UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

KATEDRA BIOLOGICKÝCH A LÉKAŘSKÝCH VĚD

DIPLOMOVÁ PRÁCE

VYHODNOCENÍ AKTIVITY POTENCIÁLNĚ ANTIFUNGÁLNÍCH LÁTEK POMOCÍ MIKRODILUČNÍ BUJÓNOVÉ METODY

Vedoucí diplomové práce: Mgr. MARCELA VEJSOVÁ, Ph.D.

HRADEC KRÁLOVÉ, 2016 **Bc. NELA DRNKOVÁ**

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala vedoucí diplomové práce Mgr. Marcele Vejsové, Ph.D. za její ochotu, cenné rady a čas, který mi při sepisování právě věnovala. Také bych chtěla poděkovat paní laborantce Idě Dufkové za ochotu a pomoc při testování látek. Další díky patří Mgr. Martinu Krátkému, Ph.D. za pomoc s chemickou nomenklaturou. Za podporu během studia bych chtěla poděkovat celé své rodině.

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

V Hradci Králové 20.4. 2016

Bc. Nela Drnková

Obsah

1. OBSAH

2. ABSTRAKT 6

3. ABSTRACT 7

4. SEZNAM ZKRATEK 8

5. ÚVOD 10

6. ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE – CÍL PRÁCE 11

7. TEORETICKÁ ČÁST 12

7.1 Obecná charakteristika hub 12

7.2 Charakteristika testovaných kmenů 13

7.2.1 Rod *Candida* 13

7.2.2 Rod *Trichosporon* 21

7.2.3 Rod *Aspergillus* 22

7.2.4 Rod *Absidia* 24

7.2.5 Rod *Trichophyton* 26

7.3 Antimykotika 28

7.3.1 Polyenová antimykotika 28

7.3.2 Azolová antimykotika 29

7.3.3 Echinokandiny 31

7.3.4 Allylaminy 32

7.3.5 Antimetabolity 32

7.3.6 Ostatní antimykotika 33

7.3.7 Nespecifická antimykotika 34

7.4 Laboratorní diagnostika mykotických infekcí 34

7.4.1 Odběr klinického materiálu 35

7.4.2 Mikroskopické vyšetřovací techniky 36

7.4.3 Kultivační techniky 38

7.4.4 Biochemické metody 39

7.4.5 Molekulárně – biologické metody 41

7.4.6 MALDI – TOF MS 41
7.4.7 Imunologické metody 42
7.5 Testování citlivosti in vitro 43
7.5.1 Kvalitativní testy 44
7.5.2 Kvantitativní testy 45

8. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST 47
8.1 Použitý materiál 47
8.1.1 Pomůcky 47
8.1.2 Přístroje 47
8.1.3 Chemikálie a média 47
8.1.4 Testované kmeny kvasinek a vláknitých hub 47
8.1.5 Testované látky 48
8.2 Postup 62
8.2.1 Příprava růstového média 62
8.2.2 Příprava suspenzí testovaných kmenů 62
8.2.3 Příprava ředící řady testované látky 63
8.2.4 Pipetování do destičky 64
8.2.5 Vyhodnocení MIC 65

9. VÝSLEDKY 66
9.1 Salicylanilidové *N*-monosubstituované a *N,N*-disubstituované karbamáty a thiokarbamáty 67
9.2 Sulfoamidové močoviny (deriváty sulfathiazolu) 71
9.3 Amidy odvozené od sulfathiazolu 73
9.4 Deriváty rhodaninu 74
9.5 Ostatní látky 75

10. DISKUZE 76

11. ZÁVĚR 82

12. SEZNAM TABULEK 83

13. SEZNAM OBRÁZKŮ 84

14. POUŽITÁ LITERATURA 85

2. ABSTRAKT

Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra biologických a lékařských věd

Kandidát: Bc. Nela Drnková

Školitel: Mgr. Marcela Vejsová, Ph.D.

Název práce: Vyhodnocení aktivity potenciálně antifungálních látek pomocí mikrodiluční bujónové metody

Cíl práce: Cílem této práce bylo vyhodnotit antifungální aktivitu u 70 testovaných látek pomocí mikrodiluční bujónové metody. Testované látky byly syntetizovány na Farmaceutické fakultě a byly na základě jejich chemické struktury rozděleny do 5 skupin.

Metody: Pro testování byla využita mikrodiluční bujónová metoda. Antifungální aktivita látek byla testována celkem na 8 kmenech kvasinek a vláknitých hub: C*andida albicans*, *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *Trichosporon asahii*, *Aspergillus fumigatus*, *Absidia corymbifera* a *Trichophyton mentagrophytes*.

Výsledky: Nejvíce účinných látek bylo ve skupině salicylanilidových *N*-monosubstituovaných a *N,N*-disubstituovaných karbamátů a thiokarbamátů. Látky SAL-1L, SAL-1M, SAL-1N byly nejúčinnější. Působily na *Trichophyton mentagrophytes* už při koncentraci 1,95 $\mu mol.l^{-1}$. Nejširší spektrum měla látka GP-137, inhibovala růst všech testovaných kmenů, ale pouze při vysokých koncentracích. Deriváty rhodaninu a amidy odvozené od sulfathiazolu byly dvě skupiny látek, kde nebyla nalezena žádná substance účinná na mikromycety. Ze sulfonamidových močovin účinkovala pouze STZ-Ben.

Závěry: Nejcitlivějším testovaným kmenem byl *Trichophyton mentagrophytes* a nejrezistentnější byla *Candida tropicalis* a *Aspergillus fumigatus*. Aby mohly být látky použité v terapii mykotických infekcí, jsou nutná další testování a studie.

3. ABSTRACT

Charles University in Prague, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Biological and Medical Sciences

Candidate: Bc. Nela Drnková

Supervisor: Mgr. Marcela Vejsová, Ph.D.

Title of diploma thesis: Evaluation of activity of potencial antifungal substances trought the use of microdilution broth method

Background: The aim of this thesis was evaluation of antifungal activity of 70 substances trought the use of microdilution broth method. Substances for testing were synthesized at the Faculty of Pharmacy and they were divided into 5 groups based on chemical structure.

Methods: The microdilution broth method was used for testing. The antifungal activity of substances was tested on 8 strains of yeasts and filamentous fungi: C*andida albicans*, *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *Trichosporon asahii*, *Aspergillus fumigatus*, *Absidia corymbifera* a *Trichophyton mentagrophytes*.

Results: The most active substances were in group of salicylanilide *N*-monosubstituted and *N,N*-disubstituted carbamates and thiocarbamates. The most effective substances were SAL-1L, SAL-1M, SAL-1N. They were effective on *Trichophyton mentagrophytes* already at concentration of 1,95 μmol.l^{-1}. The widest spectrum had substance GP-137, it inhibited the growth of all tested strains, but only at high concentrations. Rhodamine derivatives and sulphathiazole amides were two groups of substances, which had no effect on tested micromycetes. From group of the sulfonamide ureas was effective only STZ-Ben.

Conclusions: The most sensitive strain was *Trichophyton mentagrophytes* and the most resistant was *Candida tropicalis* and *Aspergillus fumigatus*. For using the substances for therapy of mycotic infections are necessary other testing and studies.

4. SEZNAM ZKRATEK

AC	*Absidia corymbifera*
AF	*Aspergillus fumigatus*
AIDS	Acquired Immune Deficiency Syndrome (syndrom získaného selhání imunity)
c	koncentrace
CA	*Candida albicans*
cfu	Colony forming unit (kolonie formující jednotky)
CG	*Candida glabrata*
CK	*Candida krusei*
CNS	centrální nervový systém
CT	*Candida tropicalis*
DM	diabetes mellitus
DMSO	dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonukleová kyselina
ELISA	Enzyme – Linked ImmunoSorbent Assay (enzymová imunoanalýza za použití pevné fáze)
HIV	Human Immunodeficiency Virus (virus lidské imunitní nedostatečnosti)
ID	inkubační doba
IZ	inhibiční zóna
kD	kilodalton
KOH	hydroxid draselný
M	molární hmotnost
MALDI TOF MS	The matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spektrometry (hmotnostní spektrometrie s analyzátorem doby letu, při které se provádí ionizace laserem za účasti biomatrice)
MIC	minimální inhibiční koncentrace
MOPS	3-*(N*-morfolino)propansulfanová kyselina
NaOH	hydroxid sodný
PAS	Periodic Acid Schiff
PCR	Polymerase Chain Reaction (polymerázová řetězová reakce)

RT – PCR	Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (polymerázová řetězová reakce s reverzní transkripcí)
RPMI	Roswell Park Memorial Institute medium
TA	*Trichosporon asahii*
TM	*Trichophyton mentagrophytes*

5. ÚVOD

Mykotické infekce způsobené různými druhy kvasinek a vláknitých hub jsou ve všech populacích velice časté. Infekce způsobené běžnými mykotickými agens většinou člověka na životě neohrožují, mají lehký průběh a lze je poměrně dobře léčit. Na rozvoji závažných systémových mykóz se podílí celá řada různých faktorů, v takovýchto případech mohou být infekce často fatální. Mezi tyto faktory patří celá řada různých onemocnění. Jsou to onemocnění postihující imunitu (HIV, AIDS, neutropenie a jiné imunodeficitní stavy) a metabolizmus (diabetes mellitus, Addisonova choroba, hypotyreóza apod.). Dalšími faktory přispívající k rozvoji těchto nemocí jsou: léčba širokospektrými antimykotiky, transplantace, imunosupresivní léčba, chemoterapie a spoustu dalších. Důležité je zmínit, že některá mykotická agens mohou způsobit život ohrožující onemocnění v souvislosti s ošetřením nebo hospitalizací v nemocnici (tzv. nozokomiální infekce). Dalším velice závažným problémem souvisejícím s léčbou je rezistence. Díky nesprávnému používání antimykotik máme u některých mykotických onemocnění omezené možnosti terapie.

Vzhledem k tomu, že v posledních letech došlo k velkému nárůstu mykotických infekcí a rezistencí, dochází současně s tím, i k výzkumu v této oblasti. Týká se to především nových možností léčby, testování citlivosti vůči antimykotikům a také diagnostiky. Vývoj nových antimykotik je obtížný, díky podobnosti mykotické buňky se savčí buňkou. Většina antimykotik působí v dráze syntézy ergosterolu. Cílem výzkumu je nalézt látku účinnou při nízkých koncentracích, se širokým spektrem účinku, která má minimální toxicitu pro člověka.

Cílem této diplomové práce bylo zjistit antifungální aktivitu testovaných látek *in vitro* pomocí mikrodiluční bujónové metody. Testované látky byly syntetizovány na Farmaceutické fakultě v Hradci Králové (Prof. Vinšová a Dr. Krátký).

6. ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE – CÍL PRÁCE

Vyhodnocení aktivity potenciálně antifungálních látek *in vitro* pomocí mikrodiluční bujónové metody.

- Rešerše literatury
- Zvládnutí základních mikrobiologických technik v laboratoři mykologie
- Vypracování postupu vyhodnocení antifungální aktivity *in vitro* pomocí mikrodiluční bujónové metody
- Vlastní experimenty
- Zpracování výsledků
- Vyhodnocení výsledků, jejich interpretace a diskuze s využitím teoretických a praktických znalostí dané problematiky

7. TEORETICKÁ ČÁST

7.1 Obecná charakteristika hub

Houby jsou eukaryotické organizmy, které tvoří samostatnou říši v systému organizmů. Tato říše se nazývá *Fungi*. Houby mohou být jednobuněčné nebo mnohobuněčné. Ve většině případů je pro ně typický saprofytický způsob výživy. Co se týká ekosystému, tak zde hrají významnou roli. Představují destruenty se schopností rozkládat celulózu, lignin, keratin a podobně. Jen pouze velice malá část se adaptovala na parazitický způsob života. Houbami, které parazitují na člověku, se zabývá lékařská mykologie. Jsou to houby mikroskopických rozměrů a nazývají se mikromycety (Votava a kol. 2010; Buchta 1998).

Mykotická buňka obsahuje jádro s několika chromozómy ohraničené jadernou membránou. Na rozdíl od lidské (savčí) buňky, kde je základním sterolem buněčné membrány cholesterol, je u hub základním sterolem ergosterol. Tohoto rozdílu se využívá v antimykotické léčbě, kdy místem zásahu antimykotik je právě ergosterol mykotických buněk.

Kvasinky a plísně způsobují celou řadu onemocnění u lidí. Tato onemocnění postihují zejména osoby s narušenou obranyschopností (Rozsypal a Holub 2013).

Další znak charakteristický pro houby je způsob jejich rozmnožování. Mají schopnost se rozmnožovat jak pohlavně, tak i nepohlavně. Během asexuální reprodukce (mitózy) se houby vyskytují ve formě tzv. *anamorfy*, což je asexuální stadium. Po nepohlavním rozmnožování vznikají konidie. Stadia sexuální tzv. *teleomorfy* se vyskytují během rozmnožování pohlavního, jehož základem je meióza. Výsledkem pohlavního rozmnožování jsou spory (meiospory). Mezi stadiem sexuálním a asexuálním jsou značné rozdíly. Právě způsob rozmnožování spolu s typem rozmnožovacích struktur hraje významnou roli v klasifikaci hub do taxonomických jednotek (Buchta 1998; Votava a kol. 2010).

Stélka (tělo) je tvořena vlákny (hyfy). Tato vlákna mohou být jednojaderná, dvoujaderná nebo mnohojaderná. V některých případech mohou mít i septum. Hyfy se mohou při růstu splétat, větvit a vytvářet podhoubí (mycelium). Mycelium může být

vegetativní, to je zodpovědné za výživu houby a mycelium vzdušné (generativní), což je mycelium nesoucí rozmnožovací struktury. Hyfy nesoucí pohlavní spory (výtrusy) nazýváme sporofory a hyfy nesoucí nepohlavní spory (konidie) nazýváme konidiofory. Konidie a spory jsou klíčové při identifikaci mikroskopických hub, sleduje se jejich vzhled a uspořádání. Kromě hub s vláknitou strukturou rozlišujeme ještě houby, které mají stélku redukovanou na tzv. blastosporu. Blastospory jsou jednobuněčné a typické pro kvasinky. V určitých situacích mohou kvasinky tvořit tzv. pseudomycelium (nepravé mycelium) nebo i pravé mycelium. Pseudomycelium vzniká z pučících buněk kvasinek, které se protahují, a tím dochází k tvorbě útvarů podobných vláknům. Někdy se u hub můžeme setkat s tzv. dimorfismem. Je to schopnost houby, v závislosti na podmínkách ve svém okolí, růst ve formě vláknité nebo ve formě kvasinky. Nejčastěji je to v závislosti na kultivační teplotě. Tyto dvě formy jsou schopny snadno přecházet jedna ve druhou a naopak. Mezi pravé dimorfní houby patří rody *Histoplasma, Coccidioides, Blastomyces, Paracoccidioides* a *Sporothrix*. U pravých dimorfních hub platí, že forma kvasinková je formou parazitickou (růst při teplotě 35-37°C) a forma vláknitá saprofytickou (růst při teplotě 22-30°C). U kvasinek z rodu *Candida* je tomu opačně. Saprofytická forma je kvasinková a vláknitá je parazitická. Vláknitá forma umožňuje kvasinkám penetraci do tkání (Buchta 1998; Votava a kol. 2010; Jílek a kol. 2002).

7.2 Charakteristika testovaných kmenů

7.2.1 Rod *Candida*

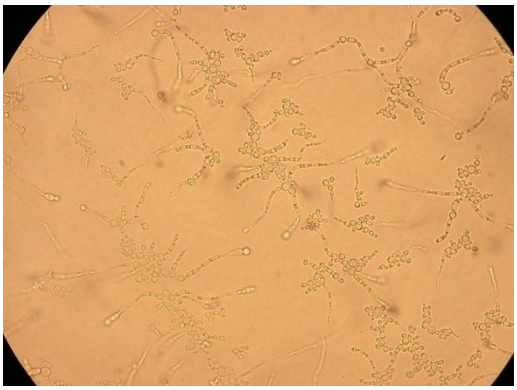
Název *Candida* pochází z latinského slova *candidus*, což znamená bílý. Jedná se o rozsáhlý rod kvasinek. Patří sem jak druhy pouze saprofytické, tak i druhy potenciálně patogenní. Potenciálně patogenní druhy jsou u člověka a zvířat významnými původci mykotických infekcí. Kandidózy tvoří velkou část systémových a povrchových mykóz na celém světě. Co se týká biochemických vlastností, jsou kandidy schopné zkvašovat různé cukry, toho se využívá při určování jejich druhů pomocí fermentačních testů – zymogramů. Další testy využívající jejich biochemických vlastností k identifikaci jsou tzv. auxanogramy. Tyto testy slouží ke zjištění schopnosti

těchto mikroorganizmů asimilovat různé cukry a dusíkaté látky (Bednář a kol. 1996; Klaban 2005).

7.2.1.1 Candida albicans

Tato kvasinka je nejčastějším původcem kandidózy, je izolována až v 70 % případů. V přírodě se přirozeně vyskytuje především v půdě, v gastrointestinálním traktu lidí a zvířat a jako komenzál sliznic. U člověka ji můžeme najít např. na kůži, v dutině ústní, ve sputu, ve vaginálních sekretech, v sekretech zvukovodů, moči, stolici a podobně (Klaban 2005; Mycology Adelaide 2015 [online]).

Buňky kvasinky (blastokonidie, blastospory) *Candida albicans* mají kulatý nebo oválný tvar, jejich velikost je od 3 do 5 µm (Obr. 1). Vzhledem k tomu, že se jedná o dimorfní houbu, může *Candida albicans* tvořit pseudohyfy a i pravé hyfy. Pravé hyfy jsou mnohobuněčné a opatřené septy. Pseudohyfy jsou řetízky protáhlých blastokonidií.



Obrázek 1: Mikroskopický vzhled *Candida albicans*

Zdroj: Candida albicans. In: *Life-worldwide* [online]. Leading international fungal education. [citováno 29. 2. 2016]. Dostupné z: http://www.life-worldwide.org/assets/uploads/images/candida2.png

Pro tuto kvasinku je typická germinace – schopnost tvořit zárodečné klíčky (germ tubes). Zárodečné klíčky vyrůstají z blastokonidií a mají strukturu jemných vláken. Vznikají jak *in vitro*, tak *in vivo* a mohou se z nich tvořit pravé hyfy. Další typickou vlastností *Candida albicans* je schopnost za určitých podmínek tvořit chlamydospory. Chlamydospory mají kulatý tvar, silnou stěnu a velikost 7-10 µm. Jsou to odolné buňky, které se tvoří při kultivaci na nutričně chudých půdách (např. na rýžovém nebo kukuřičném agaru či na půdě se žlučí). Schopnost *C. albicans* tvořit

za daných podmínek chlamydospory, se využívá při její identifikaci (Bednář a kol. 1996).

Co se týká závislosti na kyslíku, jsou kandidy aerobní. Jsou nenáročné na živiny, dobře rostou na běžných kultivačních půdách, ale většinou preferují zvýšený obsah cukrů. Na Sabouraudově glukózovém agaru mají kolonie bílou až krémovou barvu, jsou hladké, vypouklé a mají mazlavou konzistenci (Obr. 2). *C. albicans* z cukrů štěpí např. glukózu, maltózu a sacharózu. (Bednář a kol. 1996; Votava a kol. 2010; Votava a kol. 2003).

Obrázek 2: Kolonie *Candida albicans*

Zdroj: Candida albicans. In: *Life-worldwide* [online]. Leading international fungal education. [citováno 29. 2. 2016]. Dostupné z: http://www.life-worldwide.org/assets/uploads/images/image002(1).gif

Candida albicans je potenciálně patogenní houba. Pro tuto kvasinku je významných hned několik virulentních faktorů. Patří sem adheziny. Jsou to biomolekuly, které podporují přilnutí kvasinky k hostitelským buňkám. Dalším významným faktorem virulence je schopnost germinace a dimorfismus (popsáno výše). Tyto vlastnosti jsou důležité pro invazi do tkání. Jako další virulentní faktory slouží enzymy. *C. albicans* produkuje aspartátovou proteinázu a fosfolipázu. Produkované hydrolytické enzymy se podílí na adhezi, poškození tkáně a na invazi do hostitelské buňky. Posledním virulentním faktorem je tzv. fenotypové přepínání. Bylo prokázáno, že *C. albicans* je schopna spontánně a reverzibilně měnit svůj fenotyp. Mění se jak morfologie, tak fyziologie a patogenita buněk (Bednář a kol. 1996; Chung 2002).

Infekce kvasinkou *Candida albicans* můžeme rozdělit do 4 fází: kolonizace, povrchová infekce, hluboká infekce a infekce systémová. Během kolonizace žije tato kvasinka jako komenzál v rovnováze s normální přirozenou mikrobiální flórou

na povrchu sliznic a hostitele nijak nepoškozuje. Velká část lidské populace je přirozeně kolonizována touto kvasinkou. Infekce může nastat tehdy, když dojde k narušení mikrobiologické rovnováhy nebo narušení imunitního systému hostitele. Vláknitá forma je většinou invazivní (patogenní) a kvasinková forma neinvazivní (nepatogenní). To je však velice jednoduše řečeno. Při infekci se vyskytují v postižených orgánech obě formy jak kvasinková, tak i vláknitá. Závisí na typu orgánu, která forma bude převládat. Při invazivní kandidóze ledvin pravidelně pozorujeme formu vláknitou a naopak je tomu u sleziny nebo jater (Jacobsen 2012).

Sekundární kandidózy vznikají u osob postižených jiným onemocněním nebo u osob s poruchou imunity. Kandidóza se může projevovat pouze jako lehká povrchová mykóza, kdy je postižena pouze kůže a sliznice. Patří sem dermatomykózy, onychomykózy, moučnivka (soor), což je orální kandidóza, postihující např. nedonošené děti a osoby s AIDS. Další velice častou kandidózou je vulvovaginitis. Vyskytuje se především v souvislosti s léčbou širokospektrými antibiotiky, ve třetím trimestru těhotenství, u diabetes mellitus a v souvislosti s nižším poševním pH. Infekce dutiny ústní jsou typické pro pacienty s oslabenou imunitou, naopak vaginální infekce se vyskytují u pacientek bez známek oslabení imunitního systému. Dalším typem kandidózy je chronická mukokutánní kandidóza. Je to forma přetrvávající kandidózy kůže a sliznic s tím, že jsou postiženy i hlubší tkáně. Vyskytuje se u pacientů s různými poruchami metabolizmu, např. u osob s hypoparatyreózou, Addisonovou chorobou, hypotyreózou, DM a další. Nejzávažnější kandidózy jsou systémové a orgánové. Hospitalizovaní pacienti s rizikovými faktory (např. vyšší věk, imunodeficity, neutropenie apod.) jsou náchylní k život ohrožujícím systémovým kandidózám. Ty se vyznačují tím, že se šíří prostřednictvím krevního řečiště a způsobují závažné infekce orgánů. Díky tomu patří *Candida albicans* k významným původcům nozokomiálních nákaz (Bednář a kol. 1996; Jacobsen 2012; Mycology Adelaide 2015 [online]).

7.2.1.2 Candida tropicalis

Jedná se o kvasinku s celosvětovým výskytem. Tvoří asi 4 % ze všech kvasinek získaných z mořské vody, mořského sedimentu, střev mořských ryb, mořských řas

a podobně. Dále může být izolována z různých druhů ovoce, výkalů a z půdy. Z názvu lze usoudit, že největší výskyt je v tropických a subtropických oblastech (Leading international fungal education [online]).

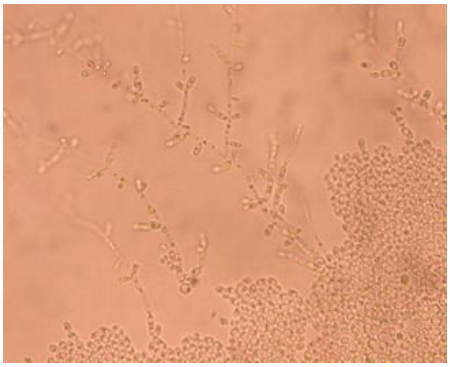
Byla identifikována jako kvasinka s největší patogenitou z druhů *Candida non – albicans*. Nejčastěji je izolována z krve, jako příčina kandidémie. V některých lokalitách může být tento původce příčinou kandidémie až ve 30 % případů. Vzácně může *C. tropicalis* způsobit orální nebo vulvovaginální kandidózu. Může však způsobit i systémové onemocnění. Invazivní kandidóza způsobená *C. tropicalis* byla častěji diagnostikována u pacientů s neutropenií, akutní leukémii nebo u pacientů po transplantaci kostní dřeně. Některé studie ukázaly, že *C. tropicalis* je ve střevě více patogenní než *C. albicans* a to zejména u pacientů s onkologickým onemocněním. Dále se při klinickém a experimentálním pozorování zjistilo, že je morbidita a mortalita u infekcí způsobených *C. tropicalis* vyšší, než u infekcí způsobených *C. albicans* (Leading international fungal education [online]; Kothavade a kol. 2010).

Počet infekcí způsobených touto kvasinkou se celosvětově zvyšuje. Hlavních příčin tohoto fenoménu je hned několik. Je to nadměrné používání antifungální léčby, zvyšování počtu pacientů s oslabenou imunitou, dlouhodobé používání katétrů, používání širokospektrých antibiotik, opakované infekce, nesnášenlivost antifungální léčby a další (Kothavade a kol. 2010).

Kolonie jsou na Sabouraudově agaru krémové nebo bílé až šedé barvy. Kolonie jsou měkké a hladké nebo mohou být matné, pomačkané až drsné (Obr. 3). Na základě makromorfologie nejsme schopni odlišit jednoznačně tuto kvasinku od ostatních z rodu *Candida*. Co se týká mikromorfologie, tak *C. tropicalis* netvoří koncové chlamydospory a větvení pseudomycelia je jiné než u *C. abcicans*. Buňky jsou sférické nebo subsférické (Obr. 4) (Leading international fungal education [online]; Mycology Adelaide 2015 [online]).

Obrázek 3: Kolonie *Candida tropicalis*

Zdroj: Candida tropicalis. In: *Microchemlaboratory* [online]. Microchemlab. [citováno 29. 2. 2016]. Dostupné z: http://microchemlab.com/sites/default/files/C.%20tropicalis.jpg



Obrázek 4: Mikromorfologie *Candida tropicalis*

Zdroj: Candida tropicalis. In: *Life-worldwide* [online]. Leading international fungal education. [citováno 29. 2. 2016]. Dostupné z: http://www.life-worldwide.org/assets/uploads/images/Candida%20tropicalis.jpg

7.2.1.3 Candida krusei

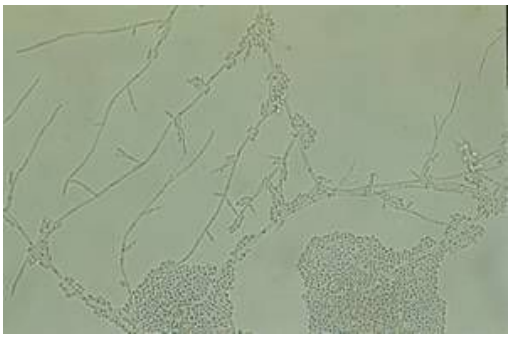
Tuto kvasinku lze najít celosvětově. Přirozeně se vyskytuje v atmosféře, půdě, kanalizaci, dále ji lze izolovat z ovoce a potravin. Jedná se o kvasinku s nízkou patogenitou. Dříve byla považována za neškodného saprofyta (Klaban 2005; Leading international fungal education [online]).

U zdravých osob se tato kvasinka vyskytuje v dutině ústní, dále je často nalezena v klinickém materiálu z gynekologických infekcí. Vyšší výskyt se také udává u osob, které používají zubní náhrady. Počet infekcí *C. krusei* roste, ve velkém počtu je izolována od pacientů po transplantaci kostní dřeně, od pacientů s AIDS a od pacientů s jinými poruchami imunitního systému (Klaban 2005).

Kolonie mají na Sabouraudově agaru bílou až krémovou barvu, jsou hladké a matné. Mohou mít okraj okrouhlý, mírně vroubkovaný nebo laločnatý (Obr. 5). Co se týká mikromorfologie, jsou buňky protáhlé a mají tvar jako rýže (Obr. 6). Je to jediný druh kandid, který může růst na médiu bez vitamínů. *C. krusei* je přirozeně rezistentní k flukonazolu. Byla zaznamenána i získaná rezistence k jiným azolovým antimykotikům (např. itrakonazol a vorikonazol). Z cukrů asimiluje a zkvašuje pouze glukózu (Klaban 2005; Leading international fungal education [online]).

Obrázek 5: *Candida krusei* na Sabouraudově glukózovém agaru

Zdroj: *Candida krusei*. In: *Postgraduální medicína* [online]. Postgraduální medicína [citováno 29. 2. 2016]. Dostupné z: http://img.mf.cz/317/064/1-54a.jpg



Obrázek 6: Mikromorfologie *Candida krusei*

Zdroj: *Candida krusei*. In: *Life-worldwide* [online]. Leading international fungal education. [citováno 29. 2. 2016]. Dostupné z: http://www.life-worldwide.org/assets/uploads/images/candida%20krusei.jpg

7.2.1.4 Candida glabrata

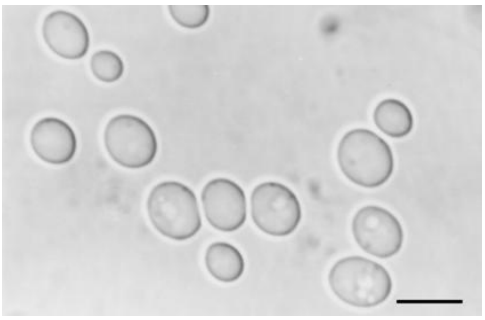
Jde o jednu z nejběžnějších kvasinek, která se nachází na povrchu těla. Tato kvasinka bývá druhou nejčastější příčinou vzniku slizničních kandidóz. Způsobuje záněty pochvy, dále je také izolována při orofaryngeální kandidóze a kandidóze jícnu (u pacientů s AIDS), kandidémii, infekci močových cest, pyelonefritidě, plicních

infekcích, endokarditidě a při hyperalimentacích. U imunosuprimovaných pacientů je schopna způsobovat hluboké a diseminované infekce. Vytváří biofilmy.

Na Sabouraudově agaru rostou hladké lesklé a bílé až krémové kolonie (Obr. 7). Nevytváří hyfy, pseudohyfy ani chlamydospory. Kvasinkové buňky mají vejčitý tvar (Obr. 8) (Mycology Adelaide 2015 [online]; Leading international fungal education [online]).

Obrázek 7: Kolonie *Candida glabrata* na Mueller-Hinton agaru s 2% glukózy a metylenovou modří

Zdroj: *Candida glabrata*. In: *Eolabs* [online]. Eo labs Microbiological Culture Media. [citováno 29. 2. 2016]. Dostupné z: http://www.eolabs.com/mueller-hinton-agar-glucose-methylene-blue.html#



Obrázek 8: Mikroskopický obraz *Candida glabrata*

Zdroj: *Candida glabrata*. In: *Biota Taiwanica* [online]. Taibif. [citováno 7. 3. 2016]. Dostupné z: http://taibif.tw/nbrpp/images/funguspic/funguspreview/Candida%20glabrata.jpg

C. glabrata si snadno tvoří sekundární rezistenci k azolovým antimykotikům. Rozvoj rezistence vede k vysoké nemocnosti a úmrtnosti. V souvislosti s rezistencí a virulentními faktory (tvorba biofilmu, adheziny, enzymy - fosfolipázy, proteázy, lipázy a hemolyziny) došlo v posledních letech k nárůstu infekcí, kde původcem je právě *C. glabrata* (Rodrigues a kol. 2014).

7.2.2 Rod *Trichosporon*

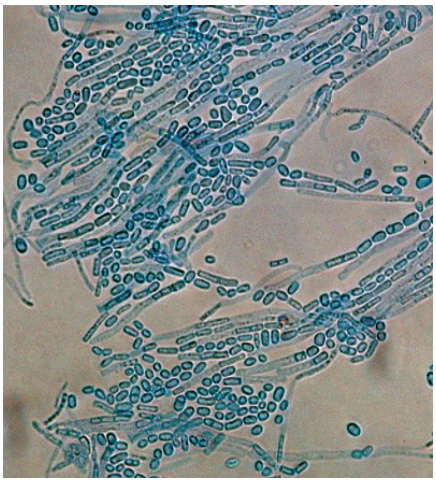
Rod *Trichosporon* patří mezi kvasinkovité organizmy. V přírodě jsou velice rozšířené, běžně jsou izolovány z půdy a z jiných zdrojů životního prostředí. Jsou komenzálem v lidském gastrointestinálním a dýchacím traktu. Druhy z rodu *Trichosporon* mají různé virulentní faktory. Produkují enzymy lipázy, proteázy a fosfolipázy. Konkrétní přínos jednotlivých enzymů ke vzniku nemoci není objasněn. Rod *Trichosporon* je schopen tvořit biofilm, který usnadňuje kolonizaci zavedených zařízení (např. katétry), umožňuje adherenci k protetickým materiálům a snižuje expozici a náchylnost houby k antimykotikům. Infekce způsobené touto houbou jsou vzácné a to i u pacientů s oslabenou obranyschopností. Mezi hlavní rizikové faktory onemocnění patří: užívání kortikosteroidů, nádory, AIDS, intravaskulární katétry a protetické srdeční chlopně (Klaban 2005; Maves 2015).

7.2.2.1 Trichosporon asahii

Dříve byl tento druh znám pod názvem *Trichosporon beigelii*, na počátku 1990 byl *T. beigelii* rozdělen do několika druhů, včetně *T. asahii*. Nyní je považován za důležitého oportunního patogena (Heslop a kol. 2011).

Je původcem tzv. bílé piedry, což je onemocnění, u kterého vznikají na vlasech uzlíky tvořené buňkami *T. asahii*. Toho onemocnění se vyskytuje v exotických oblastech, především v tropech a subtropech a nemá nijak vážný klinický průběh. Vážnější průběh bývá u pacientů s narušenou obranyschopností (neutropenie) a u pacientů se závažným onemocněním (např. u pacientů s DM). Invazivní trichosporonóza může vzniknout i u pacientů s rozsáhlými popáleninami. Existuje několik případů chronické meningitidy a mozkového abscesu v souvislosti s *T. asahii*. Pro tento druh je typický i častý výskyt rezistence. Především vůči amfotericinu B a v menší míře vůči azolům. Nicméně, novější triazoly (např. vorikonazol, posakonazol a ravukonazol) prokázaly *in vitro* velmi dobrou účinnost.

Pro *T. asahii* je charakteristická tvorba pravých hyf, pseudohyf, arthrokonidií a blastokonidií (Obr. 9). Na agaru roste v podobě plochých kolonií s plstnatým povrchem, jak je vidět na obrázku č. 10 (Heslop a kol. 2011; Votava a kol. 2010).



Obrázek 9: Mikroskopický vzhled *Trichosporon asahii*

Zdroj: *Trichosporon asahii*. In: *Mycology Adelaide* [online]. The University of Adelaide. [citováno 29. 2. 2016]. Dostupné z: http://www.mycology.adelaide.edu.au/images/trichosporon2.gif

Obrázek 10: Kolonie *Trichosporon asahii* na Sabouraudově glukózovém agaru

Zdroj: *Trichosporon asahii*. In: *Mycology Adelaide* [online]. The University of Adelaide. [citováno 29. 2. 2016]. Dostupné z: http://www.mycology.adelaide.edu.au/images/Trichoasahii.gif

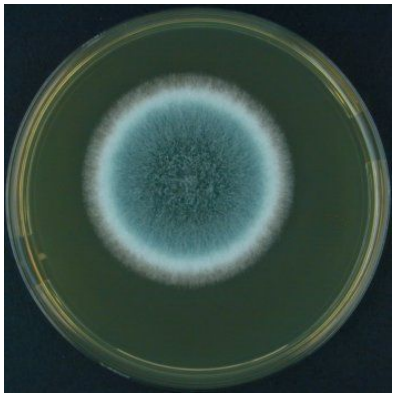
7.2.3 Rod *Aspergillus*

Název *Aspergillus* je odvozen z latinského *aspergo* = kropím (odtud český název tohoto rodu Kropidlák). Je to rod plísní, jehož druhy se vyskytují v půdě, ve vodě, v ovzduší a může se vyskytovat, jako kontaminanty v potravinách. Tento rod zahrnuje asi 150 druhů a je rozšířen celosvětově. Častější výskyt je v tropických a subtropických oblastech. Nejčastějšími původci mykóz z tohoto rodu jsou *A. fumigatus*, *A. flavus* a *A. niger* (Klaban 2005; Bednář a kol. 1996; Votava a kol. 2003).

7.2.3.1 Aspergillus fumigatus

Název této vláknité houby pochází z latinského slova *fumigatus* = kouřový. *A. fumigatus* je houba s celosvětovým výskytem. V přírodě ji můžeme nalézt téměř všude, od travnatých porostů až po hornaté oblasti. Dále ji můžeme nalézt v kompostu, ptačím trusu, v tabáku a v potravinách (např. brambory). V závislosti na kyslíku mluvíme o vysoce aerobní houbě. *A. fumigatus* je schopen růst i při teplotách 50°C, proto jej řadíme k termofilním a termotolerantním mikroorganizmům (Klaban 2005; Leading international fungal education [online]).

Na Sabouraudově agaru jsou kolonie nízké, sametové a mají zelenomodrou barvu, okraje jsou bezbarvé (Obr. 11). Spodní strana kolonií má světle žlutou barvu. Při pozorování pod mikroskopem jsou vidět vlákna, která mají na konci měchýřkovitý útvar, ze kterého vyrůstají buňky oválného tvaru nesoucí řetízky konidií. Konidie mají kulatý tvar a jsou ostnité. Hyfy jsou septované a větví se v ostrých úhlech (Obr. 12) (Klaban 2005; Votava a kol. 2010).



Obrázek 11: Kolonie *Aspergillus fumigatus*

Zdroj: *Aspergillus fumigatus*. In: *Microatlas* [online]. University of Copenhagen. [citováno 29. 2. 2016]. Dostupné z: http://atlas.sund.ku.dk/microatlas/veterinary/fungus/Aspergillus_fumigatus/aspergillusfumigatus.jpg

Obrázek 12: Mikromorfologie *Aspergillus fumigatus*

Zdroj: Aspergillus fumigatus. In: *Project life competition* [online]. Leading international fungal education. [citováno 29. 2. 2016]. Dostupné z: http://projectlifecompetition.org/images/uploads/resources_gallery/Aspergillus_fumigatus.jpg

Infekce způsobená určitým druhem *Aspergillus* se nazývá aspergilóza. Infekce je často omezena na plíce, v závažnějších případech se infekce může šířit dál po celém těle. Nejzávažnější z onemocnění způsobených aspergily je tzv. invazivní aspergilóza. Postihuje pacienty s těžce postiženým imunitním systémem, např. pacienty s hematoonkologickými malignitami (leukémie), neutropenií, pacienty po transplantaci orgánů nebo po transplantaci krvetvorných kmenových buněk, pacienty s imunodeficiencemi (např. chronická granulomatózní nemoc) a HIV. Také se může vyskytnout u pacientů, kterým se preventivně podávají dlouhodobě kortikosteroidy, např. jako prevence vzniku reakce štěpu proti hostiteli u pacientů po transplantaci. Kromě toho produkuje celou řadu toxických látek, např. fumigaklavin A, B, C, D, spinulosin a tremorgenní mykotoxiny (Leading international fungal education [online]; Klaban 2005; Dagenais a Keller 2009).

7.2.4 Rod *Absidia*

Tyto plísně patří do třídy *Zygomycetes*. Vyskytují se hojně v zevním prostředí, především v rozkládající se organické hmotě. Jsou téměř nepatogenní, infekce vyvolávají ojediněle a to zejména u osob s hematoonkologickým onemocněním. Plísně z tohoto rodu jsou častou kontaminantou klinického materiálu (Votava a kol. 2010).

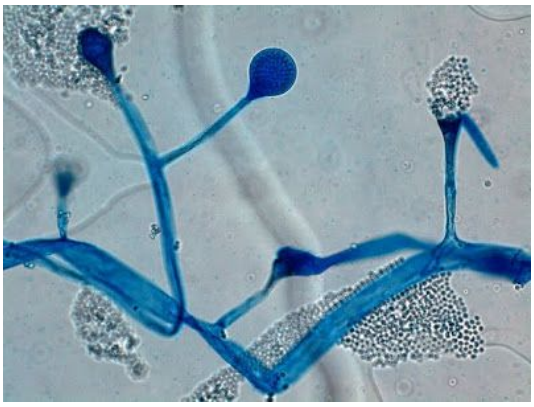
7.2.4.1 Absidia corymbifera

S touto plísní se můžeme setkat i pod názvem *Lichthemia corymbifera*. *A. corymbifera* se vyskytuje celosvětově a jejím typickým místem výskytu je půda a rozkládající se zbytky potravin a rostlin. Je to lidský patogen, který způsobuje plicní, rhinocerebrální infekce, infekce CNS a kožní infekce. Mortalita na rhinocerebrální, CNS a plicní infekce je nepřiměřeně vysoká, může přesahovat až 80 %. Týká se to především pacientů trpících hematoonkologickými malignitami nebo pacientů po transplantaci kostní dřeně. Je také často spojována s nemocemi zvířat (Mycology Adelaide 2015 [online]; Paterson a kol. 2000).

Kolonie rostou velice rychle, mají bílou barvu, která se postupně s časem mění na šedou. Kolonie mohou být vysoké až 1,5 cm (Obr. 13). Pod mikroskopem (Obr. 14) jsou viditelné hyalinní až slabě pigmentované sporangiofory, mohou být jednoduché nebo větvené a vycházejí z vrcholku stolonů (obloukovité ohnuté hyfy). K přichycení stolonů k podkladu slouží rhizoidy. Sporangia jsou malá a mají hruškovitý tvar s charakteristickou kuželovitou kolumelou (hlavice). Sporangiospory mají kulatý až podlouhlý a elipsoidní tvar, jsou hyalinní až světle šedé barvy a mají hladké stěny (Votava a kol. 2010; Mycology Adelaide 2015 [online]).

Obrázek 13: Kolonie *Absidia corymbifera*

Zdroj: *Absidia corymbifera*. In: *Thunderhouse* [online]. Fun with Microbiology. [citováno 29. 2. 2016]. Dostupné z: http://2.bp.blogspot.com/--U8oDQ77Lvk/T0e8x3JZYXI/AAAAAAAAG8s/7lTfiNob22s/s400/01-%2BAbsidia%2B%2528Front%2529.jpg



Obrázek 14: Mikromorfologie *Absidia corymbifera*

Zdroj: *Absidia corymbifera*. In: *Thunderhouse* [online]. Fun with Microbiology. [citováno 29. 2. 2016]. Dostupné z: http://4.bp.blogspot.com/-0GPN-fw-zq8/T0fF1lqw5pI/AAAAAAAAG-8/sL6-nLC15B0/s1600/Absidia%2B11.jpg

7.2.5 Rod *Trichophyton*

Rod *Trichophyton* patří do skupiny hub nazývající se dermatofyta. Mezi dermatofyta patří tři rody: *Trichophyton*, *Epidemophyton* a *Microsporum*. Jsou to tzv. keratinofilní houby. Mají vysokou afinitu ke keratinizovaným tkáním (kůže a její adnexa). Způsobují povrchové infekce kůže, vlasů, vousů a chlupů. Onemocnění nejsou závažná, ale jejich léčba je dlouhodobá a většinou lokální. Onemocnění způsobené dermatofyty se nazývá *tinea* (Votava a kol. 2010).

7.2.5.1 Trichoptyton mentagrophytes

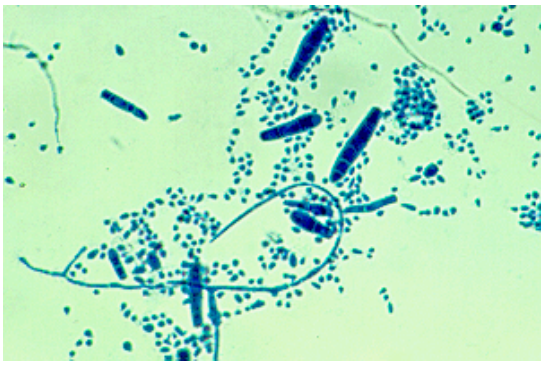
Jedná se o jednoho z nejčastějších původců dermatofytóz v České republice. *T. mentagrophytes* je zoofilní druh, vyskytuje se celosvětově a má celou řadu zvířecích hostitelů (myši, morčata, klokany, kočky, koně, ovce a králíky). Způsobuje hlavně mykózy kůže, vousů a interdigitální infekce. Tyto infekce postihují především venkovské pracovníky. V případě infekce vlasů a chlupů způsobuje infekci zvanou *ectothrix* (Bednář a kol. 1996; Votava a kol. 2010; Mycology Adelaide 2015 [online]).

Kolonie jsou na Sabouraudově agaru obvykle ploché a bílé až krémové barvy. Může mít práškový nebo až zrnitý povrch. Spodní strana je obvykle žlutohnědá až červenohnědá (Obr. 15). Mikroskopicky (Obr. 16) jsou vidět četné jednobuněčné konidie, které jsou často v hustých skupinkách. Mikrokonidie jsou sklovité, mají hladkou stěnu a převážně kulovitý, oválný a někdy až hruškovitý tvar. Hyfy jsou

spirálovité a mají hladkou stěnu. Makrokonidie jsou mnohobuněčné a mají doutníkovitý tvar (Mycology Adelaide 2015 [online]; Votava a kol. 2010).

Obrázek 15: Makroskopický vzhled *Trichophyton mentagrophytes*

Zdroj: Trichophyton mentagrophytes. In: *Mycology Adelaide* [online]. The University of Adelaide. [citováno 29. 2. 2016]. Dostupné z: http://www.mycology.adelaide.edu.au/images/ment2.gif



Obrázek 16: Mikroskopický vzhled *Trichophyton mentagrophytes*

Zdroj: Trichophyton mentagrophytes. In: *Mycology Adelaide* [online]. The University of Adelaide. [citováno 29. 2. 2016]. Dostupné z: http://www.mycology.adelaide.edu.au/images/ment3.gif

T. mentagrophytes je rychle rostoucí druh dermatofyta. U tohoto dermatofyta rozlišujeme několik variet. Patří sem například *T. mentagrophytes* var. *granulosum,* jehož kolonie vypadají jako posypané prachem a mají okrovou spodinu. Kolonie *T. mentagrophytes* var. *mentagrophytes* jsou bílé až nažloutlé, vláknité a jemně granulované. Poslední varietou je *T. mentagrophytes* var. *interdigitale.* Kolonie má chmýřité, jsou bílé barvy a jejich spodek je žlutý až hnědožlutý. Tato varieta je u člověka nejčastější (Votava a kol. 2010; Votava a kol. 2003).

7.3 Antimykotika

Antimykotika (antifungální antibiotika) jsou léky, které se používají k terapii mykotických infekcí vyvolaných patogenními houbami. Mohou být jak mikrobiálního původu, tak syntetické. Výzkum antifungálních antibiotik významně zaostává za výzkumem antibakteriálních antibiotik. Je to díky tomu, že buňky hub jsou eukaryotní. Je složité najít účinné antimykotikum, které by zároveň nepoškozovalo i buňku hostitele – člověka. Antimykotika rozdělujeme podle jejich specifity na specifická a nespecifická. Mezi nespecifická antimykotika patří účinná dezinficiencia a antiseptika. Specifická jsou antibiotika a chemoterapeutika. Dále můžeme antimykotika rozdělit podle jejich účinku na fungicidní, fungistatická a na antimykotika působící antibiotickým mechanizmem. Převážná část antimykotik má široké spektrum účinku a některá z nich působí i určité bakterie. Některá antimykotika mohou působit pouze na konkrétní agens, např. griseofulvin na dermatofyty (Buchta 1998; Diamantová 2003; Horák 2011).

7.3.1 Polyenová antimykotika

Polyenová antimykotika jsou produktem půdních vláknitých bakterií rodu *Streptomyces*. Jedná od antimykotika přirozeného původu. Polyenová antimykotika jsou jedny z nejstarších specifických antimykotik. Na trh byla uvedena na konci 50. let minulého století. Mechanizmus účinku těchto antimykotik spočívá ve vazbě molekuly antimykotika na ergosterol plazmatické membrány houby. Touto vazbou se naruší semipermeabilita membrány a dojde k ireverzibilním ztrátám iontů a nízkomolekulárních látek, což má za následek smrt buňky (Horák 2011; Buchta a kol. 2008).

Polyenová antimykotika mají velice široké spektrum účinku. Jejich spektrum zahrnuje všechny významné patogenní houby a některé prvoky (*Naegleria* spp. a *Leishmania* spp.). Do této skupiny antimykotik patří tři léčiva: nystatin, natamycin a amfotericin B (Buchta a kol. 2008).

Amfotericin B je makrolidové polyenové antimykotikum, které bylo více jak 50 let považováno za lék volby u systémových mykotických onemocnění. Přestože má tento lék velice dobrou účinnost, v současné době se od jeho systémového

používání opouští a to z důvodu jeho vysoké toxicity. Akutní toxicita je způsobena velkým uvolněním eikosanoidů, je provázena slabostí, horečkou, třesavkou a hypokalémií. Co se týká chronické toxicity, působí amfotericin B nefrotoxicky. Pro snížení toxicity byly vyvinuty lipozomální lékové formy. Tyto formy mají jinou farmakokinetiku, zabraňují vzniku vysokých nárazových hladin. Jejich nevýhodou je velmi vysoká cena. Má nejširší spektrum účinku a používá se k terapii infekcí způsobených kandidami, kryptokoky, aspergily, mukory*, Blastomyces dermatitidis, Coccidioides immitis, Paracoccidioides brasiliensis, Histoplasma capsulatum, Sporothrix* spp. a parazity *Leishmania* spp. nebo *Plasmodium falciparum*. Kromě léčby život ohrožujících systémových mykóz se používá amfotericin B jako profylaxe u pacientů s narušeným imunitním systémem (neutropenie, imunosuprese) (Buchta 1998; Horák 2011; Lincová a kol. 2007).

Nystatin je lokální antimykotikum s fungistatickým až fungicidním účinkem. Je produktem kmene *Streptomyces noursei*. Toto antimykotikum je účinné na kvasinkové organizmy z rodů *Candida, Rhodotorula, Torulopsis* a *Trichosporon*. Kromě toho má velice dobrý účinek na rod *Aspergillus*. Používá se při léčbě povrchových kandidóz a jako doplňující lék při léčbě vaginální kandidózy.

Natamycin je dalším lokálním antimykotikem. Pochází z aktinomycety *Streptomyces natalensis*. Má široké spektrum účinku, ale pro terapii se používá jen na kandidy a na *Trichomonas vaginalis*. Používá se při léčbě kandidózy ústních koutků, kandidové vulvitidy, kandidové balanitidy, *erosio interdigitalis*, *intertrigo candidomycetica*, kandidové paronychie a onychomykózy (Lincová a kol. 2007).

7.3.2 Azolová antimykotika

Tato antimykotika začala být používána v 60. letech. Dle chemické struktury je můžeme rozdělit do dvou skupin. Na azolová antimykotika, která mají strukturu založenou na imidazolu (ketokonazol, flutrimazol, mikonazol, klotrimazol, atd.) a na preparáty odvozené od triazolu (itrakonazol, flukonazol, vorikonazol, posakonazol, ravukonazol). Imidazolová antimykotika mají v heterocyklu dva uhlíky a triazolová mají uhlíky v heterocyklu tři. Triazolová antimykotika jsou novější. Imidazoly se používají především lokálně a triazoly se používají většinou jako systémová antimykotika.

Mechanizmus působení těchto antimykotik je založen na inhibici biochemické kaskády syntézy ergosterolu. Do biochemické kaskády zasahují tím, že inhibují enzym lanosteroldemetylázu. Spektrum těchto antifungálních antibiotik je velice široké. Zahrnuje *Candida* spp., *Blastomyces* spp., *Coccidioides immitis*, *Histoplasma capsulatum, Paracoccidioides brasiliensis, Phialophora* spp., *Microsporum* spp., *Epidermophyton* spp. a *Trichophyton* spp. Kromě toho je lze použít na *Plasmodium falciparum*, *Leishmania* spp., *Trypanosoma cruzii* a byla zjištěna i účinnost na některé grampozitivní bakterie a enterokoky (Buchta a kol. 2008; Horák 2011; Lincová a kol. 2007).

Azoly jsou syntetické látky. Mohou se používat lokálně nebo jako systémová léčiva. K systémovým azolům patří triazoly – flukonazol a itrakonazol. Lokální azolová antimykotika jsou skupinou látek s podobnými vlastnostmi a podobnými terapeutickými indikacemi. Jsou dodávána v různých topických lékových formách. Liší se mezi sebou v nosiči, který ovlivňuje jejich některé vlastnosti. Patří sem například mikonazol, flutrimazol, bifonazol, ekonazol, klotrimazol, fentikonazol, tiokonazol, oxikonazol a terkonazol (Lincová a kol. 2007; Buchta 1998; Horák 2011).

Flukonazol je novějším parenterálním nebo perorálním preparátem. Má ze všech azolových antimykotik nejméně nežádoucích účinků. Jeho spektrum účinku zahrnuje *Candida* spp., *Cryptococcus* spp., dermatofyta, *Blastomyces dermatitidis*, *Coccidioides immitis*, *Histoplasma capsulatum* a další. Flukonazol není účinný při léčbě aspergilózy a zygomykózy, neboť tyto mikromycety jsou k němu přirozeně rezistentní. Kromě k terapii se flukonazol používá i k primární a sekundární profylaxi.

Itrakonazol je dalším systémovým antimykotikem. Používá je jak parenterálně, tak perorálně. Antimikrobiální spektrum má podobné jako flukonazol, ale je navíc účinný na aspergily. Vorikonazol je novějším preparátem, podává se perorálně i parenterálně a působí na většinu kandid a na aspergily. Je to lék volby u závažných aspergilových infekcí a u kandidových infekcí rezistentních na flukonazol.

Klotrimazol má fungistatický až fungicidní účinek a používá se lokálně především při léčbě dermatofytóz, kandidóz, keratomykóz, interdigitálních mykóz, paronychii, balanitidy a vulvitidy. Tiokonazol, oxikonazol a terkonazol se používají k léčbě kandidových vulvovaginitid.

Ekonazol je dermatologikum. Jeho účinek je fungistatický až fungicidní. Indikován je u dermatofytóz, kandidóz, u infekcí vyvolaných fakultativně patogenními houbami a plísněmi a u smíšených bakteriálních a mykotických infekcí kůže. Nežádoucí účinky jsou mírné, u citlivých osob se vyskytuje v místě použití alergická reakce (Lincová a kol. 2007).

7.3.3 Echinokandiny

Tato antimykotika se širokým spektrem účinku byla uvedena na trh na počátku 21. století. Mechanizmus účinku těchto antimykotik se významně liší od ostatních. Tato antimykotika působí na buněčnou stěnu, zabraňují syntéze β-(1,3)-D-glukanu. Jedná se o skupinu léčiv, která se používají pouze pro léčbu systémových mykotických onemocnění, aplikace je parenterální. Jsou to cyklické lipopeptidy s molekulovou hmotností až 1200 kD. Po chemické stránce mluvíme o cyklických hexapeptidech s rozdílným N-acyl lipidovým řetězcem. Využívají se především pro terapii kandidových a aspergilových infekcí a mají akceptovatelnou toxicitu (Haber 2008; Horák 2011).

V současné době máme z této skupiny antimykotik k dispozici tři účinné látky: kaspofungin, anidulafungin a mikafungin. Všechny jsou polysyntetického původu a jsou vyrobeny z produktů kvašení mikroskopických hub *Glarea lozoyensis* (kaspofungin), *Coleophama empedri* (mikafungin) a *Aspergillus nidulans* (anidulafungin).

Spektrum účinku těchto antimykotik tvoří kandidy (včetně kandid rezistentních na triazoly), aspergily a cystická forma *Pneumocystis jirovecii*. Na kandidy mají účinek fungicidní a na aspergily fungistatický. Echinokandiny nejsou účinné proti *Cryptococcus neoformans* a zygomycetám, jelikož ve své buněčné stěně neobsahují β-(1,3)-D-glukan. Důležitou vlastností echinokandinů je jejich schopnost zasahovat do tvorby biofilmu (tím brání kolonizaci zavedených katétrů, chlopní a jiných umělých povrchů). Jsou indikovány při léčbě invazivních kandidóz, kandidémií a invazivních aspergilóz (Haber 2008).

7.3.4 Allylaminy

Allylaminová antimykotika jsou látky připravované synteticky. Do této skupiny patří naftifin a terbinafin. Jejich mechanizmus účinku spočívá v inhibici syntézy ergosterolu. Do této biochemické kaskády zasahují v časnější fázi oproti azolovým antimykotikům. Inhibice spočívá ve specifické vazbě na skvalen - epoxidázu. Allylaminy jsou léčiva, která mohou být podávána lokálně i systémově např. terbinafin nebo pouze lokálně např. naftifin. Jako systémové antimykotikum je terbinafin indikován pouze u superficiálních mykóz, nikoliv u systémových (Buchta a Doležal 2006; Horák 2011).

Tato antimykotika jsou indikována především u infekcí způsobených dermatofyty (zejména u onychomykóz). Fungicidně působí na spoustu druhů dermatofytů z rodu *Trichoptyton* a fungistaticky na zástupce z rodu *Microsporum*. Kromě toho mohou působit i na kvasinky a vláknité houby. S nežádoucími účinky allylaminů se setká jen malá část pacientů. Patří sem alergie, vzácně jaterní toxicita, neutropenie až pancytopenie, toxická epidermální nekrolýza a vzácný Stevens - Johnsonův syndrom (Buchta a kol. 2008; Horák 2011).

Naftifin je antimykotikum se širokým spektrem účinku, pouze pro lokální použití. Antimikrobiální spektrum zahrnuje všechny rody dermatofyt a kvasinky. Na dermatofyty působí fungicidně a na kvasinky fungistaticky. Je indikován při mykotických infekcích kůže a nehtů, především u *tinea pedis*, *tinea cruris* a *tinea corporis* (Kuklová 2015).

Terbinafin je systémově působící antimykotikum. Spektrum účinku zahrnuje dermatofyty, kvasinky i plísně. Působí fungistaticky nebo fungicidně. Tento efekt závisí na původci infekce. Je indikován především v terapii *tinea pedis* a onychomykóz (Hendrychová a Malý 2011).

7.3.5 Antimetabolity

Zástupcem této skupiny antimykotik je flucytosin. Z chemického hlediska je flucytosin fluorovaná pyrimidinová báze – 5 – fluorocytosin. Princip účinku spočívá v navázání 5 – fluorocytosinu do ribozomální a transferinové RNA, tím se zablokuje

proteosyntéza a současně dochází k inhibici enzymu thymidilát syntetázy, což vede k inhibici syntézy DNA. Flucytosin působí fungistaticky. Antimikrobiální spektrum tvoří kandidy, kryptokoky a původy chromomykóz. Vznik sekundární rezistence k flucytosinu je poměrně častým jevem. Toto antimykotikum není v České republice registrováno (Rozsypal 2008; Buchta a kol. 2008).

7.3.6 Ostatní antimykotika

Do této skupiny antimykotik řadíme morfoliny, griseofulvin, thiokarbamátové deriváty a ciklopirox (Buchta a kol. 2008).

Morfoliny jsou skupinou antimykotik s jedním zástupcem- amorolfin. Amorolfin je širokospektré antimykotikum působící především fungistaticky. Mechanizmus účinku spočívá jako u jiných antimykotik v narušení syntézy ergosterolu. Spektrum antimykotického účinku zahrnuje dermatofyty, kvasinky, dimorfní houby a podobně, z bakterií je účinný na aktinomycety. Amorolfin se používá pouze lokálně při léčbě onychomykóz. Je vhodné jej kombinovat se systémovými antimykotiky nebo používat jako doplňkovou léčbu (Buchta a kol. 2008; Horák 2011).

Griseofulvin je přirozené antimykotikum, jež je produktem *Penicillium griseofulvum*, *Penicillium janczewski* a dalších. Spektrum jeho antimikrobiálního účinku tvoří pouze dermatofyty – rody *Trichophyton*, *Epidermophyton* a *Microsporum*. Působí fungistaticky. Jeho účinek spočívá v zásahu do tvorby mitotického vřeténka, ovlivňuje funkci intracelulárních mikrotubulů. Pro jeho indikaci je nutný mykologický průkaz dermatofyt. V současné době je indikován především u dětí při léčbě *tinea capitis*, způsobenou mikrospory. Postupně je nahrazován preparáty se širším spektrem účinku (Buchta a kol. 2008; Rozsypal 2008).

Tolnaftát a tolciklát jsou zástupci thiokarbamátových antimykotik. Používají se pouze lokálně a mají poměrně široké spektrum účinku. Opět se jedná o další inhibitory syntézy ergosterolu. Indikovány jsou především u lehčích a nekomplikovaných forem *tinea pedis* (Buchta a kol. 2008).

Ciklopirox je syntetické a širokospektré antimykotikum. Jeho mechanizmus účinku spočívá ve změně permeability membrány. Narušuje transport proteinů do buňky (Doležal a Buchta 2006).

7.3.7 Nespecifická antimykotika

Mechanizmus působení těchto antimykotik je obecný, nepůsobí přímo v nějakém konkrétním místě metabolické dráhy u hub. Nespecifická antimykotika obvykle způsobují denaturaci bílkovin nebo mění propustnost buněčné membrány a působí fungistaticky. Všechna antimykotika uvedená výše působila v nějakém konkrétním místě metabolické dráhy, proto jsou specifická.

K nespecifickým antimykotikům patří tyto antifungální látky: undecylenová kyselina, benzidamin, tetraboritan sodný, chlorhexidin, fusafungin a další (Hendrychová a Malý 2011).

7.4 Laboratorní diagnostika mykotických infekcí

Invazivní mykotické infekce se v poslední době stávají jednou z nejhlavnějších příčin morbidity a mortality u lidí s oslabenou imunitou. Významnými rizikovými faktory pro mykotická onemocnění jsou transplantace orgánů, agresivní chemoterapie a imunosupresivní léčba. Pro úspěšnou léčbu těchto infekcí hraje zásadní roli včasná diagnóza a rychlá terapie. Běžné metody, které se používají pro diagnostiku mykotických infekcí, jsou pomalé a postrádají citlivost. V poslední době došlo k významným pokrokům v diagnostice mykotických onemocnění (Alexander a Pfaller 2006).

Metody laboratorní diagnostiky v mykologii využívají hlavně přímého průkazu patogenní houby v klinickém vzorku. Využívá se hlavně mikroskopie spolu s různými kultivačními technikami. Kromě diagnostiky tyto metody významně pomáhají v predikci možného terapeutického výsledku (na základě stanovení citlivosti k antimykotikům *in vitro*) a v epidemiologických studiích. Úspěšná laboratorní diagnostika významně závisí na správném odběru klinického materiálu a na správném výběru diagnostických metod. Neexistuje žádný jednotný univerzální postup diagnostiky. Určení přesné

diagnózy vyžaduje kombinaci různých mikrobiologických a histopatologických vyšetření (Mulla a kol. 2015).

7.4.1 Odběr klinického materiálu

Samotný odběr hraje významnou roli v laboratorní diagnostice. Při odběru klinického materiálu je důležité, aby bylo dodržováno několik zásad. Vždy je důležité správně zvolit typ klinického materiálu a způsob odběru. Odběr volíme tak, abychom zachytili potřebné množství mykotického agens a zároveň abychom zamezili kontaminaci klinického vzorku běžnou mikroflórou. Materiál je nutné odebírat před podáním antimykotik. Je to z důvodu, že by antimykotika mohla mít vliv na vitalitu původce.

V mykologické laboratoři se vyšetřují různé druhy klinického materiálu – výtěry na tamponech, sputum, krev, vzorky z horních cest dýchacích, moč, hnis, punktáty, šupinky kůže nebo nehtů, vlasy a chlupy. Většina materiálů se odebírá stejně jako pro bakteriologická vyšetření, svá specifika mají pouze odběry pro stanovení původců dermatomykóz.

Odběr klinického materiálu z mokvavých lézí, ran a slizničních mykóz se provádí stěrem za použití tamponu. V případě odběru materiálu z ran lze ještě použít otiskovou metodu, kdy je nejvhodnější použít Sabouraudův agar. V případě invazivních a orgánových mykóz se odebírá tkáň a ta se poté vkládá do vhodného transportního media. Odběry krve, moče, likvoru, sputa, bronchoalveolární laváže, punktátů, hnisu apod. se provádí stejně jako v bakteriologii. Vždy je nutné provádět odběr za aseptických podmínek do sterilních nádob, používat vhodná media pro transport a za pokojové teploty zajistit rychlý transport do laboratoře.

V případě odběru kožních šupin je nutné, aby byl materiál odebírán z okrajových částí ložiska. Je to z důvodu, že v oblasti přechodu zdravé a postižené tkáně je největší šance záchytu původce. Kůže by měla být před odběrem dekontaminována 70% alkoholem. Alkohol slouží k odstranění povrchové bakteriální mikroflóry. Odběr klinického materiálu se provádí za použití sterilního skalpelu nebo ostré lžičky do otevřené sterilní odběrové nádoby. Při nedostatečném množství materiálu se provádí stěr zvlhčeným tamponem (zvlhčen ve fyziologickém roztoku).

V případě, že byla používána lokální antimykotika, je nutné počkat a odběr provést až po 10 dnech.

Vlasy a chlupy je nutné vždy pro diagnostiku odebrat i s vlasovým folikulem. Nejdůležitější částí vlasu pro diagnostiku je část vlasu s folikulem do délky asi 1 cm od pokožky. Vlasy se odebírají po dekontaminaci ložiska pomocí sterilní pinzety a nejvhodnější je odebrat krátké pahýly vlasů z ložiska.

Odběr materiálu z nehtů se provádí seškrabem nehtu ze spodní strany. Nehtové šupinky se odebírají do sterilní odběrové nádoby. Jako při odběrech jiného materiálu, je i tady nutné provést dekontaminaci nehtu 70% alkoholem (Votava a kol. 2010).

7.4.2 Mikroskopické vyšetřovací techniky

Mikroskopie je v mnoha aspektech v mykologii nezbytná. Umožňuje detekci hub přímo v klinických vzorcích, dále jsme schopni na základě morfologických vlastností houbu identifikovat a slouží pro potvrzení, že narostlá kultura není kontaminanta ze vzduchu, ale původce infekčního onemocnění (např. *Aspergillus*) (Leading international fungal education [online]).

Mikroskopické vyšetření klinického materiálu je základní metodou laboratorní diagnostiky mykotických onemocnění. Ve většině případů je právě mikroskopie první technikou, která se při vyšetření vzorku používá. Je to nejrychlejší metoda, velice užitečná a finančně dobře dostupná. V čase kratším než je 1 hodina jsme schopni zjistit, zda je v klinickém materiálu přítomno mykotické agens a jestli se jedná o kvasinky nebo plísně. Přímá mikroskopie umožňuje většinou pouze předběžně určit diagnózu. Někdy jsme schopni mikroskopií určit přímo etiologii, např. u infekcí způsobených *Histoplasma capsulatum*, *Blastomyces dermatitidis*, *Coccidioides immitis*, *Pneumocystis jiroveci* nebo *Penicillium marneffei* (Alexander a Pfaller 2006; Votava a kol. 2010).

Jedním z preparátů používaným v mykologické laboratoři, je preparát louhový. Má velice jednoduchou přípravu. Vyšetřovaný materiál (nejčastěji šupiny kůže, nehtů, vlasy a chlupy) se dá na podložní sklíčko do kapky 10 – 40% KOH (lze použít i NaOH). Poté se materiál přikryje krycím sklíčkem a KOH se nechá působit 30 – 60 minut. KOH je používán díky jeho schopnosti projasnit tkáně. Díky projasnění jsme pak schopni

snáze rozeznat části mykotického agens ve vzorku (Votava a kol. 2010; Votava a kol. 2000).

Další technikou je příprava preparátu s inkoustem Parker (možno použít i jiná podobná barviva). Většinou se používá 20% roztok KOH s 10% inkoustu Parker. Inkoust má schopnost probarvit části mykotického agens, a tím je umožňuje snáze rozlišit od ostatních struktur. Díky změnám ve složení tohoto inkoustu se dnes již nepoužívá a je nahrazen jinými barvivy, např. MykoInk a chlorazolová čerň.

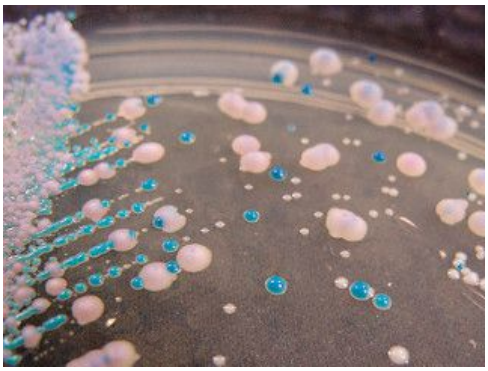
Pro vyšetření klinického materiálu v mykologické laboratoři se využívají i bakteriologické a histologické barvící techniky. Využívá se především barvení dle Grama a Giemsy. Díky těmto barvením jsme snáze schopni v tekutých materiálech rozlišit především kvasinkové organizmy, ty se barví jako grampozitivní bakterie. Tato barvení umožňují v preparátu lépe zviditelnit i hyfy. Materiál sekční a biopsií odebraný se může barvit např. barvením PAS, hematoxylinem – eosinem nebo stříbřením dle Groccota a Gomoriho. Bioptický materiál je používán při diagnostice invazivních mykóz (Votava a kol. 2010; Votava a kol. 2000; Microbiology book 2014[online]).

Pro průkaz mykotického agens v klinickém materiálu jsou využívána i fluorescenční barviva. Výhoda těchto technik je, že se barviva specificky váží na struktury v buněčné stěně hub (chitin). Nevýhodou je, že nejsme schopni určit konkrétní druh. Příkladem těchto fluorescenčních barviv je Calcofluor, Blancophor a Rylux. Preparát připravený s fluorescenčními barvivy je nutné prohlížet ve fluorescenčním mikroskopu při vlnové délce 420 nm. Preparát se vytvoří smícháním 0,1% roztoku fluorescenčního barviva s 20% roztokem KOH v poměru 1:1. Do takto vytvořeného roztoku na podložním skle umístíme vyšetřovaný materiál. Po 15 minutách vytvořený preparát přikrytý krycím sklem vyšetřujeme. Ty části, kde se navázala fluorescenční barviva, zeleně září. Přímá fluorescenční mikroskopie může být použita i pro mrtvé mikroorganizmy a na tkáňových řezech (Votava a kol. 2010; Microbiology book 2014[online]).

7.4.3 Kultivační techniky

Další metodou přímé diagnostiky je kultivace. Všechny houby potřebují po správný růst a reprodukci několik specifických prvků, proto je často nutné použít pro kultivaci několik druhů médií. Obecně platí, že čím větší počet naočkovaných půd máme, tím je větší šance záchytu mykotického agens. Je vhodné použít dva typy kultivačních médií. Jedno médium by mělo být neselektivní, mělo by umožňovat růst prakticky všech klinicky významných mykotických agens. Druhé médium by mělo být selektivní, speciálně navržené pro izolaci specifických patogenních hub. Pro optimální kultivaci mykotického agens se používají média s obsahem antimikrobních látek. K potlačení růstu bakterií se z antibiotik k médiu přidávají chloramfenikol, chloramfenikol s gentamycinem nebo gentamycin s ciprofloxacinem. Cykloheximid se přidává do média k potlačení růstu rychle rostoucích mikromycet (např. penicillium). Tato půda se využívá při kultivaci dermatofyt (Tankeshwar 2014 [online]; Leading international fungal education [online]; Mulla a kol. 2015; Votava a kol. 2010).

Nejběžnějším kultivačním médiem v mykologických laboratořích je Sabouraudův agar s 2 – 4 % glukózy (nebo může obsahovat jiný cukr např. maltózu). Sabouraudův agar může být obohacen o thiamin, aneurin nebo může obsahovat antimikrobní látky. Dalšími půdami používanými pro kultivaci hub jsou: sladinkový agar, bramborový agar a krevní agar. Kromě těchto agarů existuje ještě celá řada dalších kultivačních půd. Czapek-Doxův agar je selektivní půda určená pro diagnostiku mikromycet z rodů *Aspergillus, Penicillium, Scopulariopsis*. Další možností jsou chromogenní půdy. Ty slouží k odlišení jednotlivých kmenů kvasinek na základě rozdílné barvy kolonií. Patří sem např. komerčně dodávané půdy Candiselect, CHROMAgar a Candida IDagar (Obr. 17). Pro sledování schopnosti kvasinek tvořit pseudomycelium se využívají nutričně chudá média (např. rýžový nebo kukuřičný agar). Pro rozlišení *Trichophyton rubrum* a *Trichophyton mentagrophytes* se využívá Christensenův agar obsahující ureu a fenolovou modř. (Votava a kol. 2010; Votava a kol. 2000; Mycology Adelaide 2015 [online]).



Obrázek 17: Kvasinky rodu *Candida* na ChromID Candida agaru

Zdroj: Microbiology. In: *Flickr* [online]. Flickr. [citováno 29. 2. 2016]. Dostupné z: https://www.flickr.com/photos/nathanreading/8333684249/in/pool-82661250@N00/

Optimální teplotou kultivace pro většinu klinicky významných hub je 25 – 28 °C. V případě systémové mykózy, kde mohou být původci z rodů *Candida, Aspergillus* nebo *Mucor,* provádíme kultivaci současně při 35±2°C. Při této teplotě se provádí ještě kultivace na krevním agaru, hemokultivace, kultivace při testování citlivosti k antimykotikům *in vitro* a kultivace při podezření na dimorfismus. Kultivace hub je dlouhodobá a závisí na druhu mykotického agens. Je důležité zajistit, aby během kultivace nedocházelo k vysychání. To je zajištěno dostatečnou vlhkostí v termostatu. Naočkované půdy se kontrolují denně. Kolonie mohou být rychle rostoucí, objeví se už mezi 4 – 10 dnem nebo mohou růst pomalu, v tomto případě se objeví až po 3 a více týdnech. Pomalý růst je typický pro dermatofyty a dimorfní houby. Narostlé kolonie se hodnotí jak makroskopicky, tak mikroskopicky. Z makroskopického hlediska sledujeme velikost, barvu, tvar, texturu, profil, okraje kolonií, barvu spodiny kolonií a okolní agar. Mikroskopicky hodnotíme kultury hlavně u vláknitých hub (Jílek a kol. 2002).

7.4.4 Biochemické metody

Biochemická identifikace hub je založena na sledování biochemických vlastností vyšetřovaného kmene (produkce nějakého enzymu). Základními biochemickými testy, které se používají v mykologických laboratořích, jsou auxanogramy a zymogramy (Jílek a kol. 2002).

Název auxanogram pochází z řeckého slova auxanó – rostu a grafein – psát. Existují dva typy auxanogramů – cukerné a dusíkaté. Oba typy auxanogramů fungují na podobném principu. Sleduje se schopnost mikroorganizmu utilizovat různé zdroje

uhlíku (cukry) nebo dusíku (dusičnany) za přístupu kyslíku. Spektrum látek, které mikromycety asimilují, je pro jednotlivé druhy specifické a na základě srovnání s tabulkami jsme schopni přesně určit druh. Auxamogramy se provádí na agarových plotnách. Nejdříve se na ně naočkuje testovaný mikroorganizmus (hustým roztěrem nebo přelitím suspenze) a poté se na plotnu aplikují testované látky (ve formě tablet, disků či ve formě hromádky). Takto připravené půdy se vloží do termostatu a po 48 hodinách se vyhodnocují. Schopnost asimilovat látku se projevuje růstem mikromycet v místě její aplikace (Jílek a kol. 2002; Votava a kol. 2000; Klaban 2005; Hamal a kol. 2010).

Název zymogram pochází z řeckého zymé – kvasnice a gramma – nápis. Pomocí těchto testů identifikujeme kvasinky na základě jejich schopnosti zkvašovat různé cukry bez přístupu kyslíku. Zymogram se provádí ve zkumavkách s cukerným roztokem a činidlem. Takto připravené zkumavky se poté očkují testovaným kmenem a zalijí parafinem. Zkvašování cukru se po 48 hodinové inkubaci projevuje zabarvením a může se vytvořit i plyn. Spektrum zkvašovaných cukrů je pro každý kmen charakteristické (Jílek a kol. 2002; Votava a kol. 2000; Klaban 2005).

Auxanogramy a zymogramy nejsou v klasické podobě komerčně dostupné. Pracovníci laboratoří si je musí sami připravovat. Pro laboratoř je to varianta levnější, ale je pracná a obtížně standardizovatelná. V současné době jsou tyto klasické metody nahrazovány novějšími komerčně dostupnými kity (Hamal a kol. 2010).

Dalším biochemickým testem je ureázový test, který umožňuje identifikaci dermatofyt (*Trichophyton rubrum* a *Trichophyton mentagrophytes)* a kvasinek z rodu *Candida.* Tímto testem se zjišťuje přítomnost enzymu ureázy. Používá se agar obsahující močovinu a fenolovou červeň (Christensenův agar). V přítomnosti enzymu ureázy dochází k uvolnění amoniaku. Amoniak alkalizuje prostředí a dochází ke změně pH. Tato změna je indikována změnou barvy fenolové červeně ze žluté (lehce oranžové) na červenou. Většina izolátů *T. rubrum* má ureázový test negativní a *T. mentagrophytes* pozitivní, nicméně i tak je nutná konfirmace na základě morfologie (Nayak a kol. [online]; Klaban 2005; Votava a kol. 2010).

7.4.5 Molekulárně – biologické metody

V molekulárně biologických metodách došlo v poslední době k velkým pokrokům. V současné době se stávají součástí rutinní diagnostiky. Jsou to metody, které jsou založené na detekci mikroorganizmu na základě nukleových kyselin a oproti metodám klasické diagnostiky mají celou řadu nesporných výhod. Umožňují velice rychlou diagnostiku mikroorganizmů, které bylo dříve obtížné identifikovat běžnými metodami. Diagnostika může být dokončena už během jednoho dne a stačí velice malé množství DNA nebo RNA. K těmto metodám patří klasická PCR (Polymerase Chain Reaction) a její modifikace (nested PCR, multiplex PCR, RT PCR – reverse transcription a real – time PCR), hybridizace (fluorescenční *in situ* hybridizace), DNA sondy a sekvenování DNA (Ansari a kol. 2014 [online]; Votava a kol. 2000).

Polymerázová řetězová reakce (PCR) je jednoduchá enzymatická metoda umožňující amplifikaci určitého úseku DNA. Vše se děje bez přítomnosti živých buněk a v konečné fázi získáváme miliardy kopií úseku DNA, který byl amplifikován. Namnožená DNA se poté detekuje elektroforézou nebo pomocí DNA sond (Klaban 2005; Votava a kol. 2000).

Genové sondy (DNA sondy) jsou jednovláknové úseky DNA, které se specificky váží ke komplementárnímu úseku mykotické DNA. Princip genových sond spočívá v hybridizaci. V případě, že jsou sondy značené fluorescenčním barvivem, mluvíme o fluorescenční *in situ* hybridizaci. Techniky sekvenování umožňují přesnou identifikaci mykotického agens na základě zjištění přesného pořadí nukleotidů (Votava a kol. 2010, Votava a kol. 2000).

Molekulárně – biologické metody slouží k přesné identifikaci původce a napomáhají v epidemiologických studiích v přesné typizaci izolovaných kmenů. Nevýhodou je, že jsou to metody poměrně drahé a složité (Votava a kol. 2010).

7.4.6 MALDI – TOF MS

Identifikace vláknitých hub se v rutinních mikrobiologických laboratořích spoléhá především na morfologické znaky hub a na zkušenosti pracovníků. Molekulární metody založené na identifikaci DNA (PCR, sekvenace) nejsou schopné identifikovat

velké množství mykotických druhů a proto došlo v posledních letech k velkému vývoji v oblasti MALDI – TOF MS (Becker a kol. 2014).

MALDI – TOF MS (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization – Time of Flight Mass Spectrometry) je hmotnostní spektrometrie a analyzátorem doby letu s ionizací za účasti biomatrice. Hmotnostní spektrometrie je metoda, která odděluje molekuly na základě jejich rozdílném poměru hmotnost/náboj (m/z). MALDI – TOF MS umožňuje analýzu proteinů mikroorganizmu a na základě proteinového složení se srovnáním se spektrem v referenční knihovně, jsme schopni určit přesného mykotického původce. Proteinové složení je pro každého původce vysoce specifické (Posteraro a kol. 2013; Becker a kol. 2014).

Tato metoda je velice rychlá (pro analýzu stačí pouze malé množství kolonie), finančně efektivní a poměrně jednoduchá. Hlavní nevýhoda je v referenčních knihovnách. Jsme schopni identifikovat pouze původce, jejichž proteinová spektra knihovna obsahuje. Používá se pro identifikaci zejména kvasinek, některých rodů vláknitých hub, řádu *Mucorales*, dermatofyt a dalších (Becker a kol. 2014).

7.4.7 Imunologické metody

Jedná se o širokou skupinu metod, které slouží k detekci cytoplazmatických antigenů, antigenů buněčné stěny nebo protilátek proti nim v séru či v jiných tělních tekutinách. Nejvýznamnější z těchto vyšetření je – detekce antigenu galaktomannanu, antigenu mannanu a protilátky proti němu (antimannanu) a antigenu β-1,3-D- glukanu.

Antigen galaktomannan je významným markerem invazivní aspergilózy. Jedná se o polysacharid buněčné stěny aspergilů a dalších hub. Galaktomannan je při růstu a invazi hyf uvolňován do tělních tekutin, což umožňuje jeho stanovení. Dříve se tento antigen detekoval na principu latexové aglutinace. Tato metoda měla relativně nízkou senzitivitu, proto se začala později využívat metoda ELISA (Ráčil a kol. 2007).

Antigen mannan a antimannan jsou významnými markery invazivní kandidózy. Mannan je antigen buněčné stěny kvasinek rodu *Candida*, který je stejně jako galaktomannan uvolňován do tělních tekutin. Je to vysoce imunogenní a tepelně

stabilní antigen, který má krátký biologický poločas (hodiny). Antigen může být detekován latexovou aglutinací a metodou ELISA. Test sloužící ke stanovení antimannanu má velice nízkou specifitu. Je to způsobené tím, že protilátky vytvářejí i pouze kolonizovaní pacienti, nebo naopak imunosuprimovaní pacienti mohou protilátky vytvářet jen velmi omezeně. Nejlepších výsledků je dosaženo při stanovení mannanu v kombinaci s antimannanem (Ráčil a kol. 2007; Mallátová a Mencl 2010).

Dalším významným antigenem je β-1,3-D-glukan (tzv. panfungální antigen). Je to jeden z nejvýznamnějších polysacharidů buněčné stěny téměř všech mykotických agens. K buněčné stěně je vázán velmi pevně, v tělních tekutinách je ho přítomno pouze velmi malé množství a k jeho uvolňování dochází při růstu mykotického agens. Toto vyšetření nelze použít pro diagnostiku infekcí způsobených kryptokoky a zygomycetami. K detekci antigenu slouží kolorimetrický test. Využívá se zde schopnosti β-1,3-D-glukanu aktivovat faktor G (z amebocytů klepítkatců *Lumulus polyphenus* nebo *Tachypleus tridentatus*), následná vizualizace reakce se provádí pomocí chromogenního substrátu (Ráčil a kol. 2007).

7.5 Testování citlivosti in vitro

Díky rostoucímu počtu systémových mykóz došlo v poslední době k velkému vývoji nových antimykotik. Současně s tím dochází k nárůstu rezistentních kmenů mikromycet a stoupá význam stanovení citlivosti k antifungálním látkám *in vitro*. Stanovení citlivosti antifungálních látek *in vitro* je důležité pro včasnou detekci rezistentních kmenů mikromycet nebo pro sledování vývoje rezistence během terapie (Mallátová a kol. 2011).

Metody hodnocení citlivosti lze rozdělit na kvalitativní a kvantitativní. Kvalitativní metody rozdělují kmeny mikromycet na základě jejich růstu v přítomnosti antimykotika na rezistentní, intermediátní a citlivé. Kvantitativní testy poskytují přesnou informaci o stupni rezistence či citlivosti. Většinou bývá vyjádřena jako hodnota MIC (minimální inhibiční koncentrace). Hodnota MIC je vyjádřena jako nejnižší koncentrace testované látky, u které je pouhým okem viditelná inhibice růstu testovaného kmene. Mezi metody pro testování citlivosti k antimykotikům patří diskové difúzní testy, mikrodiluční testy a E – testy. (Jílek a kol. 2002; Votava a kol. 2010).

V současné době probíhá vývoj nových technik pro hodnocení citlivosti *in vitro*. K těmto technikám patří např. kolorimetrické metody s využitím tetrazoliových solí, průtoková cytometrie nebo stanovení množství sterolu v plazmatické membráně (Mallátová 2007).

7.5.1 Kvalitativní testy

7.5.1.1 Diskový difúzní test

Diskový difúzní test je nejčastěji používaným kvalitativním testem. Tento test je jednoduchý, rychlý a finančně nenáročný. Pro testování se využívají papírové disky nasycené určitou koncentrací antimykotika. Tyto disky se jednoduše pokládají na tuhé kultivační půdy, které jsou naočkovány testovaným kmenem. Jako kultivační půda slouží Mueller – Hintonův agar s 2 % glukózy a methylenovou modří, v některých případech je nutné použít Mueller – Hintonův agar s krví. Na jedné půdě lze použít maximálně 6 disků s antimykotiky. Disky se na půdu pokládají ve směru hodinových ručiček. Půda se kultivuje při teplotě 35 – 37 °C po dobu 24-72 hodin. Podmínky závisí na druhu mikromycety. Během kultivace disk nasává vodu z půdy a antimykotikum difunduje do okolí. Růst citlivé mikromycety je v okolí disku inhibován, vzniká tzv. inhibiční zóna (IZ). Průměr této zóny (včetně disku) se měří a srovnává s tzv. referenční zónou. Na základě toho se určí, zda je mikrob rezistentní, citlivý či intermediární. Tento test vykazuje dobrou korelaci mezi výsledky *in vitro* a *in vivo* (Votava a kol. 2010; Mallátová a kol. 2011; Jílek a kol. 2002).

Kromě klasických disků jsou v současné době využívány i tablety se standardizovaným obsahem antimykotik (Neo – Sensitabs systém). Pro testování máme ze systémových antimykotik k dispozici: amfotericin B, flucytosin, flukonazol, ketokonazol, itrakonazol, posakonazol, vorikonazol a kaspofungin. Jedná se o metodu celosvětově uznávanou a doporučovanou pro kvalitativní testování citlivosti k antimykotikům (Mallátová a kol. 2011).

7.5.2 Kvantitativní testy

7.5.2.1 E – test

E- testy kombinují principy diskových difúzních a dilučních metod. Jsou založeny na stanovení hodnoty MIC a často se používají u závažně nemocných pacientů. E – test je kalibrovaný inertní plastikový nebo papírový proužek nasycený koncentračním gradientem antimykotika od jednoho konce ke druhému. Jednotlivé koncentrace antimykotika jsou na proužku vyznačené. Provedení je stejné jako u diskového difúzního testu. Proužek se pokládá na půdu naočkovanou testovaným kmenem. Takto připravená půda se inkubuje a podmínky závisí na druhu mikromycety. Opět dochází k difúzi a vzniká inhibiční zóna. Tvar je vejčitý a hodnota MIC se odečítá v místě, kde inhibiční zóna protíná proužek. Opět se jedná o jednoduchou a nenáročnou metodu. Nevýhodou je relativně vysoká cena a někdy nejasné odečítání MIC (Mallátová 2007; Votava a kol. 2010; Jílek a kol. 2002).

7.5.2.2 Agarová diluční metoda

Pro agarovou diluční metodu se používají agarové půdy, které obsahují různé koncentrace antifungálních látek – ve většině případů se testuje 12- 15 koncentrací antimykotika a ředění je dvojnásobnou geometrickou řadou. Na jednotlivé plotny s různými koncentracemi antimykotika se naočkuje standardní inokulum vyšetřovaného kmene a plotna se nechá inkubovat. Poté následuje vyhodnocení. Jako hodnota MIC je odečtena nejnižší koncentrace antimykotika na plotně, kde došlo k viditelné inhibici růstu mikromycet (Votava a kol. 2000).

Tato metoda je u řady antimykotik považována za metodu referenční. Je přesná a snadno se určuje inhibice růstu. Nevýhodou je finanční a časová náročnost, proto se v běžné praxi nepoužívá (Jílek a kol. 2002).

7.5.2.3 Diluční bujónové testy

Tyto testy se používají pro kvantitativní testování antifungální aktivity *in vitro* nejčastěji. Kromě hodnoty MIC navíc umožňují získat informaci o tzv. minimální mikrobicidní (fungicidní) koncentraci. Provedení těchto testů spočívá v naředění

testovaného antimykotika ve vhodném tekutém médiu geometrickou řadou. Takto naředěné testované antimykotikum může být rozpipetováno do zkumavek (makrodiluční bujónová metoda) nebo do jamek mikrotitračních destiček (mikrodiluční bujónová metoda). Rozplňování naředěných antimykotik lze snadno automatizovat. Používají se automatické vícekanálové pipety. Naředěné antimykotikum se poté naočkuje suspenzí vyšetřovaného kmene o hustotě 0,5 McFarlandovy stupnice optické denzity (odpovídá 10^5 – 10^6 cfu v 1 ml). Po naočkování následuje inkubace a po uplynutí inkubační doby vyhodnocení MIC. Hodnota MIC se odečítá z jamky o nejnižší koncentraci, kde není patrný zákal (růst). Srovnáním MIC s hraniční hodnotou hladiny antimykotika (break point) získáme informace o tom, zda je mykotické agens rezistentní či citlivé k antimykotiku. Vyšší MIC než hraniční hodnota znamená, že je rezistentní. Nižší nebo rovno hraniční hodnotě znamená, že je citlivý (Votava a kol. 2010; Jílek a kol. 2002).

Mikrodiluční bujónová metoda je v praxi prováděna častěji. Mikrotitrační destička má celkem 96 jamek a pro diagnostiku se používá pouze pro jeden kmen. Jamka v pravém horním rohu slouží jako kontrola růstu, neobsahuje antimykotikum. Zbylé jamky obsahují růstové médium a různé koncentrace antimykotik. Mikrotitrační destička má 12 sloupců a 8 řad. Jednu destičku lze použít pro testování až 12 různých antimykotik. Mikrodiluční bujónová metoda je poměrně pracná a vyžaduje čistou kulturu mikroorganizmu. V klinické praxi se nejčastěji používá komerčně připravená destička Sensititre YeastOne (Trek Diagnostic) s 9 naředěnými antimykotiky, kontrolou růstu a snadnějším odečtem na základě barevné změny v jamkách s nárůstem houby (Votava a kol. 2010; Mallátová a kol. 2011).

8. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

Testování potenciálně antifungálních látek mikrodiluční bujónovou metodou

8.1 Použitý materiál

8.1.1 Pomůcky

Sterilní mikrotitrační destičky s plochým dnem a víčky, mikropipety, 12 – ti kanálové pipety, sterilní pipetovací špičky, 12 – ti jamkový rezervoár na médium, sterilní zkumavky, stojánky na zkumavky, očkovací kličky, Bürkerovy komůrky

8.1.2 Přístroje

Laminární box, termostat, mikroskop, vortex

8.1.3 Chemikálie a média

RPMI 1640 (5x koncentrované definované růstové médium), MOPS (3-[*N*-morfolino]propansulfonová kyselina), glukóza, dimetylsulfoxid (DMSO), NaOH, sterilní voda, Sabouraudův agar

8.1.4 Testované kmeny kvasinek a vláknitých hub

Candida albicans **CA** ATCC 44859

Candida tropicalis **CT** 156

Candida krusei **CK** E28

Candida glabrata **CG** 20/I

Trichosporon asahii **TA** 1188

Aspergillus fumigatus **AF** 231

Absidia corymbifera **AC** 272

Trichophyton mentagrophytes **TM** 445

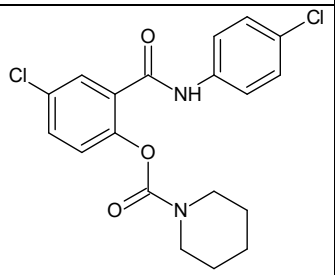
8.1.5 Testované látky

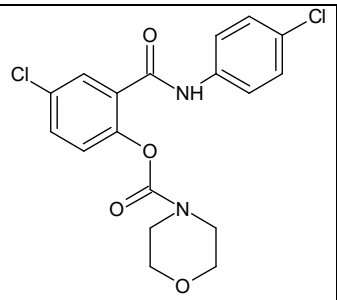
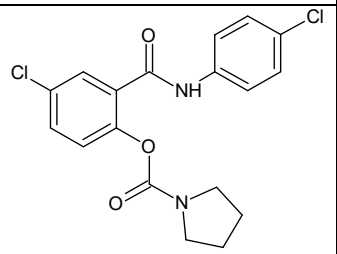
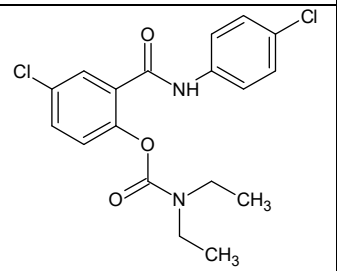
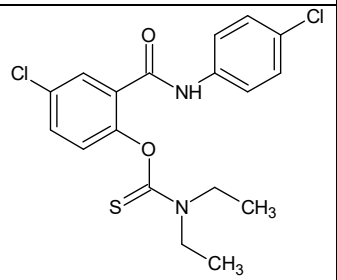
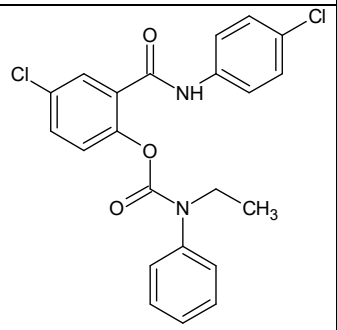
Do testování bylo zařazeno celkem 70 látek, které byly syntetizované na Katedře organické a anorganické chemie Farmaceutické fakulty (Prof. RNDr. Jarmila Vinšová, Ph.D., Mgr. Martin Krátký, Ph.D.). Na základě jejich chemických struktur byly rozděleny do 5 skupin.

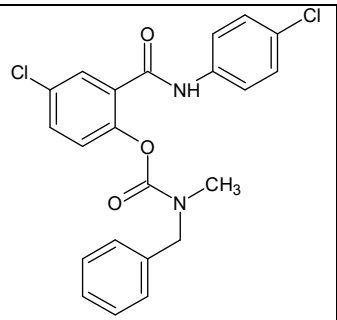
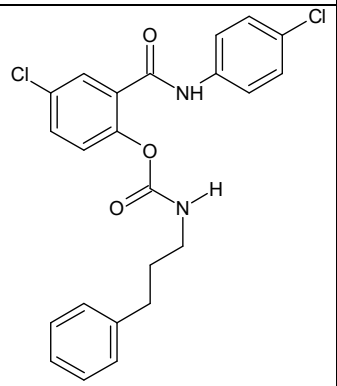
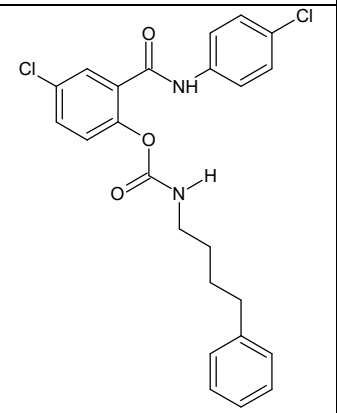
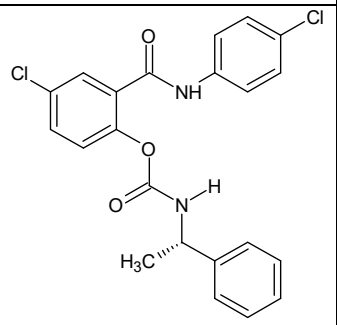
1. Salicylanilidové *N*-monosubstituované a *N,N*-disubstituované karbamáty a thiokarbamáty
2. Sulfonamidové močoviny (deriváty sulfathiazolu)
3. Amidy odvozené od sulfathiazolu
4. Deriváty rhodaninu
5. Ostatní látky

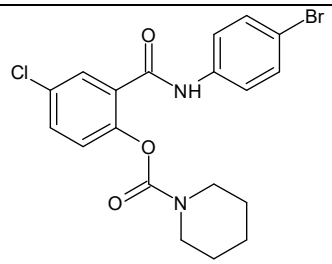
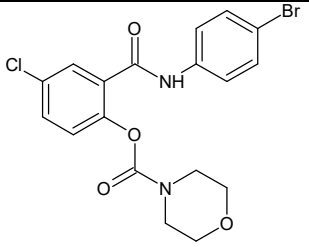
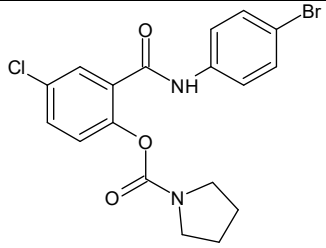
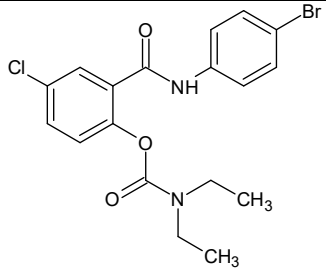
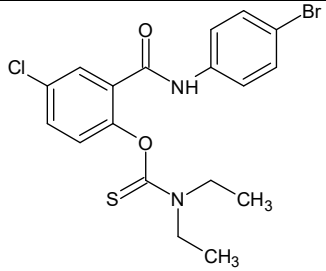
8.1.5.1 Salicylanilidové N-monosubstituované a N,N-disubstituované karbamáty a thiokarbamáty

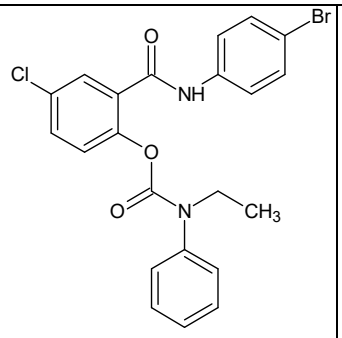
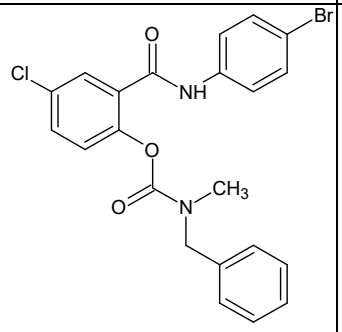
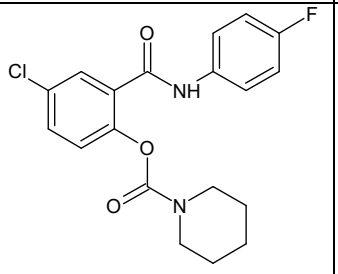
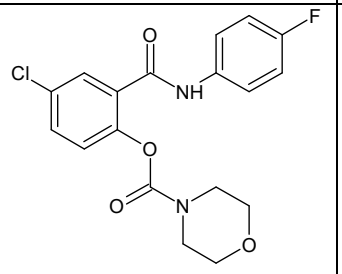
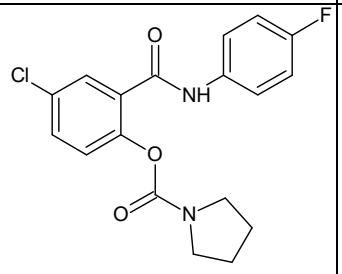
Tabulka 1: Salicylanilidové N-monosubstituované a N,N-disubstituované karbamáty a thiokarbamáty

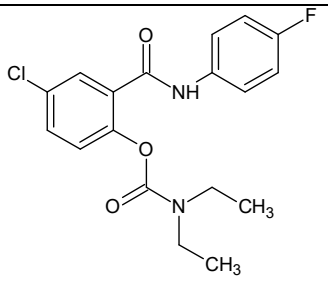
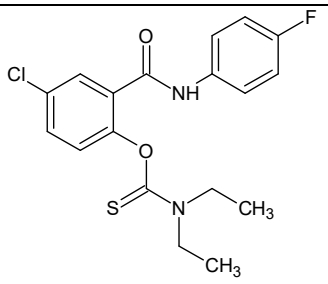
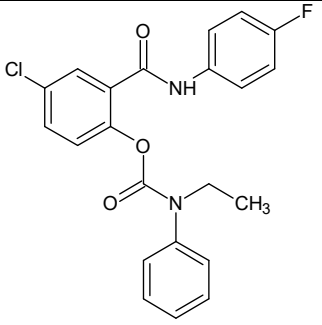
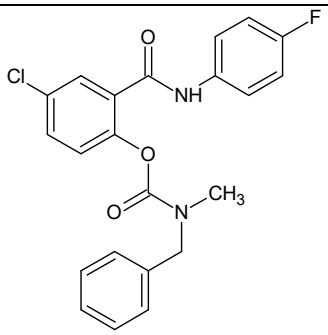
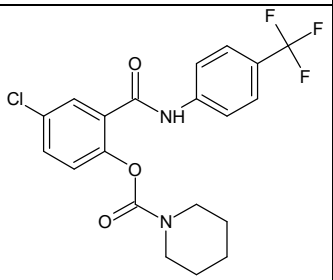
KÓD	VZOREC	NÁZEV	MW	NAVÁŽKA
SAL-1E		4-chlor-2-[(4-chlorfenyl)karbamoyl]fenyl piperidin-1-karboxylát	393,26	14,2 mg

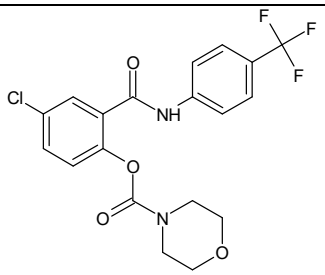
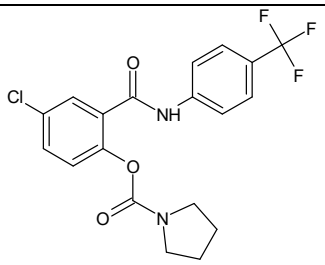
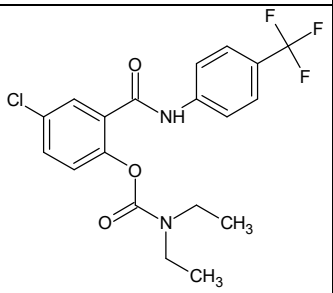
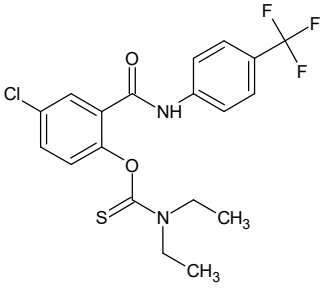
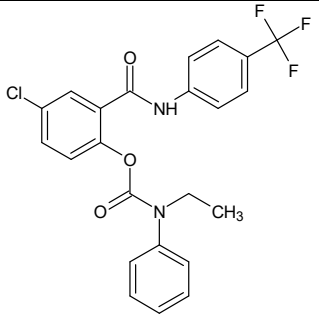
SAL-1F		4-chlor-2-[(4-chlorfenyl)karbamoyl]fenyl morfolin-4-karboxylát	395,24	12,3 mg
SAL-1G		4-chlor-2-[(4-chlorfenyl)karbamoyl]fenyl pyrrolidin-1-karboxylát	379,24	14,4 mg
SAL-1H		4-chlor-2-[(4-chlorfenyl)karbamoyl]fenyl diethylkarbamát	381,25	13,2 mg
SAL-1I		*O*-{4-chlor-2-[(4-chlorfenyl)karbamoyl]feny} diethylkarbamothioát	397,32	15,0 mg
SAL-1J		4-chlor-2-[(4-chlorfenyl)karbamoyl]fenyl ethyl(fenyl)karbamát	429,30	12,6 mg

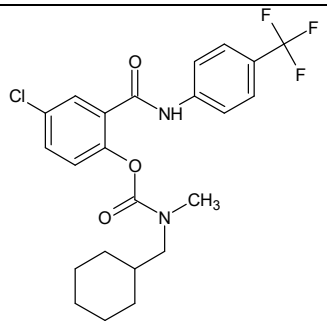
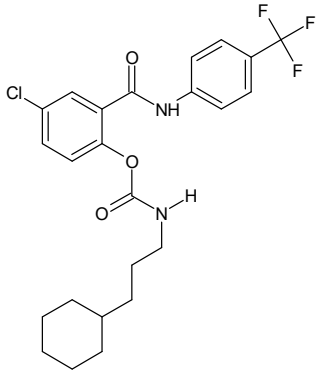
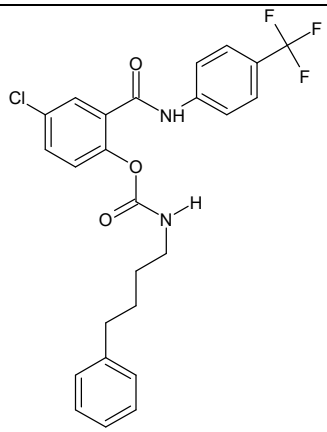
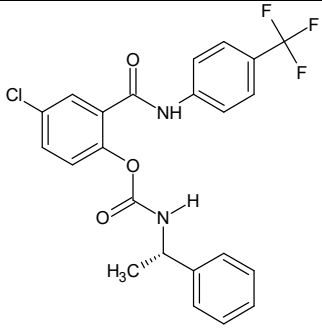
SAL-1K		4-chlor-2-[(4-chlorfenyl)karbamoyl]fenyl benzyl(methyl)karbamát	429,30	12,4 mg
SAL-1L		4-chlor-2-[(4-chlorfenyl)karbamoyl]fenyl (3-fenylpropyl)karbamát	443,32	12,1 mg
SAL-1M		4-chlor-2-[(4-chlorfenyl)karbamoyl]fenyl (4-fenylbutyl)karbamát	457,35	12,2 mg
SAL-1N		4-chlor-2-[(4-chlorfenyl)karbamoyl]fenyl (*S*)-(1-fenylethyl)karbamát	429,30	12,1 mg

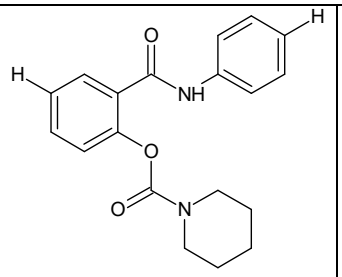
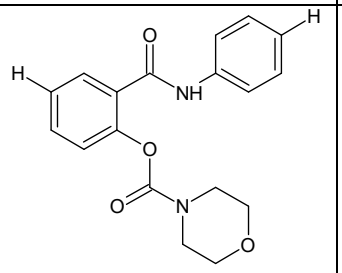
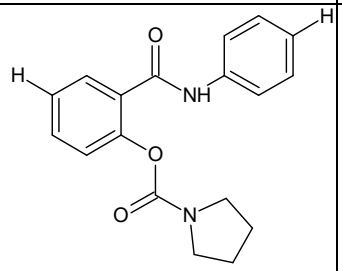
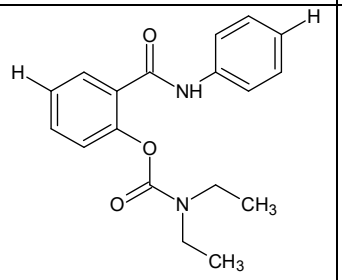
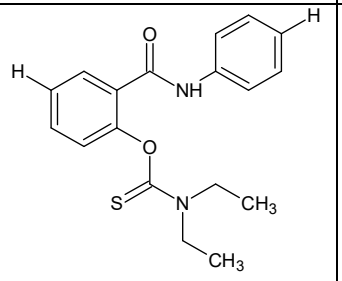
SAL-2E		2-[(4-bromfenyl)karbamoyl]-4-chlorfenyl piperidin-1-karboxylát	437,71	12,0mg
SAL-2F		2-[(4-bromfenyl)karbamoyl]-4-chlorfenyl morfolin-4-karboxylát	439,69	15,6 mg
SAL-2G		2-[(4-bromfenyl)karbamoyl]-4-chlorfenyl pyrrolidin-1-karboxylát	423,69	10,2 mg
SAL-2H		2-[(4-bromfenyl)karbamoyl]-4-chlorfenyl diethylkarbamát	425,70	10,3 mg
SAL-2I		*O*-{2-[(4-bromfenyl)karbamoyl]-4-chlorfenyl} diethylkarbamothioát	441,77	14, 7 mg

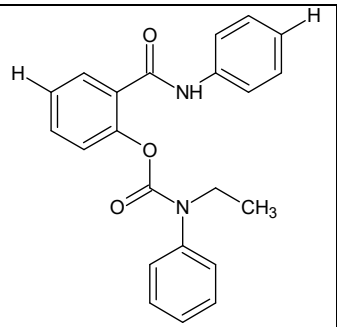
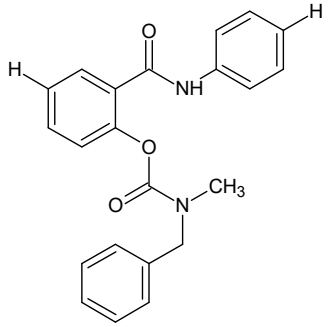
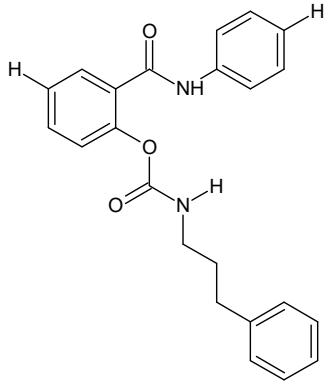
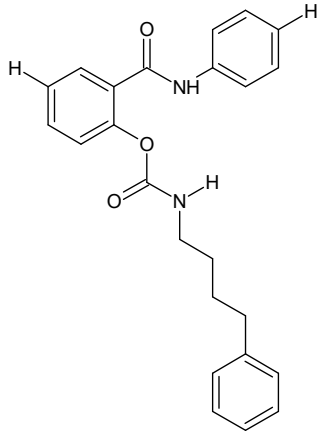
SAL-2J		2-[(4-bromfenyl)karbamoyl]-4-chlorfenyl ethyl(fenyl)karbamát	473,75	11,2 mg
SAL-2K		2-[(4-bromfenyl)karbamoyl]-4-chlorfenyl benzyl(methyl)karbamát	473,75	10,2 mg
SAL-3E		4-chlor-2-[(4-fluorfenyl)karbamoyl]fenyl piperidin-1-karboxylát	376,81	12,3 mg
SAL-3F		4-chlor-2-[(4-fluorfenyl)karbamoyl]fenyl morfolin-4-karboxylát	378,78	15,8 mg
SAL-3G		4-chlor-2-[(4-fluorfenyl)karbamoyl]fenyl pyrrolidin-1-karboxylát	362,78	14,5 mg

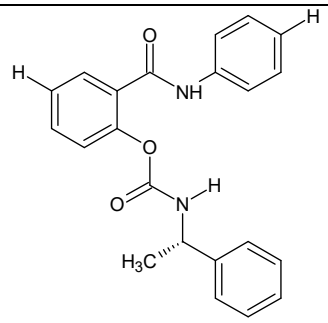
SAL-3H		4-chlor-2-[(4-fluorfenyl)karbamoyl]fenyl diethylkarbamát	364,80	10,3 mg
SAL-3I		*O*-{4-chlor-2-[(4-fluorfenyl)karbamoyl]fenyl} diethylkarbamothioát	380,86	14,5 mg
SAL-3J		4-chlor-2-[(4-fluorfenyl)karbamoyl]fenyl ethyl(fenyl)karbamát	412,84	13,7 mg
SAL-3K		4-chlor-2-[(4-fluorfenyl)karbamoyl]fenyl benzyl(methyl)karbamát	412,84	11,2 mg
SAL-4E		4-chlor-2-{[4-(trifluormethyl)fenyl]karbamoyl}fenyl piperidin-1-karboxylát	426,82	13,4 mg

SAL-4F		4-chlor-2-{[4-(trifluormethyl)fenyl]karbamoyl}fenyl morfolin-4-karboxylát	429,79	14,2 mg
SAL-4G		4-chlor-2-{[4-(trifluormethyl)fenyl]karbamoyl}fenyl pyrrolidin-1-karboxylát	412,79	15,0 mg
SAL-4H		4-chlor-2-{[4-(trifluormethyl)fenyl]karbamoyl}fenyl diethylkarbamát	414,81	11,0 mg
SAL-4I		*O*-(4-chlor-2-{[4-(trifluormethyl)fenyl]karbamoyl}fenyl) diethylkarbamothioát	430,87	12,5 mg
SAL-4J		4-chlor-2-{[4-(trifluormethyl)fenyl]karbamoyl}fenyl ethyl(fenyl)karbamát	462,85	12,9 mg

SAL-4K		4-chlor-2-{[4-(trifluormethyl)fenyl]karbamoyl}fenylbenzyl(methyl)karbamát	462,85	10,1 mg
SAL-4L		4-chlor-2-{[4-(trifluormethyl)fenyl]karbamoyl}fenyl (3-fenylpropyl)karbamát	476,88	12,0 mg
SAL-4M		4-chlor-2-{[4-(trifluormethyl)fenyl]karbamoyl}fenyl ethyl(fenyl)karbamát	490,90	10,6 mg
SAL-4N		4-chlor-2-{[4-(trifluormethyl)fenyl]karbamoyl}fenyl (*S*)-(1-fenylethyl)karbamát	462,85	11,1 mg

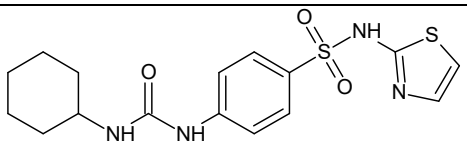
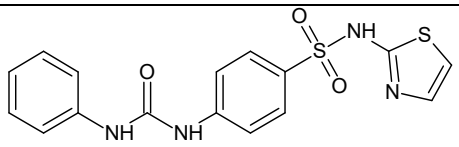
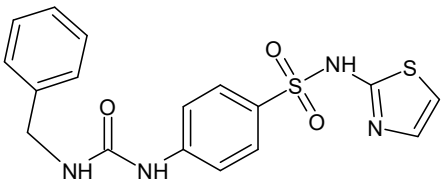
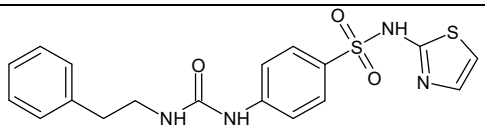
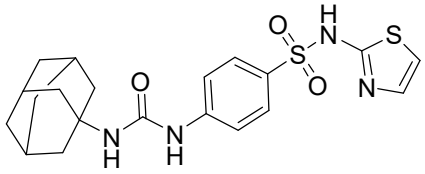
SAL-5E		2-(fenylkarbamoyl)fenyl piperidin-1-karboxylát	324,37	14,4 mg
SAL-5F		2-(fenylkarbamoyl)fenyl morfolin-4-karboxylát	326,35	12,8 mg
SAL-5G		2-(fenylkarbamoyl)fenyl pyrrolidin-1-karboxylát	310,35	12,5 mg
SAL-5H		2-(fenylkarbamoyl)fenyl diethylkarbamát	312,36	13,7 mg
SAL-5I		*O*-[2-(fenylkarbamoyl)fenyl] diethylkarbamothioát	328,43	13,2 mg

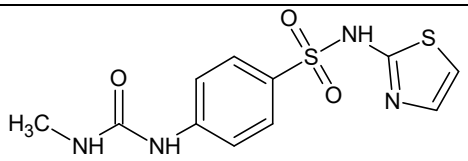
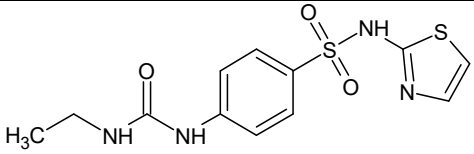
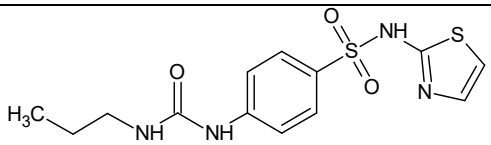
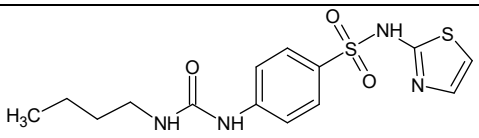
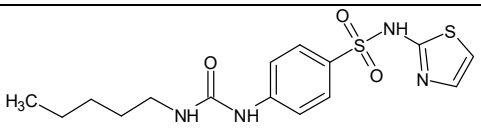
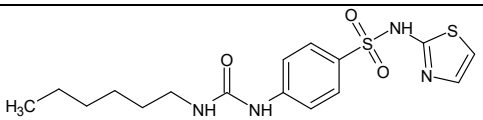
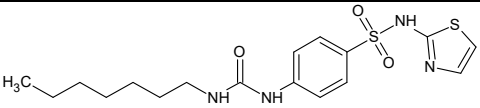
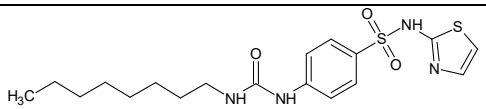
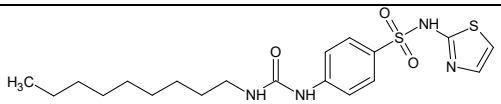
SAL-5J		2-(fenylkarbamoyl)fenyl ethyl(fenyl)karbamát	360,41	11,7 mg
SAL-5K		2-(fenylkarbamoyl)fenyl benzyl(methyl)karbamát	360,41	16,1 mg
SAL-5L		2-(fenylkarbamoyl)fenyl (3-fenylpropyl)karbamát	374,43	11,0 mg
SAL-5M		2-(fenylkarbamoyl)fenyl (4-fenylbutyl)karbamát	388,46	13,6 mg

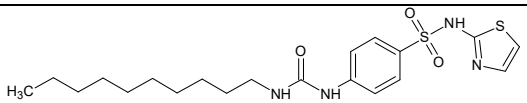
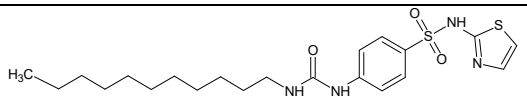
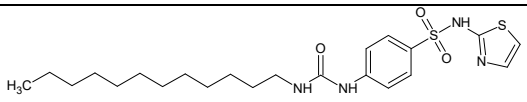
SAL-5N		2-(fenylkarbamoyl)fenyl (*S*)-(1-fenylethyl)karbamát	360,41	11,6 mg

8.1.5.2 Sulfoamidové močoviny (deriváty sulfathiazolu)

Tabulka 2: Sulfoamidové močoviny (deriváty sulfathiazolu)

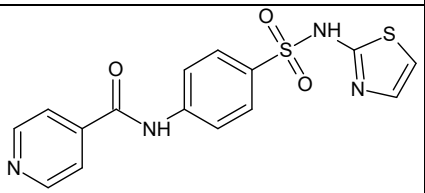
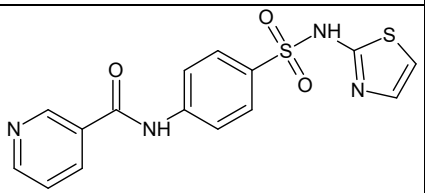
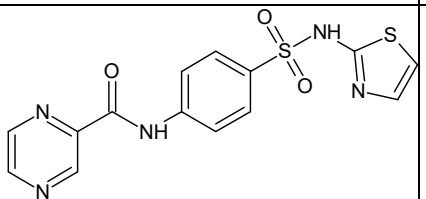
KÓD	VZOREC	NÁZEV	MW	NAVÁŽKA
STZ-Cy		4-(3-cyklohexylureido)-*N*-(thiazol-2-yl)benzensulfonamid	380,48	14,6 mg
STZ-Phe		4-(3-fenylureido)-*N*-(thiazol-2-yl)benzensulfonamid	374,44	13,0 mg
STZ-Ben		4-(3-benzylureido)-*N*-(thiazol-2-yl)benzensulfonamid	388,46	17,6 mg
STZ-PhEt		4-(3-fenethylureido)-*N*-(thiazol-2-yl)benzensulfonamid	402,49	13,8 mg
STZ-Ada		4-[3-(adamantan-1-yl)ureido]-*N*-(thiazol-2-yl)benzensulfonamid	432,56	16,8 mg

STZ-U-1		4-(3-methylureido)-*N*-(thiazol-2-yl)benzensulfonamid	312,37	11,3 mg
STZ-2		4-(3-ethylureido)-*N*-(thiazol-2-yl)benzensulfonamid	326,39	14,1 mg
STZ-3		4-(3-propylureido)-*N*-(thiazol-2-yl)benzensulfonamid	340,42	10,2 mg
STZ-4		4-(3-butylureido)-*N*-(thiazol-2-yl)benzensulfonamid	354,45	14,9 mg
STZ-5		4-(3-pentylureido)-*N*-(thiazol-2-yl)benzensulfonamid	368,47	12,2 mg
STZ-6		4-(3-hexylureido)-*N*-(thiazol-2-yl)benzensulfonamid	382,50	10,6 mg
STZ-7		4-(3-heptylureido)-*N*-(thiazol-2-yl)benzensulfonamid	396,53	15,0 mg
STZ-8		4-(3-oktylureido)-*N*-(thiazol-2-yl)benzensulfonamid	410,55	10,8 mg
STZ-9		4-(3-nonylureido)-*N*-(thiazol-2-yl)benzensulfonamid	424,58	11,2 mg

STZ-10		4-(3-decylureido)-*N*-(thiazol-2-yl)benzensulfonamid	438,61	12,2 mg
STZ-11		4-(3-undecylureido)-*N*-(thiazol-2-yl)benzensulfonamid	452,64	11,3 mg
STZ-12		4-(3-dodecylureido)-*N*-(thiazol-2-yl)benzensulfonamid	466,66	10,4 mg

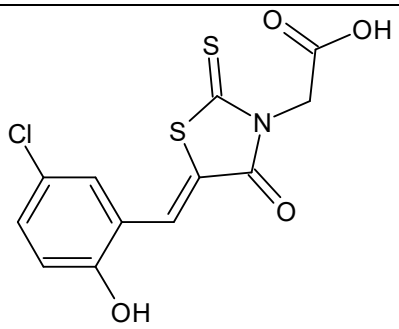
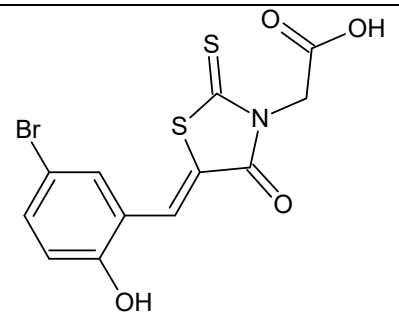
8.1.5.3 Amidy odvozené od sulfathiazolu

Tabulka 3: Amidy odvozené od sulfathiazolu

KÓD	VZOREC	NÁZEV	MW	NAVÁŽKA
STZ-IN		*N*-{4-[*N*-(thiazol-2-yl)sulfamoyl]fenyl} isonikotinamid	360,41	13,8 mg
STZ-NI		*N*-{4-[*N*-(thiazol-2-yl)sulfamoyl]fenyl}nikotinamid	360,41	17,4 mg
STZ-PZ		*N*-{4-[*N*-(thiazol-2-yl)sulfamoyl]fenyl}pyrazin-2-karboxamid	361,40	14,4 mg

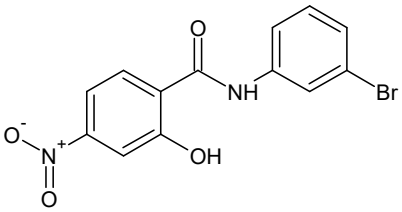
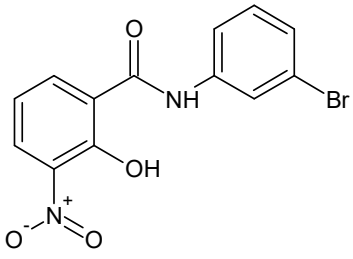
8.1.5.4 Deriváty rhodaninu

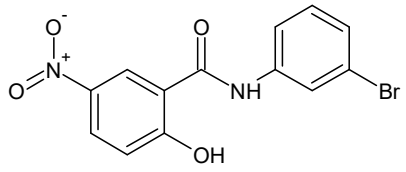
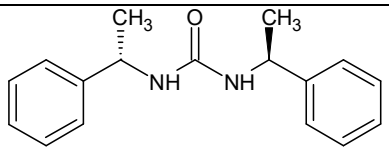
Tabulka 4: Deriváty rhodaninu

KÓD	VZOREC	NÁZEV	MW	NAVÁŽKA
TZK-4		2-[5-(5-chlor-2-hydroxybenzyliden)-4-oxo-2-thioxothiazolidin-3-yl]octová kyselina	329,78	14,8 mg
TZK-5		2-[5-(5-brom-2-hydroxybenzyliden)-4-oxo-2-thioxothiazolidin-3-yl]octová kyselina	374,23	10,8 mg

8.1.5.5 Ostatní látky

Tabulka 5: Ostatní látky

KÓD	VZOREC	NÁZEV	MW	NAVÁŽKA
GP-133		*N*-(3-bromfenyl)-2-hydroxy-4-nitrobenzamid	337,13	12,4 mg
GP-135		*N*-(3-bromfenyl)-2-hydroxy-3-nitrobenzamid	337,13	13,7 mg

GP-137		*N*-(3-bromfenyl)-2-hydroxy-5-nitrobenzamid	337,13	11, 6 mg
5N-U		1,3-bis((*S*)-1-fenylethyl)močovina	268,35	15,4 mg

8.2 Postup

8.2.1 Příprava růstového média

1. Ke 4 dílům MOPS s obsahem 2 % glukózy přidáme 1 díl RPMI 1640 (např. k 80 ml MOPS přidáme 20 ml RPMI 1640 – objem růstového média záleží na předpokládané spotřebě, resp. na počtu kmenů použitých k testování).
2. Pro úpravu pH do rozmezí 6,5 – 7,9 použijeme několik kapek NaOH. Původně žlutý roztok změní barvu na oranžovo – červenou.

8.2.2 Příprava suspenzí testovaných kmenů

1. Připravíme si 8 sterilních zkumavek. Tyto zkumavky popíšeme zkratkami testovaných kmenů CA, CT, CK, CG, TA, AF, AC a TM.
2. Do každé ze zkumavek napipetujeme 3 ml sterilní vody.
3. Z jednotlivých kultur testovaných kvasinek, které jsme si před pokusem nechali narůst na Sabouraudově glukózovém agaru, odebereme malou část kolonie a resuspendujeme ji do sterilní vody ve zkumavce s odpovídající zkratkou. Důkladně promícháme na vortexu a odebereme 12 µl do Bürkerovy komůrky. Při 200 násobném zvětšení určíme počet buněk na 100 čtverců. Hustota inokula, která je vhodná pro testování, je 1,5 – 2,5 x 10^5 cfu/ml (v Bürkerově komůrce 25 – 50 cfu/ 50 čtverců).

4. Z jednotlivých kultur vláknitých hub, které jsme si před pokusem nechali narůst na Sabouraudově glukózovém agaru, odebereme malou část konidií a resuspendujeme je do sterilní vody ve zkumavce s odpovídající zkratkou. Důkladně promícháme na vortexu a odebereme 12 µl do Bürkerovy komůrky. Při 200 násobném zvětšení určíme počet konidií na 100 čtverců. Hustota inokula vhodná pro testování vláknitých hub je cca 100 buněk na 100 čtverců.
5. Inokula připravená tímto způsobem vydrží v lednici přibližně jeden týden.

8.2.3 Příprava ředící řady testované látky

Látky jsou k testování dodávány společně s informací o navážce a molekulové hmotnosti.

1. Navážku látky rozpustíme v odpovídajícím objemu DMSO (objem DMSO vypočítáme ze vzorce uvedeného níže), tak aby 1. testovaná koncentrace byla 500 µmol.l^{-1} a aby koncentrace DMSO v jamce nepřesáhla 1 %. Poté důkladně promícháme na vortexu.
2. V případě, že se testovaná látka rozpustí nebo vytvoří homogenní suspenzi, přecházíme k dalšímu kroku. Jestliže se látka vysráží nebo nerozpustí, přidáme 2. případně 3. ekvivalent DMSO. Je důležité si uvědomit, že se přidáním každého ekvivalentu DMSO posouvá testovaná koncentrace o jedno ředění dozadu (z 500 µmol.l^{-1} na 250 µmol.l^{-1} atd.).
3. Do sterilní zkumavky označené číslem 1 pipetujeme 1,98 ml růstového média, ke kterému poté přidáme 20 µl rozpuštěné testované látky. Důkladně promícháme na vortexu.
4. V případě, že se látka nevysrážela, přecházíme k dalšímu kroku. Jestliže se látka vysráží, přidáme 2. případně 3. ekvivalent růstového média. Je důležité si uvědomit, že se přidáním každého ekvivalentu růstového média posouvá testovaná koncentrace o jedno ředění dozadu (z 500 µmol.l^{-1} na 250 µmol.l^{-1} atd.).
5. V dalším kroku přesuneme pracovní roztok první testované koncentrace (z kroku 3) do první jamky 12 – ti jamkového rezervoáru.

6. Ve sterilních zkumavkách (popsaných čísly 2 – 10) si připravíme dvojkovou ředící řadu testované látky v DMSO. Nejdříve si do každé zkumavky napipetujeme 0,2 ml DMSO. Do první zkumavky označené číslem 2 napipetujeme 0,2 ml testované látky v DMSO (připravené v kroku č. 1), důkladně promícháme a 0,2 ml přeneseme do druhé zkumavky označené číslem 3. Opět promícháme a 0,2 ml přeneseme do zkumavky s číslem 4. Tímto způsobem pokračujeme až k poslední zkumavce s číslem 11.
7. Do 12 – ti jamkového rezervoáru si do jamek č. 2 – 12 napipetujeme 1,98 ml růstového média. Poté přidáváme do jednotlivých jamek rezervoáru 20 µl ředěné testované látky. Ze zkumavky č. 2 do jamky č. 2 atd. Do 12. jamky napipetujeme místo testované látky 20 µl DMSO, slouží jako kontrola.
8. Testované koncentrace jsou 500; 250; 125; 62,5; 31,25; 15,625; 7,813; 3,906; 1,953; 0,977; 0,488 µmol.l^{-1}

Výpočet objemu DMSO:

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

m……. navážka (g)

c…… 1. testovaná koncentrace = 500 µmol.l^{-1} = 0,5 mol.l^{-1}

M……. molární hmotnost

8.2.4 Pipetování do destičky

1. Za použití 12 – ti kanálové pipety napipetujeme 200 µl příslušného zásobního roztoku do řádků A, B, C, D, E, G a H. Řádek F zůstane prázdný a TM se testuje

na druhé mikrotitrační destičce. Počet využitých řádků na druhé destičce závisí na počtu testovaných látek (např. pro tři látky využijeme řádek A, B a C).

2. Do všech jamek v řádku A pipetujeme 10 µl suspenze obsahující *Candida albicans* CA ATCC 44859, do řádku B suspenze *Candida tropicalis* CT 156, do řádku C suspenze *Candida krusei* CK E28, do řádku D suspenze *Candida glabrata* CG 20/I, do řádku E suspenze *Trichosporon asahii* TA 1188, do řádku G suspenze *Aspergillus fumigatus* AF 231, do řádku H suspenze *Absidia corymbirefa* AC 272.
3. Do všech jamek druhé destičky pipetujeme 10 µl suspenze *Trichophyton mentagrophytes* TM 445.
4. Naočkovanou destičku přiklopíme víčkem a inkubujeme v termostatu ve tmě při teplotě 35 °C (statická inkubace). První destičku inkubujeme 48 hodin a odečítáme za 24 a 48 hodin. Druhou destičku s TM inkubujeme 120 hodin a odečítáme za 72 a 120 hodin.

8.2.5 Vyhodnocení MIC

Po skončení inkubační doby hodnotíme nárůst v jednotlivých jamkách a srovnáváme ho s kontrolou. MIC odpovídá koncentraci látky v jamce, kde došlo u kvasinek 80% potlačení růstu (IC_{80}) a u plísní k 50% potlačení růstu (IC_{50}).

9. VÝSLEDKY

Každou testovanou látku jsme naředili dvojkovou ředící řadou na koncentrace 500; 250; 125; 62,5; 31,25; 15,625; 7,813; 3,906; 1,953; 0,977 a 0,488 $\mu mol.l^{-1}$ a zkoušeli jsme její účinnost na všech testovaných kmenech. Výsledky jsou pro lepší přehlednost uvedeny v tabulkách a hodnoty MIC jsou znázorněny tučně. Látky, které neprojevily žádnou antifungální aktivitu, jsou označené > 500 $\mu mol.l^{-1}$ (případně > 250 nebo > 125 $\mu mol.l^{-1}$, v závislosti na 1. testované koncentraci). Látky SAL-1G, SAL-2E, SAL-2G, SAL-3E, SAL-4F, SAL-4G, SAL-4K, SAL-4L, SAL-5F, STZ-11, STZ-12 a GP-133 (uvedené v seznamu testovaných látek) se netestovaly, protože se nerozpustily v DMSO nebo se vysrážely v růstovém médiu.

9.1 Salicylanilidové N-monosubstituované a N,N-disubstituované karbamáty a thiokarbamáty

Tabulka 6: Výsledky – salicylanilidové N-monosubstituované a N,N-disubstituované karbamáty a thiokarbamáty I.

KMEN (KÓD)	ID	TESTOVANÁ LÁTKA (KÓD) MIC/IC_{80} /IC_{50} µmol.l^{-1}									
		SAL-1E	SAL-1F	SAL-1J	SAL-1K	SAL-1L	SAL-1M	SAL-1N	SAL-2F	SAL-2J	SAL-2K
CA	24h	>125	>125	**31,25**	>125	**31,25**	**31,25**	**3,9**	>125	>125	>125
	48h	>125	>125	**31,25**	>125	**31,25**	**31,25**	**3,9**	>125	>125	>125
CT	24h	>125	>125	>125	>125	>125	**62,5**	>125	>125	>125	>125
	48h	>125	>125	>125	>125	>125	**62,5**	>125	>125	>125	>125
CK	24h	>125	>125	**125**	>125	**62,5**	**62,5**	**7,81**	>125	>125	>125
	48h	>125	>125	**125**	>125	**62,5**	**62,5**	**7,81**	>125	>125	>125
CG	24h	>125	>125	>125	>125	**31,25**	**250**	>125	>125	>125	>125
	48h	>125	>125	>125	>125	**31,25**	**250**	>125	>125	>125	>125
TA	24h	>125	>125	**125**	>125	**125**	**500**	>125	>125	>125	>125
	48h	>125	>125	**125**	>125	**125**	**500**	>125	>125	>125	>125
AF	24h	>125	>125	**125**	>125	>125	> 500	>125	>125	>125	>125
	48h	>125	>125	**125**	>125	>125	> 500	>125	>125	>125	>125
AC	24h	>125	>125	**15,62**	>125	>125	> 500	**62,5**	>125	>125	>125
	48h	>125	>125	**15,62**	>125	>125	> 500	**62,5**	>125	>125	>125
TM	72h	>125	>125	**3,9**	**125**	**1,95**	**1,95**	**1,95**	>125	**31,25**	**31,25**
	120h	>125	>125	**3,9**	**125**	**1,95**	**1,95**	**1,95**	>125	**31,25**	**31,25**

U všech látek z tabulky č. 6 (mimo SAL-1M) byla nejvyšší testovaná koncentrace 125 µmol.l^{-1}. Látky se rozpouštěly až po přidání 3. ekvivalentu DMSO (nebo se vysrážely a museli jsme přidat 3 ekvivalenty růstového média). Látky SAL-1E, SAL-1F a SAL-2F nebyly na žádnou z testovaných mikromycet účinné. Účinnost měla látka SAL-1J při koncentraci 31,25 µmol.l^{-1} na CA, při 125 µmol.l^{-1} na CK, TA a AF, při 15,62 µmol.l^{-1} na AC a při 3,9 µmol.l^{-1} na TM. Látky SAL-1K, SAL-2J a SAL-2K působily pouze na TM. Látka SAL-1L byla poměrně dobře účinná. Antifungálně působila v rozmezí koncentrací 1,95 –125 µmol.l^{-1} a účinkovala na všechny mikromycety, kromě CT, AF a AC. Druhou poměrně dobře účinnou látkou byla SAL-1M. Jako jediná z těchto látek účinkovala na CT a nebyla účinná na AF a AC. SAL-1L a SAL-1M účinkovaly na TM a to ve velice malé koncentraci (1,95 µmol.l^{-1}). Látka SAL-1N účinkovala v malých koncentracích (1,95 – 62,5 µmol.l^{-1}) a to na CA, CK, AC a TM. Na TM účinkovala v koncentraci pouhých 1,95 µmol.l^{-1}.

Tabulka 7: Výsledky – salicylanilidové N-monosubstituované a N,N-disubstituované karbamáty a thiokarbamáty II.

KMEN (KÓD)	ID	TESTOVANÁ LÁTKA (KÓD) MIC/IC_{80} /IC_{50} µmol.l^{-1}									
		SAL-1H	SAL-1I	SAL-2H	SAL-2I	SAL-3H	SAL-3I	SAL-4H	SAL-4I	SAL-5H	SAL-5I
CA	24h	> 500	> 500	> 500	> 500	**62,5**	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500
	48h	> 500	> 500	> 500	> 500	**62,5**	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500
CT	24h	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500
	48h	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500
CK	24h	> 500	> 500	> 500	> 500	**250**	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500
	48h	> 500	> 500	> 500	> 500	**250**	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500
CG	24h	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500
	48h	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500
TA	24h	> 500	> 500	> 500	> 500	**62,5**	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500
	48h	> 500	> 500	> 500	> 500	**62,5**	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500
AF	24h	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500
	48h	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500
AC	24h	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500
	48h	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500
TM	72h	> 500	> 500	**125**	> 500	**62,5**	> 500	> 500	> 500	**500**	**500**
	120h	> 500	> 500	**125**	> 500	**62,5**	> 500	> 500	> 500	**500**	**500**

Všechny látky uvedené v tabulce č. 7 byly rozpustné v 1. ekvivalentu DMSO (nevysrážely se ani v růstovém médiu), jejich nejvyšší testovaná koncentrace byla 500 µmol.l^{-1}. Látky SAL-2H, SAL-5H a SAL-5I měly účinek pouze na TM. Nejúčinnější z této tabulky byla SAL-3H. V koncentraci 62,5 µmol.l^{-1} účinkovala na CA, TA a TM a při 250 µmol.l^{-1} účinkovala i na CK. Ostatní látky neprojevily žádnou antifungální účinnost.

Tabulka 8: Výsledky – salicylanilidové N-monosubstituované a N,N-disubstituované karbamáty a thiokarbamáty III.

KMEN (KÓD)	ID	TESTOVANÁ LÁTKA (KÓD) MIC/IC_{80} /IC_{50} µmol.l^{-1}							
		SAL-3F	SAL-3G	SAL-3J	SAL-3K	SAL-4E	SAL-4J	SAL-4M	SAL - 4N
CA	24h	>125	>125	> 250	> 250	> 250	>125	**15,62**	**125**
	48h	>125	>125	> 250	> 250	> 250	>125	**15,62**	**125**
CT	24h	>125	>125	> 250	> 250	> 250	>125	>125	>125
	48h	>125	>125	> 250	> 250	> 250	>125	>125	>125
CK	24h	>125	>125	> 250	> 250	> 250	>125	**125**	>125
	48h	>125	>125	> 250	> 250	> 250	>125	**125**	>125
CG	24h	>125	>125	> 250	> 250	> 250	>125	**125**	>125
	48h	>125	>125	> 250	> 250	> 250	>125	**125**	>125
TA	24h	>125	>125	> 250	**250**	> 250	>125	**125**	>125
	48h	>125	>125	> 250	**250**	> 250	>125	**125**	>125
AF	24h	>125	>125	> 250	> 250	> 250	>125	**62,5**	**125**
	48h	>125	>125	> 250	> 250	> 250	>125	**62,5**	**125**
AC	24h	>125	>125	> 250	**250**	> 250	>125	**15,62**	**125**
	48h	>125	>125	> 250	**250**	> 250	>125	**15,62**	**125**
TM	72h	>125	>125	**125**	**62,5**	> 250	**15,62**	**3,9**	**125**
	120h	>125	>125	**125**	**62,5**	> 250	**15,62**	**3,9**	**125**

Z tabulky č. 8 neměly antifungální aktivitu SAL-3F, SAL-3G a SAL-4E. Pouze na TM účinkovaly SAL-3J (koncentrace 125 µmol.l^{-1}) a SAL-4J (koncentrace 15,62 µmol.l^{-1}). Nejvyšší testovanou koncentrací u látky SAL-3K byla 250 µmol.l^{-1}, tato koncentrace byla účinná na TA a AC. SAL-3K účinkovala na TM při koncentraci 62,5 µmol.l^{-1}. SAL-4M inhibovala růst všech testovaných kmenů kromě CT. Rozmezí koncentrací s antifungálním účinkem bylo široké (od 3,9 do 125 µmol.l^{-1}). Na TM působila antifungálně už při koncentraci 3,9 µmol.l^{-1}. Látka SAL-4N účinkovala při koncentraci 125 µmol.l^{-1} na CA, AF, AC a TM.

Tabulka 9: Výsledky – salicylanilidové N-monosubstituované a N,N-disubstituované karbamáty a thiokarbamáty IV.

KMEN (KÓD)	ID	TESTOVANÁ LÁTKA (KÓD) MIC/IC80 /IC50 µmol.l-1						
		SAL-5E	SAL-5G	SAL-5J	SAL-5K	SAL-5L	SAL-5M	SAL-5N
CA	24h	> 500	> 500	> 250	> 500	**62,5**	> 500	**62,5**
	48h	> 500	> 500	> 250	> 500	>125	> 500	**250**
CT	24h	> 500	> 500	> 250	> 500	>125	> 500	> 500
	48h	> 500	> 500	> 250	> 500	>125	> 500	> 500
CK	24h	> 500	> 500	> 250	> 500	**62,5**	> 500	**500**
	48h	> 500	> 500	> 250	> 500	**62,5**	> 500	> 500
CG	24h	> 500	> 500	> 250	> 500	>125	> 500	> 500
	48h	> 500	> 500	> 250	> 500	>125	> 500	> 500
TA	24h	> 500	> 500	> 250	> 500	>125	> 500	> 500
	48h	> 500	> 500	> 250	> 500	>125	> 500	> 500
AF	24h	> 500	> 500	> 250	> 500	>125	> 500	> 500
	48h	> 500	> 500	> 250	> 500	>125	> 500	> 500
AC	24h	> 500	> 500	> 250	> 500	>125	> 500	> 500
	48h	> 500	> 500	> 250	> 500	>125	> 500	> 500
TM	72h	> 500	> 500	> 250	> 500	>125	> 500	> 500
	120h	> 500	> 500	> 250	> 500	>125	> 500	> 500

Z této skupiny látek byly účinné jen SAL-5L a SAL-5N. Spektrum účinku těchto látek tvořily pouze kvasinky CA a CK. SAL-5L účinkovala na CA pouze po 24 hodinové inkubaci a to při koncentraci 62,5 µmol.l^{-1}. Při stejné koncentraci působila i na CK. Látka SAL-5N účinkovala na CA po 24 hodinové inkubaci při koncentraci 62,5 µmol.l^{-1} a po 48 hodinové inkubaci při koncentraci 250 µmol.l^{-1}. Na CK působila antifungálně jen po 24 hodinové inkubaci a to při nejvyšší koncentraci (500 µmol.l^{-1}).

9.2 Sulfoamidové močoviny (deriváty sulfathiazolu)

Tabulka 10: Výsledky – sulfoamidové močoviny (deriváty sulfathiazolu) I.

KMEN (KÓD)	inkubační doba	TESTOVANÁ LÁTKA (KÓD) MIC/IC80 /IC50 µmol.l-1				
		STZ-Cy	STZ-Phe	STZ-Ben	STZ-PhEt	STZ-Ada
CA	24h	> 500	> 500	**250**	>125	>125
	48h	> 500	> 500	**250**	>125	>125
CT	24h	> 500	> 500	**250**	>125	>125
	48h	> 500	> 500	**250**	>125	>125
CK	24h	> 500	> 500	**125**	>125	>125
	48h	> 500	> 500	**125**	>125	>125
CG	24h	> 500	> 500	**125**	>125	>125
	48h	> 500	> 500	**125**	>125	>125
TA	24h	> 500	> 500	**250**	>125	>125
	48h	> 500	> 500	**250**	>125	>125
AF	24h	> 500	> 500	> 500	>125	>125
	48h	> 500	> 500	> 500	>125	>125
AC	24h	> 500	> 500	> 500	>125	>125
	48h	> 500	> 500	> 500	>125	>125
TM	72h	> 500	> 500	**125**	>125	>125
	120h	> 500	> 500	**125**	>125	>125

Z této skupiny látek byla účinná pouze STZ – Ben. Tato látka působila antifungálně na všechny kvasinky, TA a TM. Účinná byla pouze v poměrně vysokých koncentracích (250 a 125 µmol.l^{-1}).

Tabulka 11: Výsledky – sulfoamidové močoviny (deriváty sulfathiazolu) II.

KMEN (KÓD)	ID	TESTOVANÁ LÁTKA (KÓD) MIC/IC_{80} /IC_{50} µmol.l^{-1}									
		STZ-U1	STZ-2	STZ-3	STZ-4	STZ-5	STZ-6	STZ-7	STZ-8	STZ-9	STZ-10
CA	24h	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500	>125	> 500	> 500	> 500	> 500
	48h	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500	>125	> 500	> 500	> 500	> 500
CT	24h	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500	>125	> 500	> 500	> 500	> 500
	48h	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500	>125	> 500	> 500	> 500	> 500
CK	24h	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500	>125	> 500	> 500	> 500	> 500
	48h	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500	>125	> 500	> 500	> 500	> 500
CG	24h	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500	>125	> 500	> 500	> 500	> 500
	48h	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500	>125	> 500	> 500	> 500	> 500
TA	24h	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500	>125	> 500	> 500	> 500	> 500
	48h	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500	>125	> 500	> 500	> 500	> 500
AF	24h	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500	>125	> 500	> 500	> 500	> 500
	48h	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500	>125	> 500	> 500	> 500	> 500
AC	24h	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500	>125	> 500	> 500	> 500	> 500
	48h	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500	>125	> 500	> 500	> 500	> 500
TM	72h	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500	>125	> 500	> 500	> 500	> 500
	120h	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500	>125	> 500	> 500	> 500	> 500

Z látek uvedených v tabulce č. 11 neprojevila ani jedna antifungální aktivitu. Všechny kromě STZ-6 byly testovány v nejvyšší koncentraci 500 µmol.l^{-1}.

9.3 Amidy odvozené od sulfathiazolu

Tabulka 12: Výsledky – amidy odvozené od sulfathiazolu

KMEN (KÓD)	ID	TESTOVANÁ LÁTKA (KÓD) MIC/IC80 /IC50 µmol.l-1		
		STZ-IN	STZ-NI	STZ-PZ
CA	24h	> 500	> 500	> 500
	48h	> 500	> 500	> 500
CT	24h	> 500	> 500	> 500
	48h	> 500	> 500	> 500
CK	24h	> 500	> 500	> 500
	48h	> 500	> 500	> 500
CG	24h	> 500	> 500	> 500
	48h	> 500	> 500	> 500
TA	24h	> 500	> 500	> 500
	48h	> 500	> 500	> 500
AF	24h	> 500	> 500	> 500
	48h	> 500	> 500	> 500
AC	24h	> 500	> 500	> 500
	48h	> 500	> 500	> 500
TM	72h	> 500	> 500	> 500
	120h	> 500	> 500	> 500

Z látek uvedených v tabulce č. 12 neprojevila ani jedna účinnost na některý z testovaných kmenů. Všechny byly rozpustné už při přidání 1. ekvivalentu DMSO (nevysrážely se ani v růstovém médiu), tudíž byla u všech nejvyšší testovaná koncentrace 500 µmol.l^{-1}.

9.4 Deriváty rhodaninu

Tabulka 13: Výsledky – deriváty rhodaninu

KMEN (KÓD)	ID	TESTOVANÁ LÁTKA (KÓD) MIC/IC80 /IC50 µmol.l-1	
		TZK-4	TZK-5
CA	24h	> 500	> 500
	48h	> 500	> 500
CT	24h	> 500	> 500
	48h	> 500	> 500
CK	24h	> 500	> 500
	48h	> 500	> 500
CG	24h	> 500	> 500
	48h	> 500	> 500
TA	24h	> 500	> 500
	48h	> 500	> 500
AF	24h	> 500	> 500
	48h	> 500	> 500
AC	24h	> 500	> 500
	48h	> 500	> 500
TM	72h	> 500	> 500
	120h	> 500	> 500

Ani jeden z derivátů rhodaninu neprojevil antifungální aktivitu na některou z testovaných mikromycet. U obou látek byla nejvyšší testovaná koncentrace 500 µmol.l^{-1}.

9.5 Ostatní látky

Tabulka 14: Výsledky – ostatní látky

KMEN (KÓD)	ID	TESTOVANÁ LÁTKA (KÓD) MIC/IC80 /IC50 µmol.l-1		
		GP-135	GP-137	5N-U
CA	24h	>125	**250**	>125
	48h	>125	**250**	>125
CT	24h	>125	**500**	>125
	48h	>125	**500**	>125
CK	24h	>125	**250**	>125
	48h	>125	**250**	>125
CG	24h	>125	**500**	>125
	48h	>125	**500**	>125
TA	24h	>125	**125**	>125
	48h	>125	**250**	>125
AF	24h	>125	**250**	>125
	48h	>125	**500**	>125
AC	24h	>125	**250**	>125
	48h	>125	**250**	>125
TM	72h	>125	**31,25**	>125
	120h	>125	**62,5**	>125

Látky GP-135 a 5N-U byly rozpustné až po přidání 3. ekvivalentu DMSO (nebo se vysrážely a museli jsme přidat 3 ekvivalenty růstového média) a testované koncentrace neměly antifugální účinek. Látka GP-137 působila jako jediná ze všech testovaných látek na všechny mikromycety. Působila však pouze při vyšších koncentracích – 500, 250 a 125 µmol.l^{-1}. Pouze u TM účinkovala při koncentraci 31,25 µmol.l^{-1} (po 72 h inkubaci) a při 62,5 µmol.l^{-1} (po 120 h inkubaci).

10. DISKUZE

V průběhu několika posledních desítek let došlo k výraznému zvýšení počtu mykotických onemocnění, především se to týká nebezpečných systémových invazivních mykóz. Zvýšená incidence není jediným problémem, současně se tato onemocnění výrazně podílejí na morbiditě a mortalitě u imunoalterovaných pacientů. Existuje celá řada rizikových faktorů, které souvisejí s výskytem těchto onemocnění. Jsou to AIDS, neutropenie, či jiné imunodeficience, metabolické poruchy a spousty dalších. Je důležité si uvědomit, že zvýšená incidence těchto onemocnění souvisí i s pokroky v medicíně, např. s používáním nových chemoterapeutik, širokospektrých antimykotik, s katetrizací a transplantacemi (Buchta a Doležal 2006). Dalším významným problémem je nárůst rezistence vůči antimykotikům.

Díky zvyšujícímu počtu mykotických infekcí, omezenému množství účinných systémových antimykotik a zvyšující se rezistenci dochází v současné době k intenzivnímu výzkumu v oblasti nových antimykotik. Farmaceutická fakulta je jedno z pracovišť, které se tímto výzkumem zabývá. Vývoj nových antimykotik je obtížný. Ve srovnání s antibiotiky máme na trhu jen velmi omezené množství účinných preparátů. Mykotická buňka je stejně jako savčí buňka eukaryotická, což znamená, že je obtížné najít místo, kde by mělo antimykotikum působit, aniž by poškodilo buňku hostitele (savčí). Velká část antimykotik působí v nějakém konkrétním místě dráhy syntézy ergosterolu. Zvyšující se počty rezistencí vedly k tomu, že došlo k rozvoji nových metod hodnocení citlivosti a standardizaci těchto postupů (Mallátová a kol. 2011).

Do testování bylo zařazeno celkem 70 látek, tyto látky byly na základě jejich chemické struktury rozděleny do 5 skupin. K testování antifungální aktivity byla využita mikrodiluční bujónová metoda. Antifungální aktivita látek byla testována celkem na 8 různých druzích kvasinek a vláknitých hub.

První skupinou látek byly deriváty salicylanilidových *N*-monosubstituovaných a *N,N*-disubstituovaných karbamátů a thiokarbamátů. Deriváty salicylanilidu jsou širokou skupinou látek se širokým spektrem účinku. Působí na *Mycobacterium tuberculosis*, netuberkulózní mykobakterie, bakterie, kvasinky a plísně (Krátký

a kol. 2014). Celkem bylo v této skupině 44 látek. Všechny z těchto látek měly ve své struktuře salicylanilid. Samotný salicylanilid vykazoval při dřívějším testování slabou antifungální aktivitu vůči všem testovaným kmenům (Žmolová 2013). Navázáním různých substituentů může být dosaženo zvýšené antifungální aktivity. Díky tomu se jedná o skupinu látek, které je věnována velká pozornost.

Látky SAL-1G, SAL-2E, SAL-2G, SAL-3E, SAL-4F, SAL-4G, SAL-4K, SAL-4L a SAL-5F (uvedené v seznamu testovaných látek) se nakonec netestovaly, protože se nerozpustily v DMSO, nebo se vysrážely v růstovém médiu. Účinných látek bylo v této skupině celkem 18, většina z nich byla účinná pouze při vysokých koncentracích. Téměř všechny látky z této skupiny, které projevily nějaký antifungální efekt, byly účinné na jediného zástupce dermatofyt – *Trichophyton mentagrophytes*. Rozdíly v MIC byly obrovské. Nejúčinnější byly látky SAL-1L, SAL-1M a SAL-1N, inhibice růstu *Trichophyton mentagrophytes* byla už při koncentraci 1,95 $\mu mol.l^{-1}$. Na TM působily dále velmi dobře i látky SAL-1J a SAL-4M, jejich MIC bylo 3,9 $\mu mol.l^{-1}$. Látka s označením SAL-1N působila velmi dobře i na kvasinky *Candida albicans* a *Candida krusei*. Hodnoty MIC byly 3,9 $\mu mol.l^{-1}$ a 7,81 $\mu mol.l^{-1}$. Nejširší spektrum z této skupiny měla látka s kódem SAL-4M. Spektrum zahrnovalo všechny testované kmeny, kromě kvasinky *Candida tropicalis*. MIC se lišila v závislosti na testovaném kmenu, rozmezí bylo od 3,9 – 125 $\mu mol.l^{-1}$. Při nejnižších koncentracích působila tato látka na CA, TM a AC.

Co se týká vlivu jednotlivých substituentů na biologickou aktivitu (Obr. 18), tak se jako účinnější ukázal být chlor navázaný jako substituent R^1. Látky s označením SAL-1 až SAL-4 (tj. deriváty halogenovaných salicylanilidů) vykazují větší aktivitu ve srovnání s látkami s kódem SAL-5, které mají místo chloru navázán vodík.

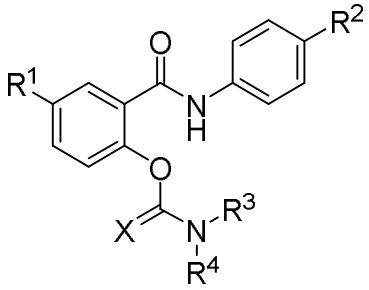
V poloze R^2 už bylo hodnoceno více možných substituentů. Na anilinovém jádře může být navázán v poloze 4 chlor (deriváty SAL-1), brom (SAL-2), fluor (SAL-3), trifluormethyl (SAL-4) nebo vodík (SAL-5). Nejvýhodnějším substituentem pro antifungální aktivitu se ukázal opět chlor, následovaný trifluormethylem. Bromované a fluorované deriváty mají obdobnou účinnost. Deriváty obsahující v poloze R^2 vodík jsou opět *in vitro* nejméně účinné.

Za X může být ve struktuře dosazen kyslík, pak se jedná o karbamáty (SAL – YH, kdy Y je 1 až 5) nebo síra – thiokarbamáty (SAL-YI). I když řada těchto derivátů byla

antifungálně inaktivní, na základě porovnání těchto dvojic: SAL-3 a SAL-2 se karbamáty (X = O) zdají výhodnější.

V případě R^3 a R^4 byla na karbamátový (příp. thiokarbamátový) dusík navázána celá řada různých substituentů – methyl, ethyl, fenyl, benzyl, fenylalkyl, cyklické zbytky. Porovnáním *N*-monosubstituovaných karbamátů a *N,N*-disubstituovaných karbamátů jsme zjistili, že výraznější antifungální aktivitu mají karbamáty *N*-monosubstituované (R^3 = H). U *N*-monosubstituovaných karbamátů (SAL-YL až SAL-YN), nelze jednoznačně říci, jaký je vliv prodlužujícího se řetězce mezi dusíkem a benzenovým jádrem. U dvou skupin sloučenin (SAL-1, SAL-5) s prodlužujícím se alkylovým řetězcem aktivita klesá, u SAL-4 je tomu však naopak. U SAL-2 a SAL-3 nelze rozhodnout, neboť minisérie nebyla zhodnocena kompletně. V případě *N, N*-disubstituovaných karbamátů jsou výhodnější „otevřené“ deriváty (SAL-YH až SAL-YK). U *N,N*-disubstituovaných cyklických karbamátů nebylo zaznamenáno, že by rozšíření cyklu a záměna uhlíku za kyslík nějak ovlivňovala antifungální aktivitu; ve všech případech se jednalo o inaktivní sloučeniny. V případě *N,N*-disubstituovaných karbamátů je nejvýhodnější kombinace substituentů R^3 a R^4 ethyl, fenyl (SAL-YJ) a methyl, benzyl (SAL-YK). Látky s kódem SAL-YH měly ve své struktuře dva ethyly (R^3= R^4= ethyl) a byla to kombinace nejméně výhodná.

Salicylanilidové karbamáty SAL-1G, SAL-2E, SAL-2G, SAL-3E, SAL-4F, SAL-4G, SAL-4K, SAL-4L a SAL-5F nebyly rozpustné v DMSO, nebo se vysrážely v růstovém médiu. Lze tedy souhrnně konstatovat, že inkorporace karbamátového dusíku do uzavřeného cyklu (jde tedy o cyklické karbamáty) a přítomnost trifluormethylu na anilinovém jádře negativně ovlivňuje rozpustnost látek, a tím znemožňuje stanovení antifungální aktivity. V případě CF_3 skupiny se může jednat o důsledek zvýšené lipofility ve srovnání s dalšími substituenty (H, F, Cl, Br).

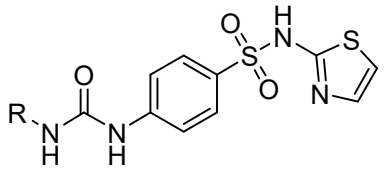


Obrázek 18: Obecný vzorec – *N*-monosubstituované a *N,N*-disubstituované karbamáty a thiokarbamáty

Krátký a kol. (2014) připravil salicylanilidové *N,N*-disubstituované karbamáty a thiokarbamáty. Antifungální aktivita těchto sloučenin byla testována pomocí mikrodiluční bujónové metody a kmeny pro testování byly využity stejné, jako v této diplomové práci. Bylo testováno pět mateřských salicylanilidů (SAL-1 až SAL-5), 15 salicylanilidových karbamátů (SAL-XA, C, D; X je 1,2,3,4 a 5) a 5 thiokarbamátů (SAL-XB). Na základě sledování vztahu mezi strukturou a aktivitou se zjistilo, že výraznější aktivitu mají thiokarbamáty oproti karbamátům. Dalším velmi důležitým zjištěním bylo, že přítomnost fenylu na karbamátovém dusíku brání *in vitro* antimykotickému působení. Nejvýhodnějším substituentem na anilinovém jádře byl chlor a za ním brom. Nejúčinnější byly salicylanilidové karbamáty SAL-1B (R^1= Cl, R^2= Cl, R^3= CH_3 a R^4= CH_3) SAL-2B (R^1= Cl, R^2= Br, R^3= CH_3 a R^4= CH_3). Antifungálně působily na *Trichophyton mentagrophytes* už při koncentraci 1,95 µmol.l^{-1}.

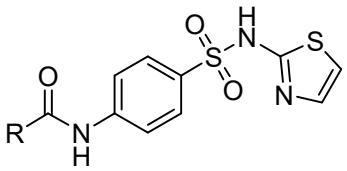
Druhou skupinou látek byly sulfonamidové močoviny. V této skupině bylo celkem 17 látek. Jedinou účinnou látkou byla STZ-Ben. Tento derivát měl široké spektrum účinku. Působil na všechny testované kmeny, kromě AC a AF. Hodnota MIC se bohužel pohybovala v rozmezí 125 a 250 µmol.l^{-1} , což znamená, že se jedná o látku málo účinnou. Právě vazba benzylu (Obr. 19) na N-3 močovinu měla oproti cyklohexylu, fenylu, fenethylu a adamantan-1-ylu pozitivní vliv na antifungální aktivitu. Ani alkylový řetězec v homologické řadě methyl až decyl neovlivňoval antifungální účinnost. Látky STZ-11 a STZ-12 nebyly rozpustné v DMSO nebo se vysrážely v růstovém médiu, pravděpodobně vlivem vystupňované lipofility dané přítomností dlouhého uhlíkatého řetězce (undecyl, dodecyl).

Žmolová (2013) testovala látky odvozené od sulfonamidu a převážná část z nich byla účinná. Bylo to díky tomu, že měly ve své struktuře navázaný salicylanilid, který mám sám o sobě slabou antifungální aktivitu. Samotné deriváty sulfonamidů jsou zkoumány především pro jejich antibakteriální účinky.



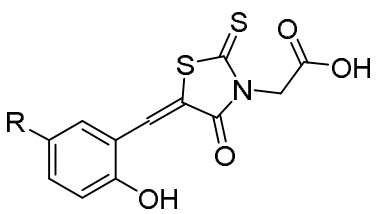
Obrázek 19: Obecný vzorec – sulfoamidové močoviny

Další skupinou látek byly amidy odvozené od sulfathiazolu (Obr. 20). Tato skupina látek měla pouze tři zástupce. Žádný z navázaných heterocyklických substituentů (pyridin-3-yl, pyridin-4-yl, pyrazin-2-yl) neovlivnil pozitivně aktivitu. Nízká až nulová antifungální aktivita derivátů sulfathiazolu (močovin i amidů) není příliš překvapivá, neboť sulfathiazol je léčivo užívané pro svoje antibakteriální, nikoli antimykotické účinky.



Obrázek 20: Obecný vzorec – amidy odvozené od sulfathiazolu

Druhou skupinou látek, kde neprojevila žádná látka účinnost, byly deriváty rhodaninu. Tato skupina byla nejméně početná, měla pouze dva zástupce. Sloučeniny se mezi sebou lišily substituentem navázaným na benzenovém kruhu v poloze 5 (Obr. 21). U obou látek byl substituentem halogen. TZK-4 měla navázaný v poloze 5 chlor a TZK-5 brom.



Obrázek 21: Obecný vzorec – deriváty rhodaninu

Poslední skupina látek byla nazvaná jako ostatní. Patří sem látky s kódem GP-133, GP-135, GP-137 a 5N-U. Nitrosalicylanilidy (GP-X) se mezi sebou lišily polohou nitro skupiny. Nitro skupina byla navázána buď v poloze 3, 4 nebo 5 na salicylovém jádře. Jak je slyšet z názvu, tak i tyto látky mají ve své struktuře slabě antifungálně účinný salicylanilid. Jako jediný vykazoval aktivitu derivát s kódem GP-137, který měl nitroskupinu v poloze 5. Měl nejširší spektrum účinku a jako jediný působil na všechny testované kmeny. Bohužel se jedná o derivát slabě účinný, MIC bylo v rozmezí 125 – 500 $\mu mol.l^{-1}$. Pouze na TM působil při nižší koncentraci – 31,25 $\mu mol.l^{-1}$ (po 72 hodinové inkubaci) a 61,5 $\mu mol.l^{-1}$ (po 120 hodinové inkubaci). Naopak přesun nitroskupiny do polohy 4 měl negativní vliv na rozpustnost látky. Látka s kódem 5N – U byla derivátem močoviny a nebyl u ní zaznamenán nějaký antifungální účinek.

Nejcitlivějším kmenem byl *Trichophyton mentagrophytes*. Působila na něj většina ze všech účinných látek a některé dokonce i ve velmi nízkých koncentracích. Naopak je potřeba věnovat větší pozornost kvasince *Candida tropicalis* a plísni *Aspergillus fumigatus*. Jedná se o kmeny, které byly vůči testovaným látkám nejrezistentnější.

Vývoj nových léčiv je velice složitý proces, který je finančně a časově náročný. Vývoj jednoho léčiva zabere v průměru 12 – 15 let a nově jej lze rozdělit do čtyř základních fází: *in silico*, *in vitro, in vivo* a *in homo* (Součková a kol. 2015). Právě samotné hodnocení antifungální aktivity látek je jedním z mnoha kroků při vývoji nových antimykotik.

11. ZÁVĚR

Pomocí mikrodiluční bujónové metody jsme testovali potenciální antifungální aktivitu celkem u 70 látek. Tyto látky byly na základě jejich podobnosti v chemické struktuře rozděleny 5 skupin. Testování bylo prováděno na 8 různých kmenech kvasinek a vláknitých hub.

U dvou z testovaných skupin látek nebyla zaznamenána antifungální aktivita. Byly to deriváty rhodaninu a amidy odvozené od sulfathiazolu.

Z rozsáhlé skupiny sulfoamidových močovin účinkovala pouze jedna látka. Byla to látka s kódem STZ – Ben.

Ve skupině salicylanilidových *N*-monosubstituovaných a *N,N*-disubstituovaných karbamátů a thiokarbamátů bylo nejvíce testovaných látek. Velká část z těchto látek neměla žádný účinek nebo účinkovala jen slabě. V této skupině se však objevily i látky účinné, které působily ve velice malých koncentracích. Byly to SAL-1J, SAL-1L, SAL-1M, SAL-1N a SAL-4M. Působily už při koncentraci 3,9 µmol.l-1 a některé dokonce i při koncentraci 1,95 µmol.l-1.

Látka s nejširším spektrem účinku byla zařazena do poslední skupiny látek (ostatní). Tato látka měla kód GP-137 a inhibovala růst všech testovaných kmenů pouze při vysokých koncentracích.

Nejcitlivějším z testovaných kmenů byl *Trichophyton mentagrophytes*. Naopak nejmenší účinnost měla testovaná antimykotika na kvasinku *Candida tropicalis* a na plíseň *Aspergillus fumigatus.*

12. SEZNAM TABULEK

Tabulka 1: Salicylanilidové *N*-monosubstituované a *N,N*-disubstituované karbamáty a thiokarbamáty 48
Tabulka 2: Sulfoamidové močoviny (deriváty sulfathiazolu) 58
Tabulka 3: Amidy odvozené od sulfathiazolu 60
Tabulka 4: Deriváty rhodaninu 61
Tabulka 5: Ostatní látky 61
Tabulka 6: Výsledky – salicylanilidové *N*-monosubstituované a *N,N*-disubstituované karbamáty a thiokarbamáty I. 67
Tabulka 7: Výsledky – salicylanilidové *N*-monosubstituované a *N,N*-disubstituované karbamáty a thiokarbamáty II. 68
Tabulka 8: Výsledky – salicylanilidové *N*-monosubstituované a *N,N*-disubstituované karbamáty a thiokarbamáty III. 69
Tabulka 9: Výsledky – salicylanilidové *N*-monosubstituované a *N,N*-disubstituované karbamáty a thiokarbamáty IV 70
Tabulka 10: Výsledky – sulfoamidové močoviny (deriváty sulfathiazolu) I. 71
Tabulka 11: Výsledky – sulfoamidové močoviny (deriváty sulfathiazolu) II. 72
Tabulka 12: Výsledky – amidy odvozené od sulfathiazolu 73
Tabulka 13: Výsledky – deriváty rhodaninu 74
Tabulka 14: Výsledky – ostatní látky 75

13. SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1: Mikroskopický vzhled *Candida albicans* 14
Obrázek 2: Kolonie *Candida albicans* 15
Obrázek 3: Kolonie *Candida tropicalis* 18
Obrázek 4: Mikromorfologie *Candida tropicalis* 18
Obrázek 5: *Candida krusei* na Sabouraudově glukózovém agaru 19
Obrázek 6: Mikromorfologie *Candida krusei* 19
Obrázek 7: Kolonie *Candida glabrata* na Mueller-Hinton agaru s 2% glukózy a metylenovou modří 20
Obrázek 8: Mikroskopický obraz *Candida glabrata* 20
Obrázek 9: Mikroskopický vzhled *Trichosporon asahii* 22
Obrázek 10: Kolonie *Trichosporon asahii* na Sabouraudově glukózovém agaru 22
Obrázek 11: Kolonie *Aspergillus fumigatus* 23
Obrázek 12: Mikromorfologie *Aspergillus fumigatus* 24
Obrázek 13: Kolonie *Absidia corymbifera* 25
Obrázek 14: Mikromorfologie *Absidia corymbifera* 26
Obrázek 15: Makroskopický vzhled *Trichophyton mentagrophytes* 27
Obrázek 16: Mikroskopický vzhled *Trichophyton mentagrophytes* 27
Obrázek 17: Kvasinky rodu *Candida* na ChromID Candida agaru 39
Obrázek 18: Obecný vzorec – *N*-monosubstituované a *N,N*-disubstituované karbamáty a thiokarbamáty 79
Obrázek 19: Obecný vzorec – sulfoamidové močoviny 80
Obrázek 20: Obecný vzorec – amidy odvozené od sulfathiazolu 80
Obrázek 21: Obecný vzorec – deriváty rhodaninu 80

14. POUŽITÁ LITERATURA

ALEXANDER, B., D. a PFALLER, M. Contemporary Tools for the Diagnosis and Management of Invasive Mycoses. In: *Oxford Journals* [online]. 2006, Vol. 43, pp. 15-27. ISSN 1537-6591. Citováno [2. 11. 2015]. Dostupné z: http://cid.oxfordjournals.org/content/43/Supplement_1/S15.full

BECKER, P., T., DE BEL, A., MARTINY, D., RANGUE, S., PIARROUX, R., CASSAGNE, C., DETANDT, M. a HENDRICKX, M. Identification of filamentous fungi isolates by MALDI-TOF mass spectrometry: clinical evaluation of an extended reference spectra library. In: *Medical Mycology* [online]. 2014, Vol. 52, No. 8, pp. 826-834. ISSN 1460-2709. Citováno [11. 11. 2015]. Dostupné z: http://mmy.oxfordjournals.org/content/52/8/826.long

BEDNÁŘ, M., FRAŇKOVÁ, V., SCHINDLER, J., SOUČEK, A., VÁVRA, J. a kol. *Lékařská mikrobiologie*. Praha: Marvil, 1996.

BUCHTA, V., SLEZÁK, R., ŠPAČEK, J., KOŠŤÁLOVÁ, M., VEJSOVÁ, M. a DOLEŽAL, M. Současné možnosti léčby kožních a slizničních mykóz. In: *Klinická farmakologie a farmacie* [online]. 2008, Vol. 22, No. 2, pp. 72-75. ISSN 1803-5353. Citováno [26. 10. 2015]. Dostupné z: http://www.klinickafarmakologie.cz/pdfs/far/2008/02/06.pdf

BUCHTA, V., JÍLEK, P., HORÁČEK, J. a HORÁK, V. *Základy mikrobiologie a parazitologie pro farmaceuty.* Praha: Karolinum, 1998. ISBN 80-7184-565-5.

DAGENAIS, T. a KELLER, N., P. Pathogenesis of *Aspergillus fumigatus* in Invasive *Aspergillosis*. In: *Clinical Microbiology Reviewes* [online]. 2009, Vol. 22, No. 3, pp. 447-465. ISSN 1098-6618. Citováno [19. 2. 2016]. Dostupné z: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2708386/

DIAMANTOVÁ, D. Léčba mykóz. In: *Interní medicína- mezioborové přehledy* [online]. 2003, Vol. 5, pp. 8-10. Citováno [26. 10. 2015]. Dostupné z: http://www.internimedicina.cz/pdfs/int/2003/10/14.pdf

DOLEŽAL, M. a BUCHTA, V. Aktuální pohled na skupiny antimykotik. In: *Praktické lékárenství* [online]. 2006, Vol. 1, pp. 10-14. ISSN 1803-5329. Citováno [29. 10. 2015]. Dostupné z: http://www.praktickelekarenstvi.cz/pdfs/lek/2006/01/02.pdf

HABER, J. Echinokandiny- nová skupina antimykotik. In: *Remedia* [online]. 2008, Vol. 18, No. 4, pp. 297-309. ISSN 2336-3541. Citováno [27. 10. 2015]. Dostupné z: http://www.remedia.cz/Okruhy-temat/Mikrobiologie-a-infekcni-choroby/Echinokandiny-nova-skupina-antimykotik/8-1c-jH.magarticle.aspx

HADAŠOVÁ, E. Lipozomální lékové formy. In: *Remedia* [online]. 2006, Vol. 16, No. 4, pp. 433-436. ISSN 2336-3541. Citováno [22. 2. 2016]. Dostupné z: http://www.remedia.cz/Clanky/Lekove-formy/Lipozomalni-lekove-formy/6-H-gC.magarticle.aspx

HAMAL, P., JANDOVÁ, B. a MENCL, K. Identifikace kvasinek z klinického materiálu. Přehled současných možností se zaměřením na fenotypové metody a komerční produkty. In:

Postgraduální medicína [online]. Příloha 5/2010. ISSN 1212-4184. Citováno [10. 11. 2015]. Dostupné z: http://zdravi.e15.cz/clanek/postgradualni-medicina-priloha/identifikace-kvasinek-z-klinickeho-materialu-prehled-soucasnych-moznosti-se-zamerenim-na-fenotypove-metody-a-komercni-produkty-455847

HENDRYCHOVÁ, T. a MALÝ, J. Volně prodejná antimykotika. In: *Praktické lékárenství* [online]. 2011, Vol. 7, No. 3, pp. 132-137. ISSN 1803-5329. Citováno [29. 10. 2015]. Dostupné z: http://www.praktickelekarenstvi.cz/pdfs/lek/2011/03/09.pdf

HESLOP, D., O., NYI, M., P., ABBOTT, S., P., RAINFORD, L., E., CASTLE, D., M., a COARD, K., C., M. Disseminated Trichosporonosis in a Burn Patient: Meningitis and Cerebral Abscess Due to *Trichosporon asahii*. In: *Journal of Clinical Mikrobiology* [online]. 2011, Vol. 49, No. 12, pp. 4405-4408. ISSN 1098-660x. Citováno [21. 10. 2015]. Dostupné z: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3232981/

HORÁK, P. Specifická antimykotika a jejich použití u vybraných patologických stavů. In: *Interní medicína pro* praxi [online]. 2011, Vol. 13, No. 4, pp. 171-175. ISSN 1803-5256. Citováno [26. 10. 2015]. Dostupné z: http://www.internimedicina.cz/pdfs/int/2011/04/06.pdf

CHUNG, Y., L., NEWPORT, G., MURILLO, L., A., JONES, T., SCHERER, S., DAVIS, R., W. a AGABIAN, N. Metabolic specialization associated with phenotypic switching in *Candida albicans*. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* [online]. 2002, Vol. 99, No. 23, pp. 14907-14912. ISSN 1091-6490. Citováno [14. 10. 2015]. Dostupné z: http://www.pnas.org/content/99/23/14907.full

JACOBSEN, ID. A kol. *Candida albicans* dimorphism as a therapeutical target. In: *Expert review of anti-infective therapy* [online]. 2012, Vol. 10, No. 1, pp. 85-93. ISSN 1744-8336. Citováno [14. 10. 2015]. Dostupné z: http://search.proquest.com/docview/910108928/fulltext?accountid=15618

JÍLEK, P., BUCHTA, V., KUBANOVÁ, P. a FORSTL, M. *Úvod do mikrobiologických vyšetřovacích metod ve zdravotnictví.* Praha: Karolinum, 2002. ISBN 80-246-0459-0.

KLABAN, V. *Ilustrovaný mikrobiologický slovník*. Praha: Galén, 2005. ISBN 80-7262-341-9.

KOTHAVADE, R. J., KURA, M. M., VALAND, A., G. a PANTHAKI, M. H. *Candida tropicalis:* its prevalence, pathogenicity and increasing resistance to fluconazole. In: *Journal of Medical Microbiology* [online]. 2010, Vol. 59, pp. 873-880. ISSN 1473-5644. Citováno [16. 10. 2015]. Dostupné z: http://jmm.microbiologyresearch.org/content/journal/jmm/10.1099/jmm.0.013227-0;jsessionid=27fv6xt3yjmun.x-sgm-live-02#tab2

KRÁTKÝ M., VOLKOVÁ M., NOVOTNÁ A., TREJTNAR F., STOLAŘÍKOVÁ J. a VINŠOVÁ J**.** Synthesis and Biological Activity of New Salicylanilide *N*,*N*-Disubstituted Carbamates and Thiocarbamates. In: *Bioorganic and Medical Chemistry*. 2014**,** Vol. 22, No. 11, pp. 4073-4082. ISSN 0968-0896.

KUKLOVÁ, I. Naftifin v léčbě kožních mykóz. In: *Dermatologie pro praxi* [online]. 2015, Vol. 9, No. 2, pp. 73-76. ISSN 1803-5337. Citováno [29. 10. 2015]. Dostupné z: http://www.dermatologiepropraxi.cz/pdfs/der/2015/02/07.pdf

LINCOVÁ, D., FARGHALI, H. a kol. *Základní a aplikovaná farmakologie*. 2. doplněné a přepracované vydání. Praha: Galén, 2007. ISBN 978-80-7262-373-0.

MALLÁTOVÁ, N. Stanovení citlivosti mikromycet k antimykotikům a interpretace výsledků. In: *Klinická mikrobiologie a infekční lékařství* [online]. 2007, Vol. 13, No. 4, pp. 151-155. ISSN 1211-264X. Citováno [16. 11. 2015]. Dostupné z: http://kmil.trios.cz/Predchozi/kmil07044c.htm

MALLÁTOVÁ, N., HAMAL, P., KOCMANOVÁ, I., BUCHTA, V. a MENCL, K. Testování citlivosti mikromycet k antimykotikům in vitro u imunosuprimovaných pacientů – doporučení odborníků s podporou CELL a SML ČLS JEP. In: *Postgraduální medicína* [online]. Příloha 5/2011. ISSN 1212-4184. Citováno [16. 11. 2015]. Dostupné z: http://zdravi.e15.cz/clanek/postgradualni-medicina-priloha/testovani-citlivosti-mikromycet-k-antimykotikum-in-vitro-u-imunosuprimovanych-pacientu-doporuceni-odborniku-s-podporou-cell-a-slm-cls-jep-462246

MALLÁTOVÁ, N. a MENCL, K. Laboratorní diagnostika invazivní kandidózy. In: *Postgraduální medicína* [online]. Příloha 5/2010. ISSN 1212-4184. Citováno [22. 2. 2016]. Dostupné z: http://zdravi.e15.cz/clanek/postgradualni-medicina-priloha/laboratorni-diagnostika-invazivni-kandidozy-455845

MAVES, R., C. Trichosporon infections. In: *The Medscape Journal of Medicine* [online]. 2015. ISSN 1934-1997. Citováno [20. 10. 2015]. Dostupné z: http://emedicine.medscape.com/article/230705-overview#showall

MULLA, A., F., SHAH, A., A., KOSHY, A., V. a MAYANK, M. Laboratory diagnosis of fungal infections. In: *Universal Research Journal of Dentistry* [online]. 2015, Vol. 5, No. 2, pp. 49-53. ISSN 2250-9725. Citováno [2. 11. 2015]. Dostupné z: http://www.urjd.org/article.asp?issn=2249-9725;year=2015;volume=5;issue=2;spage=49;epage=53;aulast=Mulla

PATERSON, P., J., MARSHAL, S., R., SHAW, B., KENDRA, J., R., ETHEL, M., KIBBLER, C., C., PRENTICE, H., G. a POTTER, M. Fatal invasive cerebral *Absidia corymbifera* infection following bone marrow transplantation. In: *Bone Marrow Transplantation* [online]. 2000, Vol. 26, No. 6, pp. 701-703. ISSN 1476-5365. Citováno [19. 2. 2016]. Dostupné z: http://www.nature.com/bmt/journal/v26/n6/full/1702575a.html

POSTERARO, B., DE CAROLIS, E., VELLA, A. a SANGUINETTI, M. MALDI-TOF mass spectrometry in the clinical mycology laboratory: identification of fungi and beyond. In: *Expert Review of Proteomics* [online]. 2013, Vol. 10, No. 2, pp. 151-164. ISSN 1744-8387. Citováno [11. 11. 2015]. Dostupné z: http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1586/epr.13.8#abstract

RÁČIL, Z., KOCMANOVÁ, I., WAGNEROVÁ, B., LENGEROVÁ, M. a MAYER, J. Časná diagnostika invazivních mykotických infekcí u hematoonkologických nemocných pomocí serologických metod. In: *Vnitřní lékařství* [online]. 2007, Vol. 53, No. 9, pp. 990-999. ISSN 1801-7592. Citováno [22. 2. 2016]. Dostupné z: http://www.prolekare.cz/pdf?ida=vl_07_09_20.pdf

RODRIGUES, C., F., SILVA, S. a HENRIQUES, M. *Candida glabrata*: A review of its features and resistence. In: *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases* [online]. 2014,

Vol. 33, No. 5, pp. 673-688. ISSN1435-4373. Citováno [3. 11. 2015]. Dostupné z: http://link.springer.com/article/10.1007/s10096-013-2009-3/fulltext.html

ROZSYPAL, H., HOLUB, M. a KOSÁKOVÁ, M. *Infekční nemoci ve standardní a intenzivní péči.* Praha: Karolinum, 2013. ISBN 978-80-246-2197-5.

ROZSYPAL, H. Systémová antimykotika. In: *Klinická farmakologie a farmacie* [online]. 2008, Vol. 22, No. 1, pp. 40-44. ISSN 1803-5353. Citováno [29. 10. 2015]. Dostupné z: http://www.klinickafarmakologie.cz/pdfs/far/2008/01/09.pdf

SOUČKOVÁ, L., KOSTKOVÁ, H. a DEMLOVÁ, R. Jak se vyvíjí nový lék. In: *Praktické lékárenství* [online]. 2015, Vol. 11, No. 4, pp. 144-147. ISSN 1803-5329. Citováno [7. 3. 2016]. Dostupné z: http://www.praktickelekarenstvi.cz/pdfs/lek/2015/04/07.pdf

VOTAVA, M. a kol. *Lékařská mikrobiologie vyšetřovací metody*. Brno: Neptun, 2010. ISBN 978-80-86850-04-8.

VOTAVA, M. a kol. *Lékařská mikrobiologie speciální*. Brno: Neptun, 2003. ISBN 80-902896-6-5

VOTAVA, M. a kol. *Lékařská mikrobiologie II. Přehled vyšetřovacích metod v lékařské mikrobiologii*. Brno: Masarykova univerzita, 2000. ISBN 80-210-2272-8

ŽMOLOVÁ, M. *Vyhodnocení aktivity potenciálně antifungálních látek pomocí mikrodiluční bujónové metody*. Hradec Králové: FAF UK 2013. Diplomová práce, Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta, Katedra biologických a lékařských věd.

INTERNET

ANSARI, M., AYATOLLAHI, A. a ESLAMINEJAD, T. Molecular Techniques and their Use in the Diagnosis of Mycoses. In: *E - science cental* [online]. Omics group e – books. c2014 [citováno 10. 11. 2015]. Dostupné z: http://www.esciencecentral.org/ebooks/fungi-and-nosocomial/molecular-techniques-diagnosis-mycoses.php

Fungal infections. In: *Life-worldwide* [online]. Leading international fungal education. [citováno 16. 10. 2015]. Dostupné z: http://www.life-worldwide.org/fungal-diseases/yeasts

Mycology. In: *Mikrobiology book* [online]. Univerzity of South California School of Medicine. c2014 [citováno 6. 11. 2015]. Dostupné z: http://www.microbiologybook.org/book/mycol-sta.htm

Mycology online. In: *Mycology Adelaide* [online]. The Univerzity of Adelaide. c2015 [citováno 13. 10. 2015]. Dostupné z: http://www.mycology.adelaide.edu.au/Fungal_Descriptions/

NAYAK, S., SHENOY, A. a NAYAK, K. Laboratory diagnosis on fungal infections- a review. In: *Guident* [online]. c2011-2015. Citováno [6. 11. 2015]. Dostupné z: http://www.guident.net/oral-pathology/laboratory-diagnosis-on-fungal-infections-a-review.html

TANKESHWAR Araya. Common Fungal Culture Media and their uses. In: *Microbe online* [online]. 2014 [citováno 16. 10. 2015]. Dostupné z: http://microbeonline.com/common-fungal-culture-media-uses/