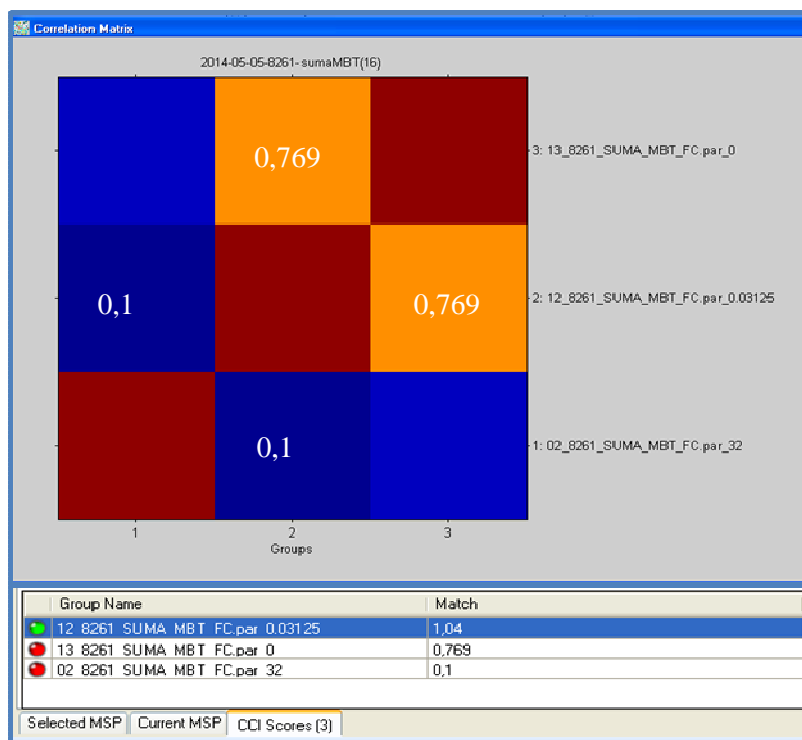


Obr. 15 CCI matrix referenčního citlivého kmene C. albicans CCM 8261.

CCI 0,03125 : CCI 0 = 0,804
CCI 0,03125 : CCI 32 = 0,321

Tab. 5 Výsledné hodnoty CCI.

7.2.1.2 Metoda MBT.FC.par



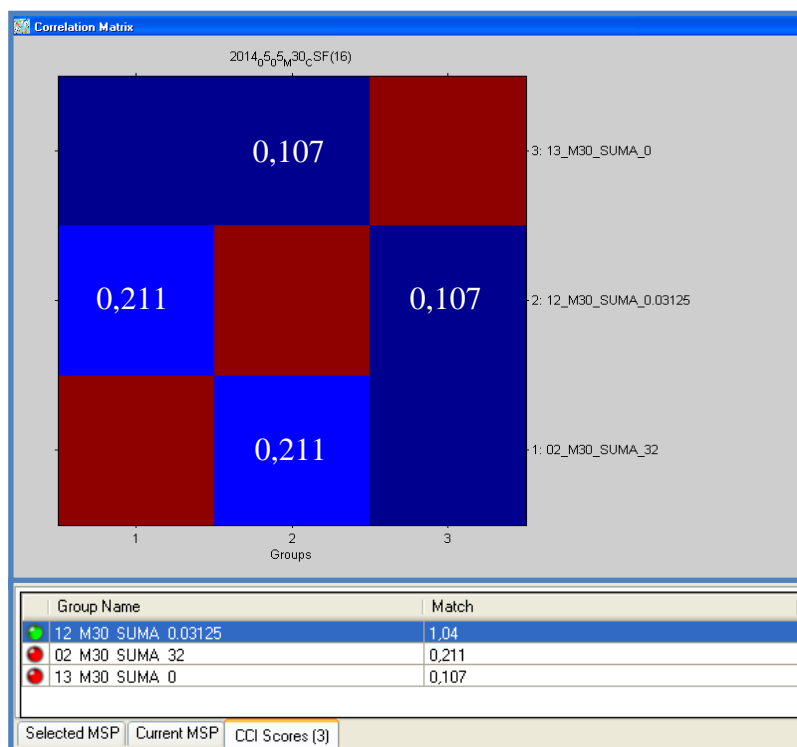
*Obr. 16 CCI matrix referenčního citlivého kmene *C. albicans* CCM 8261.*

CCI 0,03125 : CCI 0 = 0,769
CCI 0,03125 : CCI 32 = 0,1

Tab. 6 Výsledné hodnoty CCI.

7.2.2 Rezistentní kmen *Candida albicans* M30

7.2.2.1 Metoda Caspofungin

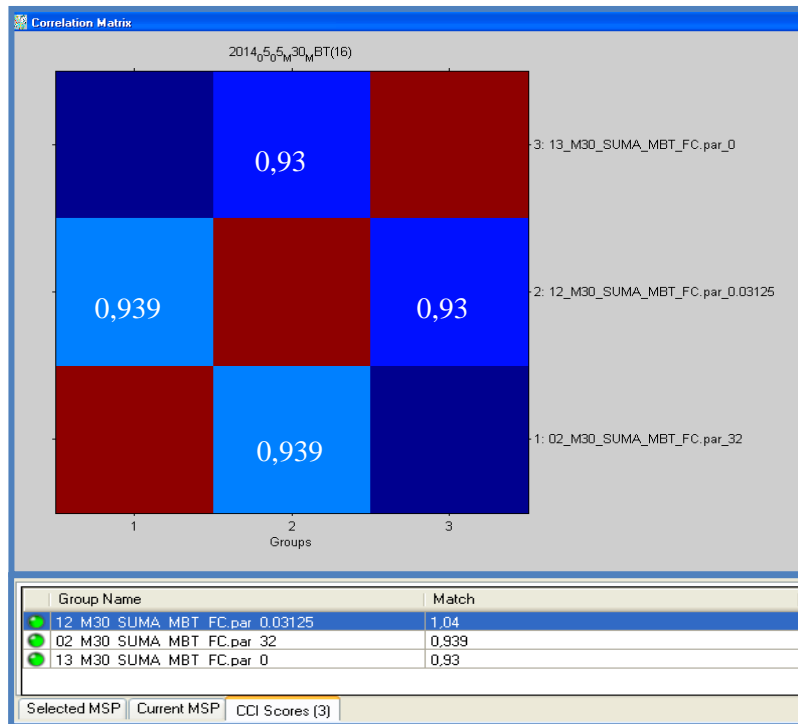


Obr. 17 CCI matrix rezistentního kmene *C. albicans* M30.

CCI 0,03125 : CCI 0 = 0,107
CCI 0,03125 : CCI 32 = 0,211

Tab. 7 Výsledné hodnoty CCI.

7.2.2.2 Metoda MBT.FC.par



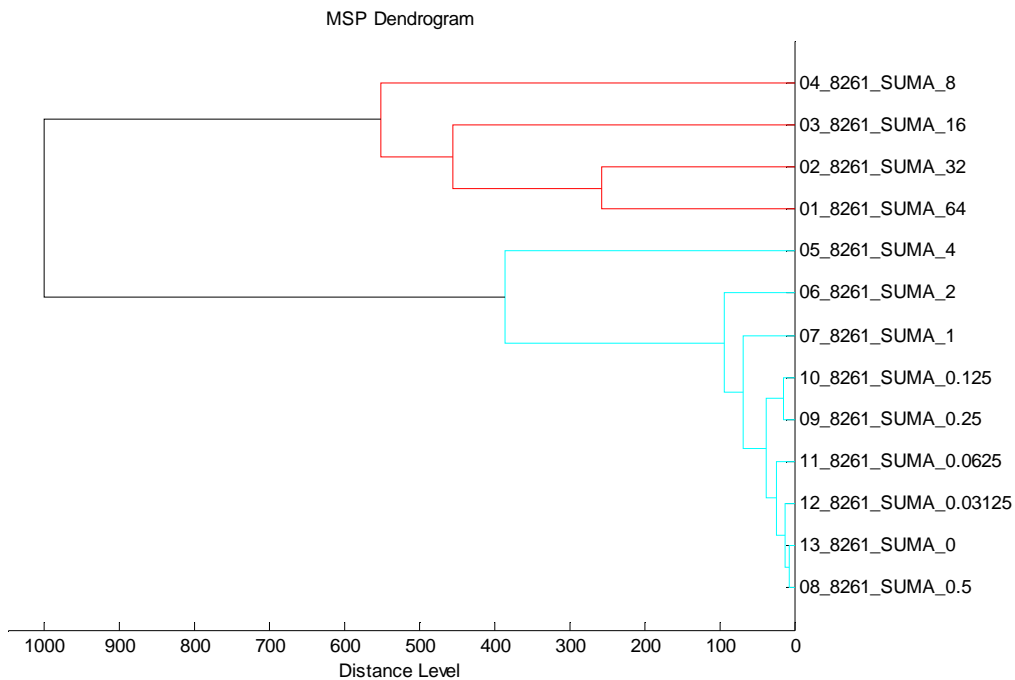
Obr. 18 CCI matrix rezistentného kmene *C. albicans* M30.

CCI 0,03125 : CCI 0 = 0,93
CCI 0,03125 : CCI 32 = 0,939

Tab. 8 Výsledné hodnoty CCI.

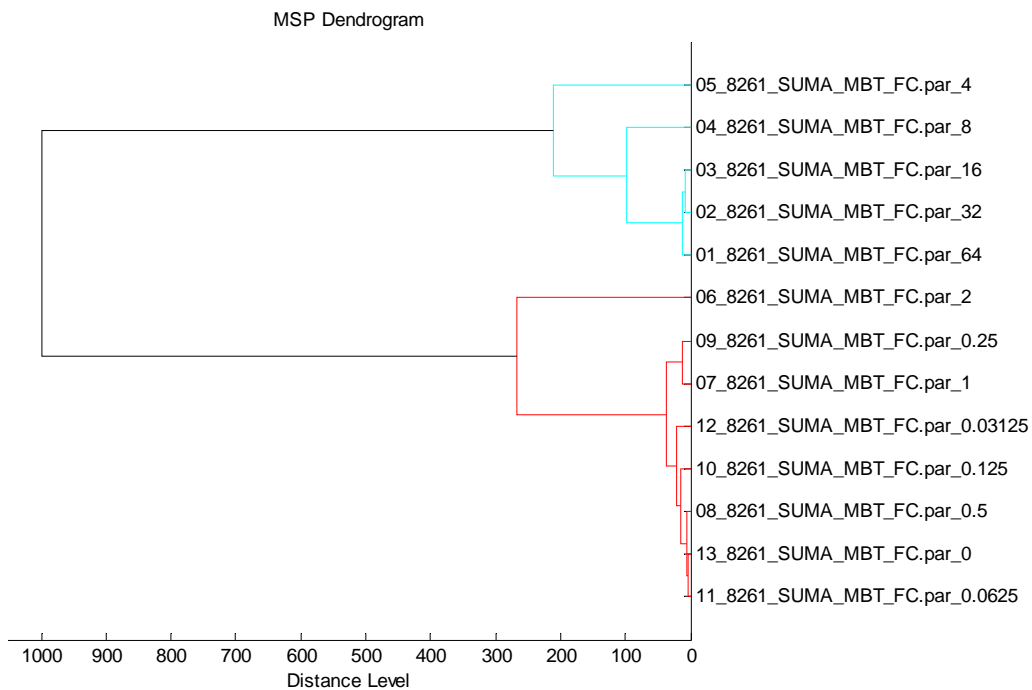
7.3 Vyhodnocení pomocí dendrogramu

7.3.1 Referenční kmen *C. albicans* CCM 8261 – metoda *Caspofungin*



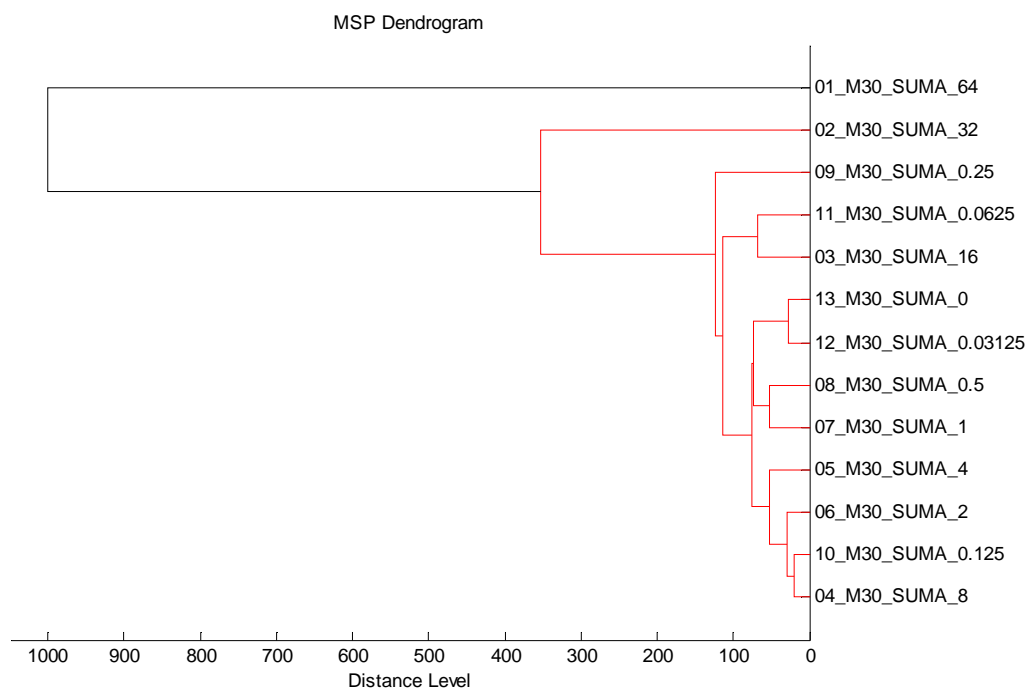
Obr. 19 Dendrogram citlivého referenčního kmene *C. albicans*.

7.3.2 Referenční kmen *C. albicans* CCM 8261 – metoda *MBT.FC.par*



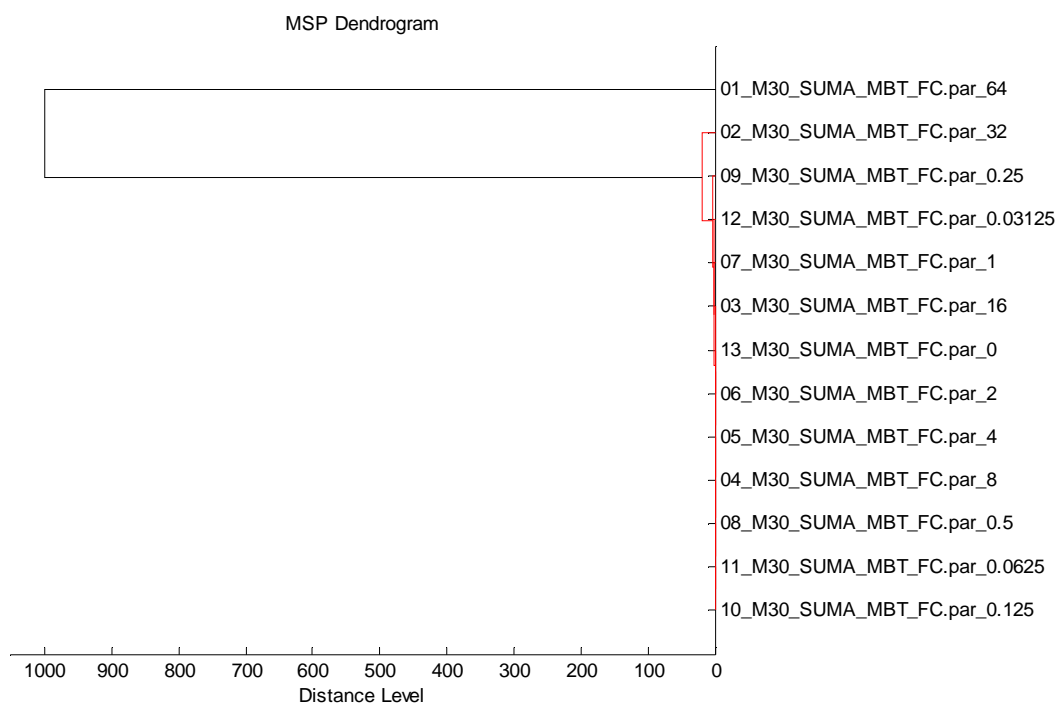
Obr. 20 Dendrogram citlivého referenčního kmene *C. albicans*.

7.3.3 Rezistentní kmen *C. albicans* M30 – metoda *Caspofungin*



Obr. 21 Dendrogram rezistentního kmene *C. albicans*.

7.3.4 Rezistentní kmen *C. albicans* M30 – metoda *MBT.FC.par*



Obr. 22 Dendrogram rezistentního kmene *C. albicans*.

8 Diskuze

Pro měření bylo nejprve použito nastavení dle vybrané publikace [49], ale již během testování bylo zjištěno, že spektra nedosahují vhodné kvality. Konzultace s výrobcem upřesnila, že pro každý přístroj má své individuální nastavení a proto publikace takových hodnot je vlastně nevhodná, protože je nelze v praxi použít.

Nepodařilo se nám ověřit platnost vztahu hodnot CCI matrix dle zvolené publikace [49] k průkazu rezistence či citlivosti ke kaspofunginu na našich kmenech. Proto bylo použito jiné metody vyhodnocení – dendrogramu, který odlišil kmen rezistentní a citlivý. Podle získaných výsledků dendrogramu u citlivého kmene by se mohlo zdát, že jako citlivé jsou hodnoceny kmeny, které mají $MIC \leq 2$ mg/l, což odpovídá dnes již neplatným doporučením pro kaspofungin [53]. Později byla publikována data na podkladě molekulárních vyšetření, která změnila interpretační kritéria pro *Candida albicans* a kaspofungin na hodnotu MIC 0,125 mg/l pro citlivý kmen [54].

Nelze jednoznačně rozhodnout, zda získaná hodnota našeho měření 2 mg/l znamená nedostatečnou senzitivitu zvolené metody pro vyšetření citlivosti na kaspofungin, protože během testování bylo použito antimykotikum kaspofungin rozpouštěné ve vodě pro injekce, roztok byl uchováván při teplotě – 20 °C po dobu více než 3 měsíců a byl několikrát opětovně rozmrazován. Výrobce námi testované formy Caspofungin diacetate (Sigma-Aldrich) na svých webových stránkách u tohoto výrobku uvádí solubilitu ve vodě [34]. Navíc dle souhrnu údajů o přípravku Cancidas (Merck) [33] se rekonstituce klasických injekčních lahviček s CSF provádí právě pomocí vody pro injekce a koncentrát pro přípravu infuzního roztoku lze uchovávat po dobu maximálně 24 hodin. Nicméně podle dokumentu vydaného EUCAST [55, 56] jsme se dodatečně dozvěděli, že dochází při použití vody jako rozpouštědla, a to zejména u kaspofunginu, ke značným rozdílům v hodnotách MIC. Z toho důvodu je pro kaspofungin, a také pro další antimykotika, doporučen jako rozpouštědlo dimethylsulfoxid (DMSO). Díky použití tohoto diluentu se prodlužuje doba použitelnosti naředěného antimykotika (při teplotě – 70 °C a nižší lze antimykotikum skladovat až po dobu 6 měsíců).

Rekonstituovaný CSF byl poté použit pro přípravu diluční řady s RPMI-1640 médiem bez bikarbonátu. Podle výše zmíněného dokumentu EUCAST má být médium obohaceno o glukózu, což mohlo ovlivnit růst testovaných kmenů a následně i výsledek testu.

ZÁVĚR

Invazivní kandidózy představují významnou komplikaci léčby zejména imunokompromitovaných pacientů. Rychlá detekce rezistence na echinokandinová antimykotika může významně urychlit volbu správné terapie a jako vhodná technologie pro detekci takové rezistence se ukazuje být hmotnostní spektrometrie na principu MALDI-TOF. V této práci se podařilo pomocí hmotnostní spektrometrie odlišit kmen citlivý a rezistentní ke kaspofunginu, nicméně opakování provedených měření s uplatněním dodatečně zjištěných poznatků, stejně jako testování většího množství kmenů bude nutné pro ověření použitelnosti zvolené metody detekce rezistence a její zavedení do rutinní praxe.

REFERENČNÍ SEZNAM

1. KOCKOVÁ-KRATOCHVÍLOVÁ, Anna. *Kvasinky a kvasinkovité mikroorganizmy*. 1. vyd. Bratislava: Alfa, 1982, 483 s.
2. VOTAVA, Miroslav a kol. *Lékařská mikrobiologie speciální*. Brno: Neptun, 2003, 495 s. ISBN 80-902-8966-5.
3. JANDEROVÁ, Blanka a Olga BENDOVIÁ. *Úvod do biologie kvasinek*. 1. vyd. Praha: Karolinum, 1999, 108 s. ISBN 80-718-4990-1.
4. DOHNAL, Vlastimil, Alena JEŽKOVÁ a Jiří SKLÁDANKA. *Ergosterol: klíčový steroid hub*. České Budějovice: Zdravotně sociální fakulta Jihočeské univerzity, 2008, roč. 10, č. 2, s. ISSN 1804-7122. Dostupné z: <http://casopis-zsfju.zsf.jcu.cz/kontakt/administrace/clankyfile/20120504145335154666.pdf>
5. RIPPON, John Willard. *Medical mycology: the pathogenic fungi and the pathogenic actinomycetes*. 3rd ed. Philadelphia: Saunders, 1988, 797 s. ISBN 0-7216-2444-8
6. ŠILHÁNKOVÁ, Ludmila. *Mikrobiologie pro potravináře a biotechnology*. 3. oprav. a dopl. vyd. Praha: ACADEMIA, 2002, 363 s. ISBN 80-200-1024-6.
7. THOMPSON, Demla S., Patricia L. CARLISLE and David KADOSH. Coevolution of Morphology and Virulence in Candida Species. *Eukaryotic Cell*. 2011-08-31, vol. 10, issue 9, s. 1173-1182. DOI: 10.1128/EC.05085-11. Dostupné z: <http://ec.asm.org/cgi/doi/10.1128/EC.05085-11>
8. KLIS, Frans M., Pietermella MOL, Klaas HELLINGWERF a Stanley BRUL. Dynamics of cell wall structure in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiology Reviews*. 2002, vol. 26, issue 3. DOI: 10.1111/j.1574-6976.2002.tb00613.x. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1574-6976.2002.tb00613.x>
9. NOVÁK, Miroslav. β -glukany, historie a současnost. *Chemické listy*. Praha: Česká společnost chemická, 2007, č. 11, s. 872-880. Dostupné z: http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2007_11_872-880.pdf
10. KLIS, Frans M., Andre BOORSMA a Piet W. J. DE GROOT. Cell wall construction in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*. 2006, vol. 23, issue 3, s. 185-202. DOI: 10.1002/yea.1349. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/yea.1349>
11. GOW, Neil A. R., Frank L. van de VEERDONK, Alistair J. P. BROWN a Mihai G. NETEA. Candida albicans morphogenesis and host defence: discriminating invasion from colonization. *Nature Reviews Microbiology*. 2011, roč. 10, č. 2. DOI: 10.1038/nrmicro2711. Dostupné z: <http://www.nature.com/doi/10.1038/nrmicro2711>

12. LIPKE, Peter N. a Rafael OVALLE. Cell Wall Architecture in Yeast: New Structure and New Challenges. *Journal of bacteriology*. 1998, č. 15. Dostupné z: <http://jb.asm.org/content/180/15/3735.long>
13. RICHARDSON, Malcolm D. a David W. WARNOCK. *Fungal infection: diagnosis and management*. 3rd ed. London: Blackwell Publishing, 2003, 366 s. ISBN 1-4051-15785-5.
14. HABER, Jan. *Systémové mykózy a jejich léčba*. 1. vyd. Praha: Galén, 1995, 319 s. ISBN 80-858-2416-7.
15. DISMUKES, William E, Peter G. PAPPAS a Jack D. SOBEL. *Clinical mycology*. New York: Oxford University Press, 2003, 519 s. ISBN 01-951-4809-6.
16. KOČMANOVÁ, I., L. DRGOŇA, Z. RÁČIL, V. CHRENKOVÁ, P. OLIŠAROVÁ, N. MALLÁTOVÁ, J. HABER, M. LISALOVÁ, E. BENDO VÁ, R. DOBIÁŠ a S. DOBIÁŠOVÁ. Invazivní kvasinkové infekce na vybraných hematologických odděleních České a Slovenské republiky - mikrobiologické výsledky projektu CAN CELL. *Klinická mikrobiologie a infekční lékařství*. Praha: Trios, 2011, roč. 17, č. 1. ISSN 1211-264X.
17. LYNCH, Denis P. Oral candidiasis. History, classification, and clinical presentation. *Oral surgery, oral medicine and oral pathology*. St. Louis: Mosby, 1994, roč. 78, č. 2. Dostupné z: [http://dx.doi.org/10.1016/0030-4220\(94\)90146-5](http://dx.doi.org/10.1016/0030-4220(94)90146-5)
18. SAEZ-GOMEZ, J. M. a M. ROMERO-MAROTO. Scientific Ideas on Muguet (Thrush) in the XVIII Century. *Journal of Dental Research*. 2010, roč. 89, č. 6. DOI: 10.1177/0022034510363965. Dostupné z: <http://jdr.sagepub.com/cgi/doi/10.1177/0022034510363965>
19. KOČKOVÁ-KRATOCHVÍLOVÁ, Anna. *Taxonómia kvasinek a kvasinkovitých mikroorganizmov*. 1. vyd. Bratislava: Vydavateľstvo Alfa, 1990, 699 s. Edícia potravinárskej literatúry. ISBN 80-050-0644-6.
20. MCCULLOUGH, M. J., B. C. ROSS a P. C. READE. Candida albicans: a review of its history, taxonomy, epidemiology, virulence attributes, and methods of strain differentiation. *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*. Copenhagen: Munksgaard, 1996, roč. 25, č. 2. Dostupné z: [http://dx.doi.org/10.1016/S0901-5027\(96\)80060-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0901-5027(96)80060-9)
21. VOTAVA, Miroslav a kol. *Lékařská mikrobiologie - vyšetřovací metody*. Brno: Neptun, 2010, 495 s. ISBN 978-80-86850-04-7.
22. DE HOOG, G. S., J. GUARRO, J. GENÉ a M. J. FIGUERAS. *Atlas of clinical fungi electronic version 3.1* [online]. Pilotversion of the 3rd ed. Utrecht: CBS, 2011. ISBN 9789070351656.

23. SCHINDLER, Jiří. *Mikrobiologie: pro studenty zdravotnických oborů*. 1. vyd. Praha: Grada, 2010, 223 s. ISBN 978-802-4731-704.
24. MALLÁTOVÁ, Naďa a Karel MENCL. Laboratorní diagnostika invazivní kandidózy. *Postgraduální medicína: příloha postgraduální medicíny*. Praha: Strategie, 2010, roč. 12, příloha 5, s. 51-58.
25. ISENBERG, Henry D. *Clinical microbiology procedures handbook*. 2nd ed. Washington, D.C.: ASM Press, 2004. ISBN 15-558-1243-0.
26. BUCHTA, Vladimír, Petr HAMAL, Naďa MALLÁTOVÁ, Iva KOČMANOVÁ, Vanda CHRENKOVÁ, Markéta ROUBALOVÁ a Petra OLÍŠAROVÁ. Nepodkročitelné minimum laboratorní diagnostiky invazivních mykotických infekcí - doporučení odborníků s podporou CELL a SLM JEP. *Postgraduální medicína: příloha postgraduální medicíny*. Praha: Mladá fronta a.s., 2010, roč. 12, příloha 5, s. 76-81.
27. MALLÁTOVÁ, Naďa, Petr HAMAL, Iva KOČMANOVÁ a Vladimír BUCHTA. Testování citlivosti mikromycet k antimykotikům in vitro u imunosuprimovaných pacientů: doporučení odborníků s podporou CELL a SLM ČLS JEP. *Postgraduální medicína: příloha postgraduální medicíny*. Praha: Mladá fronta a.s., 2011, příloha č. 5, s. 51-65. ISSN 1212-4184.
28. HYNIE, Sixtus. *Farmakologie v kostce*. Vyd. 2. Praha: Triton, 2001, 520 s. ISBN 80-725-4181-1.
29. HABER, Jan. Echinokandiny – nová skupina antimykotik. *Remedia: farmakoterapeutický dvouměsíčník pro lékaře a farmaceuty*. Kostelec nad Černými Lesy: CZ Pharma s.r.o., 2008, roč. 18, č. 4. ISSN 0862-8947. Dostupné z: <http://www.remédia.cz/Archiv-rocniku/Rocnik-2008/4-2008/Echinokandiny-nova-skupina-antimykotik/e-9q-a4-jH.magarticle.aspx>
30. SCHMATZ, D. M., M. A. POWLES, D. MCFADDEN, K. NOLLSTADT, F. A. BOUFFARD, J. F. DROPINSKI, P. LIBERATOR a J. ANDERSEN. New semisynthetic pneumocandins with improved efficacies against *Pneumocystis carinii* in the rat. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 1995, roč. 39, č. 6. DOI: 10.1128/AAC.39.6.1320. Dostupné z: <http://aac.asm.org/content/39/6/1320>
31. DENNING, David W. Echinocandin antifungal drugs. *The Lancet*. 2003, roč. 362, č. 9390, s. 1142-1151. DOI: 10.1016/S0140-6736(03)14472-8. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0140673603144728>

32. KARTSONIS, Nicholas A., Jennifer NIELSEN a Cameron M. DOUGLAS. Caspofungin: the first in a new class of antifungal agents. *Drug Resistance Updates*. 2003, roč. 6, č. 4. DOI: 10.1016/S1368-7646(03)00064-5. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1368764603000645>
33. *CANCIDAS® for injection: Safety data sheet*. MERCK & CO, 2008.
34. *Strukturní vzorec kaspofunginu (caspofungin diacetate)*. Dostupné z: <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/sml0425?lang=en®ion=CZ>
35. MURRAY, Patrick R., Ken S. ROSENTHAL a Michael A. PFALLER. *Medical microbiology*. 5th ed. Philadelphia: Elsevier Mosby, 2005, 963. ISBN 03-230-3303-2.
36. KATHIRAVAN, Muthu K., Amol B. SALAKE, Aparna S. CHOTHE, Prashik B. DUDHE, Rahul P. WATODE, Maheshwar S. MUKTA a Sandeep GADHWE. The biology and chemistry of antifungal agents: A review. *Bioorganic*. 2012, roč. 20, č. 19, s. 5678-5698. DOI: 10.1016/j.bmc.2012.04.045. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S096808961200329X>
37. MAYERS, Douglas L., Stephen A. LERNER, Marc OUELLETTE a Jack D. SOBEL. *Antimicrobial drug resistance: Mechanisms of Drug Resistance, Volume 1*. New York: Humana Press, 2009, 678 s. ISBN 16032759592.
38. JEDLIČKOVÁ, Anna. *Systémové mykózy: Průvodce ošetřujícího lékaře*. Praha: Maxdorf, 2006. Farmakoterapie pro praxi, svazek 16. ISBN 80-7345-000-x.
39. CHRENKOVÁ, Vanda, Petr HUBÁČEK, Petr SEDLÁČEK, Petr ŘÍHA, Daniela KODETOVÁ a Eliška BĚBROVÁ. *Post-mortem analysis of Candida albicans breakthrough infection during echinocandin treatment in haematopoietic stem cell transplant recipient*. EMI, 2014. in press.
40. BENNETT, John E. Echinocandins for Candidemia in Adults without Neutropenia. *New England Journal of Medicine*. 2006, roč. 355, č. 11. DOI: 10.1056/NEJMct060052. Dostupné z: <http://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJMct060052>
41. FRIEDECKÝ, D. a K. LEMR. Úvod do hmotnostní spektrometrie. *Klinická biochemie a metabolismus: časopis České společnosti klinické biochemie*. Praha: Česká lékařská společnost J.E. Purkyně, 2012, roč. 20, č. 3. Dostupné z: <http://www.cskb.cz/res/file/KBM-pdf/2012/2012-3/KBM12-3-Friedecky-152.pdf>
42. BIZZINI, A. a G. GREUB. Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry, a revolution in clinical microbial identification. *Clinical Microbiology and Infection*. 2010, roč. 16, č. 11. DOI: 10.1111/j.1469-0691.2010.03311.x. Dostupné z: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1469-0691.2010.03311.x/pdf>

43. BADER, Oliver. MALDI-TOF-MS-based species identification and typing approaches in medical mycology. *Proteomics*. 2013, vol. 13, issue 5. DOI: 10.1002/pmic.201200468. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/pmic.201200468>
44. KALČÍK, Vojtěch, Milan KODÍČEK a Martin HASSMAN. Využití hmotnostní spektrometrie na principu MALDI-TOF pro studium prostorové struktury proteinů. *Chemické listy*. 2002, roč. 96, č. 7. Dostupné z: http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2002_07_06.pdf
45. KLOUDA, Pavel. *Moderní analytické metody*. 2., upr. a dopl. vyd. Ostrava: Pavel Klouda, 2003, 132 s. ISBN 80-86369-07-2.
46. HALADA, Petr. Hmotnostní spektrometrie peptidů a proteinů. *Mikrobiologický ústav AV ČR*. Dostupné z: http://www.uhkt.cz/files/proteomika/Druhy_den-Principy_MS.pdf
47. MARINACH, Carine, Alexandre ALANIO, Martine PALOUS, Stéphanie KWASEK, Arnaud FEKKAR, Jean-Yves BROSSAS, Sophie BRUN, Georges SNOUNOU, Christophe HENNEQUIN, Dominique SANGLARD, Annick DATRY, Jean-Louis GOLMARD a Dominique MAZIER. MALDI-TOF MS-based drug susceptibility testing of pathogens: The example of *Candida albicans* and fluconazole. *Proteomics*. 2009, vol. 9, issue 20, s. 4627-4631. DOI: 10.1002/pmic.200900152. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/pmic.200900152>
48. Supporting information for Proteomics: DOI 10.1002/pmic.200900152 (MALDI-TOF MS-based drug susceptibility testing of pathogens: The example of *Candida albicans* and fluconazole). 2009. Dostupné z: http://onlinelibrary.wiley.com/store/10.1002/pmic.200900152/asset/supinfo/pmic_200900152_sm_SupplInfo.pdf?v=1&s=46dcb775f91f30ea012e69c9d8f56fcd55702311
49. VELLA, Antonietta, Elena DE CAROLIS, Luisa VACCARO, Patrizia POSTERARO, David S. PERLIN, Markus KOSTRZEWA, Brunella POSTERARO a Maurizio SANGUINETTI. Rapid Antifungal Susceptibility Testing by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry Analysis. *Journal of Clinical Microbiology*. 2013-08-16, vol. 51, issue 9, s. 2964-2969. DOI: 10.1128/JCM.00903-13. Dostupné z: <http://jcm.asm.org/cgi/doi/10.1128/JCM.00903-13>
50. WALKER, Ian. *Výzkumné metody a statistika*. Vyd. 1. Praha: Grada, 2013, 218 s. Z pohledu psychologie. ISBN 978-80-247-3920-5.
51. BRUKER DALTONICS. *MALDI Biotyper 3.1 User Manual*. 2012.
52. MELOUN, Milan. *Kompendium statistického zpracování dat: metody a řešené úlohy včetně CD*. Vyd. 1. Praha: Academia, 2002, 764 s. ISBN 80-200-1008-4.

53. CANTÓN, Emilia, Ana ESPINEL-INGROFF a Javier PEMÁN. Trends in antifungal susceptibility testing using CLSI reference and commercial methods. *Expert Review of Anti-infective Therapy*. 2009, vol. 7, issue 1, s. 107-119. DOI: 10.1586/14787210.7.1.107. Dostupné z: <http://informahealthcare.com/doi/abs/10.1586/14787210.7.1.107>
54. GARCIA-EFFRON, G., S. PARK a D. S. PERLIN. Correlating Echinocandin MIC and Kinetic Inhibition of fks1 Mutant Glucan Synthases for *Candida albicans*: Implications for Interpretive Breakpoints. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2008-12-23, vol. 53, issue 1, s. 112-122. DOI: 10.1128/AAC.01162-08. Dostupné z: <http://aac.asm.org/cgi/doi/10.1128/AAC.01162-08>
55. ARENDRUP, Maiken C., Manuel CUENCA-ESTRELLA, Cornelia LASS-FLÖRL a William HOPE. EUCAST technical note on the EUCAST definitive document EDef 7.2: method for the determination of broth dilution minimum inhibitory concentrations of antifungal agents for yeasts EDef 7.2 (EUCAST-AFST)*. *Clinical Microbiology and Infection*. 2012, vol. 18, issue 7. DOI: 10.1111/j.1469-0691.2012.03880.x. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1469-0691.2012.03880.x>
56. EUCAST DEFINITIVE DOCUMENT EDef 7.2 Revision. *Method for the determination of broth dilution minimum Inhibitory concentrations of antifungal agents for yeasts*. Sweden: Växjö. EUCAST (The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing), March 2012. Dostupné z: http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/AFST/EUCAST_EDef_7_2_revision.pdf