

Lékařská mykologie

Iva Kocmanová

Prolog

...houbové infekce kůže a kožních adnex jsou **čtvrtou** nejčastější lidskou zdravotní komplikací (po zubních kazech, vysokém tlaku a migréně)...

vaginální kandidóza	cca 75 mil.
chronické aspergilózy	cca 6 mil.
kryptokoková meningitida	cca 1 mil.
pneumocystová pneumonie	cca 400 tis.
invazivní kandidóza	cca 400 tis.
Invazivní aspergilóza	cca 200 tis.

Úvod

Mykologie

nauka o houbách (řec. *mykes*, lat. *fungi*)

Houby jsou organismy **eukaryotní** (pravé jádro; mitochondrie),
jednobuněčné i vícebuněčné,
heterotrofní,
buněčná stěna složená z polysacharidů (chitin; glukan;
galaktomanan; manan etc.)

Osnova přednášky

1. Morfologie, rozmnožování hub, názvosloví
2. Patogeneze nemocí způsobených houbami (mykózy)
3. Léčba mykóz - antimykotika
4. Vyšetřovací metody v mykologii
5. Nejčastější mykózy

Osnova přednášky

1. Morfologie, rozmnožování hub, názvosloví
2. Patogeneze nemocí způsobených houbami (mykózy)
3. Léčba mykóz - antimykotika
4. Vyšetřovací metody v mykologii
5. Nejčastější mykózy

1. Morfologie; základní pojmy

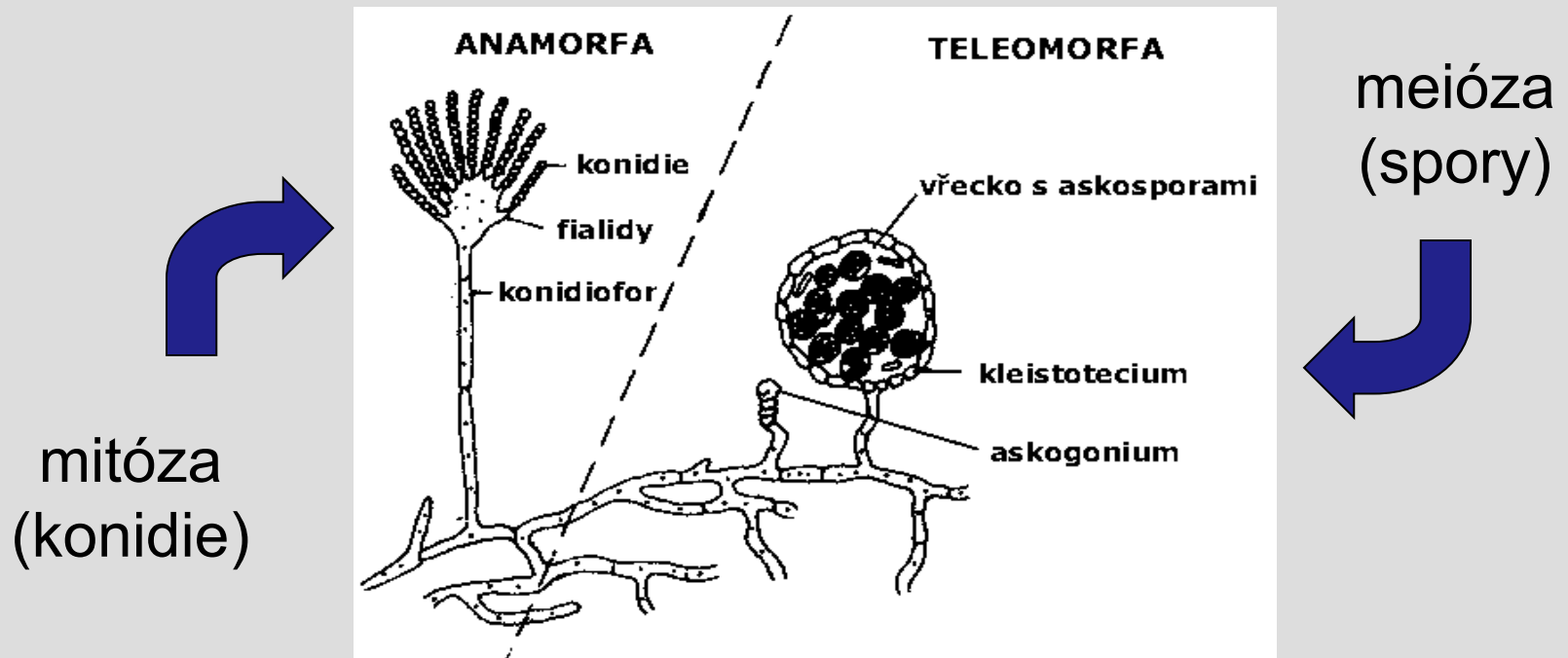
Hyfa: houbové tělo bez ohledu na diferenciaci

Mycelium: jen vegetativní část, žádný reprodukční orgán, zajišťuje výměnu látek a energie mezi houbou a prostředím

Reprodukční struktury: sporangiofory, konidiofory, stromata, plodnice, mikrokonidie, makrokonidie, blastokonidie etc.

1. Rozmnožování hub

anamorfa (nepohlavní stadium) + teleomorfa (pohlavní stadium)
= holomorfa



1. Názvosloví hub

- složité, pořád se měnící (genetika + názorové střety systematiků 😊)
- většina medicínsky významných hub se vyskytuje jako **anamorfa** (nepohlavní stadia)

teleomorfa	anamorfa
<i>Eurotium, Emericella, Petromyces, Neosartoria</i>	<i>Aspergillus</i>
<i>Eupenicillium, Talaromyces</i>	<i>Penicillium</i>
<i>Pseudoallescheria boydii</i>	<i>Scedosporium apiospermum</i>
<i>Issatchenkia orientalis</i>	<i>Candida krusei</i>

1.

Názvosloví hub

...ale – „one fungus – one name“

International Code of Nomenclature for algae, fungi, and plants
(Melbourne Code) adopted by the Eighteenth
International Botanical Congress Melbourne,
Australia, July 2011.

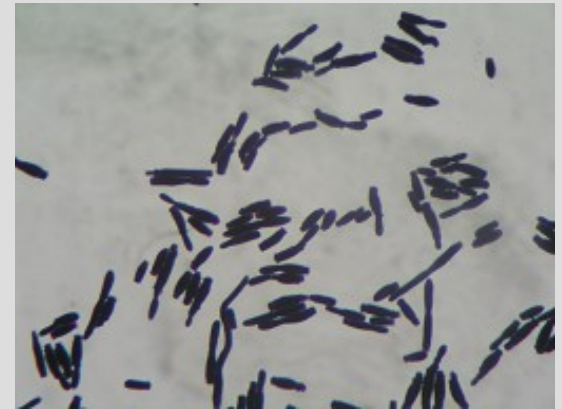
teleomorfa	anamorfa
<i>Eurotium, Emericella, Petromyces, Neosartoria</i>	<i>Aspergillus</i>
<i>Eupenicillium, Talaromyces</i>	<i>Penicillium</i>

1. ...mezitím v klinické praxi

a) kvasinky a jim podobné

- mikroskopicky kulaté nebo protáhlé buňky, 3-6 x 3-15 μm
- obvykle nepohlavní rozmnožování pučením a dělením
- na pevných půdách kolonie podobné bakteriálním

rody *Candida*, *Trichosporon*, *Cryptococcus* etc.



b) vláknité houby (plísně)

- složeny ze soustavy hyf (mycelium) jednobuněčné/mnohobuněčné
- obvykle nepohlavní rozmnožování rozrůstáním hyf, nebo vegetativní „spory“
- na pevných půdách vláknité povlaky

rody *Aspergillus*, *Rhizopus*, *Mucor*, *Alternaria*, *Trichophyton*, *Microsporum* etc.

1. ...mezitím v klinické praxi

c) dimorfní houby

- růst ve dvou formách (kvasinkové a vláknité) v závislosti na teplotě
- importované (endemické) mykózy (Severní i Jižní Amerika, Dálný Východ)

rody *Histoplasma*, *Blastomyces* etc.

d) ty, co se nikam nevešly

- přeřazeny z parazitů díky studiu genomu
- nekultivovatelné (nebo obtížně)

Pneumocystis jiroveci, *Microsporidium* spp. etc.



Osnova přednášky

1. Morfologie, rozmnožování hub, názvosloví
- 2. Patogeneze nemocí způsobených houbami (mykózy)**
3. Léčba mykóz - antimykotika
4. Vyšetřovací metody v mykologii
5. Nejčastější mykózy

2. Patogeneze mykóz

Houby až na výjimky (dermatofyta, endemické mykózy) nejsou primárně patogenní (mohou kolonizovat kůži i GIT...),
ale jsou

oportunními patogeny



ke vzniku onemocnění napomáhá přítomnost nějaké predispozice hostitele,
tj.

rizikové faktory

(např. onkologická onemocnění a jejich léčba, léčba kortikoidy, diabetes, pobyt na JIP, nezralí novorozenci – ale i léčba antibiotiky, vlhká zapářka apod)

2. Dělení mykóz

Celkové, neboli invazivní infekce

sepsy (nejč.kandidové), pneumonie (nejč.aspergilové), diseminované mykózy

Lokální (povrchové, slizniční) infekce

infekce kůže, kožních adnex a sliznic (dermatomykózy a kandidózy)

Mykotoxikózy

obvykle alimentární otravy způsobené toxiny hub (*Claviceps purpurea*, *Aspergillus* etc.), které kontaminují potravu (ergotismus-námel, aflatoxiny..)

Alergická onemocnění

přecitlivělost na části hub (konidie, části hyf..)

Osnova přednášky

1. Morfologie, rozmnožování hub, názvosloví
2. Patogeneze nemocí způsobených houbami (mykózy)
- 3. Léčba mykóz - antimykotika**
4. Vyšetřovací metody v mykologii
5. Nejčastější mykózy

3. Antimykotika dle chem. struktury

- **alyeny**

(amfotericin a jeho lipidové formy, nystatin)

- **azoly**

(flukonazol, itrakonazol, vorikonazol, clotrimazol, isavukonazol..)

- **echinokandiny**

(caspofungin, micafungin, anidulafungin)

- **antimetaboly**

(flucytosin)

- **alylaminy**

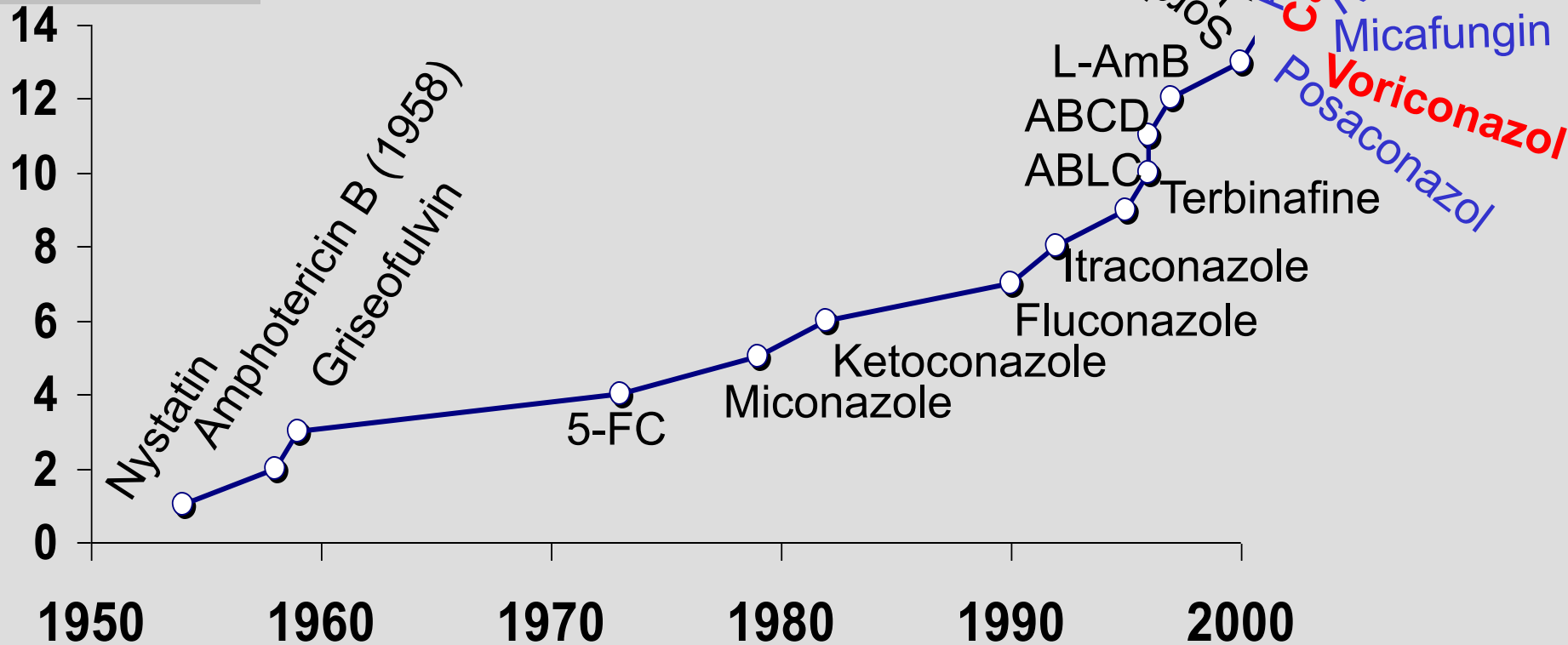
(terbinafin)

- **ostatní**

(k.undecylová, ciclopiroxolamin)

Medical Mycology: The Last 50 Years

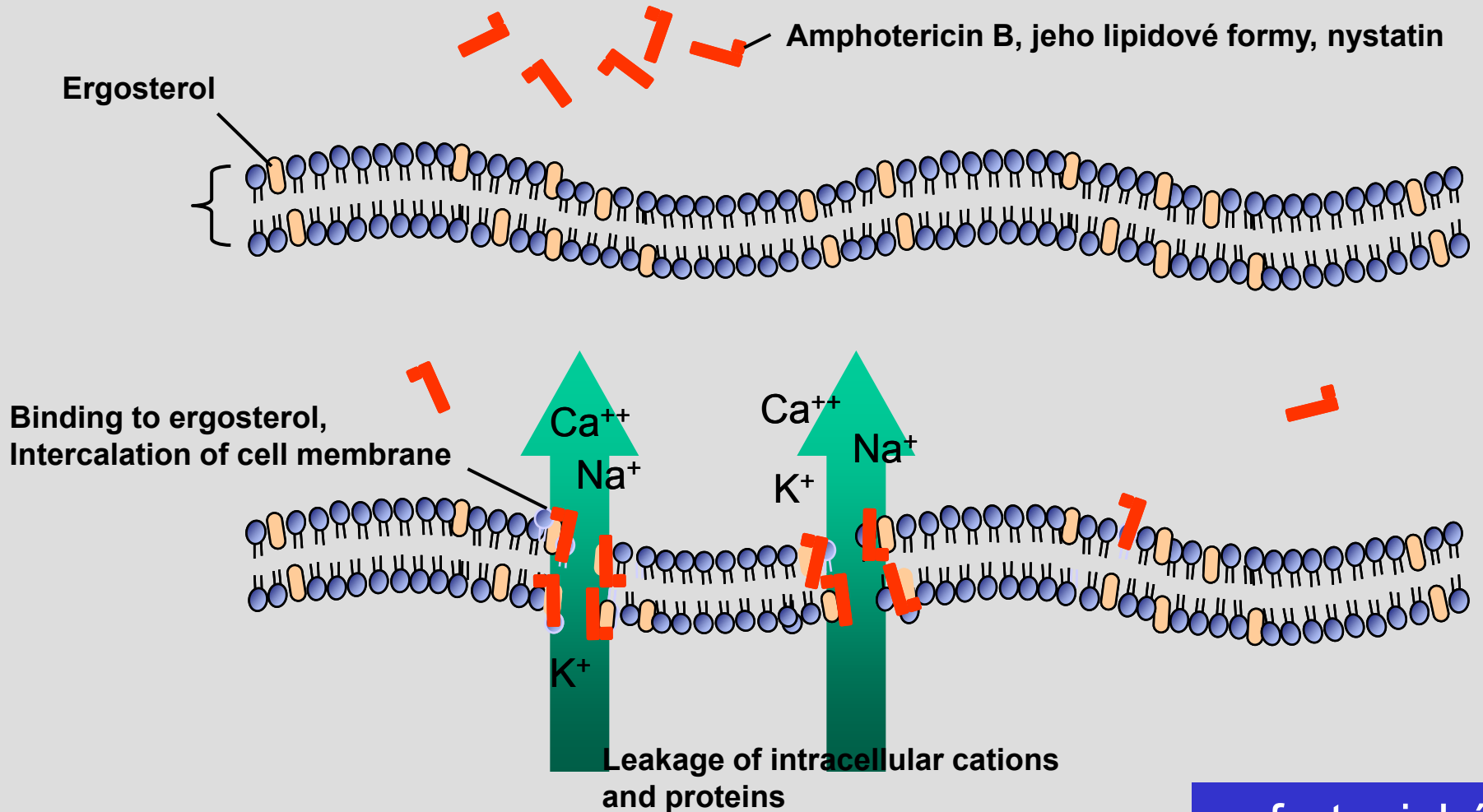
of drugs



3.

Alyeny

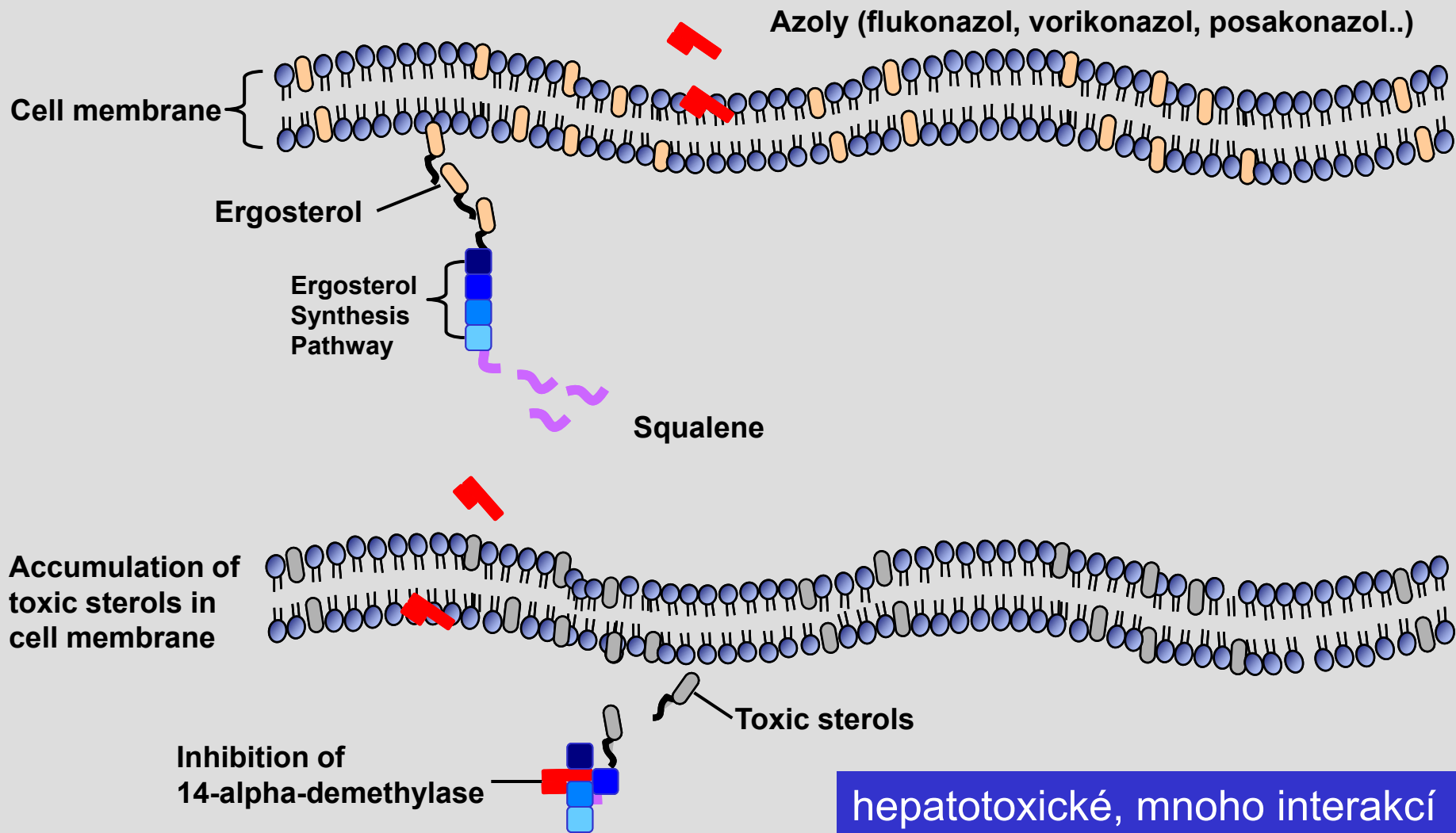
Princip – změna permeability buněčné membrány



nefrotoxické

3. Azoly

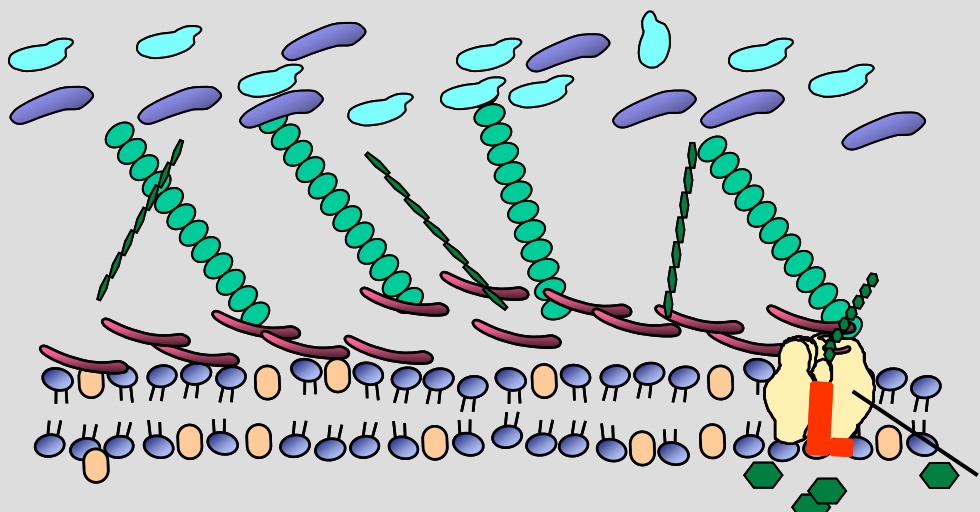
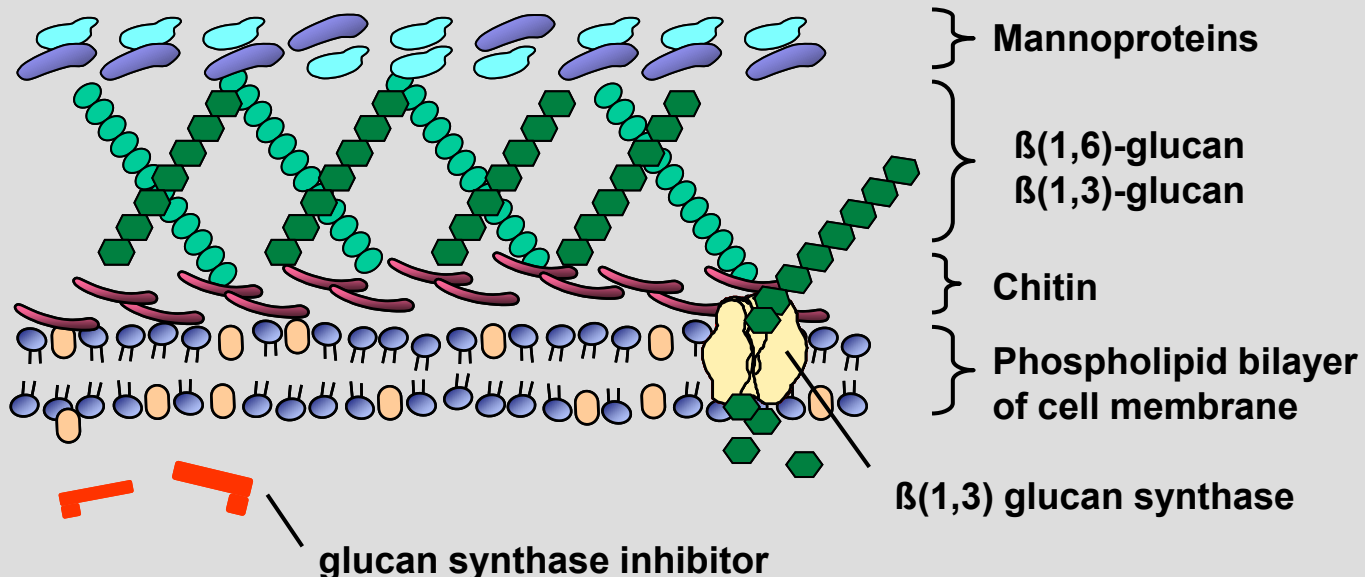
Princip – inhibice syntézy ergosterolu (cytochrom P450)



hepatotoxické, mnoho interakcí

3. Echinokandiny

Princip – inhibice syntézy glukanu



takřka bez nežádoucích účinků, drahé

Inhibition of $\beta(1,3)$ glucan synthase

Osnova přednášky

1. Morfologie, rozmnožování hub, názvosloví
2. Patogeneze nemocí způsobených houbami (mykózy)
3. Léčba mykóz - antimykotika
- 4. Vyšetřovací metody v mykologii**
5. Nejčastější mykózy

4. Vyšetřovací metody - možnosti

- mikroskopie
- kultivační metody
- imunologické metody (stanovení antigenu nebo protilátek)
- molekulárně-biologické metody

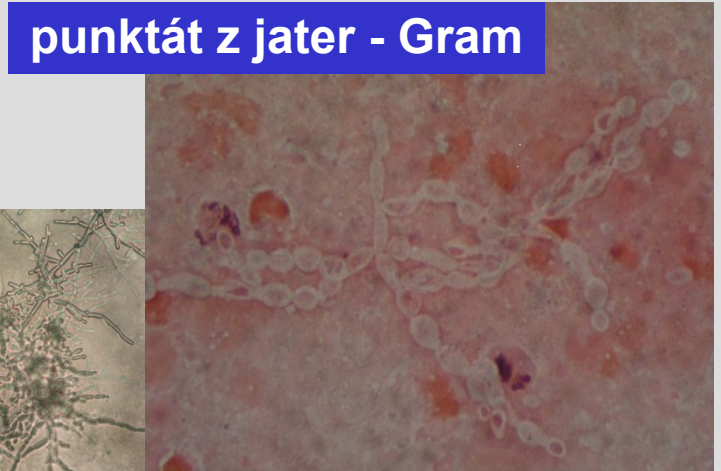
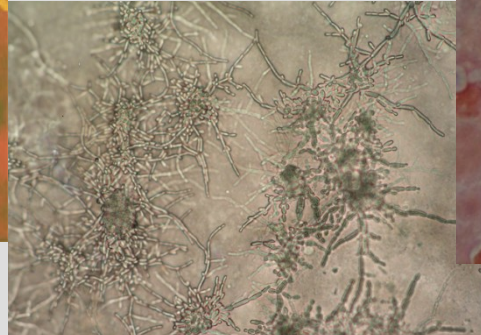
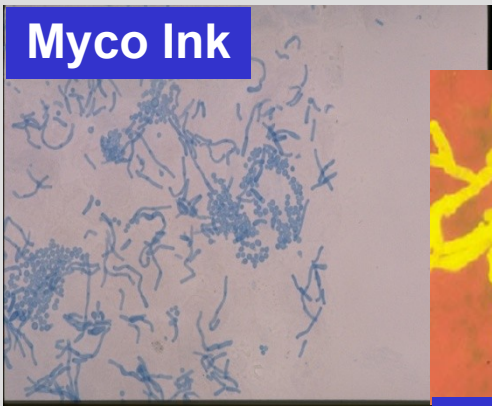
4. Mikroskopie

a) nativní preparát

- kultury
- nespecifická barvení (Lugol),
- specifická barvení (Mycolnk, Rylux – vážou se na chitin)

b) fixovaný preparát

- obecná barvení (Gram)
- speciální barvení (imunofluorescence, Groccot, Gram-Weigert ...)



Calcofluor

rýžový agar (kultura)

punktát z jater - Gram

Myco Ink

4. Mikroskopie - shrnutí

Výhody:

- rychlost (minuty)
- relativně nízká cena vyšetření
- specificita

riziko kontaminace není velké, ale vyšetření může být pozitivní i v případech, kdy houba již není životaschopná (např. u dermatomykóz)

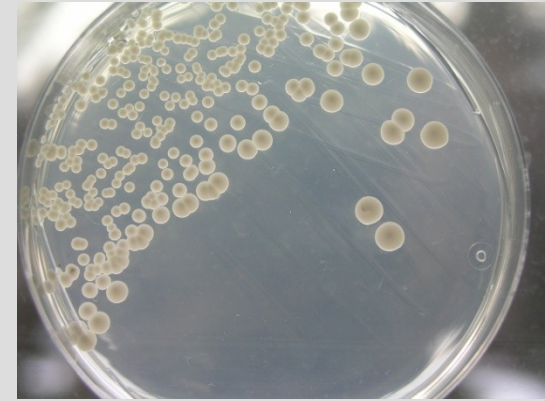
Nevýhody:

- malá senzitivita, pozitivní obvykle až pozdějších stádiích onemocnění
- v materiálu lze většinou jen orientačně zařadit patogena do rodu nebo skupiny (septované x neseptované)

4. Kultivační metody

č.1:

Sabouraudův agar s glukózou s antibiotiky



další speciální média...

- chromogenní agary, rýžový agar (dourčení kvasinek)
- RPMI 1640, MH s glukózou a metylenovou modří (testování citlivosti)
- Czapek Dox (dourčení aspergilů)

atd.

Kultivační teplota

37+/-1°C

30+/-1°C

25+/-1°C



4. Kultivační metody

....umožňují zařadit kultivát do rodu a druhu

(pomocí makro a mikromorfologie na různých agarech; kvašení či utilizace cukrů, nebo jiných látek; proteomiky, PCR)

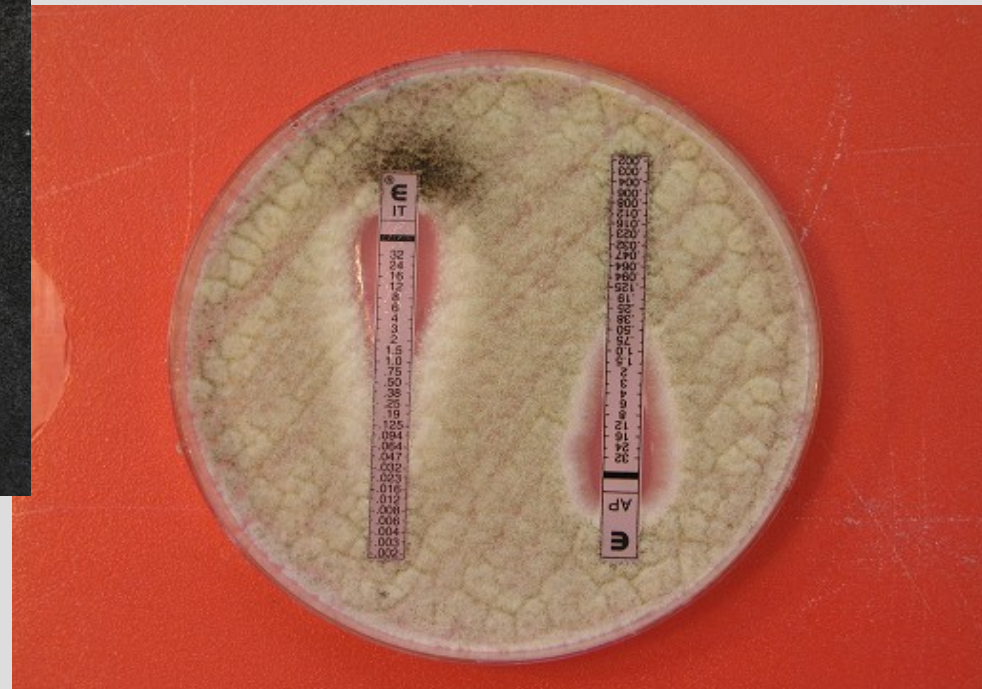
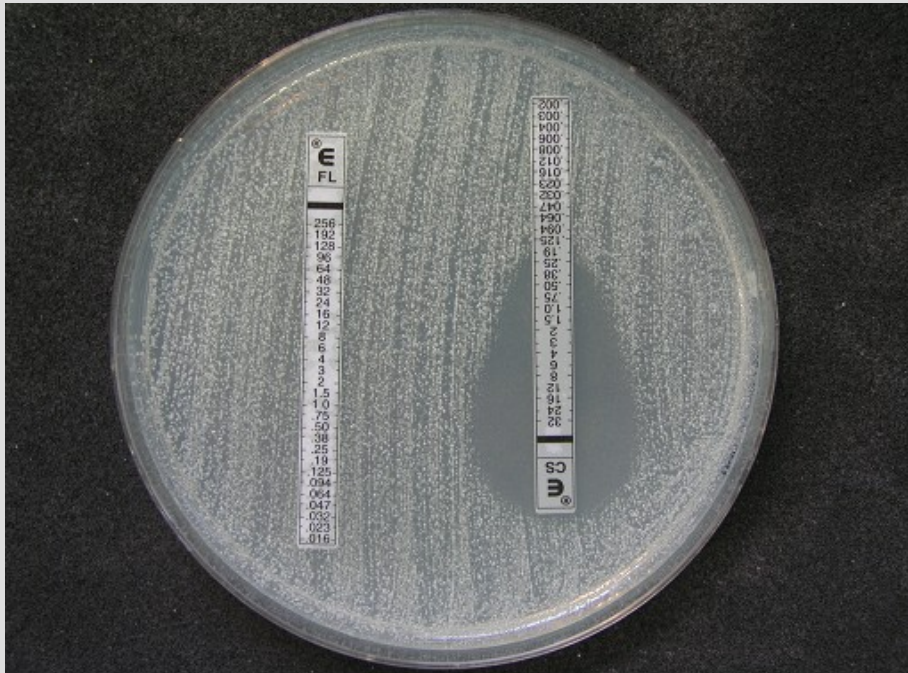
....otestovat jeho citlivost k antimykotikům

(stále není zcela prokázaný vztah mezi výsledky in vitro a in vivo – vliv pomalého růstu hub, stavba jejich buňky etc.)

- standardní metodiky – CLSI, EUCAST (pracné, drahé a rutinně nepoužívané)
- v rutinní praxi pomocné metodiky s různou shodou se standardními (E-TEST, Sensititre, NeoSensitabs...)
- nicméně problematická interpretace (chybí breakpointy)

E TEST :

stanovení MIC (minimální inhibiční koncentrace) pomocí
plastického proužku s gradientem antimykotika



4. Kultivace – shrnutí

Výhody:

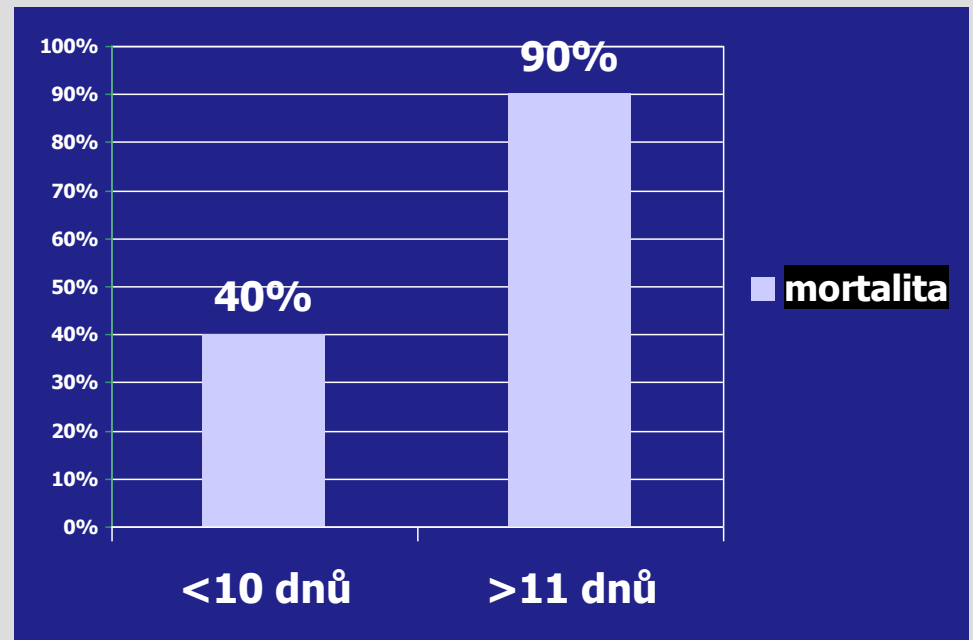
- zařazení do rodu a druhu, testování citlivosti
- specifická (z primárně sterilních materiálů)
- relativně levné

Nevýhody:

- málo senzitivní (ale víc než mikroskopie)
- časově náročnější (dny až týdny)
- obtížná interpretace, zejména u primárně nesterilních materiálů
(musíte se rozhodnout mezi kolonizací, kontaminací nebo infekcí)

...pro dobrou prognózu pacienta s invazivní mykózou je zcela zásadní časné zahájení účinné léčby → velký důraz je proto kladen na **časnou diagnostiku** (tj. imunologické a molekulárně-biologické metody)

mortalita IA & čas
zahájení léčby



Von Eiff, Respiration, 1995

4. Imunologické metody

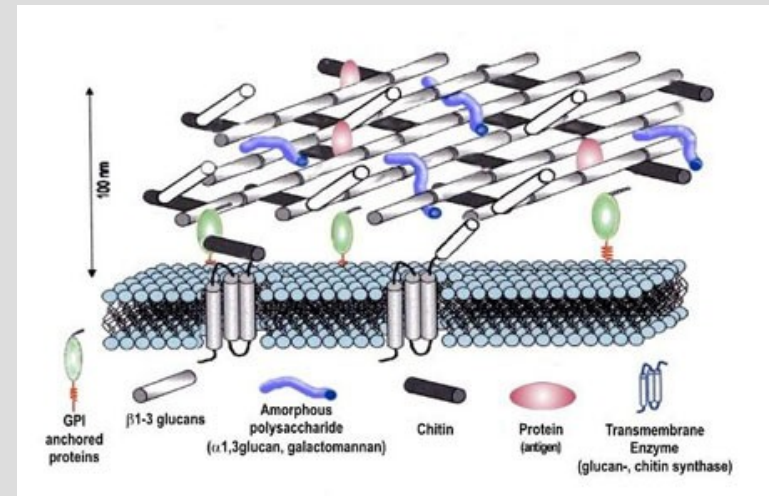
a) antigeny buněčné stěny hub

- invazivní aspergilóza (galaktomanan)
- invazivní kandidóza (manan)
- invazivní kryptokokóza (glukuronoxylomnan)
- invazivní mykóza (glukan)

b) protilátky

- endemické mykózy
(histoplazmóza, kokcidioidomykóza..)
- alergické stavy
- invazivní mykózy?

(pro dg invazivních mykóz není stanovení protilátek obvykle přínosné (obecná promořenost), navíc nejvíce ohrožení neutropeničtí pacienti protilátky ani netvoří)



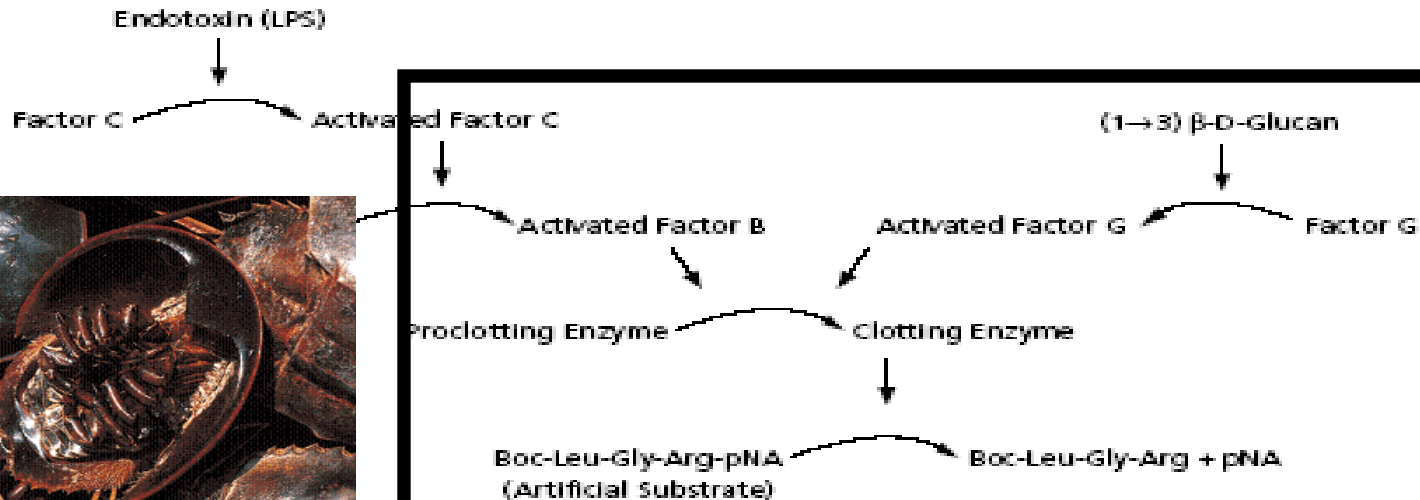
4. Imunologické metody

- latexová aglutinace
- ELISA (enzyme linked immunosorbent assay)
- G-test (limulus test)
- komplement-fixační reakce, hemaglutinace, imunodifuze v gelu..

4. Imunologické metody

- latexová aglutinace
- ELISA (enzyme linked immunosorbent assay)
- G-test (limulus test)
- komplement-fixační reakce, hemaglutinace, imunodifuze v gelu..

Figure 1
Limulus Amebocyte Lysate Pathway



4. Imunologické metody

Výhody:

- rychlé (časná diagnóza)
- senzitivní a specifické
- možnost monitorovat léčebnou odpověď (v případě některých antigenů)
- vysoká negativní prediktivní hodnota!
(tj. negativní výsledek s vysokou pravděpodobností znamená nepřítomnost choroby)

Nevýhody:

- falešné pozitivivity
- nejednoznačná interpretace (u protilátek)
- cena

4. Molekulárně - biologické metody

Výhody:

- rychlé (časná diagnóza)
- velmi senzitivní
(mohou detekovat jen několik kopií genu v reakci a dokonce méně než jeden genom)
- variabilní
(lze využít jak konzervované, tak variabilní úseky genomu a navrhnout panfungální nebo specifickou PCR pro určité rody nebo druhy)
- kvantifikací lze odlišit kolonizaci od aktivní infekce

Nevýhody:

- kontaminace, standardizace
(při odběru, izolaci DNA, přípravě PCR reakce)
- nízká specifická
(zkřížené reakce s jinými příbuznými druhy nebo dokonce lidskou DNA)

Osnova přednášky

1. Morfologie, rozmnožování hub, názvosloví
2. Patogeneze nemocí způsobených houbami (mykózy)
3. Léčba mykóz - antimykotika
4. Vyšetřovací metody v mykologii
5. Nejčastější mykózy

Stanovení diagnózy je komplexní...

✓ rizikové faktory

(onkologická onemocnění a jejich léčba, léčba kortikoidy, diabetes, pobyt na JIP, nezralí novorozenci – ale i léčba antibiotiky, vlhká zapářka apod.)

✓ klinické příznaky

(pozitivní HRCT plic, CNS, horečka, vyrážka, soor apod.)

✓ mikrobiologické výsledky

(kultivace a mikroskopie, sérologie, PCR)



Pro dg. invazivní infekce platí tzv. EORTC/MSG kritéria (infekce prokázaná, pravděpodobná a možná)

De Pauw, CID 2008

Epidemiologie - ČR

Infection	Number of infections per underlying disorder per year					Total burden	Rate /100 000
	None	HM/AIDS	Respir.	Cancer/ Tx	ICU		
Oral candidiasis	? 773		7558	?	?	8331	79
Oesophageal candidiasis	- 210		?	?	-	210	2.0
Candidaemia	-	-	-	368	158	526	5.0
Candida peritonitis	-	-	-	-	79	79	0.75
Recurrent vaginal candidiasis (4 x/year)	152 840	-	-	-	-	152 840	3282 ¹
ABPA	-	-	4739 ²	-	-	4739	45
SAFS	-	-	6581 ³	-	-	6581	62
Hypersensitivity pneumonitis	-	-	1050	-	-		10
Chronic pulmonary aspergillosis	-	-	365 ⁴	-	-	365	3.5
Invasive aspergillosis	-	-	-	91	206	297	2.8
Mucormycosis	-	-	-	22	-	22	0.2
Cryptococcal meningitis	-	1	-	-	-		<0.1
Pneumocystis pneumonia	-	12	?	60	-	72	0.7
Tinea capitis/corporis	960	-	-	-	-	960	9
Total burden estimated	153 800	996	20 293	541	443	176 073 ⁵	

Table 3 Summary of fungal burden in the Czech Republic.

orální kandidóza

vaginální kandidóza

astma (sensibilizace)

ABPA, allergic bronchopulmonary aspergillosis; SAFS, severe asthma with fungal sensitisation; Tx, transplantation; ICU, intensive care unit. The symbol "?" is used where significant number of cases with particular fungal infection are suspected but no data found to make our estimates.

¹Rate per 100 000 adult women.

²Best estimate, range 1316–14 712.

³Best estimate, range 5641–16 814.

⁴This is the lower estimate, the high estimate could be as much as 604.

⁵Skin fungal infections affecting up to 1.5 million not included.

1,67% houbových infekcí/rok

(UZIS; publikované práce)

Epidemiologie - invazivní mykózy

N. Azie et al. / *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 73 (2012) 293–300

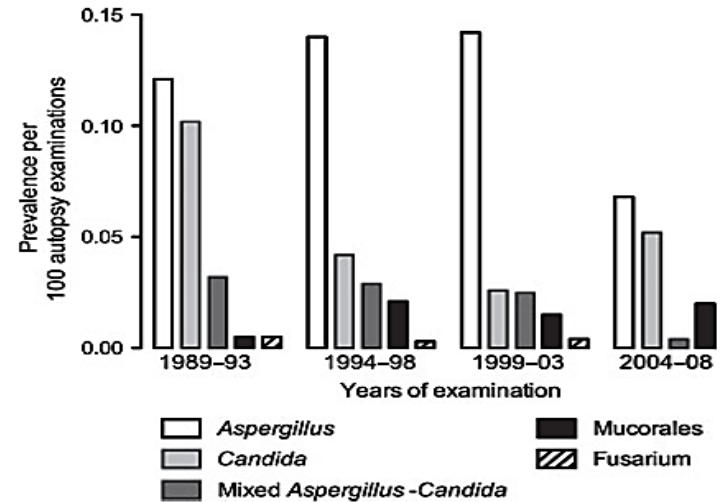
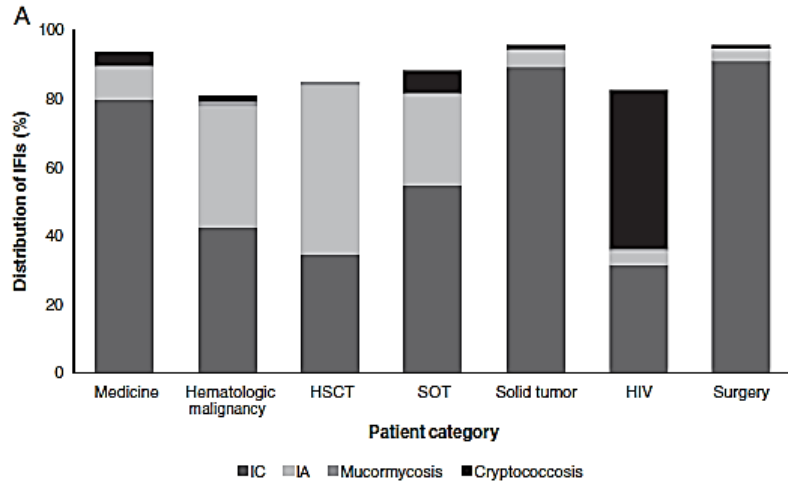
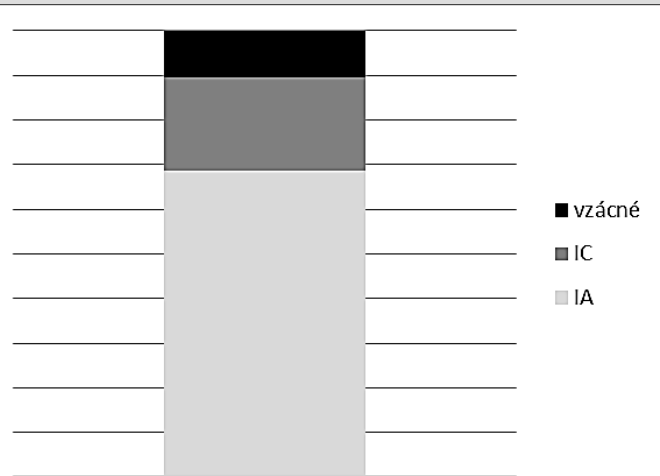


Figure 1 Prevalence of the five most common invasive fungal infections identified at autopsy in patients with haematological malignancies over a 20 year period. Chi-squared test for trend, *Aspergillus* $P = 0.01$; *Candida* $P = 0.01$; Mixed $P = 0.002$; *Mucormycosis* $P = 0.04$; *Fusariosis* $P = 0.7$.

7 526 IFD; S. Amerika; 2004-2008
Azie 2012 – PATH - Prospektive antifungal therapy)

1 213 autopsií; 371 IFD; 1989 – 2008 (jen hematologické malignity)
Lewis 2013



954 IFD; 2001 – 2017 (jen hematologické malignity)
Weinbergerová 2018 - FIND

5.

Kandidóza

Původci:

C. albicans (% v závislosti na populaci)

ostatní kandidy – ale i rod *Trichosporon*, *Saccharomyces* etc.

Infekce:

- invazivní – sepse nebo diseminovaná infekce
- neinvazivní - onychomykóza, kožní kandidóza, vaginální kandidóza...

V malém množství patří kvasinky do běžné flóry kůže či GIT, z čehož plyne, že kandidózy jsou obvykle **endogenního** původu

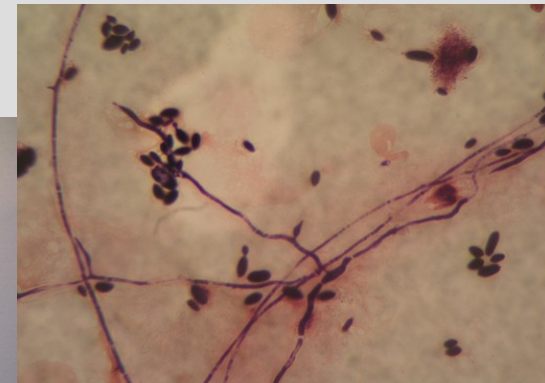
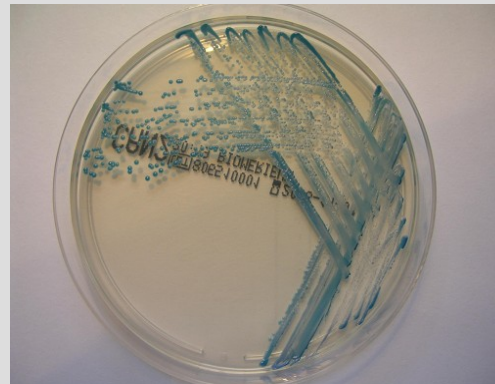
Mikrobiologická diagnostika:

kultivace a mikroskopie

- běžné bakteriologické metody

nekultivační

- glukan
- PCR



5.

Invazivní kandidóza

...po koaguláza-negativním stafylokoku, zlatém stafylokoku a enterokoku jsou kvasinky třetím až čtvrtým nejčastějším původcem nozokomiální sepse...

lokality	1.	2.	citace
S. Amerika	<i>C. albicans</i> (45,6%)	<i>C. glabrata</i> (26,0%)	2010, Pfaller
Itálie	<i>C. albicans</i> (60,3%)	<i>C. parapsilosis</i> (16,7%)	2015, Bassetti
Brazílie	<i>C. albicans</i> (34,3%)	<i>C. parapsilosis</i> (24,1%)	2016, Doi
Česká republika	<i>C. albicans</i> (49,7%)	<i>C. glabrata</i> (15,3%)	2018, Kocmanová
Čína	<i>C. tropicalis</i> (28,6%)	<i>C. albicans</i> (23,3%)	2013, Chun-fang

Původci:

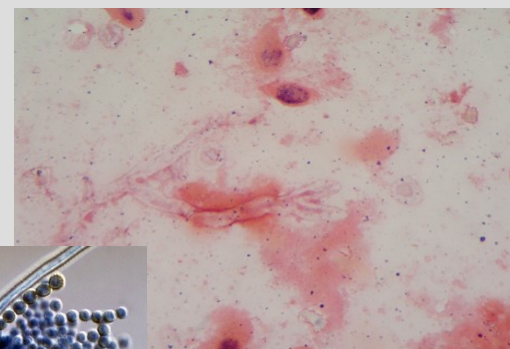
***Aspergillus fumigatus* (90%)**

Aspergillus niger, Aspergillus flavus, Aspergillus terreus...

Infekce:

- invazivní - nejčastěji plicní, možnost diseminace hematogenně
- neinvazivní – onychomykózy, otomykózy, alergická broncho-pulmolární...

Na rozdíl od kvasinek nejsou aspergily součástí běžné flóry člověka a infekce jsou tedy obvykle **exogenního** původu (stavební práce!!)



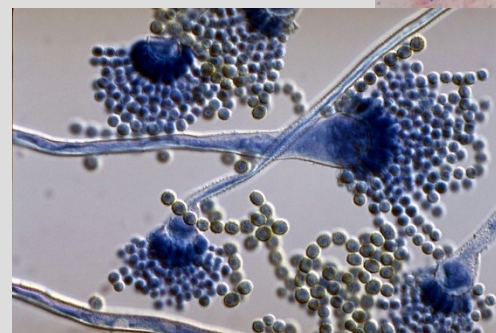
Mikrobiologická diagnostika:

kultivace a mikroskopie

- ne biochemie - ale mikromorfologie, MALDI

nekultivační

- galaktomanan, glukan
- PCR



5.

Invazivní aspergilóza

nejčastější mezi invazivními infekcemi způsobenými vláknitou houbou, zřídka diseminovaná

nejvyšší incidence u pacientů:

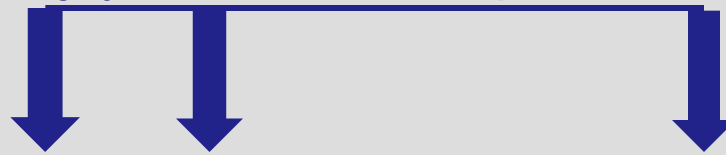


Table 6. Distribution of invasive fungal pathogens based on the clinical service or underlying condition of the patient.^{a,b}

Pathogen group	% Infections by clinical service (N)								Total (6,031)
	GMED (3,640)	HEME (1,010)	SCT (377)	HIV (263)	NICU (54)	SOT (886)	ST (863)	SURG (1,906)	
<i>Candida</i> spp.	81.7	42.6	31.6	32.7	96.3	57.2	89.2	91.2	75.0
<i>Cryptococcus</i> spp.	4.0	2.1	0.0	48.7	0.0	6.4	1.6	1.0	4.5
Other yeasts ^c	1.2	3.3	2.7	3.4	0.0	1.0	1.2	0.8	1.4
<i>Aspergillus</i> spp.	8.3	33.8	50.7	4.9	1.9	26.0	4.9	3.4	12.3
Zygomycetes	1.1	5.2	6.4	1.1	1.9	1.7	0.0	0.6	1.4
Other mould ^d	1.6	7.6	6.4	1.5	0.0	4.7	1.3	1.5	2.7
Endemic fungi	1.9	1.2	0.5	7.6	0.0	2.6	0.8	0.7	1.6

^aData compiled from Horn et al. (2007); Horn et al. (2009); Neofytos et al. (2009 a,b).

^bGMED, general medicine; HEME, hematologic malignancy; SCT, stem cell transplant; HIV, human immunodeficiency virus/acquired immunodeficiency syndrome (AIDS); NICU, neonatal intensive care unit; SOT, solid organ transplant; ST, solid tumor; SURG, surgical (nontransplant).

^cOther yeasts include 6 cases of *Malassezia* spp., 26 *Pneumocystis*, 12 *Rhodotorula*, 21 *Saccharomyces*, and 6 *Trichosporon*.

^dOther moulds include 2 cases of *Acremonium*, 9 *Alternaria*, 3 *Bipolaris*, 53 *Fusarium*, 10 *Paecilomyces*, 13 *Scedosporium apiospermum*, 6 *S. prolificans*, and 1 *Sporothrix*.

Původci:

***Rhizopus spp.* (až 50%)**

Mucor spp., *Absidia spp.*, *Rhizomucor spp.*, *Cunninghamella spp.*

Infekce:

- invazivní - rhinocerebrální, plicní, sinusitidy, možnost diseminace hematogenně
- neinvazivní – onychomykózy, otomykózy...

exogenní (stejně jako aspergilózy), méně časté

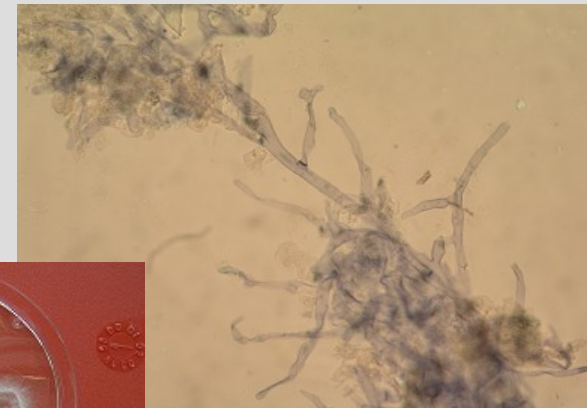
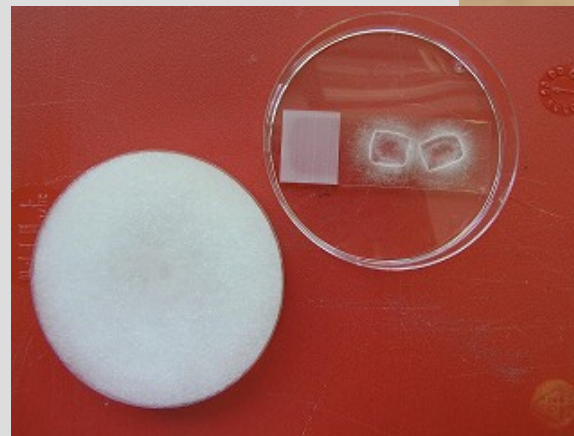
Mikrobiologická diagnostika:

kultivace a mikroskopie

- ne biochemie - ale mikromorfologie, MALDI

nekultivační

- bez serologických metod!!
- PCR



Původci:

***Fusarium solani* (až 50%), *F.oxysporum*, *F.verticillioides*...**

Infekce:

- invazivní - nejčastěji plicní, u imunokompromitovaných až v 70% diseminace!!
- neinvazivní – onychomykózy, otomykózy, keratitidy (čočky)

exogenní (stejně jako aspergilózy), méně časté

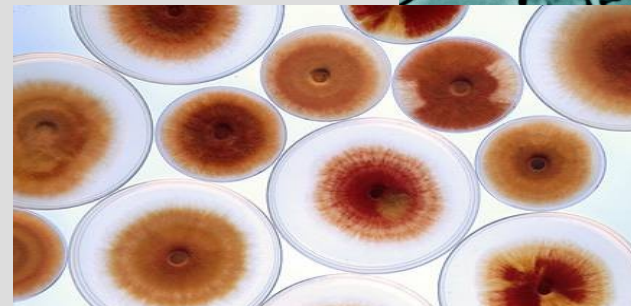
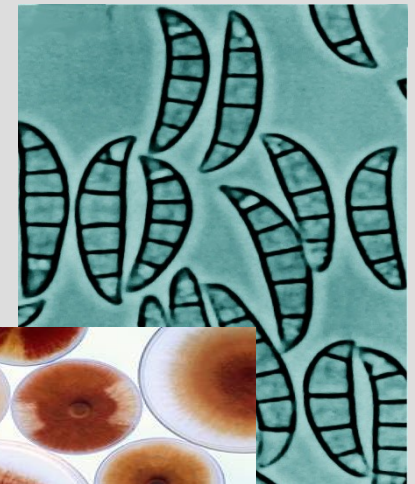
Mikrobiologická diagnostika:

kultivace a mikroskopie

- ne biochemie – ale mikromorfologie, MALDI
- u diseminovaných pozitivní hemokultura!!

nekultivační

- glukan
- PCR



5.

Kryptokokóza

Původce:

C. neoformans, *C. gatii*

Infekce:

- invazivní - primárně plicní, při diseminaci má afinitu k CNS (meningitidy), často první příznak rozvíjejícího se AIDS (Afrika!)
- neinvazivní - kožní

exogenní (rezervoár- holubí trus), raritní

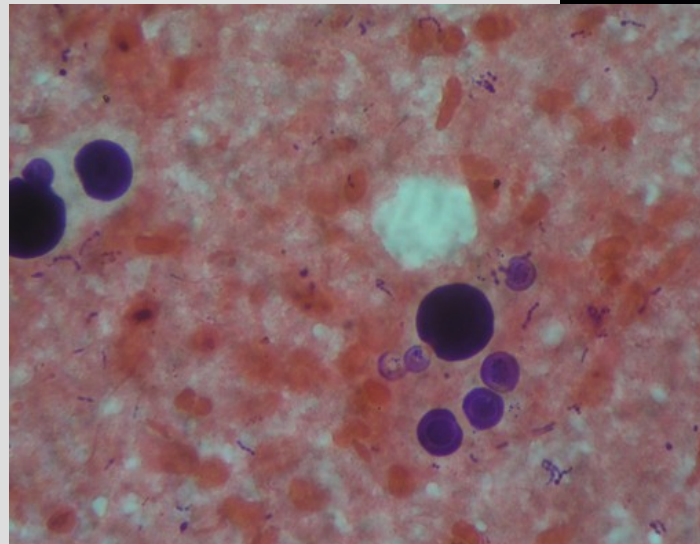
Mikrobiologická diagnostika:

kultivace a mikroskopie

- v mikroskopickém preparátu typické polysacharidové pouzdro
- kultivace – běžné půdy

nekultivační

- glukuronoxylomanan
- PCR



5. Pneumocystová pneumonie

Původce:

P. jiroveci (na počest českého parazitologa prof. Jírovce) – původně parazit, přeřazeno k houbám na základě studia genomu

Infekce:

- invazivní - plicní, často první příznak rozvíjejícího se AIDS, komplikace u neutropenických pacientů
- neinvazivní – nejsou

exogenní (ubikvitní), raritní

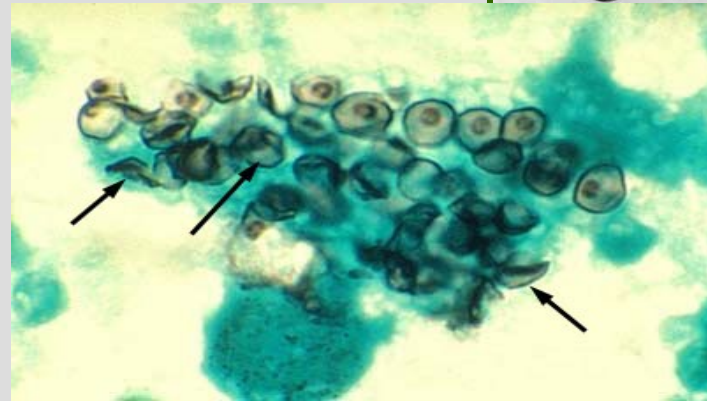
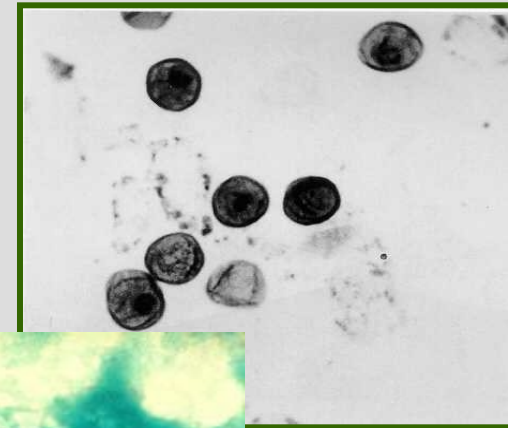
Mikrobiologická diagnostika:

kultivace a mikroskopie:

- jen mikroskopie

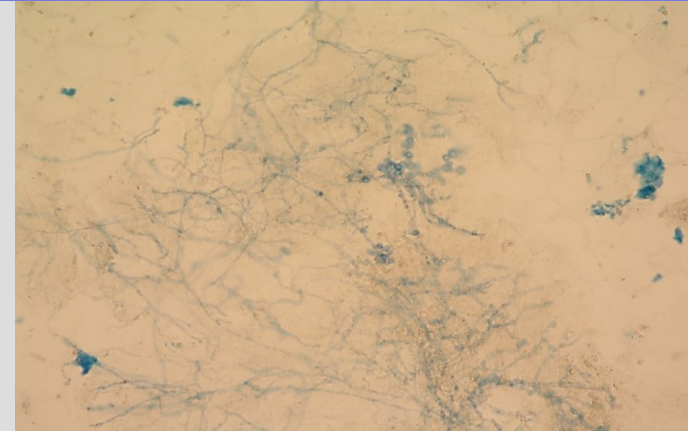
nekultivační

- glukon (krev, tekutina z BAL)
- PCR (tekutina z BAL)



5. Povrchové mykózy (neinvazivní)

- dermatofytózy (tinea – dle lokalizace capitis, corporis, manus, pedis, unguium - onychomykózy) (*Trichophyton* spp., *Epidermophyton floccosum*, *Microsporum* spp...)
- kandidózy (*C. albicans*, *C. parapsilosis*, *T. asahii*...)
- hyfomykózy (*Aspergillus* spp., *Fusarium* spp., *S.brevicaulis*...)
- keratomykózy (*Malassezia furfur*...)



Mikrobiologická diagnostika:

kultivace a mikroskopie:

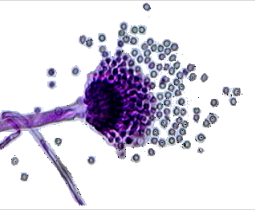
- mikroskopie (speciální barvení)
- kultivace až 6 týdnů

nekultivační

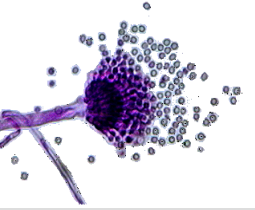
- neprovádí se



Závěry



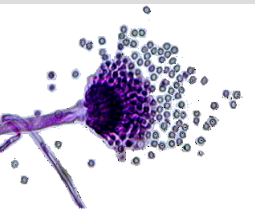
rozdíl bakterie x houby, jak se dělí



mikrobiologická diagnostika (mikroskopie, kultivace, sérologie, PCR)



mykózy (invazivní x neinvazivní)



nejpočetnější (dermatomykózy, kandidózy, aspergilózy,)



v diagnostice je nutný komplexní přístup (rizikové faktory x klinický stav x mikrobiologie)