Farmacie 2-10 3.5.2010 15:19 Str. 79
proLékaře.cz | 25.4.2025

Identifikace a stanovení citlivosti kvasinek rodu *Candida* vzhledem k optimalizaci uvolňování ciclopiroxolaminu z mukoadhezivních orálních tablet

MAŠKOVÁ E.[1], MAŠEK J.[1,2], GAJDZIOK J.[1], RABIŠKOVÁ M.[1]
[1]Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, Farmaceutická fakulta, Ústav technologie léků
[2]Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, Výzkumný ústav veterinárního lékařství, Oddělení farmakologie a toxikologie

Došlo 22. března 2009 / Přijato 30. března 2010

SOUHRN

Identifikace a stanovení citlivosti kvasinek rodu *Candida* vzhledem k optimalizaci uvolňování ciclopiroxolaminu z mukoadhezivních orálních tablet
Orální kandidózy představují u imunodeficientních pacientů obtížně léčitelnou komplikaci s častými recidivami. Mukoadhezivní orální tablety s prodlouženým uvolňováním lokálně působícího antimykotika, např. ciclopiroxolaminu, by mohly přispět k jejich farmakoterapii. Pro efektivní terapii je nutné stanovit koncentraci léčiva, která musí být v ústní dutině zachována, tj. zjistit obsah v lékové formě a rychlost uvolňování léčivé látky z ní. Práce se v teoretické části zabývá základní charakteristikou kvasinek rodu *Candida* a jimi vyvolávanými orálními kandidózami, možnostmi použití standardizovaných metod k jejich průkazu a stanovení citlivosti na antimykotika. Experimentální část se zaměřuje na průkaz, identifikaci a kvantifikaci zastoupení druhu *Candidy* u 536 pacientů pomocí kultivace na chromogenním agaru. U izolovaných i referenčních kmenů kvasinek byla mikrodiluční a diskovou difuzní metodou hodnocena citlivost na ciclopiroxolamin. Ze zjištěných měření vyplynulo, že 65,96 % kandidových infekcí způsobuje kvasinka druhu *Candida albicans*, zatímco ostatní testované druhy se na vzniku tohoto onemocnění podílejí minoritní částí (*C. tropicalis* 12,76 %, *C. glabrata* 10,64 %, *C. parapsilosis* 10,64 %). Mikrodiluční metodou byla stanovena minimální inhibiční koncentrace pro referenční kmeny kandid na 2 µg/ml ciclopiroxolaminu u druhu *Candida glabrata*, na 1 µg/ml u *Candida albicans* a *Candida tropicalis* a 0,5 µg/ml u *Candida parapsilosis*. Teoretický obsah ciclopiroxolaminu v tabletě zajišťující překročení MIC pro testované druhy *Candid* po dobu 8–10 hodin by se při uvážení všech ovlivňujících faktorů měl pohybovat v rozmezí 25–50 mg s rychlostí uvolňování minimálně 0,24 mg/hodin.
Klíčová slova: orální kandidózy – ciclopiroxolamin – mikrobiologický průkaz – stanovení citlivosti patogenu – mukoadhezivní orální tablety

Čes. slov. Farm., 2010; 59, 79–86

SUMMARY

Identification and susceptibility evaluation of *Candida* yeasts due to the optimization of ciclopiroxolamine release from mucoadhesive oral tablets
Oral candidosis represents a difficult and often recidivating complication in immunodeficient patients. Oral mucoadhesive tablets with prolonged release of a locally acting antifungal drug, e.g. ciclopiroxolamine, could contribute to their pharmacotherapy. For efficient therapy, the drug concentration present in oral cavity has to be determined, i.e. the drug content in the dosage form and its release have to be formed. The Theoretical Part of this paper aims to describe the basic characteristics of *Candida* yeasts and their induction of oral candidosis, to the possibilities of using standardized methods for detecting and determining their susceptibility to antifungal agents. The

Adresa pro korespondenci:
PharmDr. Jan Gajdziok
Ústav technologie léků FaF VFU Brno
Palackého 1–3, 612 42, Brno
e-mail: gajdziokj@vfu.cz

Farmacie 2-10 3.5.2010 15:19 Str. 80
proLékaře.cz | 25.9.2025

Experimental Part is focused on the establishment, identification and quantification of *Candida* species represented in 536 patients by cultivation on chromogenic agar. The microdilution and disc diffusion methods have been used for assessing the susceptibility of isolated and reference strains of yeasts to the antifungal drug – ciclopiroxolamine. The obtained results showed that 65.96% of candidosis are caused by *Candida albicans*, however the other tested species of *Candida* involve the disease only in minor part (*C. tropicalis* 12.76%, *C. glabrata* 10.64%, C. *parapsilosis* 10.64%). The microdilution method established the minimum inhibitory concentration for the reference strains of *Candida* to 2 μg/ml of ciclopiroxolamine for *Candida glabrata*, 1 μg/ml for *Candida albicans* and *Candida tropicalis*, and 0.5 μg/ml for *Candida parapsilosis*. Theoretical ciclopiroxolamine content in a tablet providing exceeding MIC for the tested species of *Candida* for 8–10 hours should lie, when considering all influencing factors, in the range of 25–50 mg with a release rate of 0.24 mg per hour at the minimum.
Key words: oral candidosis – ciclopiroxolamine – microbiological establishment – pathogen susceptibility evaluation – oral mucoadhesive tablets

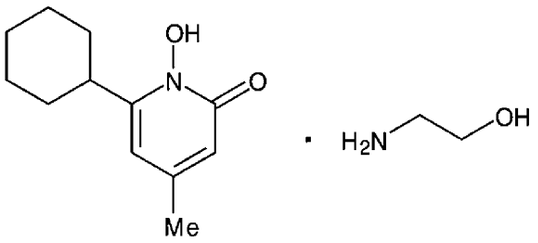
Čes. slov. Farm., 2010; 59, 79–86 *Má*

Úvod

Mezi časté choroby dutiny ústní patří mykotická onemocnění způsobená patogeny rodu *Candida*. Orální kandidózy postihují zejména imunodeficientní pacienty včetně HIV pozitivních. U těchto pacientů se jedná o těžko léčitelnou komplikaci s častými recidivami. V současné době není v České republice registrována žádná léková forma s účinným léčivem pro lokální léčbu orálních kandidóz. Vhodnou lékovou formou by mohly být mukoadhezivní orální tablety obsahující lokálně působící antimykotikum, např. ciclopiroxolamin. Nosnou pomocnou látkou jsou mukoadhezivní polymery (karbomery, lektiny, hypromelosa, oxycelulosa, chitosan atd.), které tvorbou adhezivních viskózních hydrogelových vrstev na povrchu matricových tablet zajišťují jejich přilnutí k bukální sliznici i prodloužené uvolňování léčiva[1–3]. Rychlost uvolňování léčiva a jeho množství, tj. koncentrace v dutině ústní, jsou zásadní podmínkou pro úspěšnou farmakoterapii kandidóz. Z tohoto důvodu se jako první krok stanovily patogeny v ústní dutině u souboru pacientů a následně jejich citlivost na vybrané léčivo.

Ciclopiroxolamin

Ciclopiroxolamin (CP) je aminová sůl cyklohexylhydroxy-methyl-pyridonu (obr. 1). Jedná se o moderní širokospektré léčivo využívané k léčbě povrchových mykotických onemocnění[4]. CP je lipofilní látka o molekulové relativní hmotnosti 268,35[5, 6]. Díky svým fyzikálně-chemickým vlastnostem penetruje snadno do kůže a nehtů[7, 8]. Je velmi málo toxický, není teratogenní, mutagenní ani kancerogenní. Jeho nežádoucí účinky jsou mírné. Jedná se zejména o pálení, svědění a lokální iritace[7–10]. Mechanismus účinku CP spočívá v tlumení celulárního příjmu látek nezbytných pro metabolismus a růst buňky. Ciclopiroxolamin navázáním na buněčné struktury a organely blokuje příjem esenciálních aminokyselin fenylalaninu a lysinu, draslíku a fosfátových iontů do buňky[10, 11]. Dochází i k poškození proteinů důležitých pro replikaci a reparaci DNA[12]. Tyto účinky jsou podpořeny chelatací a tvorbou málo rozpustných komplexů



Obr. 1. Chemická struktura ciclopiroxolaminu[7]

s trojmocnými ionty železa, důležitého kofaktoru bakteriálních a houbových enzymů[4, 9, 10]. Minimální inhibiční koncentrace (MIC) ciclopiroxolaminu pro *Candida albicans* i běžná dermatofyta se pohybuje v rozmezí od 0,98 do 3,9 μg/ml[4, 11]. Ciclopiroxolamin se dnes využívá v lokální terapii vaginálních a kožních kandidóz a dermatofytóz vyvolaných rody *Candida, Epidermophyton, Microsporum, Trichophyton* a *Malassezia furfur* včetně azolrezistentních kmenů *C. glabrata, C. krusei* a *C. guilliermondi*[4, 11, 13]. Účinek je fungistatický, při vyšší koncentraci též fungicidní a sporocidní. Kromě toho účinkuje antimikrobiálně na četné, klinicky relevantní grampozitivní i gramnegativní bakterie. Ciclopiroxolamin se aplikuje ve formě krémů a roztoků v terapii onychomykóz a vaginálních kandidóz (v České republice registrované přípravky Batrafen®, Dafnegin®)[8].

K novějším derivátům tohoto léčiva patří rilopirox, který působí mechanismem blokace dýchacího řetězce a tvorby stabilního komplexu se železem, kofaktorem enzymů důležitých pro metabolizmus určitých patogenů[4, 11].

Rod *Candida*, kandidózy

K rodu *Candida* náleží kvasinkovité organismy patřící mezi nejběžnější houbové patogeny, způsobující lokální (kožní i slizniční) a u oslabených jedinců i systémové mykózy[14]. Mezi nejčastěji se vyskytující kvasinky patří *Candida albicans*, dále pak *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. krusei, C. parapsilosis, C. guilliermondii*[14–17]. Kva-

Farmacie 2-10 3.5.2010 15:20 Str. 81
proLékaře.cz | 25.4.2025

sinky rodu *Candida* jsou podmíněnými patogeny nacházejícími se v dutině ústní, v pochvě, na pokožce a v plicích zdravých jedinců[14, 18]. Přemnožení kvasinek a vývoj onemocnění může vyvolat například podávání antibiotik nebo imunosupresiv[15, 18]. Základním morfologickým útvarem kvasinek je oválná grampozitivní buňka velikosti 3–6 μm. Za určitých podmínek se buňky kvasinek enormně protahují, ale svými konci zůstávají spojeny a vytváří řetízky – pseudohyfy (obr. 2)[15, 19].

Kandidóza je akutní nebo subakutní infekce, při níž se vytváří léze v ústech (orální kandidóza), ve vagíně (vulvo-vaginální kandidóza), na pokožce a nehtech (onychomykózy), v průduškách nebo v plicích (broncho-pulmonální kandidóza). Příležitostně může způsobovat až otravu krve, zánět endokardu nebo zánět mozkových blan[15–17, 19].

Orální kandidózy

V naprosté většině případů je orální kandidóza vyvolána kvasinkou *Candida albicans*. Ta je za normálních podmínek na ústní sliznici saprofytem, přítomným jen v malém množství[14]. Jako patogen se projeví oportunisticky při lokálním či celkovém narušení imunitního systému, kdy dochází k nefyziologickému zmnožení kvasinek[15]. U pacientů s těžkým imunodeficitem jsou orální kandidózy způsobeny *Candidou crusei*, kandidózy u pacientů po radiační terapii v oblasti krku vyvolává *Candida glabrata*. Nové druhy kvasinek (*Candida dubliniensis* nebo *C. conspicua*) byly popsány u pacientů s HIV[14, 15].

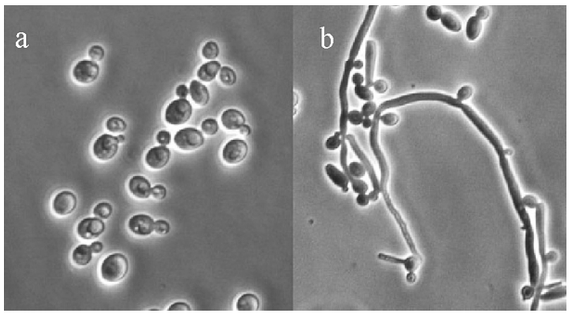
Průkaz kandidóz probíhá přímo. K diagnostice sooru a poševní kandidózy stačí mikroskopie, ke zjištění citlivosti je nezbytná kultivace. Sabouraudův agar je postupně nahrazován chromogenními agary, na nichž *Candida* vyrůstá v typicky zbarvených koloniích. Zelené kolonie vytváří *C. albicans*, modré *C. tropicalis*, růžové s plstnatým povrchem *C. parapsilosis* a drobné, tmavě fialové *C. glabrata* (obr. 3)[17].

Léčba orálních kandidóz

U lehčích forem kandidóz stačí pouze lokální podávání antiseptik a imidazolových antimykotik. U těžších forem je třeba systémová léčba, a to zejména aplikací triazolových antimykotik – flukonazolu nebo itrakonazolu, či amfotericinu B nebo nystatinu[18,19]. Mezi další méně častá antimykotika v léčbě kandidóz patří karbamáty, morfolin, DNA analog 5-fluorocytosin a capsofungin[18].

Mikrobiologické hodnocení citlivosti patogenů k antimykotikům

Účinnost protimikrobní látky na příslušný patogen můžeme stanovit pomocí dvou laboratorních hodnot – minimální inhibiční koncentrace a minimální baktericidní (fungicidní) koncentrace[21]. Se zvyšujícím se výskytem mykotických infekcí a stále rostoucím počtem antifungálních přípravků nabývá na významu stanovení *in vitro* citlivosti k antimykotickým látkám. Důvodem je i vyskytující se rezistence některých druhů patogenů a potřeba zvolit nejen vhodný preparát, ale také dávku v závislosti na citlivosti k danému antimykotiku. Poslední roky znamenaly velký pokrok ve standardizaci metod vhodných k testování *in vitro* citlivostí. Pro použití v klinické laboratoři je nezbytné zvolit jednoduchou a málo nákladnou metodu, která poskytuje dostatečně reprodukovatelné výsledky[22].



Obr. 2. Candida albicans: a) kvasinka jako oválná buňka, b) pseudohyfy[19]

Pro zjišťování a hodnocení citlivosti nebo rezistence metodou kvantitativní a kvalitativní se používají metody zavedené Standardized Antifungal Susceptibility Testing – Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI), dříve National Committee for Clinical Laboratory Standards, Subcomittee for Antifungal Testing. Stejnými problémy se zabývá také European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). Používají se i doporučení Národní referenční laboratoře[17]. Pro zjišťování antimykotické citlivosti metodou diluční CLSI doporučuje směrnice M27-A a M27-A2 a pro diskovou difuzní metodu určení antimykotické citlivosti M44-A. Ke stanovení citlivosti používáme též kvantitativní MIC (E-test) a semikvantitativní diluční metodu (Fungitest)[17].

Mikrodiluční metody stanovení

CLSI (dokument M27-A2)

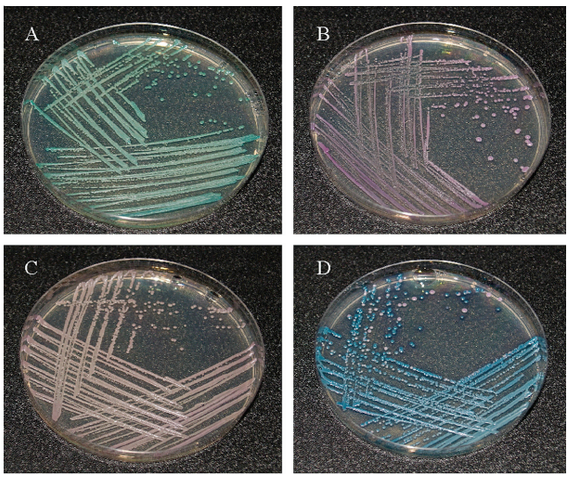
Jedná se o metodu kvantitativní, poskytující možnost stanovit minimální inhibiční koncentraci a umožňující dle hodnoty MIC zařadit testovaný izolát do kategorie citlivý (S), citlivý v závislosti na dávce (SDD – Susceptible Dose Dependent), rezistentní (R). Standard CLSI pro kvasinky (dokument CLSI M27-A2) určuje postup při testování citlivosti kvasinek rodu *Candida* a *Cryptococcus neoformans* s použitím média RPMI-1640 s glutaminem, bez bikarbonátů, obohaceného 0,2 % glukosy. Hustota očkovaného inokula je 0,5 McFarland, a inkubace probíhá při 35 °C 24-48 hodin pro *Candida spp*. a 48–72 hodin pro *Cryptococcus neoformans*. Hodnotí se stupeň zákalu dle určených kritérií[16, 23–25].

EUCAST (dokument 7.1)

EUCAST vypracoval v roce 2002 návrh standardizovaného postupu pro testování citlivosti kvasinek k antimykotikům. Jako médium se použil RPMI-1640 s 2 % glukosy, inokulum obsahující $0,5 \times 10^5$ až $2,5 \times 10^5$ CFU (colony forming units)/ml a podmínky inkubace byly

Farmacie 2-10 3.5.2010 15:20 Str. 82
proLékaře.cz | 25.9.2025

Obr. 3. Kultivace rodu Candida na chromogenním agaru[20)]
a – C. albicans, b – C. tropicalis, c – C. parapsilosis, d – C. glabrata,



Obr. 4. Identifikace izolátů
a – C. albicans, b – C. glabrata, b – C. parapsilosis, d – C. tropicalis

stanoveny na 35 °C a 24 hodin. Tyto postupy byly ověřeny ve studiích, kde se sledovala korelace s postupy CLSI a interlaboratorní reprodukovatelnost výsledku u ciclopiroxolaminu, terbinafinu, ketokonazolu, itrakonazolu a flukonazolu. I přesto, že doporučené postupy CLSI a EUCAST se liší v přípravě média (obohacení glukosou), v přípravě inokula, době inkubace i způsobu interpretace, je míra korelace mezi oběma metodami vysoká, a to zejména u ciclopiroxolaminu a terbinafinu[16)].

Disková difuzní metoda

Disková difuzní metoda umožňuje dle zóny inhibice růstu vytvořené kolem disku s antimykotickou látkou zařadit testovaný izolát také do kategorie citlivý (S), citlivý v závislosti na dávce (SDD), rezistentní (R)[26)]. Metodika pro testování citlivosti kvasinek k flukonazolu diskovou difuzní metodou publikovaná v roce 1996 Barrym a Braunem[27)] byla následně ověřena v celosvětové studii infekčních nemocí a jejich původců (ARTEMIS) a v roce 2004 uznána CLSI jako standard M44-A [22, 28, 29)]. Pro testování je dle CLSI doporučen Mueller-Hintonův agar obohacený 2 % glukosy s 0,5 µg/ml methylenové modři. pH média má být v rozmezí 7,2–7,4, inokulum má dosahovat hustoty 0,5 McFarland, inkubace má probíhat při 35 °C 24 hodin, u některých druhů v případě slabého růstu i 48 hodin[28, 29)]. Možnou alternativou je modifikovaný Sabouraudův glukosový agar (2% glukosa, 1% pepton, 2,5% agar, pH neupraveno), pro azolová chemoterapeutika s výjimkou 5-fluorocytosinu lze použít agar s kasitoninem nebo komerční půdu Antimycotic sensitivity agar firmy Hi-media. U testování citlivosti kvasinek se též využívá Asparaginový agar.

POKUSNÁ ČÁST

Materiál

Jako léčivá látka se v experimentální části práce použil ciclopiroxolamin (Hoechst-Biotika, SK) a antimykotické disky s obsahem 30 µg ciclopiroxolaminu (ITEST plus s r.o., CZ). Pro kultivaci kvasinek se použily mikrobiologické půdy a média: Sabouraudův agar (Imuna Pharm a.s., SK), CHROM Agar Candida (AscoMed, CZ), Mueller – Hintonův bujon (Hi Media, F), RPMI-1640 médium (Sigma Aldrich, USA) a asparaginový agar (Sigma Aldrich, USA). V pokusu se dále použilo rozpouštědlo dimethylsulfoxid (DMSO) (Kulich, CZ), fyziologický roztok (B. Braun Melsungen AG, Německo) a tenzid Tween 80 (Kulich, CZ).

Identifikace Candid

Jednotlivé kmeny kvasinek byly izolovány a identifikovány z klinického materiálu zpracovaného na Mikrobiologickém ústavu Fakultní nemocnice U svaté Anny v Brně. Z 536 vzorků odebraných pacientům z dutiny ústní od října 2007 do března 2008 bylo vykultivováno 47 kmenů *Candid*. Kvasinky se nejdříve nakultivovaly ve zkumavkách na šikmo nalitém Sabouraudově agaru v termostatu (BT 120, Chirana, CZ) při teplotě 27 °C po dobu 24–48 hodin. Vyžíhanou bakteriologickou kličkou bylo nabráno několik kolonií kvasinek, které se naočkovaly na Petriho misku s chromogenním médiem CHROM Agar Candida. Kultivace probíhala při 27 °C po dobu 24–48 hodin. Kvasinky narostlé na CHROM Agar Candida byly identifikovány na základě barvy kolonií (obr. 4).

Mikrobiologické hodnocení citlivosti patogenů

Mikrodiluční metoda stanovení

a) Příprava inokula

Kvasinky se ze Sabouraudova selektivního agaru vyžíhanou bakteriologickou kličkou přenesly a nakultivovaly

Farmacie 2-10 3.5.2010 15:20 Str. 83
proLékaře.cz | 25.9.2025

v Mueller-Hintonově bujonu v termostatu při teplotě 37 °C po dobu 2 hodin. Takto připravená suspenze se naředila na hustotu 0,5 Mc Farland. Hustota byla změřena pomocí densi-la-metru (Pliva-Lachema a.s., CZ).

b) Příprava roztoků

Všechny roztoky byly připraveny za aseptických podmínek. Roztok glukosy se připravil rozpuštěním glukosy (Kulich, CZ) ve fyziologickém roztoku (20 mg/ml) a přefiltroval přes filtr (Whatman, UK) o velikosti pórů 100 nm. Ciclopiroxolamin (Hoechst-Biotika, SK) se rozpustil v DMSO a také přefiltroval za sterilních podmínek.

c) Příprava mikrotitrační destičky

Do 96 jamkové sterilní plastové destičky (Gama group a.s., CZ) se za sterilních podmínek napipetovalo 100 µl RPMI-1640 média o pH 7 (s 0,2% roztokem glukosy). Ciclopiroxolamin se přidal v takovém množství, aby výsledná koncentrace v jednotlivých jamkách byla 0,008; 0,015; 0,031; 0,063; 0,125; 0,25; 0,5; 1; 2 a 4 µg/ml. Do jamek se nadávkovalo po 100 µl inokula o hustotě 0,5 Mc Farland a inkubovalo se v termostatu po dobu 48 hodin při 35 °C. Výsledky se hodnotily odečtením zákalu vizuálně. Jako minimální inhibiční koncentrace se hodnotila koncentrace ciclopiroxolaminu, při níž došlo k inhibici růstu, tedy jamka bez zákalu.

Disková difuzní metoda

a) Příprava inokula

Kvasinky se nakultivovaly ve zkumavce na šikmo nalitém Sabouradově agaru v termostatu při teplotě 27 °C po dobu 24–48 hodin. Vyžíhanou bakteriologickou kličkou bylo nabráno několik kolonií kvasinek a inokulováno do fyziologického roztoku s Tweenem 80 na hustotu 0,5 Mc Farland. Hustota byla změřena pomocí densi-la-metru.

b) Disková difuzní metoda

Kolonie testované čisté kultury kvasinek se suspendovala v 3 ml fyziologického roztoku s Tweenem 80 na hustotu cca 0,5 podle Mc Farlanda. Sterilním vatovým tampónem na špejli se nanesla suspenze rovnoměrně na povrch asparaginového agaru v Petriho misce. Sterilní jehlou byly aplikovány antimykotické disky s obsahem ciclopiroxolaminu (max. 6 disků na misku). Takto naočkovaná Petriho miska se inkubovala při 27 °C po dobu 24–48 hodin. Citlivý kmen vytvořil okolo disku inhibiční zónu o průměru doporučeném výrobcem. Odečtení inhibiční zóny se provádělo posuvným měřítkem. Pro ciclopiroxolamin má být velikost inhibiční zóny > 10 mm. Rostou-li kvasinky až k disku, nebo je-li zóna inhibice menší než hraniční hodnota, je kvasinka k příslušnému antimykotiku rezistentní.

Pro srovnání se použily referenční kmeny kvasinek: *Candida albicans CCM 8261*, *Candida glabrata CCM 8270*, *Candida parapsilosis CCM 8260* a *Candida tropicalis CCM 8264*.

c) Statistické porovnání rozdílů v citlivosti jednotlivých kmenů *Candid*

Aby bylo možné říci, že průměrné hodnoty minimálních inhibičních zón u jednotlivých kmenů *Candid* se statisticky významně liší, je nutné výsledky podrobit statistickému zpracování. Pro posouzení, zda je rozdíl v citlivosti statisticky významný, je vhodné využít one tailed nepárový Studentův t-test. Nejprve bylo třeba ověřit, zda data v jednotlivých skupinách odpovídají normálnímu rozložení a rozptyly dat v jednotlivých skupinách se statisticky významně neliší. K tomu účelu se využil F-test. Statistické porovnání bylo provedeno v programu Prism 4.

VÝSLEDKY A DISKUZE

Identifikace kvasinek na chromogenní půdě

Z 536 vzorků odebraných pacientům z dutiny ústní ve Fakultní nemocnici U sv. Anny v Brně bylo v Mikrobiologickém ústavu nakultivováno 47 kmenů *Candid*, které byly identifikovány na chromogenním agaru dle barvy a charakteru kolonií (obr. 4). Největší procentuální zastoupení kolonií představovala *Candida albicans* (65,96 %), dále pak *C. tropicalis* (12,76 %), *C. glabrata* (10,64 %) a *C. parapsilosis* (10,64 %) (tab. 1).

Tab. 1. Procentuální zastoupení Candid v izolátech

Rod *Candida*	Procentuální zastoupení jednotlivých kmenů (%), n = 47
C. albicans	65,96
C. glabrata	10,64
C. parapsilosis	10,64
C. tropicalis	12,76

Stanovení citlivosti mikrodiluční metodou

Pomocí mikrodiluční metody na mikrotitrační destičce bylo možno stanovit minimální inhibiční koncentraci ciclopiroxolaminu na referenčních kmenech *Candid* (*Candida albicans CCM 8261, Candida glabrata CCM 8270, Candida parapsilosis CCM 8260* a *Candida tropicalis CCM 8264*). Sledoval se zákal jednotlivých jamek, kde byl ciclopiroxolamin v koncentracích 0,008 až 4 µg/ml (tab. 2). Výsledná minimální inhibiční koncentrace ciclopiroxolaminu byla pro referenční kmen *Candida albicans CCM 8261* stanovena na 1 µg/ml, pro referenční kmen *Candida glabrata CCM 8270* 2 µg/ml, *Candida parapsilosis CCM 8260* 0,5 µg/ml a *Candida tropicalis CCM* 8264 1 µg/ml (tab. 3). Výsledek koreluje s literárními údaji, které uvádějí MIC ciclopiroxolaminu v rozmezí od 0,98 do 3,9 µg/ml[1, 8]. Mikrodiluční metodou byla ověřena antimykotická účinnost ciclopiroxolaminu, který se následně použil do nalisovaných mukoadhezivních orálních tablet.

Farmacie 2-10 3.5.2010 15:20 Str. 84
proLékaře.cz | 25.9.2025

Tab. 2. Odečet minimální inhibiční koncentrace v 96 jamkové mikrotitrační destičce

	C. albicans		*C. glabrata*		*C. parapsilosis*		*C. tropicalis*	
koncentrace ciclopiroxolaminu (µg/ml)	4	4	4	4	4	4	4	4
	2	2	2	2	2	2	2	2
	1	1	1	1	1	1	1	1
	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25
	0,125	0,125	0,125	0,125	0,125	0,125	0,125	0,125
	0,063	0,063	0,063	0,063	0,063	0,063	0,063	0,063
	0,031	0,031	0,031	0,031	0,031	0,031	0,031	0,031
	0,015	0,015	0,015	0,015	0,015	0,015	0,015	0,015
	0,008	0,008	0,008	0,008	0,008	0,008	0,008	0,008
	0	0	0	0	0	0	0	0

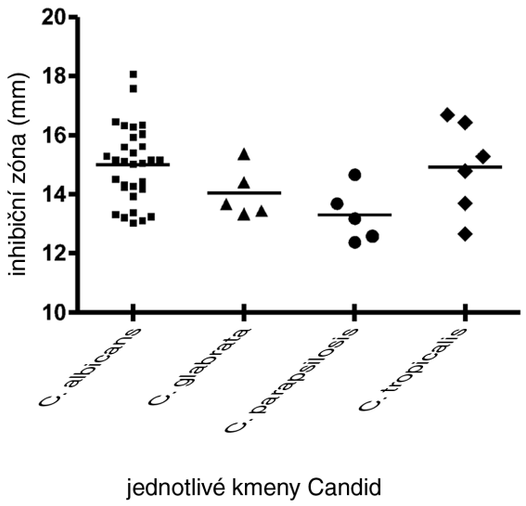
Ve vybarvených jamkách byl pozorován zákal, tedy růst.

Tab. 3. Minimální inhibiční koncentrace ciclopiroxolaminu

Rod *Candida*	**Minimální inhibiční koncentrace (µg/ml)**
C. albicans	≥ 1
C. glabrata	≥ 2
C. parapsilosis	≥ 0,5
C. tropicalis	≥ 1

Hodnocení citlivosti patogenů diskovou difuzní metodou

Diskovou difuzní metodou na asparaginovém agaru se stanovila velikost inhibičních zón standardních disků s obsahem 30 µg ciclopiroxolaminu na jednotlivých izolovaných kmenech kvasinek – *Candida albicans, C. glabrata, C. parapsilosis, C. tropicalis* a referenčních kmenech: *Candida albicans CCM 8261, Candida glabrata CCM 8270, Candida parapsilosis CCM 8260* a *Candida*



Obr. 5. Inhibiční zóny standardního disku s obsahem CP na izolovaných kvasinkách

Tab. 4. Průměrné inhibiční zóny standardního disku s obsahem CP na kvasinkách

Izoláty kmene *Candida*	**Průměrná inhibiční zóna (mm)**	**Směrodatná odchylka**
C. albicans	15,01	1,268
C. glabrata	14,04	0,758
C. parapsilosis	13,31	0,821
C. tropicalis	14,92	1,421

Tab. 5. Porovnání rozdílů variability rozptylů hodnot u jednotlivých kmenů (F-test)

Porovnání rozptylu hodnot jednotlivých kmenů	**Hodnota F**	**Kritická hodnota F**	**Významnost rozdílu**
C. albicans-parapsilosis	1,97	2,68	NE
C. albicans-tropicalis	1,46	2,53	NE
C. albicans-glabrata	2,31	2,68	NE
C. parapsilosis-tropicalis	2,87	5,19	NE
C. glabrata-tropicalis	3,37	5,19	NE
C. glabrata-parapsilosis	1,17	6,38	NE

Tab. 6. Porovnání rozdílné citlivosti jednotlivých kmenů Candida (nepárový Studentův t-test)

Rozdíl v citlivosti jednotlivých kmenů	**Hodnota t**	**Kritická hodnota t**	**Významnost rozdílu**
C. albicans-parapsilosis	2,80	1,64	ANO
C. albicans-tropicalis	0,13	1,64	NE
C. albicans-glabrata	1,59	1,64	NE
C. parapsilosis-tropicalis	2,03	1,83	ANO
C. glabrata-tropicalis	1,13	1,83	NE
C. glabrata-parapsilosis	1,31	1,85	NE

Farmacie 2-10 3.5.2010 15:20 Str. 85
proLékaře.cz | 25.9.2025

tropicalis CCM 8264. Velikost referenční inhibiční zóny pro disky s obsahem ciclopiroxolaminu 30 µg je stanovena výrobcem na 10 mm. Pro referenční kmen *Candida albicans CCM 8261* byla naměřena velikost inhibiční zóny 12,50 mm, průměrná hodnota pro izolované kmeny *C. albicans* byla 15,01 mm. Pro referenční kmen *Candida glabrata CCM 8270* byla inhibiční zóna 12,70 mm, průměrná hodnota pro jednotlivé izoláty tohoto kmene pak 14,04 mm. Inhibiční zóna 14,70 mm odpovídala referenčnímu kmeni *Candida parapsilosis CCM 8260*, průměrná hodnota inhibiční zóny izolovaných kvasinek tohoto kmene byla 13,31 mm. Velikost inhibiční zóny pro referenční kmen *Candida tropicalis CCM 8264* byla 10,50 mm, průměrná hodnota inhibiční zóny izolátu 14,92 mm (tab. 4, obr. 5). U všech vzorků, jakož i referenčních kmenů byla naměřena inhibiční zóna standardního disku s obsahem ciclopiroxolaminu vyšší než referenční hodnota uváděná výrobcem. Testované kmeny lze tedy hodnotit jako citlivé k ciclopiroxolaminu. Na základě statistického zpracování výsledků stanovení citlivosti k ciclopiroxolaminu jednotlivých kmenů *Candid* diskovou difuzní metodou se jako statisticky významná (hladina významnosti 95%) prokázala nižší citlivost izolátů *Candida parapsilosis* oproti *Candida albicans* a *Candida tropicalis*. Jiný statisticky významný rozdíl v citlivosti se neprokázal (tab. 5, tab. 6).

Na základě výsledků identifikace a stanovení MIC čtyř nejčastějších druhů *Candid* budou v následující fázi experimentu připraveny mukoadhezivní tablety pro lokální terapii kandidových infekcí dutiny ústní. Cílem této formulace je zajistit setrvání tablety na bukální sliznici po dobu 8–10 hodin a současně optimalizovat rychlost uvolňování léčiva z tablet tak, aby bylo po celou dobu jejich setrvání na sliznici zajištěno překročení MIC pro nejméně citlivý kmen kvasinek – *Candida glabrata* (minimálně 2 µg ciclopiroxolaminu/ml slin a rychlost uvolňování nejméně 0,24 mg za hodinu). Obsah léčivé látky v tabletě na základě zjištěných výsledků by měl být minimálně 2,5 mg. Je třeba však počítat s dostatečným koncentračním gradientem léčiva, který by zabezpečil jeho koncentraci trvale nad MIC po celou dobu působení lékové formy. Kromě denní produkce slin (120 ml/hod.[30]) je třeba počítat s určitou ne nepodtatnou částí léčivé látky odstraněné s příjmem tekutin a potravy. Proto by se měl teoretický obsah ciclopiroxolaminu v tabletě pohybovat mezi 25 a 50 mg.

ZÁVĚR

Kultivací stěrů 536 pacientů na chromogenním agaru bylo zjištěno, že majoritní podíl na vzniku orálních kandidóz má kvasinka druhu *Candida albicans*. Ostatní tři identifikované druhy (*C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*) se podílejí na rozvoji této infekce každá méně než 13 %. Moderní mikrodiluční metoda stanovení citlivosti jednotlivých kmenů kvasinek ukázala, že nejmenší citlivost na ciclopiroxolamin vykazuje kmen *Candida glabrata* (MIC ≥ 2 µg/ml). Tento údaj je důležitý pro formulaci lokálně antimykoticky působících mukoadhezivních tablet z důvodu optimalizace jejich disolučního profilu tak, aby po celou dobu setrvání tablety na bukální sliznici bylo dosaženo koncentrace léčiva ve slinách nad hladinou MIC pro sledované kvasinky.

LITERATURA

1. **Dvořáčková, K.:** Principy uvolňování léčiv z perorálních matricových tablet obsahujících hypromelosu. Chem. listy, 2009; 103, 66–72.
2. **Dostálová, M., Rabišková, M.:** Mukoadhezivní orální tablety – moderní léková forma s řízeným uvolňováním léčiva. Čes. slov. Farm., 2000; 2, 55–61.
3. **Bajerová, M., Krejčová, K., Rabišková, M., Gajdziok, J., Masteiková, R.:** Oxycellulose – significant characteristics in relation to its pharmaceutical and medici applications, Adv. Polym. Technol., 2009; 28, 199–208.
4. **Niewerth, M., Kunze, D., Seibold, M.:** Ciclopirox Olamine Treatment Affects the Expression Pattern of Candida albicans Genes Encoding Virulence Factors, Iron Metabolism Proteins, and Drug Resistance Factors. Antimicrob. Agents Chemother., 2003; 47, 1805–1817.
5. Český lékopis, Praha, Grada Publishing, 2005, 7348 s.
6. **Hui, X., Wester, R. C., Barbadillo, S.:** Ciclopirox Delivery into the Human Nail Plate. J. Pharm. Sci., 2004; 93, 2545–2548.
7. Martindale, The complete drug reference. In: Sweetman, S.C. eds., Pharmaceutical press, 2002; 33, 52-63.
8. **Švihovec, J., Novotná, H.:** Pharmindex Kompendium 2001. Český Těšín: MediMedia, 2001, 1802 s.
9. **Gupta, A. K., Bluhm, R.:** Ciclopirox (Loprox) gel for superficial fungal infections. Skin Ther. Lett., 2004; 9, 4–9.
10. **Shilova, I. B., Guskova, T. A., Glushkov, R. G.:** Modern drugs for treating dermatomycosis. Pharm. Chem. J., 2004; 38, 175–180.
11. **Niewerth, M., Schiller, N.:** Wirkungsweise von Ciclopiroxolamin auf Candida albicans. Mycoses, 2002; 45, 63–68.
12. **Tarawneh, R. T., Imad, I.:** Physicochemical studies on Ciclopiroxolamine complexes with divalent metal ions. Int. J. Pharm., 2005; 289, 179–187.
13. **Polak, A., Jackel, A., Noack A.:** Agar-Sublimations-Test zur In vitro-Bestimmung der antimykotischen Aktivität von Morpholin-Derivaten. Mycoses, 2004; 47, 184–192.
14. **Cannon, R. D., Chaffin, W. L.:** Oral colonization by Candida albicans. Crit. Rev. Oral. Biol. Med., 1999; 10, 359–383.
15. **Cannon, R. D., Holmes, A. R., Mason, A. B., Monk, B. C.:** Oral Candida: Clearance, Colonization, or Candidiasis? J. Dent. Result, 1995; 74, 1152–1161.
16. **Figueiredo, V. T., Santos, D., Resende, M. A., Hamdan, J. S.:** Identification and in vitro antifungal susceptibility testing of 200 clinical isolates of Candida spp. responsible for fingernail infection. Mycopathologia, 2007; 164, 27–33.
17. **Jedličková, A.:** Systémové mykózy. 1. vyd. Praha: Maxdorf 2006, 24–49.
18. **Soysa, N. S., Samaranayake, L. P., Ellepola, A.:** Antimicrobials as a contributory factor in oral candidosis – a brief overview. Oral Dis., 2008; 14, 138–143.

Farmacie 2-10 3.5.2010 15:20 Str. 86
proLékaře.cz | 25.9.2025

19. **Haber, J.:** Systémové mykózy a jejich léčba. Praha: Galén, 1995, 19–53.
20. http://www.ma.uni-heidelberg.de/inst/imh/myko_2/n_myco1.html (20. 11. 2009).
21. **Votava, M.:** Lékařská mikrobiologie obecná. Praha: Neptun 2001, 163–164.
22. **Karaca, N., Koc, N.:** In vitro susceptibility testing of dermatohytes: comparison of disk diffusion and reference broth dilution methods. Diagn. Microbiol. Infect. Dis., 2004; 48, 259–264.
23. **Messer, S. A., Diekema, D. J., Boyken, L., Tendolkar, S.:** Activities of micafungin against 315 Invasive clinical isolates of fluconazole-resistant Candida spp. J. Clin. Microbiol., 2006; 44, 324–326.
24. **Pfaller, M. A., Messer, S. A., Boyken, L.:** In vitro activities of voriconazole, posaconazole, and fluconazole against 4,169 clinical isolates of Candida spp. and Cryptococcus neoformans collected during 2001 and 2002 in the ARTEMIS global antifungal surveillance program. Diagn. Microbiol. Infect. Dis., 2004; 48, 201–205.
25. **Pfaller, M. A., Messer, S. A., Boyken, L., Rice, C., Tendolkar, S.:** Use of fluconazole as a surrogate marker to predict susceptibility and resistance to voriconazole among 13,338 clinical isolates of Candida spp. tested by Clinical and Laboratory Standards Institute-Recommended broth microdilution methods. J. Clin. Microbiol., 2007; 45, 70–75.
26. **Bille, J.:** Biomic video reading of fluconazole agar disk diffusion susceptibility testing of Candida spp. Clinical izolates compared to NCCLS microbroth dilution. ICAAC poster J-120; S. Diego, CA, 1998.
27. **Barry, A., Brown S.:** Fluconazole Disk Diffusion Procedure for Determining Susceptibility of Candida Species. J. Clin. Microbiol., 1996; 34, 2154–2157.
28. **Pfaller, M. A., Boyken, L., Messer, S. A., Tendolaker, S.:** Comparison of results of voriconazol disk diffusion testing for Candida species with results from a Central Reference Laboratory in the ARTEMIS Global Antifungal Surveillance Program. J. Clin. Microbiol., 2005; 43, 5208–5213.
29. **Pfaller, M. A., Hazen, K. C., Boyken, L., Messer, S. A., Tendolaker, S.:** Comparison of results of fluconazol disk diffusion testing for Candida species with results from a Central Reference Laboratory in the ARTEMIS Global Antifungal Surveillance Program. J. Clin. Microbiol., 2004; 42, 3607–3612.
30. **Shojaei, A. H.:** Buccal mucosa as a route for systemic drug delivery: a review. Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences J. Pharm. Pharm. Sci., 1998; 1, 15–30.

Z ČINNOSTI FARMACEUTICKÝCH SPOLEČNOSTÍ

Ze zasedání Výboru České farmaceutické společnosti

Dne 18. února 2010 se konalo na Farmaceutické fakultě UK v Hradci Králové první letošní zasedání výboru České farmaceutické společnosti (ČFS) ČLS JEP. Jednání vedl předseda ČFS prof. Luděk Jahodář.

Úvodem předseda zkontroloval jednotlivé body z minulé schůze výboru ČFS a jejich plnění a projednal aktuální a vyřešenou korespondenci za poslední období.

Při jednání o zahraničních aktivitách výbor ČFS konstatoval, že příprava XII. symposia ISOPP (International Society of Oncology Pharmacy Practitioners), které se bude konat 5. až 8. května 2010 v hotelu Clarion v Praze, pokračuje úspěšně. Bližší informace o kongresu jsou na adrese www.isopp2010.com.

Výbor schválil možnost 2–4 účastníků na kongres Mezinárodní farmaceutické federace (FIP), který se bude konat 28. srpna až 2. září 2010 v Lisabonu. Zde se zástupce ČFS zúčastní i zasedání Rady FIP. Materiály týkající se kongresu jsou k dispozici u předsedy ČFS prof. L. Jahodáře. Zástupce ČFS se zúčastní i zasedání Rady Evropské federace pro farmaceutické vědy 20. června 2010 v Budapešti.

Účastníci jednání vyslechli informaci o časopisu Česká a slovenská farmacie. Slovenská farmaceutická společnost se finančně podílela na ztrátě časopisu za rok 2009. Připravuje se smlouva o spolupráci při vydávání tohoto časopisu. Byly vytvořeny nové pokyny v českém a anglickém jazyce pro autory publikací v tomto časopise, které jsou počínaje letošním rokem v každém čísle časopisu. Výbor doporučuje, aby se případné zbylé a neprodané výtisky používaly jako propagační materiál na akcích pořádaných ČFS.

Výbor ČFS se domluvil na přípravě e-mailového adresáře všech členů ČFS, který by v budoucnu sloužil k zasílání hromadné e-mailové korespondence. Tohoto způsobu bude využito i k organizaci voleb do nového výboru ČFS.

V dalších projednávaných záležitostech výbor diskutoval vyhlášky došlé z MZ ČR, včetně požadavku navrhnout členy do Akreditačních komisí pro oblast specializačního vzdělávání farmaceutů. Výbor podporuje návrh na zřízení 10 rezidenčních míst v oboru Klinická farmacie.

Dne 18. února 2010 byla první schůzí obnovena činnost Spolku farmaceutů ve Zlíně. Místopředseda ČFS dr. P. Grodza, informoval, že se plánuje aktivizace i dalších regionálních spolků farmaceutů.

Výbor projednal další organizační záležitosti, bylo vydáno jedno další osvědčení pro přípravu cytostatik v lékárnách. Od října 2009 se do ČFS přihlásilo 11 nových členů.

Příští schůze výboru ČFS se plánuje na 16. dubna 2010 v rámci Beskydského sletu v Malenovicích.

P. Komárek