

**UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE**

**Farmaceutická fakulta v Hradci Králové**

**KATEDRA BIOLOGICKÝCH A LÉKAŘSKÝCH VĚD**



**MIKROBIOLOGICKÁ ANALÝZA MYKOTICKÝCH AGENS  
IZOLOVANÝCH Z KLINICKÉHO MATERIÁLU VE  
FAKULTNÍ NEMOCNICI PRAHA – MOTOL V ROCE 2004**

bakalářská práce

Hradec Králové, 2006

Martina Kapalová

Děkuji mému školiteli MUDr. Otakaru Nyčovi za ochotné poskytnutí odborné rady, literatury a provedení korektury.

# 1 OBSAH

<b>1</b>	<b>OBSAH</b> .....	<b>3</b>
<b>2</b>	<b>ÚVOD</b> .....	<b>5</b>
<b>3</b>	<b>HOUBY</b> .....	<b>6</b>
3.1	POSTAVENÍ HUB V PŘÍRODĚ.....	6
3.2	CHARAKTERISTIKA HOUBOVÉ BUŇKY.....	6
3.3	SYSTÉM HUB.....	7
3.4	ONEMOCNĚNÍ VYVOLANÉ HOUBAMI.....	7
3.4.1	<i>Rozdělení mykóz</i> .....	8
3.4.1.1	Povrchové mykózy.....	8
3.4.1.2	Kožní mykózy ( dermatomykózy).....	8
3.4.1.3	Podkožní mykózy.....	8
3.4.1.4	Hluboké mykózy.....	9
3.4.2	<i>Přirozená mikroflóra</i> .....	9
<b>4</b>	<b>NOZOKOMIÁLNÍ INFEKCE</b> .....	<b>11</b>
4.1	NOZOKOMIÁLNÍ INFEKCE NA INTENZIVNÍ PÉČI.....	11
4.1.1	<i>Definice a rozdělení nozokomiálních nákaz</i> .....	12
4.1.2	<i>Přenos původců nemocničních nákaz</i> .....	13
4.1.3	<i>Predispoziční faktory vzniku nozokomiálních mykóz</i> .....	13
4.1.4	<i>Etiologická agens mykotických nozokomiálních nákaz</i> .....	15
4.1.4.1	Kandidóza.....	16
4.1.4.2	Aspergilóza.....	17
4.1.5	<i>Příznaky onemocnění plísněmi</i> .....	17
<b>5</b>	<b>LABORATORNÍ DIAGNOSTIKA HUB</b> .....	<b>19</b>
5.1	MATERIÁL.....	20
5.1.1	<i>Odběr materiálu</i> .....	20
5.2	MIKROSKOPIE.....	20
5.2.1	<i>Gramovo barvení</i> .....	22
5.2.2	<i>Barvení tuší</i> .....	23
5.3	KULTIVACE.....	23
5.3.1	<i>Kultivační média</i> .....	24

5.3.2	<i>Selektivní média</i> .....	24
5.3.3	<i>Hemokultivace</i> .....	25
5.4	<b>IDENTIFIKACE</b> .....	26
5.4.1	<i>Test tvorby chlamydospór</i> .....	26
5.4.2	<i>Test klíčních hyf v séru</i> .....	27
5.4.3	<i>Auxanogramy</i> .....	27
5.4.4	<i>Identifikace vláknitých hub</i> .....	28
5.4.5	<i>Polymerázová řetězová reakce (PCR)</i> .....	30
5.4.6	<i>ELISA (enzyme-linked immuno sorbent essay)</i> .....	32
5.4.7	<i>Aglutinace</i> .....	32
6	<b>ZÁVĚR</b> .....	34
7	<b>LITERATURA</b> .....	35

## 2 ÚVOD

V posledních šedesáti letech výrazně vzrostl výskyt mykotických onemocnění způsobených oportunními patogenními houbami. K tomu přispívá i samotné rozšíření spektra známých patogenních hub. Vznikají tak velmi závažné infekce, které zhoršují průběh jiného už probíhajícího patologického stavu nebo způsobují nově vzniklé zdravotní komplikace. Infekce způsobené oportunními patogenními houbami postihují zejména imunoalterované pacienty.

Nezbytnou součástí úspěšné léčby pacientů je laboratorní diagnostika. Cílem laboratoře je správné a rychlé určení původce infekce. Existuje množství metod k identifikaci patogenních, oportunně patogenních agens. V dnešní době je snahou metody co nejvíce zjednodušit, zkrátit čas procesů nezbytných pro diagnostiku a eliminovat chyby. To umožňuje automatizace metod a používání komerčních souprav. Vyhodnocení nálezu je pro lékaře vodítkem, které ho směřuje při vedení léčby.

## 3 HOUBY

### 3.1 POSTAVENÍ HUB V PŘÍRODĚ

Houby jsou organismy, které patří do samostatné říše Fungi. Jedná se o jedno- nebo vícebuněčné mikroorganismy. Jejich eukaryotické buňky se vyznačují převážně saprofytickým způsobem výživy. Ve volné přírodě působí jako destruenti látek organického původu. Známe 300 tisíc druhů hub, jen 0,5 % se zvrhlo k parazitismu jak rostlin, živočichů tak i člověka.

### 3.2 CHARAKTERISTIKA HOUBOVÉ BUŇKY

Houbové buňky mají eukaryotickou stavbu. Tím je dána podobnost k buňce člověka. Tato shoda tak značně komplikuje vývoj nových, selektivně působících antifugálních látek, které by byly jen málo toxické pro člověka. Dnešní antimykotika působí hlavně na úrovni ergosterolu ( složka plazmatické membrány), jež je u člověka nahrazen cholesterolem.

Stélka vyšších hub ( *Eumycota*) je tvořena jedno-, dvou- nebo mnohojadernými vlákny – hyfami. Houbová vlákna mohou být septovaná, mohou se větvit a splétat a tvořit tak podhoubí ( mycelium). Na specializovaných hyfách ( sporofory) rostou spóry ( výtrusy). Nepohlavní spóry se nazývají konidie a rostou na konidioforech. Po určité době kultivace na pevné živné půdě rozeznáváme kolonie. Makroskopický vzhled kolonií je pro některé houby charakteristický a pomáhá při jejich identifikaci.

Vedle vláknitých hub existuje velká skupina houbových organismů – kvasinky. Jejich stélka je tvořena pouze jednobuněčnými buňkami, blastospóry. Kvasinky se rozmnožují pučením. Za daných podmínek mohou tvořit pseudomycelium ( dceřinné buňky se protahují a neoddělují se od mateřské buňky).

Dimorfismus je zvláštní schopností hub, které v závislosti na okolním prostředí existují buď jako kvasinky nebo vláknité mycelium. Tento jev je častý u patogenních hub.

### 3.3 SYSTÉM HUB

Vyšší pravé houby ( *Eumycota*), které zahrnují pro člověka patogenní zástupce, rozdělujeme do několika tříd. Nejvýznamnější z hlediska parazitismu pro člověka jsou:

1. Zygomycetes ( houby spájivé)
2. Ascomycetes ( houby vřeckovýtrusé)
3. Basidiomycetes ( houby stopkovýtrusé)
4. Fungi imperfecti ( Deuteromycetes)

Převážná většina hub patogenních pro člověka patří mezi *Deuteromycetes*, které se dělí do dalších dvou taxonů:

Blastomycetes- imperfektní kvasinky ( *Candida*, *Cryptococcus*, *Malassezia*, *Rhodotorula*, *Trichosporon*)

Hyphomycetes- vláknité houby ( *Aspergillus*, *Blastomyces*, *Coccidioides*, *Histoplasma*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Epidermiphyton*, *Microsporium*, aj.)

### 3.4 ONEMOCNĚNÍ VYVOLANÉ HOUBAMI

Rozeznáváme čtyři způsoby poškození zdraví člověka houbami:

1. Mycetismy- jsou způsobeny požitím plodnic vyšších hub a následnou intoxikací jejich toxiny- jde o alimentární otravy
2. Mykotoxikózy- jsou způsobeny toxiny sekundárního metabolismu hub, které se obvykle nachází v kontaminované potravě člověka
3. Mykoalergie- jde o hypersenzitivní reakce imunitního systému člověka na antigenní stimulaci houbového alergenu ( obvykle spóry)
4. Mykózy- jsou onemocnění charakterizované kolonizací a následnou proliferací houby v tkáních nebo tělesných tekutinách člověka

## 3.5 ROZDĚLENÍ MYKÓZ

### 3.5.1 POVRCHOVÉ MYKÓZY

Povrchové mykózy jsou lokalizovány v nejsvrchnějších vrstvách kůže a kutikule vlasů. Je známa pyitiriasis versicolor, jež vyvolává *Malassezia furfur*.

### 3.5.2 KOŽNÍ MYKÓZY (DERMATOMYKÓZY)

Kožní mykózy postihují keratinizované vrstvy kůže, vlasové folikuly, nehtové lůžko a valy. Této skupině onemocnění se také jinak říká dermatofytózy. Mezi původce dermatofytóz patří *Epidermophyton*, *Mikrosporium*, *Trichophyton*, v širším slova smyslu můžeme k původcům dermatomykóz zařadit jakákoliv mykotická agens ( *Candida*, *Aspergillus*, aj.)

Mezi nejznámější dermatomykózy patří kvasinkové onemocnění sliznice dutiny ústní- moučnivka ( soor) vyznačující se bělavými povlaky na jazyku nebo jinde v dutině ústní. Dalším velmi rozšířeným onemocněním je mykóza kůže mezi prsty na nohou projevující se svěděním, pálením a olupováním kůže mezi prsty nebo mykózy nehtů ( onychomykóza). Také mykotické onemocnění kůže a sliznic pohlavních orgánů žen se vyskytuje relativně často.

### 3.5.3 PODKOŽNÍ MYKÓZY

Podkožní mykózy obvykle propukají po traumatické inokulaci mykotického agens. Postiženy jsou hlubší vrstvy *dermis*, subkutánní tkáň, popřípadě i kosti. V naší společnosti se obvykle nevyskytují, jsou časté v subtropických a tropických oblastech.



### 3.5.4 HLUBOKÉ MYKÓZY

Hluboké mykózy jsou onemocnění postihující tělní orgány, v případě postižení dvou a více orgánů mluvíme o systémových mykózách. Rozlišujeme:

Primární mykózy: jsou infekce způsobené dimorfní houbami a kvasinkou *Cryptococcus neoformans*.

Sekundární ( oportunní) mykózy: jde o infekce, které postihují zvláště imunoalterované pacienty. Původci jsou oportunní houby, hlavně *Candida*, *Aspergillus*, *Cryptococcus* a *Zygomycetes*. Nejčastěji se vyskytují v nemocničním prostředí, tzv. nozokomiální infekce.

Systémové mykózy jsou závažné, často život ohrožující stavy, kdy plíseň postihuje jeden nebo postupně i více orgánů, přičemž progredující, především neléčené formy mohou znamenat pro pacienta smrtící komplikaci. Jejich výskyt je relativně vzácný a postihuje osoby v těžkém stavu, trpící závažným základním onemocněním. Invazivní mykóza nejčastěji napadá plíce, častý nález mykózy je ve vedlejších dutinách nosních, v játrech, slezině, střevech nebo mozku. Vzácněji je popisováno mykotické onemocnění ledvin, srdce, kostí, oka, ale postiženo může být jakékoliv místo v lidském těle.

## 3.6 PŘIROZENÁ MIKROFLÓRA

Za přirozenou mikroflóru považujeme mikroorganismy, které po narození přednostně osidlují ( kolonizují) vnější i vnitřní tělní povrchy člověka. Za normálních okolností hostitele neohrožují, ale naopak jsou prospěšné a v mnoha ohledech nezbytné z hlediska správného fungování imunitního systému. Kromě jiného kompetují ( soutěží) s potenciálními patogeny o prostor a živiny, syntetizují vitamíny, a plní i detoxikační funkce. Některé části těla (krev, vnitřní orgány a dutiny) jsou za normálních okolností sterilní. Následkem základního onemocnění nebo v důsledku traumatu může dojít k proniknutí mikroorganismu do těchto míst, přechodné kolonizaci a v závislosti na virulenci příslušného k rozvoji mnohdy závažné infekce.

Za určitých podmínek se může i přirozená mikroflóra uplatnit jako původce infekce, zejména dojde-li k významnému selhání funkcí imunitního systému ať již v důsledku základního onemocnění, léčby, intoxikace apod.

Kolonizace je jedním z kroků, který může vést, ale nemusí k infekčnímu procesu..

## 4 NOZOKOMIÁLNÍ INFEKCE

Medicína posledních desetiletí úspěšně uplatňuje své poznatky k prodloužení nebo záchraně života dříve nevléčitelných nemocí. Nezbytnou součástí tohoto úspěchu je doba strávená v nemocničním prostředí, na nemocničním lůžku, kdy probíhají diagnostické a terapeutické výkony, které mohou různou měrou narušovat celkovou i lokální imunitu. To má za následek zvýšené riziko vzniku nosokomiálních nákaz, nebo-li infekcí vzniklých v souvislosti s pobytem ve zdravotnickém zařízení.

Od 80. let se výskyt nozokomiálních houbových nákaz postupně zvyšuje. V současné době mikroskopické houby, především kvasinky a aspergily, představují více než 8% všech nozokomiálních infekcí (Henderson a Hirvela 1996).

### 4.1 NOZOKOMIÁLNÍ INFEKCE NA INTENZIVNÍ PÉČI

Na jednotkách intenzivní péče jsou hospitalizováni lidé s polytraumaty, s rozsáhlými popáleninami, po těžkých chirurgických zákrocích, transplantacích, pacienti s maligními nádory, s AIDS, nedonošení novorozenci s nízkou porodní váhou apod. Jejich léčba často vyžaduje dlouhodobou hospitalizaci, která je spojena s vyšším rizikem vzniku infekce. Patogeneze nozokomiálních infekcí souvisí s pobytem v nemocnici a významné riziko mohou představovat diagnostické a terapeutické výkony. Značný výskyt těchto infekcí vyžaduje časté podávání antimikrobiálních léčiv. Jejich vysoká spotřeba způsobuje selekční tlak, který je příčinou vzniku a šíření rezistence mikrobiálních patogenů. Multirezistentní kmeny pak značně ztěžují možnost účinné léčby a zvyšují náklady na terapii. Léčba širokospektrými antibiotiky také představuje další z rizikových faktorů pro rozvoj lokálních i systémových mykóz na podkladě narušení přirozené bakteriální mikroflóry, která hraje důležitou roli v lokální imunitě.

## 4.2 DEFINICE A ROZDĚLENÍ NOZOKOMIÁLNÍCH NÁKAZ

Nosokomiální nákazy vznikají v souvislosti s pobytem ve zdravotnickém zařízení zpravidla v nemocnicích nebo, zcela výjimečně se objevují jako následek hospitalizace u pacientů, kteří již byli z nemocnice propuštěni. Jejich původci jsou nejčastěji oportunní patogeny, které mohou být kromě vyšší virulence rezistentní k různým skupinám antimikrobních léků.

Nozokomiální nákazy můžeme dělit podle :

a) podle původu vyvolávajícího agens:

1. Exogenní nemocniční nákazy- infekční agens se do organismu dostane zvenčí ( rukama personálu, při převazu rány, kontaminovanými nástroji apod.) Zdrojem exogenních nemocničních nákaz bývá nejčastěji zdravotnický personál, který často podceňuje svá vlastní banální onemocnění ( kožní hnisavé onemocnění, lehká průjmová onemocnění, faryngitidy atd.) a nerespektuje základní hygienická opatření ( mytí a dezinfekci rukou mezi ošetřením jednotlivých pacientů...) nebo chybí důsledné používání bariérových pomůcek (ústěnka, empír, rukavice..), které hrají významnou roli v prevenci přenosu nosokomiálních původců mezi personálem a pacienty.

2. Endogenní nosokomiální nákazy- infekční agens je složkou původní mikroflóry ( dutina ústní, střevo, kůže...) pacienta, přičemž se různým způsobem dostává na místo, kde může za určitých podmínek vyvolat vznik a rozvoj infekce ( operační rána, traumatizovaná tkáň, serózní dutina apod. )

b) z epidemiologického hlediska:

1. Nespecifické- mohou probíhat i mimo nemocnice ( školy, jesle apod.) Příkladem jsou alimentární infekce, zejména salmonelové.
2. Specifické- vznikají pouze jako důsledek diagnostických nebo terapeutických zákroků u hospitalizovaných pacientů nebo ambulantně vyšetřovaných osob. Nejčastěji bývají způsobené přímou inokulací agens do tkáně, rány atd. Méně často se infekce šíří kapénkami nebo alimentární cestou.

### 4.3 PŘENOS PŮVODCŮ NEMOCNIČNÍCH NÁKAZ

Přímý přenos vyžaduje současnou přítomnost zdroje infekce a vnímavého příjemce. V nemocnici probíhá nejčastěji kontaktem nebo kapénkami.

Nepřímý přenos je podmíněn schopností agens přežít určitou dobu mimo tělo hostitele nebo přítomností vektoru, ve kterém se může agens pomnožit. Následným užitím vektoru při výkonu je agens vpraven do makroorganismu. Vektorem zde mohou být kontaminované diagnostické pomůcky, nástroje, přístroje, obvazový materiál, infikované roztoky, léky ( plazma, infúzní roztoky, masti apod.), kontaminovaný vzduch, potraviny.

#### 4.3.1 PREDISPOZIČNÍ FAKTORY VZNIKU NOZOKOMIÁLNÍCH MYKÓZ

*Candida spp.*, která je nejčastějším původcem mykotické infekce, je součástí normální slizniční mikroflóry zažívacího traktu a je také v malém množství nalézána na kůži. Jakékoliv narušení integrity těchto míst zvyšuje možnost vzniku infekce.

S jistotou není znám žádný faktor odpovědný za virulenci kmenu *C. albicans*. Předpokládá se, že k nim patří schopnost rychlého klíčení ve tkáních,

tvorba proteás, přítomnost adhezinů a schopnost rychle měnit povrchové struktury.

Riziko vzniku houbových infekcí se exponenciálně zvyšuje s užíváním širokospektrých antibiotik. Antibiotika podporují růst hub v důsledku potlačení růstu přirozené mikrobiální flóry. Následně vzniklá vysoká místní koncentrace kvasinky umožňuje její přemístění přes neporušenou sliznici, čemuž napomáhá i intestinální atrofie. Ta souvisí s poklesem funkce střevní sliznice, která je způsobená intestinální ischemií nebo celkovou parenterální výživou.

Intravaskulární katetry považujeme za velmi významné rizikové faktory rozvoje kandidemie. Tyto katetry jsou obvykle kolonizovány intra- nebo extraluminálně přemístěním kandid z povrchu kůže. Časté zavádění katetrů tak znamená zvýšené riziko vzniku invazivní bakteriální nebo houbové infekce.

Užívání kortikosteroidů, imunosupresiv, cytostatik, ozařování ( léčby tumorů, krevních malignit) nebo samotné patologické stavy pacienta navozují defekty imunity.

Popáleniny zvyšují riziko v důsledku ztráty ochranné bariéry- pokožky. Procento poškození pokožky koreluje s výší rizika.

U diabetiků, kde hraje roli hyperglykémie, u alkoholiků v důsledku špatné výživy snadno probíhá endogenní pomnožení patogenů a následuje invaze do dalších tkání. Poruchy vstřebávání některých látek- takzvaný malabsorpční syndrom, některá onemocnění ledvin ( nefrotický syndrom), chronická jaterní onemocnění jsou rovněž rizikovými faktory z hlediska rozvoje systémové mykózy.

V neposlední řadě mohou být příčinou vzniku mykotické infekce získané závažné poruchy obranyschopnosti- onemocnění způsobené virem získané imunodeficience ( HIV) -AIDS. Tento virus napadá bílé krvinky a vede k těžké poruše obranyschopnosti.

K nejčastějším autoimunním onemocněním patří zánět štítné žlázy, zánět střev- Crohnova choroba, ulcerózní kolitida, nemoci krve ( imunní trombocytopenická purpura, autoimunní hemolytická anémie), systémový lupus erythematoses, dermatomyositis a další.

### 4.3.2 ETIOLOGICKÁ AGENS MYKOTICKÝCH NOZOKOMIÁLNÍCH NÁKAZ

Původcem nozokomiálních mykóz mohou být následující agens

- *Aspergillus* spp. (*A. fumigatus*, *A. flavus*, *A. niger*)
- *Bipolarit* spp.
- *Candida* spp. (*C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. krusei*, *C. lusitania*, aj.)
- *Culvularia* spp.
- *Fusarium* spp. (*F. solani*, aj.)
- *Malassezia* spp. (*M. furfur*)
- *Paecilomyces* spp. (*P. lilacinus*)
- *Penicilium* spp.
- *Rhizomucor* spp. (*R. pusillus*)
- *Rhizopus* spp. (*R. oryzae*)
- *Rhodotorula* spp.
- *Saksenaea* spp.
- *Trichoderma* spp.
- *Yarowia* spp.

Celosvětově patří k nejčastějším původcům mykóz dimorfní kvasinka *Candida albicans* a hyfomycety rodu *Aspergillus*. V poslední době se jako významný patogen jak u imunosuprimovaných pacientů tak u kriticky nemocných pacientů objevují *kandidy non- albicans*, zejména *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, dále *Cryptococcus neoformans*, *Pneumocystis carinii*.

Onemocnění jsou označována podle vyvolavatele. Jako kandidózy označujeme nemoci způsobené kvasinkami- kandidami. Je-li vyvolavatelem vláknitá houba *Aspergillus*, označujeme nemoc za aspergilózu.

### 4.3.2.1 Kandidóza

Kandidózy představují jednoznačně nejčastější a nejvýznamnější oportunní mykotické infekce. Jedná se především o endogenní infekce. Kandida je v určité kvantitě součástí přirozené mikroflóry sliznic zdravých jedinců. Při porušení mikrobiální rovnováhy v její prospěch dojde k přemnožení a ze saprofyta se stává oportunní patogen.

Většina druhů rodu kandida patří mezi bifázické, dimorfní houby. To znamená, že za určitých podmínek se rozmnožují kvasinkovou formou růstu (pučení), nebo potom mycelární formou.

Nález kvasinkové formy představuje saprofytický, komenzální vztah k makroorganizmu. Při prokázání mycelární formy se jedná spíše o invazivní formu, s případným rozvojem klinických projevů. Avšak jsou známy i případy, kdy při invazivní formě kandidóz byla jako původce prokázána kvasinková forma.

Dosud bylo popsáno 150 druhů kandid, pouze některé z nich se mohou uplatnit v patogenezi lidských infekcí :

- *C. albicans*
- *C. tropicalis*
- *C. glabrata*
- *C. parapsilosis*
- *C. krusei*
- *C. kefyr*
- *C. lusitaniae*
- *C. ouillermondii*
- *C. rugosa*

Nejčastěji prokazovaným druhem byla a stále je *C. albicans*, přestože se zvyšuje zastoupení non- albicans druhů kvasinek.

Podle klinické manifestace a rozsahu je možné kandidózy dělit do několika skupin:



- lokální, povrchové infekce, bez zásahu do hlubších tkání, se slizničními a kožními projevy

- orgánové kandidózy

- diseminovaná kandidóza

Diseminované a orgánové kandidózy souhrnně označujeme jako systémové infekce.

#### 4.3.2.2 Aspergilóza

Aspergily jsou v současné době druhým nejčastějším původcem oportunních mykóz.

Jsou to vláknité houby se saprofytickým způsobem života. Aspergily jsou ubikviterní, byly izolovány např. z ventilačního systému nemocničních budov, čaje, koření, zdiva budov. Nejčastěji se přenáší vzduchem, ze vzduchu se jeho spóry snadno dostanou až do alveolů plic, kde způsobují pneumonii. *Aspergillus* je jen výjimečně izolován z míst mimo respirační trakt. Jinou možností přenosu je kontakt, kdy je zdrojem obvaz nebo lékařský nástroj.

*Aspergillus* tvoří kolonie plísňového typu se septovanými hyfami a palicemi s konidiemi. V přírodě přežívají ve formě spór (konidií) o velikosti 2-3  $\mu\text{m}$ .

Z více jak 300 druhů jsou u pacientů nejčastěji izolované tři druhy:

- *A. fumigatus*

- *A. flavus*

- *A. niger*

#### 4.3.3 PŘÍZNAKY ONEMOCNĚNÍ PLÍSNĚMI

Pro lékaře není snadné rozpoznat plísňové onemocnění. Příznaky jsou nespecifické, záleží na tom, který orgán lidského těla onemocní (jestli jde o onemocnění povrchové, lokalizované na určitém místě kůže nebo sliznice, nebo o onemocnění systémové). Diagnózu ještě zhoršuje fakt, že pacienti jsou často

léčení pro jiné závažné onemocnění, jehož příznaky mohou být podobné příznakům mykózy.

Při postižení kůže sledujeme pouze změny v místě infekce- zarudnutí, vyrážku, svědění, pálení. Postižené bývají zejména místa zapáčky ( třísla, podpaží, meziprstní prostory nohou). Podobné projevy má postižení sliznic dutiny ústní nebo pohlavních orgánů.

Rozpoznání systémových mykóz je složitější. K nejčastějším příznakům patří horečka, zvláště dlouhotrvající, která nereaguje na antibiotickou léčbu. Dále celkové neprospívání a chátrání organismu, občas vyrážka.

Neléčená invazivní mykóza směřuje od nezávažných projevů k závažným a vždy vede k postupnému zhoršování stavu a ke smrti.

## 5 LABORATORNÍ DIAGNOSTIKA HUB

Pro diagnostiku plísní jsou v současnosti k dispozici různé vyšetřovací metody. Žádná z nich však není stoprocentně spolehlivá a žádná z nich při negativním nálezu nezaručuje, že můžeme onemocnění vyloučit. Za jednoznačně prokázané se mykotické onemocnění považuje pouze při průkazu plísně mikroskopicky nebo kultivačně z postižené tkáně.

Při mikroskopii se sleduje nejčastěji speciálně barvený nebo nativní biologický vzorek pod mikroskopem a hledají se typické znaky charakteristické pro jednotlivé houby a kvasinky.

Další skupinou vyšetření jsou zobrazovací metody. Rentgenový snímek pomůže odhalit postižení plic, vedlejších dutin nosních nebo kostí, ultrazvukem lze diagnostikovat onemocnění nitrobřišních orgánů (jater, sleziny, ledvin). Vyšetření počítačovou tomografií (CT) a magnetickou rezonancí (MRI) se používá kromě již uvedených orgánů také při podezření na mykózu mozku.

Endoskopická vyšetření jsou vyšetření, při kterých je do různých orgánů těla (průdušky, žaludek, močový měchýř, střevo ...) zavedena tenká hadička s optickým aparátem, vyšetřovaný orgán je důkladně prohlédnut.

Při podezření na mykotickou infekci některého orgánu je pro diagnózu nejlepší odebrání malého kousku napadené tkáně (biopsie) a jeho vyšetření histologické a mikrobiologické. Vzorek lze odebrat při endoskopii, jehlou při takzvané punkční biopsii nebo při malé operaci.

K pomocným vyšetřením patří i vyšetření krve. Změny v krevním obraze, zvýšená sedimentace a C-reaktivní protein mohou svědčit o zánětu v těle. Je možné stanovovat také antigeny některých plísní a protilátky proti nim, ale tato vyšetření nejsou zcela spolehlivá.

## 5.1 MATERIÁL

### 5.1.1 ODBĚR MATERIÁLU

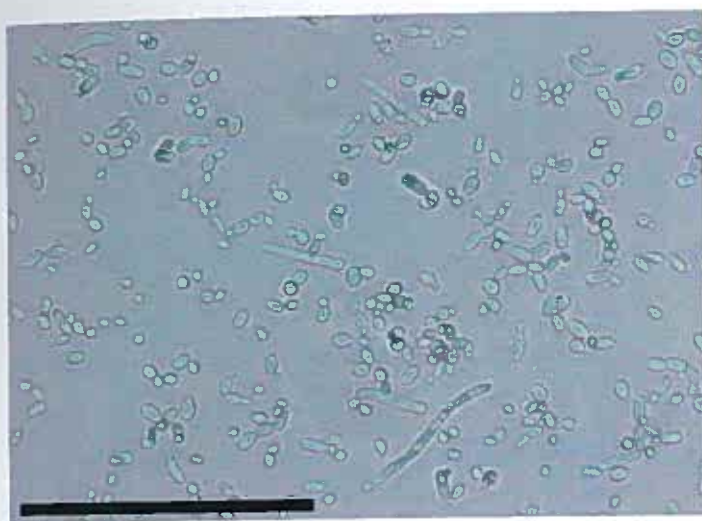
Materiál se odebírá podle formy a lokalizace probíhajícího onemocnění. Při postižení kůže na jiných částech těla či při postižení nehtu se vyšetřují seškrábnuté části zachvácené kůže nebo nehtu, rovněž za pomoci mikroskopického vyšetření v 10 % hydroxidu draselném nebo fluorescenční mikroskopii. Předběžná diagnóza je stanovena při nalezení hyalinních rozvětvených filamentózních útvarů. Ke konečné diagnóze je nutná kultivace. Materiálem pro mykologické vyšetření dále může být stěr ze sliznic ( dutina ústní, nos, krk, konečník, pochva...), sputum, bronchiální laváž, moč, stolice, hnis, krev, tkáň.

Je nutné aby materiál byl vyšetřen co nejdříve, jinak dochází k riziku zkreslení konečného výsledku. V případě časové prodlevy (několik hodin) mezi odebráním a zpracováním vzorku je třeba vzorek přechodně uchovávat při teplotě kolem 10°C.

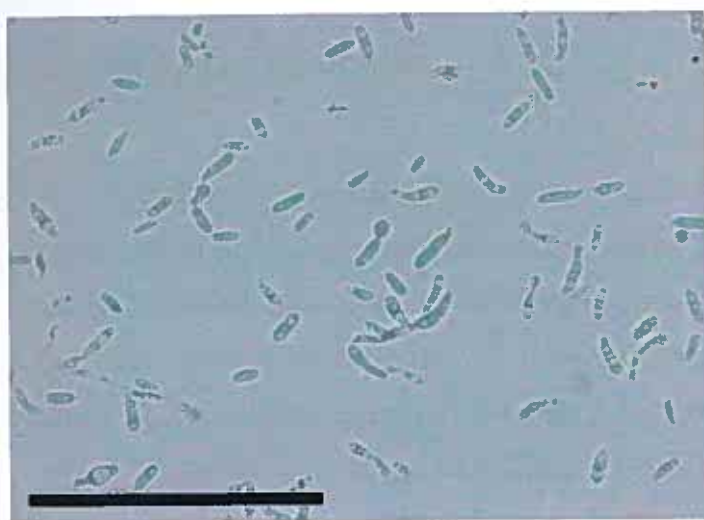
Na tamponu odebraný materiál je vhodné zanořit do transportního media , které udrží vzorek stabilní po dobu minimálně 24 hodin. Před laboratorním zpracováním se vzorek uchovává se při pokojové teplotě.

## 5.2 MIKROSKOPIE

Mikroskopie je přímá, pomocná metoda při identifikaci hub. V preparátech se vyšetřující zaměřuje zejména na druhové morfologické znaky. Pro mikroskopii hub se používají nativní preparáty, preparáty barvené Lugolovým roztokem, methylenovou nebo bavlnovou modří v laktofenolu a Gramovo barvení.



Obr. 1. *C. krusei* – nativní preparát, úsečka na fotografii znázorňuje délku 100  $\mu\text{m}$



Obr. 2. *C. rugosa* – nativní preparát, úsečka na fotografii znázorňuje délku 100  $\mu\text{m}$



Obr. 3. *C. tropicalis* – nativní preparát, úsečka na fotografii znázorňuje délku 100  $\mu\text{m}$

### 5.2.1 GRAMOVO BARVENÍ

Podstatou rozdílu v barvitelnosti bakterií podle Grama (gram pozitivní a gram negativní mikroorganismy) je rozdílná stavba bakteriální stěny. Při barvení vzniká v bakteriální buňce komplex krystalové violeti s jódem, který se u gram negativních bakterií při odbarvení alkoholem nebo acetonem snadno vyplavuje, zatímco u gram pozitivních bakterií po delší dobu vzdoruje.

Následným kontrastním karbolfuchsinovým barvením se gram negativní bakterie dobarví do růžova, gram pozitivní mikroorganismy zůstávají temně fialové.

Postup barvení dle Grama:

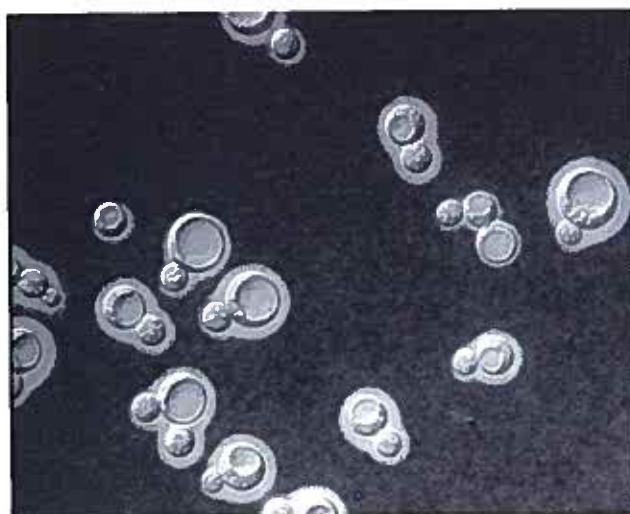
1. Na fixovaný preparát se kápne krystalová violet', nechá se působit 1 minutu.
2. Krystalová violet' se slijí ze sklíčka a převrství několika kapkami Lugolova roztoku. Necháme působit 1 minutu. Lugol se váže na barvivo a vytváří s ním precipitát. Někdy se tento krok označuje jako moření.
3. Preparát promýváme acetonem dokud se vyplavuje barvivo.
4. Sklíčko opláchneme destilovanou vodou.
5. Provede se kontrastní barvení karbolfuchsinem. Karbolfuchsin se nechá působit po dobu jedné minuty.

6. Karbolfuchsin se slije a sklíčko se opláchne destilovanou vodou.
7. Preparát se nechá uschnout na vzduchu ( lze uspíšit opatrným zahříváním nad plamenem kahanu).

Preparát se prohlíží optickým mikroskopem příslušným zvětšením většinou s pomocí imerzního oleje.

### 5.2.2 BARVENÍ TUŠÍ

Preparáty s tuší se používají hlavně při detekci kryptokoků v likvoru, jejich polysacharidová pouzdra zůstávají neobarvena a jsou tak zvýrazněna na černém podkladu tuše.



Obr. 4. *Cryptococcus neoformans* – preparát barvený tuší

### 5.3 KULTIVACE

Pro úspěšnou identifikaci patogenních hub je nutné provést ve většině případů jejich izolaci. Pokud ze základního biologického materiálu naroste po příslušné inkubační době mykotické agens, je vhodné ověřit tento nález mikroskopicky a kolonie primoizolátu přenést sterilní bakteriologickou kličkou na Petriho misku s SGA a rozočkovat. Po inkubaci se provádí další identifikace

různými metodami. Samotná inkubace probíhá při teplotě 20 °C a 37 °C. Kultury kvasinek a vláknitých hub vyrůstají obvykle do 24 nebo 72 hodin. Jestliže do 7 dní nenarostou žádné kolonie, lze s vysokou pravděpodobností označit kultivaci jako negativní. V případě dermatofytů trvá inkubace nejméně 3 týdny. Do živného média se mohou přidat antibiotika, která brání růstu bakterií a ty potom neruší identifikaci mykotického agens.

### 5.3.1 KULTIVAČNÍ MÉDIA

1. Sabouraudův glukózový agar ( SGA)
2. SGA s chloramfenikolem
3. SGA s gentamicinem



Obr. 5. *Candida albicans* vykultivovaná na Sabouraudově agaru

### 5.3.2 SELEKTIVNÍ MÉDIA

Chromagar

Chromagar obsahuje chromopepton, glukózu, chloramfenikol, chromogen směs a agar. Chromagar je používán jako selektivní izolační medium pro



kvasinkové druhy. Kolonie *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. krusei* produkují díky obsaženým chromogenickým substrátům v mediu rozdílné barvy, které umožňují přímou detekci těchto kvasinkových species na izolační plotně.

Směs chromogenů se skládá z přírodních substrátů (chromogenů), které uvolňují rozdílně barevné složky v závislosti na degradaci specifických enzymů. Toto dovoluje diferenciaci určitých species, nebo detekci určitých skupin organismů, s pouze minimem konfirmačních testů. Chloramfenikol inhibuje většinu bakteriálních kontaminant.

Kolonie *C. albicans* jsou světle až středně zelené, *C. tropicalis* modrozelené až kovově modré, *C. krusei* světle růžové s bílým ohraničením a *C. glabrata* zelená s bílým okrajem.



Obr. 6. *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. glabrata* vykultivované na Chromagaru

### 5.3.3 HEMOKULTIVACE

Dospělému pacientovi odebíráme alespoň 5 – 10 ml krve ( při vzestupu teploty, před zahájením léčby antibiotiky, v průběhu antibiotické léčby těsně před podáním terapeutické dávky antibiotik), kterou potom přeneseme do kultivační lahvičky. Vždy se odebírá krev minimálně ze dvou různých míst v určitých časových intervalech ( několikrát za den). Zakládají se 2 lahvičky, na aerobní a

anaerobní kultivaci. Lahvičky se vkládají do automatu ( Bactec, Bact/Alert) a kultivují 7- 14 dní. Automat detekuje změnu stavu hemokultury ( produkce plynu, konkrétně narůstající koncentraci  $\text{CO}_2$  ) a pozitivní nález signalizuje akusticky a světelně. Kromě bakteriálních původců, lze tímto způsobem prokázat některé mykotické mikroorganismy (kandidy, aspergily...). Při důvodném podezření na mykotickou infekci lze cíleně pro hemokultivaci použít speciální kulturační lahvičky se zvýšenou detekční schopností pro mykotická agens a případně prodloužit dobu kultivace.

## 5.4 IDENTIFIKACE

### 5.4.1 TEST TVORBY CHLAMYDOSPÓR

*C. albicans* tvoří chlamydospóry. Prokazují se *in situ* na kukuřičném nebo rýžovém agaru po 2-3 dnech inkubace při teplotě 26- 28 °C.



Obr. 7. Chlamydospóry *C. albicans*

### 5.4.2 TEST KLÍČNÍCH HYF V SÉRU

Analyzovaný materiál se naočkuje na půdu Sabouraudův agar, po primokultivaci přeneseme část kolonie sterilní kličkou do zkumavky se sérem (bovinního nebo telecího). Po 4 hodinách inkubace při teplotě 37 °C mikroskopujeme nativní preparát. Pokud se u testované kvasinky vytvořily klíční hyfy, jedná se o *C. albicans*.



Obr. 8. Klíční hyfy *C. albicans*

### 5.4.3 AUXANOGRAMY

Auxanogramy jsou testy, které zjišťují zda daná kultura je schopná asimilovat zdroj uhlíku (cukr) a dusíkatou látku za přítomnosti vzduchu.

Auxacolor

Auxacolor (BIO RAD) je test k identifikaci kvasinek založený na utilizaci cukrů

(asimilace uhlíku, rezistence k aktidionu a tvorby fenoloxidázy). Set obsahuje 13 cukrů: glukóza, maltóza, sacharóza, galaktóza, laktóza, rafinóza, inozitol, celobióza, trehalóza, adonitol, melezitóza, xylóza, arabinóza.

Používaná suspenze je vypěstovaná za 24 až 48 hodin na SGA , mikropipetou homogenizována a upravena tak, aby zákal odpovídal zákalu kontroly obsažené v testu. Mikropipetou se rozdělí do každé jamky mikrotitrační destičky dvě kapky připravené suspenze. Destička je překryta přilnavou fólií a inkubuje se 24 nebo 48 ( 72) hodin při teplotě 30 ° C. Pozitivním výsledkem je barevná změna pH indikátoru ( bromokresolová modř) z modré do žluté a vytvoření zákalu v jamce. Navíc je sledována citlivost k aktidionu a fenoloxidázová aktivita u *Cryptococcus neoformans*. Jamky jsou uspořádány po trojicích do pěti skupin. Tyto tři hodnocené znaky poskytují bodové hodnocení. Konečným výsledkem je číselný kód, pomocí kterého se provádí identifikace v přiložené tabulce.



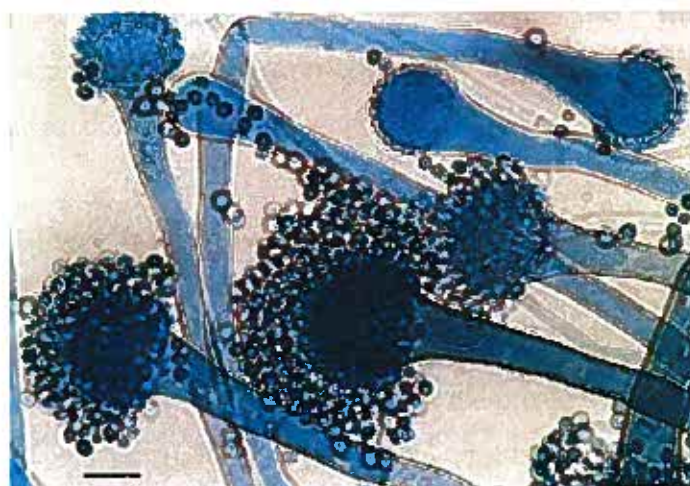
Obr. 9. Auxacolor test

#### 5.4.4 IDENTIFIKACE VLÁKNITÝCH HUB

Diagnostika vláknitých hub se provádí makroskopickým a mikroskopickým posouzením morfologie narostlé kultury. Hodnotí se zejména struktura, barva kolonie ( i spodina kolonie) , velikost a uspořádání spór a reprodukčních orgánů.



Obr. 10. *Aspergillus flavus* – preparát barvený bavlnovou modří



Obr. 11. *Aspergillus fumigatus* – preparát barvený bavlnovou modří

U invazivní aspergilózy nestačí pouze kultivační a mikroskopické stanovení. U invazivních forem mykóz (kandidózy, aspergilózy apod.) je často problémem získání validního biologického materiálu z místa předpokládané infekce (vnitřní orgán, tkáň), čímž jsou výrazně omezeny možnosti mikroskopické a kultivační diagnostiky. Proto se stále hledají další laboratorní metody s cílem zvýšit citlivost laboratorního vyšetření a tím napomoci časně diagnóze těchto závažných, často život ohrožujících infekcí. K těmto metodám řadíme v posledních letech průkaz cirkulujících antigenů typických pro aspergily (galaktomannan) nebo kandidy (mannan) v séru nebo v BAL (bronchoalveolární laváž). Další metodou je PCR.

### 5.4.5 POLYMERÁZOVÁ ŘETĚZOVÁ REAKCE ( PCR)

Polymerázová řetězová reakce je metoda, která se často používá k detekci patogenních hub. Umožňuje zjistit v infikovaném biologickém materiálu přítomnost velmi malých množství mykologických DNA.

PCR je vysoce účinná technika, kterou se *in vitro* exponenciálně zmnožují (amplifikují) vybrané sekvence nukleových kyselin. Podmínkou pro aplikaci této metody je znalost nukleotidové sekvence hledané nukleové kyseliny, na jejímž základě se připraví komplementární oligodeoxyribonukleotidy, které se vážou před a za hledanou oblast a slouží jako primery polymerační reakce. Primery se připravují automatickou chemickou syntézou a lze je získat na zakázku od řady výrobců ( na běžném komerčním trhu zatím chybí).

Principem metody je amplifikace cílových úseků DNA ohraničených primery mnohonásobným opakováním cyklů PCR. Každý cyklus tvoří následující fáze:

1. Izolace DNA – volí se postup dle prostředí, v němž se mikroby a tudíž DNA nacházejí. K DNA se přidává termostabilní DNA polymerázy, dále nukleotidy ve formě trifosfátů a oligonukleotidové primery, které umožní nasednutí polymerázy.
2. Tepelná denaturace studované DNA. Počáteční fází PCR je tepelná denaturace vzorové ( templátové) DNA, prováděná při teplotě 94-96 °C. V prvním cyklu denaturace trvá 2-3 minuty a ve všech následujících cyklech probíhá 5-35 vteřin, aby se příliš nesnižovala aktivita termostabilní polymerázy.
3. Vazby primerů- resociace. Ochlazením na hybridizační teplotu 50-65 °C se vytvoří podmínky pro asociaci primerů s komplementárními sekvencemi DNA. Asociací primerů se vymezuje amplifikovaná oblast na obou templátových řetězcích. Tato fáze obvykle trvá 30-60 vteřin.
4. Extenze ( elongace) primerů. Prodlužování primerů Taq DNA polymerázou probíhá ve směru 5' - 3' na obou řetězcích obvykle při teplotě 72 °C po dobu 30-60 vteřin.
5. Opakování cyklu bodů 2-4 se cyklicky opakují zpravidla třicetkrát, jelikož produkty každého cyklu PCR slouží zároveň jako templáty pro následující

cykly, narůstá každým opakováním počet kopií amplifikované oblasti dvojnásobně, takže teoreticky vznikne  $2^{30}$  kopií. V posledním cyklu se polymerace prodlužuje na 3 minuty. Vzniklými produkty jsou řetězce dvouvláknové DNA, jejichž konce jsou vymezeny 5' konci primerů a jejichž délky jsou dány místy resociace primerů.

6. PCR se ukončí ochlazením inkubační směsi na 0-4 °C.
7. Automatické opakování jednotlivých cyklů umožňují speciální programovatelné a procesorem řízené termostaty, tzv. PCR termocyklery.

Detekce dané amplifikované DNA se provádí pomocí gelové elektroforézy, kde se pozitivní nález jeví jako jeden výrazný proužek v gelu. Pro vizualizaci DNA se používá fluorescenční barvivo a transluminátor nebo automatický analyzátor.

Poslední desetiletí se zasadilo o zavedení této metody v diagnostice infekčních chorob. V mykologii hlavně invazivní aspergilózy. Typickým, ale ne výhradním, původcem invazivní aspergilózy je *Aspergillus fumigatus*.

PCR však stále nebyla zavedena do rutinní laboratorní praxe. Hlavním důvodem je obtížná standardizace metody PCR. Je to způsobeno přetrvávajícími problémy technického rázu.

U PCR je důležité vyvarovat se falešně pozitivních a falešně negativních výsledků. Falešně pozitivní výsledky mohou být způsobeny kontaminací, falešně negativní výsledky inhibitory PCR.

Pro PCR stále není jasně určen typ materiálu, plná krev nebo sérum. Nález aspergilového DNA v bronchoalveolární laváži není pro diagnózu invazivní aspergilózy směrodatný ( může jít o kontaminaci vzdušnými spórami nebo infekci horních cest dýchacích).

Nové studie prokázaly, že *Aspergillus fumigatus* během své aktivní růstové fáze produkuje do okolí ( tělních tekutin) směs bílkovin a polysacharidů bohatých na galaktomannan. Postranní řetězce manannu, které obsahují galaktofuranové jednotky, jsou imunogenní ( reagují s lidskými protilátkami). Galaktomannan se ukázal být lépe stanovitelným antigenem než komponenty buněčné stěny aspergilu. Průkaz galaktomannanu se provádí metodou latexové aglutinace nebo citlivější metodou ELISA.

#### 5.4.6 ELISA (ENZYME-LINKED IMMUNO SORBENT ESSAY)

ELISA analytická metoda využívaná ke kvantitativnímu stanovení různých antigenů nebo protilátek (nejčastěji IgG, IgM). Metoda je založena na vysoce specifické interakci antigenu a protilátky, přičemž na jednoho z těchto partnerů je kovalentně navázán enzym (nejčastěji peroxidáza nebo alkalická fosfatáza). Tento enzym katalyzuje chemickou přeměnu substrátu, který je přidán do reakční směsi, na produkt, který je barevný (stanovuje se spektrofotometricky) nebo fluoreskující (fluorimetrické stanovení). Koncentrace produktu je úměrná koncentraci antigenu nebo protilátky ve vzorku.

Existují dvě varianty metody ELISA. U přímé ELISA je značená přímo lidská protilátka. U nepřímé ELISA je enzymem značená protilátka zvířecího druhu, která se specificky váže na protilátku lidskou (imunoglobulin pacienta, který se vytvořil proti antigenu).

Při podezření na invazivní aspergilózu se sérum pacienta nakápne do jamky mikrodiluční destičky, jejíž povrch je pokryt galaktomannanem. Inkubace probíhá 3 hodiny. V případě pozitivního nálezu se lidská protilátka naváže na galaktomannan. Na lidskou protilátku se naváže zvířecí protilátka (firma BIO RAD používá krysí monoklonální protilátky EBA-2) značená enzymem peroxidázou, která přemění substrát. Tato přeměna se projeví barevnou změnou.

#### 5.4.7 AGLUTINACE

Principem aglutinačních reakcí je shlukování částic antigenu protilátkami za vzniku sraženiny viditelné pouhým okem. Pro detekci galaktomannanu, případně mannanu se konkrétně využívá latexová aglutinace, tedy částice latexu potažené monoklonální protilátkou proti příslušnému antigenu. Oproti ELISA metodě je tento test jednodušší, ale jeho citlivost je nižší a navíc neumožňuje případnou kvantifikaci nálezu, což může být například důležité pro monitorování



účinnosti systémové antimykotické léčby u vysoce ohrožených pacientů (hemato-onkologie..)

## 6 ZÁVĚR

Cílem mé práce byl přehled a zhodnocení současných laboratorních možností diagnostiky mykotických infekcí s důrazem na systémové infekce. I přes značný pokrok a rozvoj nových diagnostických postupů v mikrobiologii je patrné, že zdaleka ještě není důvod k úplné spokojenosti s citlivostí a specificitou všech vyšetření. Každá metoda má kromě přínosu i své nedostatky a proto je optimální, zejména u těžkých onemocnění, využít co nejširšího spektra dostupných metod a v každém případě korelovat jejich výsledky s klinickým stavem a dalšími laboratorními nálezy (zobrazovací metody, biochemie, hematologie...).

Jak bylo již zmíněno v textu nerozpoznaná mykóza může být pro pacienta smrtící komplikací, ale na druhé straně intenzivní antimykotická léčba pouhé kolonizace sliznic, neadekvátně interpretovaná jako infekce, může rovněž pacienta poškodit, nehledě na ekonomické náklady terapie.

Domnívám se proto, že u těžkých pacientů je třeba individuálně posuzovat význam jednotlivých vyšetření a s maximální zodpovědností je interpretovat. K tomu je nezbytná úzká spolupráce a častá komunikace kliniků, mikrobiologů, epidemiologů a dalších odborností, jejichž informace a poznatky jsou velmi cenné při komplexním posuzování problematiky mykotických infekcí.

## 7 LITERATURA

1. [http://www.bcgsc.ca/about/news/crypto\\_public](http://www.bcgsc.ca/about/news/crypto_public)
2. <http://www.bio-rad.com>
3. <http://www.volny.cz/microbiology/cesky/scripta/mykologie/mykologie.html#mykologie>
4. <http://www.poliklinika-harni.hr/temel.asp?id=276&godina=2006>
5. <http://www.vscht.cz/obsah/fakulty/fpbt/ostatni/miniatlas/mikr.htm>
6. <http://www.biovendor.cz/klinika/index.html>
7. Flanagan, P. G., Barnes, R. A.: Fungal infection in the intensive care unit. *Journal of Hospital Infection* 1998, 38, 163-177
8. Pfaller, M. A.: Epidemiology of candidiasis. *Journal of Hospital Infection* 1995, 30, 329-338
9. Cohen, J., Powdery, W. G.: *Infectious diseases- sekund edition*. Mosby 2004
10. Mandell, G. L., Bennet, J. E., Dolin, R.: *Principles and Practice of Infectious Diseases*. Churchill Livingstone, 2000
11. Votava, M.: *Lékařská mikrobiologie speciální*. 1. vyd. Neptun, 2003
12. Votava, M., Ondrovčík, P.: *Vybrané kapitoly z klinické mikrobiologie*. 1. vyd. Neptun, 1998
13. Eggimann, P., Gardino, J., Pittet, D.: Management of *Candida* species infections in critically ill patients. *Management of candidiasis. Rev., Infectious Diseases*, 3, 2003, 778-780
14. Buchta, V., Jílek, P., Horáček, J., Horák, V.: *Základy mikrobiologie a parazitologie pro farmaceuty*. 1. vyd. Karolinum, 1998
15. Lagté, J.P., Kobayashi, H., Debeaupuis, J.P., Diaquin, M.: Chemical and Immunological Characterization of the Extracellular Galactomannan of *Aspergillus fumigatus*. *Infection and Immunity*, 12, 1994, 5424-5433
16. Rovira, M., Jiménet, M., Bellacasa, J., P., Mensa, J.: Detection of *Aspergillus* Galactomannan by Enzyme Immunosorbent Assay in Recipients of Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation: A Prospective Study. *Transplantation*, 8, 2004, 1260-1264

17. Bretagne, S.: Molecular diagnostics in clinical parasitology and mycology: limit of the current polymerase chain reaction (PCR) assay and interest of the real-time PCR assay. *European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 9, 2003, 505-511
18. Henderson, V.,J., Hirvela, E.R.: Emerging and reemerging microbial threats. Nosocomial fungal infections. *Arch. Surg.* 1996, 131, 330-337