

Univerzita Karlova v Praze
Farmaceutická fakulta v Hradci Králové
Katedra biologických a lékařských věd

Laboratorní diagnostika houbových infekcí

Bakalářská práce

Hradec Králové, 2006

Eva Stopková

Ráda bych poděkovala Doc. RNDr. Vladimíru Buchtovi, CSc. Za odborné vedení a ochotnou pomoc při vypracování této bakalářské práce.

1. Obsah

1. OBSAH	3
2. ÚVOD	4
2.1. CÍL PRÁCE	5
3. TEORETICKÝ ÚVOD	6
3.1. HOUBY	6
3.2. OBECNÁ CHARAKTERISTIKA HUB	6
3.3. KLASIFIKACE LÉKAŘSKY VÝZNAMNÝCH HUB	7
3.4. ONEMOCNĚNÍ VYVOLANÉ HOUBAMI	8
3.5. ROZDĚLENÍ MYKÓZ	9
3.5.1. <i>Povrchové mykózy</i>	9
3.5.2. <i>Kožní mykózy</i>	9
3.5.3. <i>Podkožní mykózy</i>	10
3.5.4. <i>Hluboké mykózy</i>	10
3.6. NOZOKOMIÁLNÍ NÁKAZY	11
3.7. NOZOKOMIÁLNÍ MYKOTICKÉ INFEKCE	12
3.8. KANDIDÓZA	12
3.8.1. <i>Kožní a slizniční kandidóza</i>	13
3.8.2. <i>Systémová kandidóza</i>	13
3.9. KRYPTOKOKÓZA.....	14
3.10. ASPERGILÓZA.....	14
3.11. MUKORMYKÓZA.....	15
3.12. PNEUMOCYSTÓZA.....	15
4. LABORATORNÍ DIAGNOSTIKA MYKOTICKÝCH INFEKČÍ	16
4.1. MYKOLOGICKÉ LABORATORNÍ VYŠETŘENÍ	16
4.1.1. <i>Mikroskopie</i>	16
4.1.2. <i>Kultivace</i>	17
4.1.3. <i>Identifikace patogenních hub</i>	17
4.1.3.1. <i>Identifikace kvasinek</i>	18
4.1.3.2. <i>Identifikace vláknitých hub</i>	20
4.1.4. <i>Testování citlivosti</i>	20
4.1.4.1. <i>Diluční techniky</i>	20
4.1.4.2. <i>Difúzní agarová technika</i>	21
4.1.4.3. <i>Komerční soupravy k testování citlivosti hub k antimykotikům in vitro</i>	22
4.1.4.4. <i>Ostatní metody</i>	23
4.1.5. <i>Imunologické vyšetření</i>	23
5. LITERATURA	25

2. ÚVOD

V posledních desetiletích značně vzrostl výskyt, důležitost a závažnost mykotických onemocnění, zvláště v souvislosti s jinými závažnými stavy a nemocemi člověka.

Příčin tohoto vývoje je několik. Jednak je to vyšším procentem zachytu, které je dáno zlepšující se mykologickou diagnostikou, ale současně se jedná také o zvyšující se výskyt mykóz ovlivněných různými predispozičními faktory, mezi které patří např. používání širokospektrých antibakteriálních antibiotik, kortikosteroidů, cytostatik, ionizujícího záření, transplantační zákroky, složité operace, hemodialýza, diabetes mellitus, hormonální antikoncepce, AIDS a těžké akutní a chronické infekce. Současně se rozšiřuje také spektrum humánně patogenních hub.

Další závažnou skutečností je, že se mykotické infekce uplatňují jako původci závažných infekčních komplikací, jako jsou nozokominální nákazy. Tyto infekce jsou téměř vždy spojeny s pobytem imunoalterovaných pacientů v nemocničním prostředí, zvláště na oddělení JIP a mají často iatrogenní původ.

2.1. Cíl práce

Cílem práce je podat přehled hlavních původců mykotických infekcí v nemocničním prostředí a zásadách jejich laboratorní diagnostiky.

3. Teoretický úvod

3.1. Houby

Houby jsou dnes řazeny do samostatné říše Fungi. Jedná se o jedno - a vícebuněčné eukaryotní organismy, které se vyznačují saprofytickým způsobem života. Přírozenou rolí hub v ekosystému je jejich postavení destruentů rozmanitých látek organického původu.

Z 300 000 dosud popsaných druhů hub je asi o 150-ti druzích známo, že mohou vyvolávat onemocnění (mykózy) u člověka a zvířat (Hlisnikovská, 2002). Některé houby jsou vysoce patogenní a způsobují infekci i u exponovaných osob. Jiné druhy hub jsou příležitostné patogeny, jež způsobují onemocnění jen u osob se sníženou imunitou. Forma a závažnost mykóz závisí na způsobu jakým se do těla infekce dostává, na bráně vstupu a na míře inkompetence hostitele (Haber et al., 1995).

3.2. Obecná charakteristika hub

Houby tvoří velkou a různorodou skupinu heterotrofních eukaryotních organismů, saprofytů, parazitů nebo komenzálů. Absorbují výživu buď parazitováním živých organismů nebo napadáním organické hmoty jako saprotrofové. Buněčná stěna hub obsahuje polysacharidy a chitin. Cytoplazma je obklopena plasmatickou membránou obsahující ergosterol. Houby dokáží zvyšovat svou virulenci pomocí adheze na biologické (sliznice, endotel) i umělé povrchy (katétry). Mají schopnost ubránit se fagocytóze a svými vláknitými výběžky rozšiřují kontinuitu tkáně, která umožňuje penetraci houby do hlubších struktur (Buchta, et al. 2000) .

Houby se rozmnožují dvěma hlavními typy reprodukce, sexuálně nebo asexuálně. Sexuální reprodukce na rozdíl od asexuální, zahrnuje spojení dvou jader následované meiosisou. Tímto sexuálním procesem vznikají spóry buď uvnitř (askospóry) nebo vně (basidiospóry) specializovaných orgánů. Při asexuální reprodukci vznikají endospóry (sporangiospóry) nebo exospóry (konidie) (Buchta, et al., 2000).

Základní stavební jednotkou stélky vyšších hub je vlákno-hyfa. Hyfy se obvykle větví a splétají se v podhoubí tzv. mycelium. Na specializovaných hyfách zvaných sporofory se tvoří spóry (výtrusy). Spóra je reprodukční jednotka, která může být vytvořena buď sexuálním nebo asexuálním procesem. Jedná-li se o nepohlavní spóry mluvíme o konidiích, které se tvoří na konidioforech.

Vedle hub s typickou vláknitou strukturou existuje početná skupina houbových organismů (kvasinky), jejichž stélka je redukována na jednobuněčné buňky tzv. blastospóry. Kvasinky se reprodukují pučením (nepohlavní rozmnožování), při němž se na buňce vytvoří výrůstek, který se zvětšuje a nakonec se od mateřské buňky oddělí. Za určitých podmínek mohou kvasinky vytvářet pseudomycelium (řetízky prodloužených buněk) (Buchta, et al., 2000).

Jako dimorfismus mikromycetů označujeme jejich schopnost vytvářet dvě zcela odlišné morfologické formy. S tímto fenoménem se setkáváme u řady kvasinek, které takto přizpůsobují svoji morfologii podmínkám zevního prostředí. Mohou tak růst buď jako kvasinky (blastická fáze) nebo ve formě vláknité (pseudomycelium, mycelium).

3.3. Klasifikace lékařsky významných hub

Eumycota

- Zygomycetes
 - Mucorales (*Rhizomucor, Rhizopus, Absidia*)
 - Entomophorales (*Basidiobolus, Conidiobolus*)
- Ascomycetes (*Talaromyces, Eurotium, Arthroderma, Ajellomyces, Saccharomyces, Claviceps*)
- Basidiomycetes
 - Agaricales (*Amanita, Boletus, Inocybe, Tricholoma*)
- Fungi Imperfecti (Deuteromycetes)
 - Blastomycetes (*Candida, Cryptococcus, Malassezia, Rhodotorula, Trichosporon*)
 - Hyphomycetes (*Alternaria, Aspergillus, Blastomyces, Epidermophyton, Fusarium, Geotrichum, Histoplasma, Microsporium, Penicillium, Trichophyton*) (Buchta, et al., 2000).

3.4. Onemocnění vyvolané houbami

Houby jsou eukaryotní sporogenní organismy, které jsou jednobuněčné, event. vícebuněčné, vláknité a některé mají ve stěně chitinovou složku. Stěna hub obsahuje manan, vůči němuž člověk postrádá mechanismy k jeho odstranění (natrávení v procesu fagocytózy). Část z nich je schopna vyvolat různá, a dokonce i závažná onemocnění u člověka (Kožousek, 2003).

Mycetismy: zahrnují alimentární otravy požitím plodnic vyšších hub jako potravy a následnou intoxikaci jejich toxiny. Nejčastěji jde o druhy *Amanita phalloides*, *A. pantherina*, *A. muscaria*.

Mykotoxiny dělíme do dvou skupin na:

- cytotoxiny (amanitoxiny, phallatoxiny)
- neurotoxiny (muskarin).

Mykotoxikózy: jsou otravy toxiny nebo jinými toxickými látkami sekundárního metabolismu hub jako následek požití kontaminované potravy, kontaktem nebo inhalací. Hlavními producenty mykotoxinů jsou vláknité houby rodu *Aspergillus*, *Penicillium* a *Fusarium*. Mykotoxiny představují výrazný rizikový faktor. Jejich účinek může být neurotoxický, hepatotoxický či imunosupresivní řada je potencionálními karcinogeny a teratogeny.

Na základě mechanismu působení dělíme mykotoxiny na:

- inhibitory energetického metabolismu
- inhibitory proteosyntézy
- modifikátory cytoskeletu
- mutageny a karcinogeny.

K nejvýznamnějším mykotoxinem jsou aflatoxiny. Jedná se o termostabilní látky. Nejtoxičtější je aflatoxin B produkovaný toxigeními kmeny *A. flavus*.

Mykoalergie: jsou hypersenzitivní reakce imunitního systému hostitele na antigenní stimulaci houbového alergenu, obvykle představovaného spórami. Po chemické stránce se většinou jedná o polysacharidy a glykoproteiny. K nejvýznamnějším alergenním houbám náleží hyfomycety rodu *Cladosporium*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium*.

Alergická onemocnění vyvolaná houbami se dělí do čtyř hlavních skupin:

- alergická rhinitis a astma
- alergická alveolitis

- chronická bronchitis
- toxický syndrom reakce na organický prach.

Mykózy: jsou onemocnění charakterizovaná kolonizací, následnou proliferací a případnou diferenciací a sporulací houby v tkáních nebo tělesných tekutinách hostitele, které mají za následek jeho poškození. K přenosu houbové nákazy dochází inhalací, kontaktem nebo traumatem (Buchta, et al., 2000).

3.5. Rozdělení mykóz

3.5.1. Povrchové mykózy

Povrchové mykózy jsou lokalizovány v nejsvrchnějších vrstvách kůže a kutikule vlasů. Prakticky se můžeme setkat jen s *pityriasis versicolor* (původce *Malassezia furfur*) postihující kůži, kde vytváří rozličné velké hyperpigmentované a hypopigmentované skvrny bez známek zánětu.

Mezi ostatní onemocnění povrchových mykóz se řadí *tinea nigra* vyskytující se v tropických oblastech a vyznačující se tmavými skvrnami na dlaních a ploskách nohou (Votava, 1998).

3.5.2. Kožní mykózy

Kožní mykózy postihují keratinizované vrstvy kůže, vlasové folikuly a nehtové lůžko a valy. Do této skupiny onemocnění náleží především dermatofytózy (původci dermatofyty, druhy náležící do rodu *Trichophyton*, *Epidermophyton*, *Microsporum*). I když *dermatofyty* nepatří k normální kožní mikroflóře, jsou výborně na kůži adaptovány, protože jako zdroj živin dovedou využívat keratin. Různé typy dermatofytóz se označují jako *tinea*. U mnoha dermatofytóz pozorujeme sekundární vyrážku (tzv. dermatofytidu), výrazně svědicí, většinou vesikulárního vzhledu vyskytující se na místě vzdáleném primárnímu ložisku infekce. Častou kožní mykózou je *tinea pedis*, kterou vyvolává nejčastěji antropofilní *Trichophyton rubrum*. Infekce obvykle začíná mezi prsty, šíří se a postihuje i nehty. *Tinea cruris*, častá zejména u mužů, postihuje kůži bérce, nejčastěji je vyvolaná stejně tak jako *tinea unguium* postihující nehty *T. rubrum*. *Tinea corporis* má často klasický prstencovitý

vzhled se zanícenou periférií a hojícím se centrem. Původce, který vyvolává *tinea corporis* je taktéž *T. rubrum*. Mykotická infekce vlasaté části hlavy se označuje jako *tinea capitis*. Projevuje se vypadáváním vlasů v ohraničených ložiscích. V širším smyslu můžeme zařadit mezi dermatomykózy i klinické projevy dalších původců mykóz jako je např. kandidóza, aspergilóza aj. (Votava, 1998).

3.5.3. Podkožní mykózy

Podkožní mykózy jsou infekce vznikající jako následek traumatické inokulace mykotického agens, které zasahuje hlubší vrstvy dermis, subkutánní tkáň, popř. i kosti. Vyskytují se především v subtropických a tropických oblastech, mají většinou chronický charakter. Léčení obvykle vyžaduje chirurgický zákrok. (Buchta et al., 2000).

3.5.4. Hluboké mykózy

Hluboké (viscerální, orgánové) mykózy jsou onemocnění postihující jeden nebo více orgánů, v případě dvou a více orgánů mluvíme o systémových mykózách. Můžeme je rozlišit na:

Primární mykózy: jsou to infekce způsobené dimorfními houbami a kvasinkou *Cryptococcus neoformans*. Tito původci mohou vyvolat onemocnění i u lidí s nenarušenou obranyschopností, kteří vstupují do endemických oblastí jejich výskytu. Řadí se k nim blastomykóza, histoplasmóza, kokcidiodomykóza, parakokcidiodomykóza a kryptokokóza.

Sekundární (oportunní) mykózy: jedná se o infekce imunoalterovaných pacientů způsobené oportunními houbami. Nejčastěji se s nimi setkáváme jako s nozokomiálními nákazami - hospitalismy. V našich podmínkách jsou vyvolány zejména kandidami, aspergily, kryptokoky (Buchta et al, 2000).

3.6. Nozokomiální nákazy

Jsou to infekční onemocnění vyvolaná mikroflórou ve zdravotnickém zařízení. Za nozokomiální nákazy (NN) se považuje i nákaza, která se projeví až po propuštění ze zdravotnického zařízení. Postihují pacienty se sníženou imunitou nebo pacienty s poškozením přirozených bariér (kůže, sliznice) a slizniční mikroflóry. Původcem jsou nemocniční kmeny oportunních patogenů, které vykazují vysokou rezistenci až multirezistenci k antimikrobním látkám. Mimořádná rezistence je způsobena selekčním účinkem používaných antibiotik a dezinfekčních prostředků. Původci nozokomiálních nákaz jsou především bakterie (*Staphylococcus aureus*, pyogenní streptokoky, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*), viry, prvoci a houby.

Zdroj původce NN: může být pacientova mikroflóra (endogenní původ) nebo jiný pacient jehož mikroflóra je obsažená v kontaminovaném prachu, kapénkách vzduchu a na předmětech běžné potřeby. Zdrojem nozokomiální nákazy může být také nemocniční personál (exogenní původ).

Přenos původce NN: tj. přenos infekčního agens ze zdroje nákazy na vnímavého hostitele. Vlastní cesta přenosu je rozmanitá a závisí na lokalitě orgánu, ve kterém je infekční proces, na bráně výstupu infekce ze zdroje a na bráně vstupu do vnímavého jedince (kůže, sliznice respiračního traktu, alimentárním ústrojím, spojivkami a urogenitálním traktem).

Přenos infekčního agens ze zdroje na vnímavého jedince je dvojitý:

-přímý: pro tento přenos je charakteristická přítomnost zdroje nákazy a vnímavého jedince buď kontaktem, kapénkovou infekcí nebo alimentární cestou.

-nepřímý: pro tento přenos je charakteristická nepřítomnost zdroje nákazy při přenosu infekčního agens na vnímavý organismus. K tomuto přenosu může dojít, jestliže mikroorganismus dokáže přežít dostatečně dlouhou dobu mimo tělo hostitele ve vnějším prostředí.

Vnímavý jedinec: o vnímavosti nebo rezistenci pacienta vůči infekčnímu agens rozhoduje řada faktorů: infekční dávka, vstupní brána, specifická imunita hostitele, věk, základní onemocnění (Šrámková et al., 1995).

3.7. Nozokomiální mykotické infekce

Nozokomiální mykotické infekce vyvolané patogeny jsou příčinou morbidity a mortality u hospitalizovaných pacientů (kteří mají narušené obranné mechanismy), prodlužují dobu hospitalizace, a tím zvyšují výdaje na léčbu.

Za nozokomiální mykotickou infekci se považuje jakákoliv povrchová lokálně invazivní nebo diseminovaná infekce způsobená mikromycetami v nemocničním prostředí (Šrámková et al., 1995).

Z hlediska parazitární adaptace rozlišujeme tři skupiny mykotických agens:

1) Oportunní houby jsou převážně saprotrofické, komenzální houby, které vyvolávají infekce především u imunodeficitních pacientů. Rozlišujeme endogenní infekce (*Candida*, *Trichosporon*, *Geotrichum*) a exogenní infekce (*Aspergillus*, *Fusarium*, *Zygomycety*)

2) Primárně patogenní houby jsou schopné infikovat i zdravé jedince, u nichž probíhá infekce většinou asymptoticky. U imunoalterovaných pacientů mohou primárně patogenní houby vyvolat těžké infekce (histoplazmóza, kryptokokóza).

3) Obligátně parazitické houby jsou agens primárně vázaná na hostitele, protože parazitismus je jedinou formou existence (Hlisnikovská, 2002).

3.8. Kandidóza

Kandidóza je v současné době jedním z nejčastějších mykotických onemocnění u člověka a zvířat vyvolaných různými kvasinkovými organismy rodu *Candida*. V případě kandidózy jde prakticky vždy o endogenní infekci, protože kandidy kolonizují sliznici gastrointestinálního traktu i u zdravých jedinců, kde kompetují s přirozenou mikrobiotou o nutriční substrát a o místo k adhezi na buňkách střevní sliznice. Za určitých podmínek může dojít k přemnožení kandid a pokud přeroste fyziologickou flóru, stává se ze saprofyta potencionální a později i reálný oportunní patogen (Haber et al., 1995). Infekce vzniká u osob oslabených jiným onemocněním nebo se sníženou obranyschopností (sekundární mykóza). V poslední době se vyskytuje primární mykóza a to u zdravých lidí, kteří byli infikováni vysoce virulentními kmeny *Candida albicans*. K endogenním příčinám patří onemocnění a stavy, které oslabují nemocného a snižují jeho obranyschopnost, jako jsou maligní tumory,

diabetes mellitus a věk. Podstatným faktorem je porucha imunity jak přirozené (neutropenie, defekty ve fagocytóze), tak specifické imunity buněčného typu. Zevní vlivy souvisí často s léčebnými či diagnostickými zásahy. Léčba kortikosteroidy, imunosupresivy a cytostatiky zhoršuje imunitu nemocných, kteří jsou již poškozeni základním onemocněním.

Kandidy patří k dimorfním houbám, tzn. že za určitých podmínek preferují kvasinkovou formu růstu, jindy myceliální (plísňovou) formou. Nejběžnějším původcem kandidózy je *C. albicans*. V posledních letech se postupně zvyšuje počet onemocnění vyvolaných non-*albicans* kandidami, např. *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*.

3.8.1. Kožní a slizniční kandidóza

Bez hlubších invazí do tkáně postihuje kandidóza kůži, nehty, sliznici úst a pochvy. Kandidóza kůže se vyskytuje v místech vlhké zapáčky. K infekci nehtového lůžka, nehtu a pod nehtem dochází při častém máčení rukou. Při kandidóze dutiny ústní se tvoří bílé skvrny na bukální sliznici a na tvrdém patře. Okolní sliznice je zarudlá a bolestivá. K infekci dochází většinou u pacientů se sníženou imunitou. Při postižení pochvy jsou bílé léze na epitelu vulvy, pochvy a cervixu doprovázeny svěděním, škrábáním a nehomogenním bílým výtokem. Někdy je sliznice jen zarudlá a odlupuje se. Vaginální kandidóza je častá v těhotenství.

3.8.2. Systémová kandidóza

Systémová kandidóza je buď lokalizovaná, například v močovém ústrojí, játrech, ledvinách, plicích, oku nebo diseminovaná (kandidémie). Nejčastějším původcem je *C. albicans*. Systémová kandidóza vzniká, když tyto komenzální mikroby přerostou při nějakém vážném stavu. Rizikové faktory pro vznik kandidózy jsou: kontaminovaný centrální žilní katétr, neutropenie a léčba antibiotiky (Hlisnikovská, 2002).

3.9. Kryptokokóza

Kryptokokózu způsobuje kvasinka *Cryptococcus neoformans* vyskytující se především v půdě (exkrementy ptáků) a na rostlinách. Mukopolysacharidové pouzdro chrání kryptokoka před vnějšími vlivy a fagocytózou, což má význam pro jeho virulenci. *C. neoformans* způsobuje onemocnění centrálního nervového systému, ačkoliv primárně postihuje plíce. Vyskytuje se sporadicky, ale dnes je nejčastější u pacientů s AIDS. Infekce vzniká po inhalaci buněk *C. neoformans* u pacientů s nepravidelnostmi ve funkci T-lymfocytů. *C. neoformans* se prokazuje mikroskopicky anebo latexovou aglutinací v mozkomíšním moku (Haber et al., 1995).

3.10. Aspergilóza

Aspergily jsou přítomny celosvětově takřka ubikvitárně v přírodním prostředí na různých organických substrátech v půdě, ovzduší a potravinách. Z celé stovky druhů aspergilů vyvolává onemocnění u člověka jen několik druhů, z nichž nejdůležitější jsou: *Aspergillus fumigatus*, *A. niger*, *A. flavus*, *A. terreus* a *A. nidulans*. Přenos na člověka se děje vzdušnou cestou, inhalací mikrokonidií. Závažnost infekce je různá v závislosti na místě postižení, ale i na stupni imunitní odolnosti organismu pacienta případně ovlivněného základním onemocněním. Aspergily kolonizují nejčastěji dýchací cesty. Některé kmeny aspergilů produkují mykotoxiny (aflatoxiny), které jsou hepatotoxické a karcinogenní.

Základní formy postižení respiračního traktu:

- 1) Invazivní aspergilóza: vyskytuje se u osob se sníženou imunitou.
- 2) Alergická bronchopulmonální aspergilóza: vyskytuje se u osob s atopií se zvýšenou hladinou IgE.
- 3) Plicní aspergilom: při této formě aspergilózy kolonizuje obvykle mikrob již vytvořené dutiny v plicích a vytváří kompaktní shluky mycelia, které se opouzdřují silnou vazivovou stěnou (Haber et al., 1995).

3.11. Mukormykóza

Oportunní mykotické infekce, které jsou vyvolané ubikvitárními saprofytickými houbami řádu Mucorales, a to nejčastěji rody *Rhizopus*, *Mucor*, *Absidia* a *Rhizomucor*. Vyskytují se na rostlinách a v půdě. K infekci dojde inhalací spóry, které se uchytí nejčastěji v horních cestách dýchacích. U imunoalterovaných osob může způsobit závažná onemocnění vyznačující se vysokou mortalitou, zvláště u rhinocerebrální formy. Klinické formy mukormykózy jsou rhinocerebrální (nejčastější), plicní, gastrointestinální, primární kožní a diseminovaná (Haber et al., 1995).

3.12. Pneumocystóza

Je onemocnění způsobené kosmopolitním oportunním patogenem *Pneumocystis jiroveci*. Postihuje většinou oslabené a imunodeficientní pacienty především s AIDS. *Pneumocystis jiroveci* se v plicních alveolech extenzivně pomnožuje za tvorby pěnové masy obliterující celý alveolus a tím blokující jeho funkci (Buchta et al., 2000).

4. Laboratorní diagnostika mykotických infekcí

Cílem je získání materiálu k podrobnému mikroskopickému vyšetření a kultivačnímu zachytu, které jsou nezbytné k izolaci a určení příslušné houby.

Materiál se do laboratoře musí dodat co nejdříve po odběru a rychle zpracovat. Nejvýhodnější je, pokud je to možné, když je odběr proveden přímo v laboratoři zkušeným pracovníkem, protože je důležité správné posouzení a výběr materiálu. Nejčastěji se na vyšetření získávají vlasy, chlupy, nehty, dále moč, hnis, exudáty, sputum, bronchiální výplach, části tkání z operačního nebo pitevního materiálu, krev a sternální punktáty.

Požadavkem je přísná sterilita odběrových nástrojů a pomůcek, včetně dodržování zásad asepse, a to i tehdy, když se materiál odebírá z povrchu těla (Buchta et al., 2002).

4.1. Mykologické laboratorní vyšetření

4.1.1. Mikroskopie

Mikroskopie je rychlá přímá metoda pro detekci a identifikaci hub.

Nativní preparát se připraví tak, že se na podložní sklíčko přenese bakteriologickou kličkou nebo Pasteurovou pipetou část sputa, kapky centrifugátu mozkomíšního moku, exudátu, moči apod. Materiál se přikryje krycím sklíčkem, preparát se bez dalších úprav prohlíží suchým systémem mikroskopu při zvětšení 60 až 450 krát (Otčenášek et al., 1990).

U louhového preparátu se hodnotí přítomnost či nepřítomnost septovaných vláken. Slouží ke znázornění dermatofytů a jiných vláknitých hub a kvasinek. Na podložní sklíčko se přikápnou k vzorku 10 - 30% KOH, který slouží k projasnění klinického materiálu a ke zlepšení rozlišitelnosti elementů hub, které jsou většinou světlolomné. Preparát se přiklopí krycím sklíčkem, nechá se zhruba 30 minut stát, poté se prohlíží pod mikroskopem při zvětšení 100x – 200x (Otčenášek et al., 1990).

V preparátu barveném dle Grama se houbové elementy barví grampozitivně (modře) až gramlabilně. Hodnotí se morfologie, tj. výskyt samostatných,

pučících nebo dělených buněk, zda jsou vlákna široká nebo úzká, septovaná nebo neseptovaná, charakter větvení vláken a způsob jejich rozpadu.

4.1.2. Kultivace

S patogenními houbami se setkáváme ve formě kvasinkové nebo vláknité. U některých druhů může jedna forma přecházet ve druhou účinkem teploty a zvoleného substrátu.

Na pevných kultivačních půdách tvoří houby kolonie trojího typu:

1) Kolonie pravých kvasinek, které netvoří myceliové struktury. Mikroskopicky jsou složeny z jednobuněčných blastospór, z části pučících.

2) Kolonie kvasinkové jsou složeny z jednotlivých buněk nebo pučících buněk, která však do hloubky přecházejí v houbová vlákna.

3) Kolonie vláknité se splétají v mycelium složeno z větvených, vzájemně propletených vláken – hyf (Buchta et al., 2002).

Ke kultivaci mikromycet používáme Sabouraudův glukózový agar (SGA) pH 6,5. Většinu potenciálně patogenních hub kultivujeme při 25 - 28°C. Pokud očekáváme původce systémových mykóz kultivujeme při 37°C. Mykologická kultivace je většinou dlouhodobá, a proto hrozí nebezpečí vysychání kultur. Tomu zamezíme udržováním dostatečné vlhkosti v termostatu. Případné bakteriální kontaminaci předejdeme přidáním antibiotik (chloramfenikol) do média. Kvasinky a vláknité houby rostou na půdách obvykle 24 až 72 hodin, u dermatofytů jsou to 2 až 4 týdny (Buchta et al, 2002).

Při makroskopickém hodnocení kolonií věnujeme pozornost jejich velikosti, barvě, tvaru, vzhledu povrchu a krajům.

4.1.3. Identifikace patogenních hub

U patogenních hub se hodnotí:

- 1) makromorfologie tj. zevní vzhled kolonií (význam u vláknitých hub),
- 2) mikromorfologie tj. mikroskopické vyšetření preparátu,
- 3) biochemické vlastnosti tj. sledování fermentačních a asimilačních vlastností kultury a produkci enzymů (význam u kvasinek).

4.1.3.1. Identifikace kvasinek

Test klíčních hyf

Jde o jednoduchou, rychlou a levnou metodu sloužící k průkazu klíčních hyf (angl. germ tubes), kterou je možno pozorovat pouze u *C. albicans*. Test je založen na principu tříhodinové inkubace vyšetřovaného kmene kvasinky homogenizované v bovinním nebo eventuelně i lidském séru při 37 °C. Po této inkubaci se přenese část homogenátu na podložní sklíčko. Přítomnost klíčních hyf se pak detekuje mikroskopicky při dvěstěnásobném zvětšení (Otčenášek et al., 1990).

Sledování mikromorfologie kvasinek na kukuřičném agaru

Část kolonie se přenese na kukuřičný agar (Corn-Meal Agar, Oxoid) v malé Petriho misce a inkubuje se 48 až 72 hod při 28°C. Pod mikroskopem se sleduje mikromorfologie hub (tvorba pseudomycelia, mycelia, způsob větvení, tvar a velikost blastospór) (Špičková, 1998).

Komerční média pro rychlou diagnostiku kvasinek

Jsou to metody založené na specifických enzymových reakcích, které využívají fluorogenní nebo chromogenní substráty. Tyto substráty jsou lyzovány hexoaminidázovou aktivitou *C. albicans* a umožňují rychlou makroskopickou identifikaci tohoto druhu založenou na hodnocení fluorescence nebo barvy kolonií. K těmto médiím patří CandiSelect, HiCrome Candida Agar a další.

CandiSelect (Bio-Rad)

Tato metoda se používá k přímé identifikaci *C. albicans* a ostatních kvasinek, která je založena na průkazu aktivity specifického enzymu N-acetyl β -D-galaktózaminasy, který způsobuje hydrolýzu chromogenního substrátu, obsaženého v médiu, což má za následek modré zbarvení kolonií. Po 24 až 48 hodinové inkubaci v 35 – 37°C.

HiCrome Candida Agar (HiMedia)

Selektivní médium, která umožňuje rychlou izolaci a identifikaci kvasinek ze směsných kultur a určování druhu rodu *Candida* na základě barvy a morfologie kolonií. Výsledek se odečítá po 48 hodinové inkubaci v 26°C.

Test asimilace zdrojů uhlíku (auxanogramy)

K testu se používají disky (ITESTplus Hradec Králové) napuštěné cukry a cukernými alkoholy, tj. arabinóza, celobióza, galaktóza, glukóza, inositol, laktóza, maltóza, manitol, melezitóza, melibióza, rafinóza, sacharóza, sorbóza, trehalóza, xylóza, případně i rhamnóza a erytritol. Vyšetřovaná kolonie se resuspenduje v roztoku YNB (Yeast Nitrogen Base) v Petrino misce a přelije se agarem. Půda se nechá ztuhnout a na povrch se sterilní jehlou pokládají jednotlivé disky. Po 24 až 72 hodinové inkubaci se hodnotí schopnost růstu kvasinek kolem disků, která se projeví mléčně zakalenou kruhovou zónou růstu. Zastoupení utilizovaných cukrů je pro jednotlivé druhy kvasinek charakteristické (Otčenášek et al., 1990).

ID 32 C (BioMérieux)

Je standardizovaný systém pro identifikaci kvasinek, který používá 32 miniaturizovaných asimilačních testů. V každé jamce je dehydratovaný sacharidový substrát. Polotuhé médium je inokulováno suspenzí kvasinek. Po 24 - 48 hodinové inkubaci je růst v každé jamce odečítán vizuálně. Identifikace je hodnocena identifikačním softwarem.

Auxacolor (Bio-Rad)

Auxacolor je identifikační systém založený na principu utilizace cukrů, tj. asimilace uhlíku, citlivost k cykloheximidu a tvorba fenoloxidázy. Sada obsahuje 13 cukrů: glukóza, maltóza, sacharóza, galaktóza, laktóza, rafinóza, inositol, celobióza, trehalóza, adonitol, melezitóza, xylóza, arabinóza.

Suspenze byla připravena z kultur narostlých za 24 až 48 hodin na SGA a upravena tak, aby zákal odpovídal zákalu v kontrolní lahvičce, která je součástí soupravy. Po homogenizaci jsou do každé jamky destičky přidány dvě kapky suspenze. Po překrytí jamek umělohmotnou fólií se destička nechá inkubovat při teplotě 28 °C. Výsledky jsou odečteny po 24 až 72 hod. Pozitivním

výsledkem je barevná změna pH indikátoru (bromkrezolová modř) z modré na žlutou. Kromě asimilace je sledována citlivost k cykloheximidu a aktivita fenoxidázy u *C. neoformans*. Jamky jsou uspořádány do sedmi skupin po třech hodnocených znacích, kterým odpovídá příslušné bodové hodnocení. Konečným výsledkem je číselný kód, pomocí kterého je identifikována kvasinka, s využitím přiložené tabulky (Špičková 1998).

Zymogramy

K testování kvasných schopností kvasinek se používá tekuté médium obsahující bromtymolovou modř a roztok příslušného sacharidu. Sleduje se schopnost fermentace následujících látek: glukóza, galaktóza, sacharóza, maltóza a laktóza. Metoda se provádí ve zkumavkách, kde po 7 - 10 denní inkubaci při 27 °C se hodnotí tvorba plynu (Otčenášek et al., 1990).

4.1.3.2. Identifikace vláknitých hub

Rozhodující je hodnocení makroskopického vzhledu a mikroskopického obrazu kultury. Je hodnocena zejména textura, profil, barva (včetně spodiny kolonie) aj. Mikromorfologie vychází z popisu tvaru, uspořádání a velikosti spór a reprodukčních orgánů. U vláknitých mikromycet je významným diagnostickým znakem růstová rychlost.

4.1.4. *Testování citlivosti*

4.1.4.1. Diluční techniky

U dilučních testů se využívá tekutá půda (bujón) nebo pevné agarové médium. Tyto metody umožňují kvantitativní stanovení citlivosti respektive rezistence testovaného kmene houby, která je obvykle vyjádřena jako minimální inhibiční koncentrace (MIC). U bujónových technik lze rovněž stanovit minimální fungicidní koncentraci (MFC).

Diluční bujónová metoda se provádí ve dvou modifikacích: zkumavkové makrodiluce a destičkové mikrodiluce (Buchta et al., 2002).

Makrodiluční bujónový test

Inhibice růstu testované houby se sleduje v řadě zkumavek s tekutým médiem obsahujícím různé koncentrace antimykotika. Jako MIC se hodnotí nejnižší koncentrace, při které nedochází k makroskopicky pozorovanému růstu. Tato metoda je přesná a reprodukovatelná pro testování kvasinek (Otčenášek et al., 1990).

Mikrodiluční bujónová metoda

Tato metoda umožňuje rutinní stanovení MIC u většího počtu antimykotik a v celých souborech kmenů. Je prováděná v polyetylénových mikrotitračních destičkách s kulatým dnem jamek. Hodnoty MIC odečítáme vizuálně v první jamce, ve které není zaznamenán nárůst (Otčenášek et al., 1990).

Agarová diluční metoda

Je spolehlivá a přesná metoda, při které je testovaná látka inkorporována do agaru a testované kmeny hub inokulovány na povrch agarové plotny, to umožňuje testovat na jedné plotně více kmenů. Tato metoda je však časově, technicky i materiálově náročná. Její výhodou je snadnost odečítání, nevýhodou nemožnost stanovení MFC (Otčenášek et al., 1990).

4.1.4.2. Difúzní agarová technika

Difúzní diskový test

Je kvalitativní test, který je používán jako screeningová metoda, která se snaží poskytnout úplnou informaci o stupni citlivosti testovaného kmene, to znamená odhalit potencionálně rezistentní kmeny hub. Metoda je prováděna na Müller-Hintonově agaru s 2% glukózy a thymolovou modří, který se přelije suspenzí kvasinky a přebytek suspenze se po chvíli odsaje. Následně se na povrch agaru nanese antimykotické disky (ITEST plus Hradec Králové). Antimykotikum z disku difunduje do naočkované agarové půdy a vytváří se koncentrační gradient, který brání houbě (podle stupně jeho citlivosti) v jejím růstu. Sleduje se průměr zóny inhibice růstu kolem disků obsahujících antifugální látku. Jedná se o: amfotericin B, nystatin, natamycin, ketokonazol,

mikonazol, klotrimazol, flukonazol, ekonazol, flucytosin, itrakonazol. Odečítáme po 24 hodinové inkubaci při 37°C (Buchta et al., 2002).

4.1.4.3. Komerční soupravy k testování citlivosti hub k antimykotikům *in vitro* Nejčastěji se u nás setkáváme s E - testem a Fungitestem.

Gradientová difúzní metoda - E-test (AB Biodisk)

Na agar inokulovaný suspenzí testované kvasinky se přiloží dlouhý kalibrovaný proužek obsahující gradient koncentrací antimykotika. Po přilnutí se difúzí vytvoří kontinuální koncentrační gradient podél proužku a kolmo směrem od něj. Na proužku je označena stupnice s hodnotami minimální inhibiční koncentrace (MIC). Růst citlivých kmenů se projeví vznikem zóny inhibice, která má tvar kapky, jež svým ostrým koncem zasahuje právě do místa, kde je koncentrace antimykotika rovna MIC. Metoda je nenáročná na provedení, navíc lze pomocí této metody testovat vláknité houby včetně aspergilů. Nevýhodou jsou relativně vysoké náklady na testování jednoho antimykotika (Buchta et al., 2002).

Fungitest (Bio-Rad)

Testuje dvě koncentrace u každého z antimykotik. Jedná se o semikvantitativní test u kterého testovací koncentrace představují hraniční koncentrace, na základě kterých testované izoláty kvasinek spadající do kategorie citlivý (inhibovány obě koncentrace), intermediární (rezistentní k nižší, ale citlivé k vyšší koncentraci) a rezistentní (rezistentní k oběma koncentracím). Test je dodáván ve formě mikrotitrační destičky s dvěma řadami jamek reprezentující dvě koncentrace šesti testovaných antimykotik, ve kterých je dehydratované médium s redox indikátorem. Součástí testu je pozitivní a negativní kontrola. V případě citlivého kmene se barva nezmění, ale v případě rezistence daný kmen v dané koncentraci roste a na základě přítomnosti pH indikátoru způsobí změnu barvy média z modré na růžovou (Buchta et al., 2004).

4.1.4.4. Ostatní metody

Vedle tradičně používaných dilučních a agarových difúzních technik byla vyvinuta řada dalších metod:

Kolorimetrické metody

Jedná se o modifikované diluční bujónové metody, které pomocí pH indikátoru (Alamarová modř) nebo na základě metabolické přeměny tetrazoliových solí (XTT, MTT) umožňují jednoznačnější a přesnější stanovení cílové koncentrace a tím i hodnotu MIC (Buchta et al., 2002).

Diluční bujónový test

Spočívá v inkorporaci Alamarové modři do testovaného média, která slouží jako citlivý pH indikátor, reagující na metabolickou aktivitu houby změnou zbarvení půdy z modré na červenou (Buchta et al., 2002).

Diluční bujónový test s tetrazoliovými solemi (XTT, MTT)

Princip vychází z redukce tetrazoliových solí XTT nebo MTT mitochondriálními dehydrogenázami metabolicky aktivních hub. Výsledkem je změna žluté barvy soli na tmavě modrou. Provedení testu spočívá v přidání roztoku tetrazoliové soli do každé jamky destičky s testovanou koncentrací antimykotika před odečítáním MIC (Buchta et al., 2002).

Průtoková cytometrie

Metoda měří změnu membránového potenciálu kvasinky způsobeného antifugální látkou. Výsledkem poškození plazmalemy jsou změny v metabolické aktivitě kvasinky. Hodnota poškození je nepřímo úměrná míře poškození kvasinkové buňky. Výhodou průtokové cytometrie je rychlost a přesnost provedení (Buchta et al., 2002).

4.1.5. *Imunologické vyšetření*

Je založeno na reakci antigenů a protilátek. Antigeny jsou v tomto případě mikroorganismy a jejich produkty, které vyvolávají tvorbu protilátek. Vztah mezi protilátkou a antigenem je velmi specifický, tzn. že protilátka reaguje pouze

s antigenem na jehož popud vznikla. Pomocí známého antigenu můžeme identifikovat protilátku a pomocí známé protilátky můžeme stanovit antigen. Vyšetření se provádí především u některých systémových mykóz vyvolaných dimorfními houbami nebo oportunními kvasinkami a aspergily (Buchta et al.2002).

5.Literatura

Buchta V., Navrátilová P.,Kubátová P., Förstl M.: Srovnání výsledků testování hub k antifugálním látkám in vitro pomocí soupravy Fungitest a diskového difuzního testu, *Klinická mikrobiologie a infekční lékařství*. 2004, 10, s 80 - 88.

Buchta V.: Současné možnosti testování citlivosti hub k antifugálním látkám v podmínkách in vitro. *Klinická mikrobiologie a infekční lékařství*. 2002, 8,s 110 - 118.

Jílek P., Buchta V., Kubátová P., Förstl M.: Úvod do mikrobiologických vyšetřovacích metod ve zdravotnictví. *Karolínium Praha*, 2002, s 38, 39, 82

Buchta V.,Jílek P.,Horáček J.,Horák V.: Základy mykobiologie a parazitologie pro farmaceuty. *Karolínium Praha*, 2000, s.143 - 146, 152, 156.

Haber J. et al.: Systémové mykózy a jejich léčba. *Galén Praha*, 1995, s.25, 39,61, 67.

Hlisnikovská I.: Výskyt potenciálně patogenních hub ve Fakultní nemocnici v Hradci Králové v letech 1995 - 1999. Diplomová práce, *Farmaceutická fakulta, Univerzita Karlova*, 2002.

Koďousek R.: Mykózy. *Univerzita Palackého v Olomouci* 2003, s 37,118.

Otčenášek M. a spol.: Vyšetřovací metody při myotických onemocněních. *Avicemum, Praha* 1990,s. 24, 52, 117 - 120.

Špičková E.: Studium spektra humánně patogenních hub izolovaných ve Fakultní nemocnici Hradec Králové v roce 1996. Diplomová práce, *Farmaceutická fakulta, Univerzita Karlova*,1998.

Šrámková a kol.: Nozokomiální nákazy. *Maxdorf Praha* 1995, 14 - 21.

Votava M., Ondrovčik P.: Vybrané kapitoly z klinické mikrobiologie. Masarykova univerzita Brno 1998, 50 - 53.