

# Lékařská mykologie

Iva Kocmanová

# Úvod

1. **Mykologie** – nauka o houbách (řec. *mykes*, lat. *fungi*)
2. Houby jsou organismy **eukaryotní** (pravé jádro, mitochondrie..), jednobuněčné i vícebuněčné, heterotrofní
3. **Základní dělení:**
  - houby mikroskopické (mikromycety)
  - houby makroskopické (těmi se zabývat nebudeme)

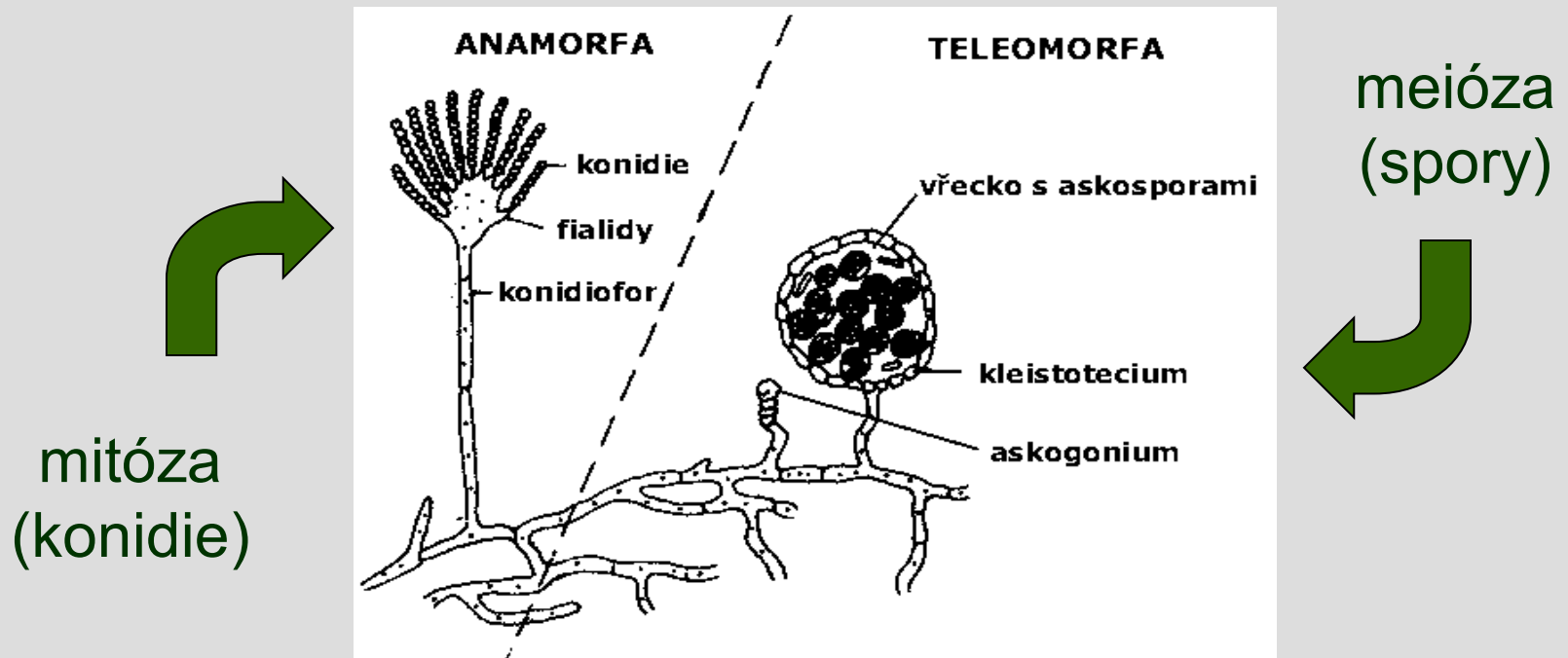
# Osnova

1. Rozmnožování hub, názvosloví
2. Patogeneze nemocí způsobených houbami (mykózy)
3. Léčba mykóz - antimykotika
4. Vyšetřovací metody v mykologii  
(mikroskopie, kultivace, sérologie a molekulárně biologické metody)
5. Nejčastější mykózy  
(kandidóza, aspergilóza, kryptokokóza, fusarióza, zygomycóza, dermatomykóza.....)

# 1. Rozmnožování hub

pohlavní stadium (teleomorfa) a nepohlavní stadium (anamorfa)

anamorfa + teleomorfa = holomorfa



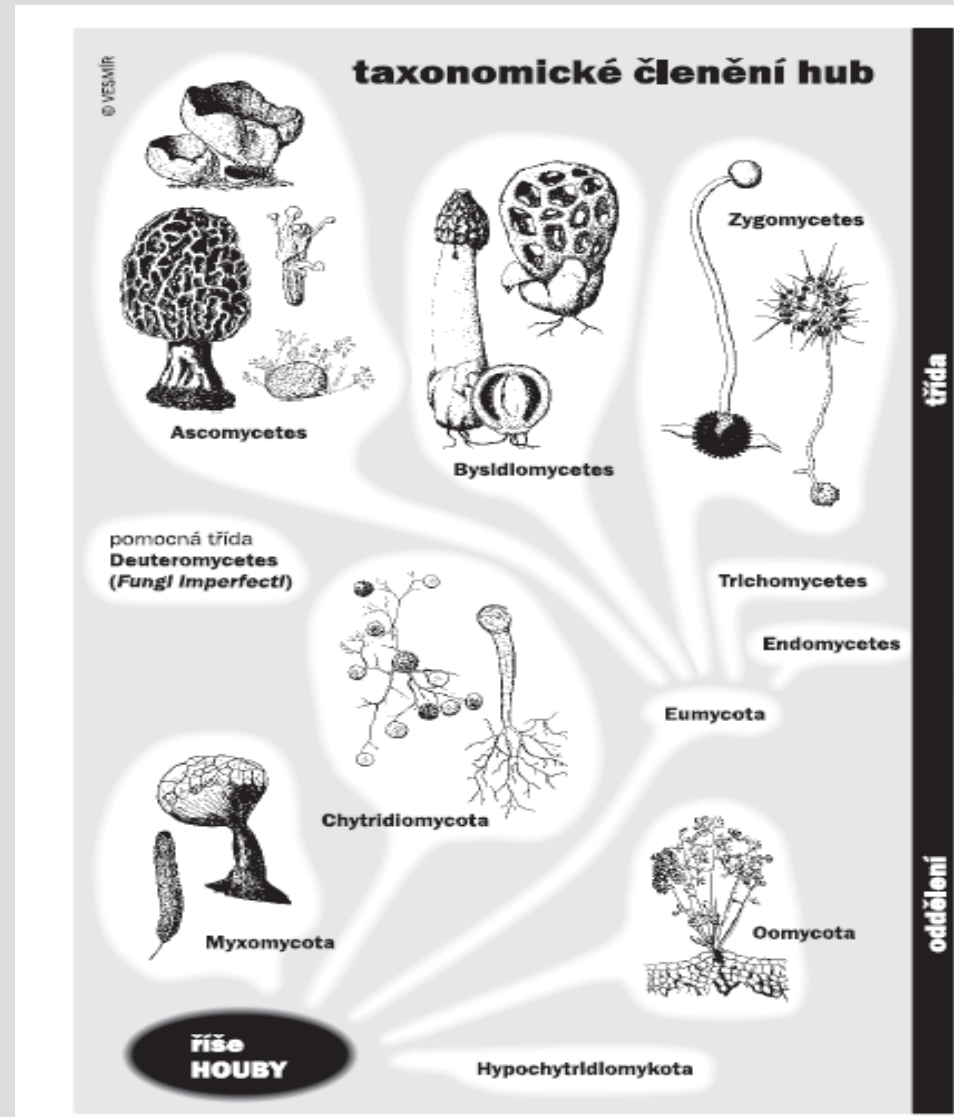
# 1. Názvosloví hub

Systematika hub je velmi složitá a stále ve vývoji (rozvoj genetických metod, anamorfa x telemorfa)

V současné době existují 2 přístupy:

Margulisová (houby s.l. do dvou říší)

Cavalier-Smith (houby s.l. do tří říší)



# 1. Názvosloví hub

- většina medicínsky významných hub se vyskytuje jako **anamorfy** (nepohlavní stadia)
- pokud je **teleomorfa** (pohlavní stadium) známá, mělo by mít její pojmenování přednost – což se ovšem v klinické praxi obvykle neděje

| <b>teleomorfa</b>                                    | <b>anamorfa</b>                 |
|--|---------------------------------|
| <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 –

názory vědců se stále mění.....

V současné době se ustupuje od dělení na telemorfy a anamorfy a s tím se zase mění názvosloví – např:

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

aktivita „One Fungus = one name“

# 1. Názvosloví hub v klinické praxi....

## A) Kvasinky a jim podobné

- mikroskopicky kulaté nebo protáhlé buňky, 3-6 x 3-15  $\mu\text{m}$
- nepohlavní rozmnožování pučením a dělením
- na pevných půdách kolonie podobné bakteriálním

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

## B) Vlákňité houby (plísně)

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

(hyalinní mikromycety – *Aspergillus*, *Fusarium*..., zygomycety - *Rhizopus*, *Mucor*.., pigm. mikromycety – *Scedosporium*, *Alternaria*.., dermatofyta – *Trichophyton*, *Microsporum*..)



# 1. Názvosloví hub 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*..

## D) Ostatní

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

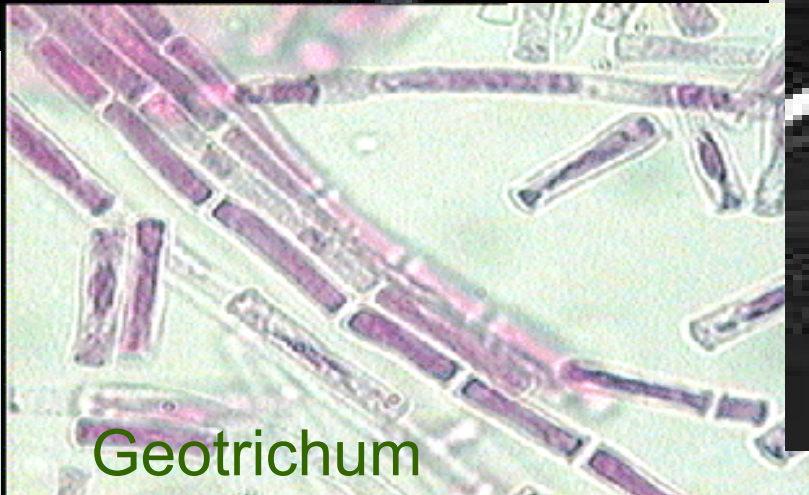
*Pneumocystis jiroveci*, *Microsporidium* spp...

# 1. Houby - zástupci

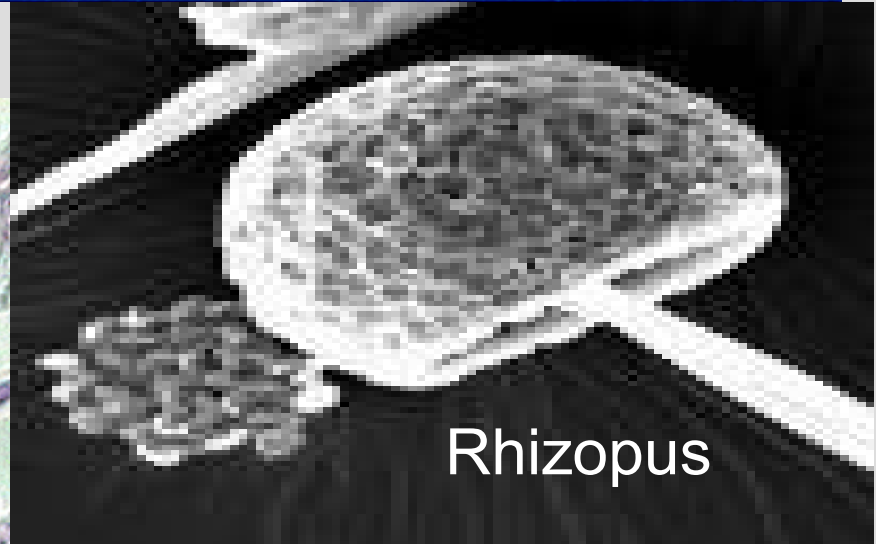
Candida



Fusarium



Geotrichum



Rhizopus

# 1. Houby - zástupci

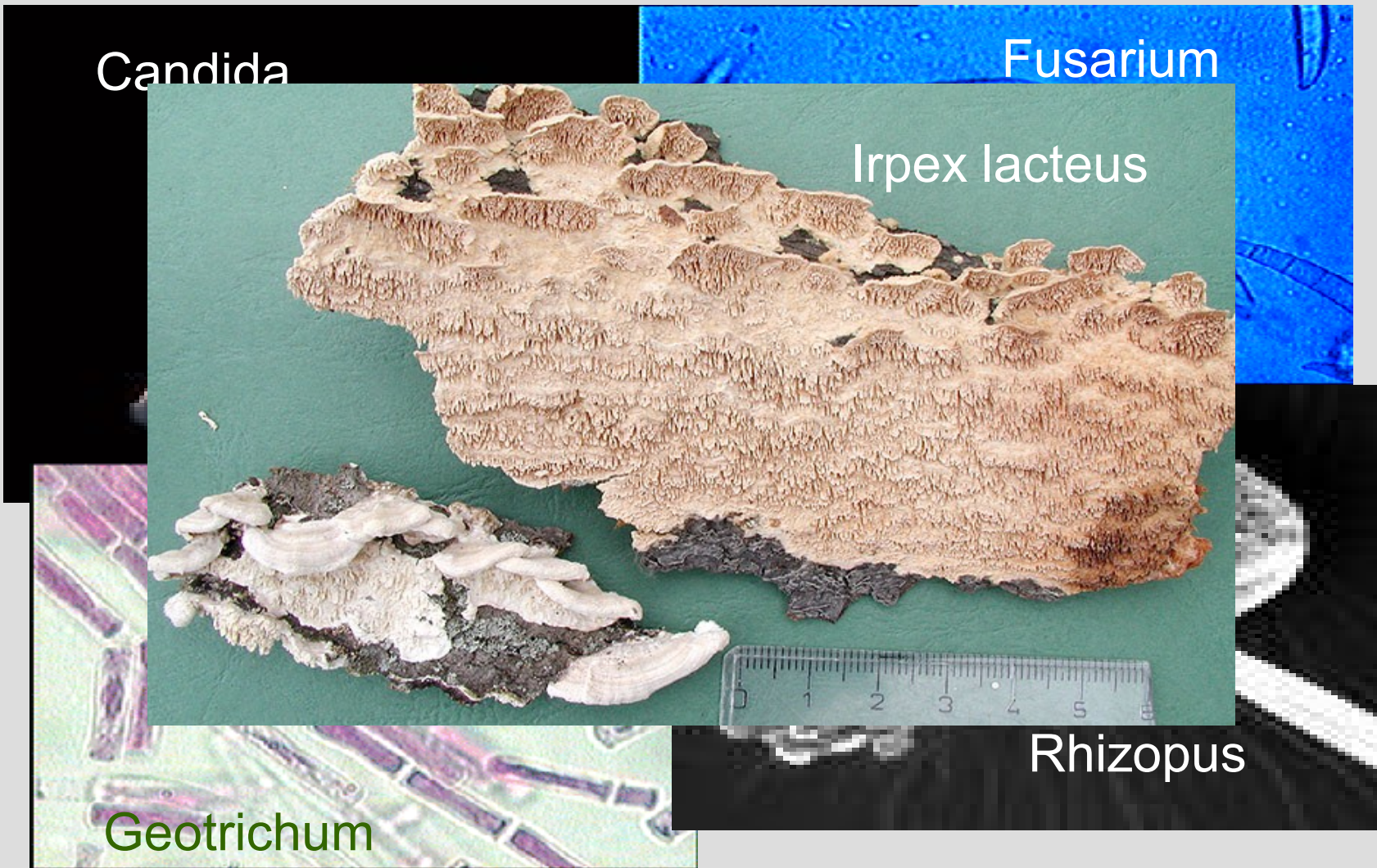
Candida

Fusarium

Irpex lacteus

Rhizopus

Geotrichum



## 2. Patogeneze mykóz

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



což znamená, že ke vzniku onemocnění (invazivního/neinvazivního) napomáhá přítomnost nějaké predispozice hostitele -

tedy **tzv.rizikové faktory**

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

Pro vznik život ohrožujících - **invazivních infekcí** - je největším rizikem **neutropenie** (obrana organismu proti houbám závisí nejvíce na buněčné imunitě)

# 2. Mykózy - rozdělení

## Celkové infekce (invazivní)

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

Lokální infekce (povrchové a slizniční) infekce kůže, kožních adnex a sliznic (dermatomykózy a kandidózy)

## Mykotoxikózy

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

## Alergická onemocnění

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

# 3. Antimykotika (léčba mykóz)

## Dle použití

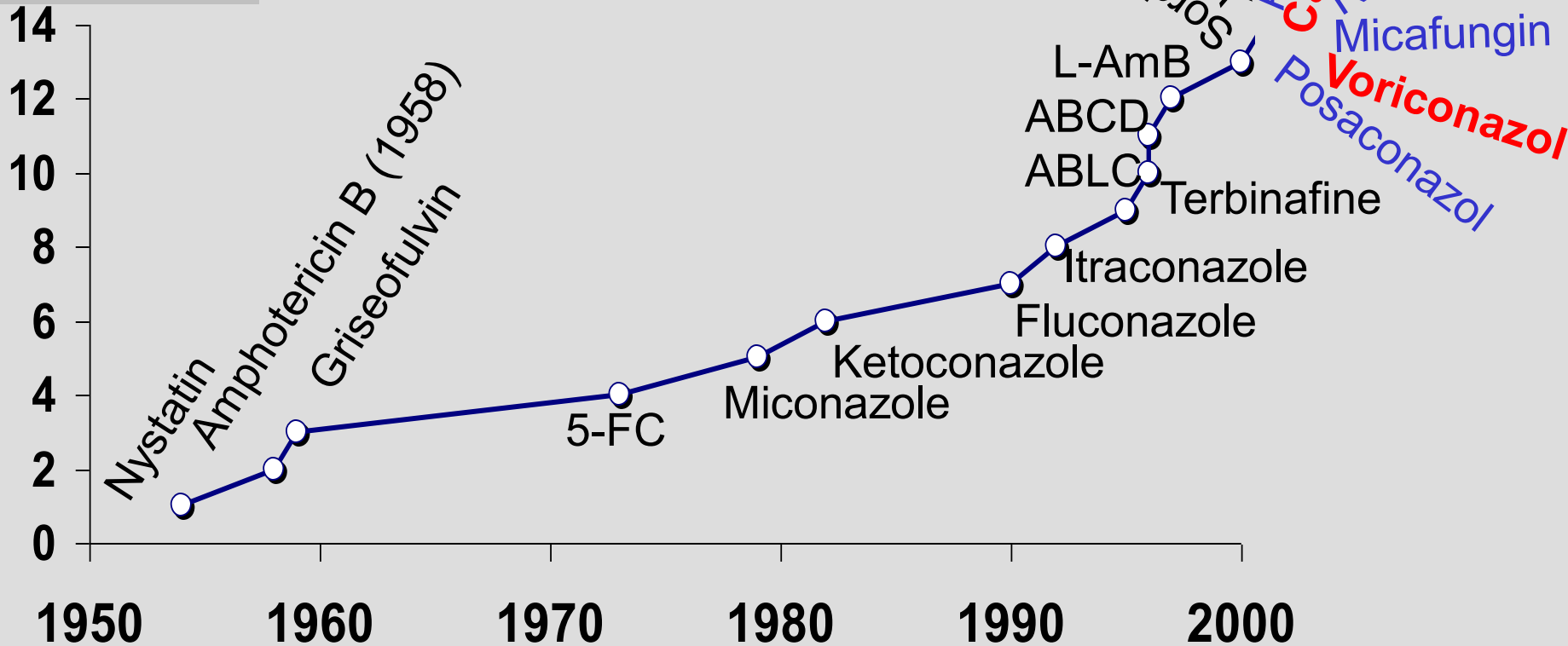
- lokální
- celková

## Dle struktury molekuly

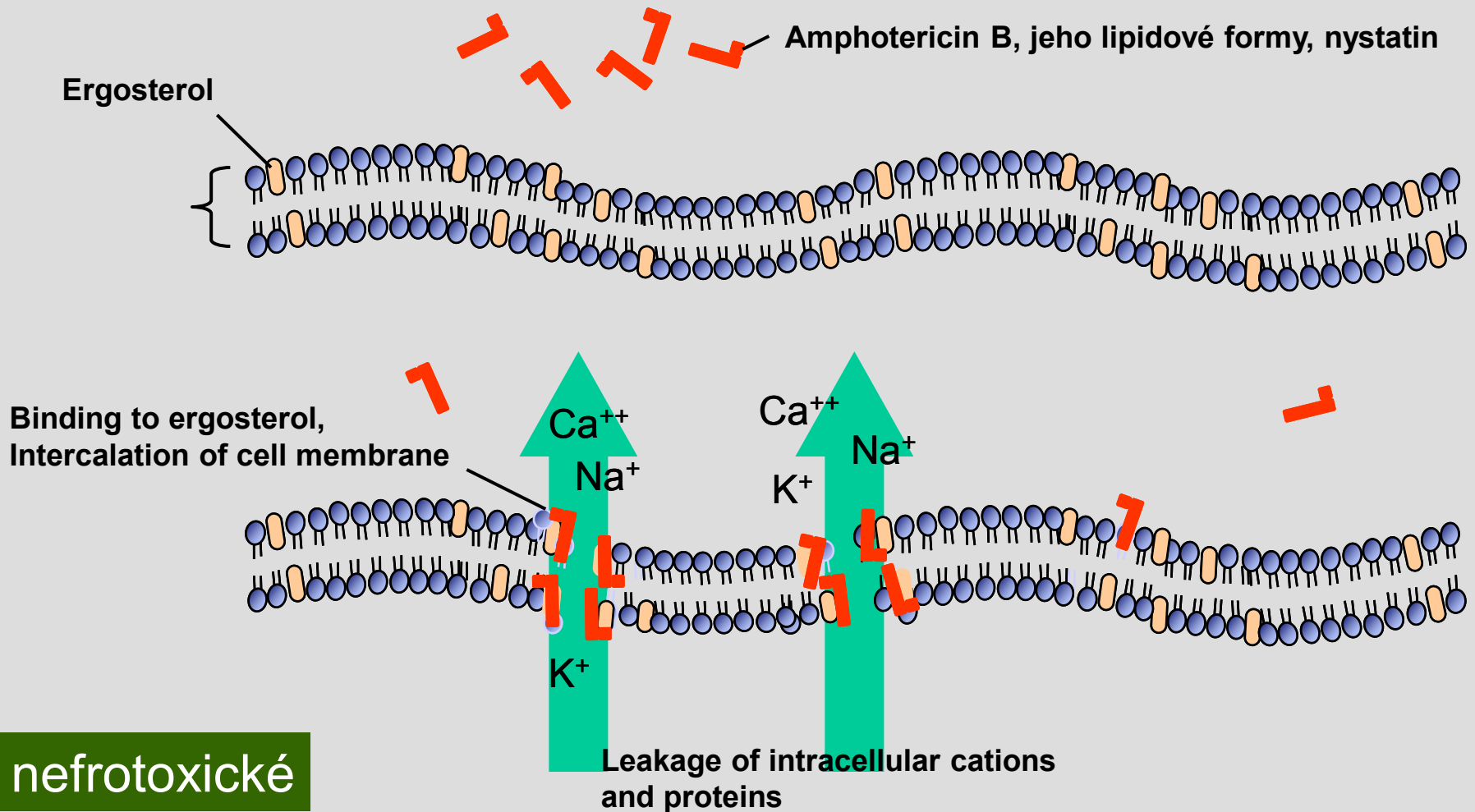
- alyeny (amfotericin a jeho lipidové formy, nystatin)
- azoly (flukonazol, itrakonazol, vorikonazol, clotrimazol..)
- echinokandiny (caspofungin, micafungin, anidulafungin)
- antimetaboly (flucytosin)
- alylaminy (terbinafin)
- ostatní (k.undecylová, ciclopiroxolamin)

# Medical Mycology: The Last 50 Years

# of drugs

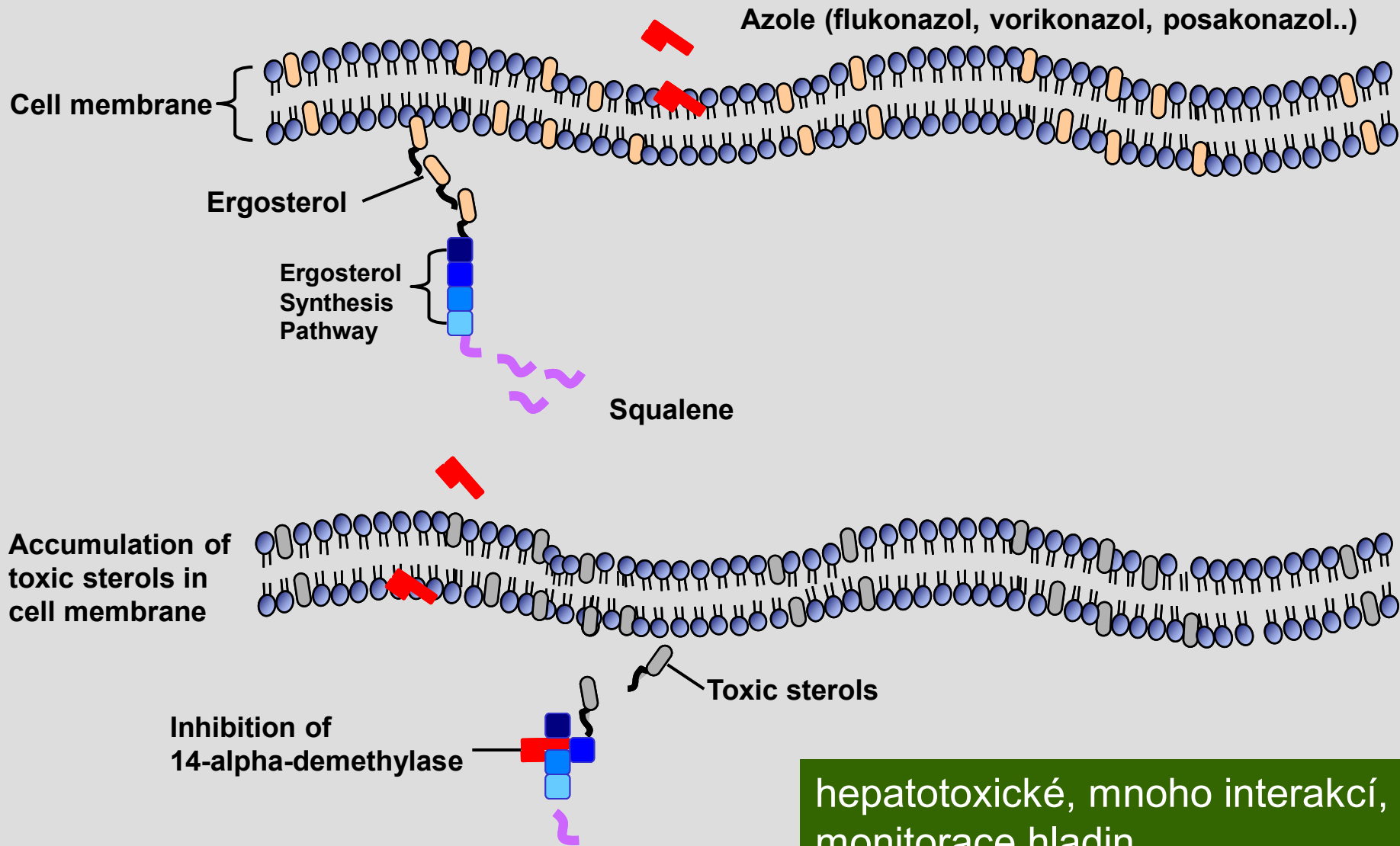


# 3. Alyeny – změna permeability buněčné membrány (vazba na ergosterol)



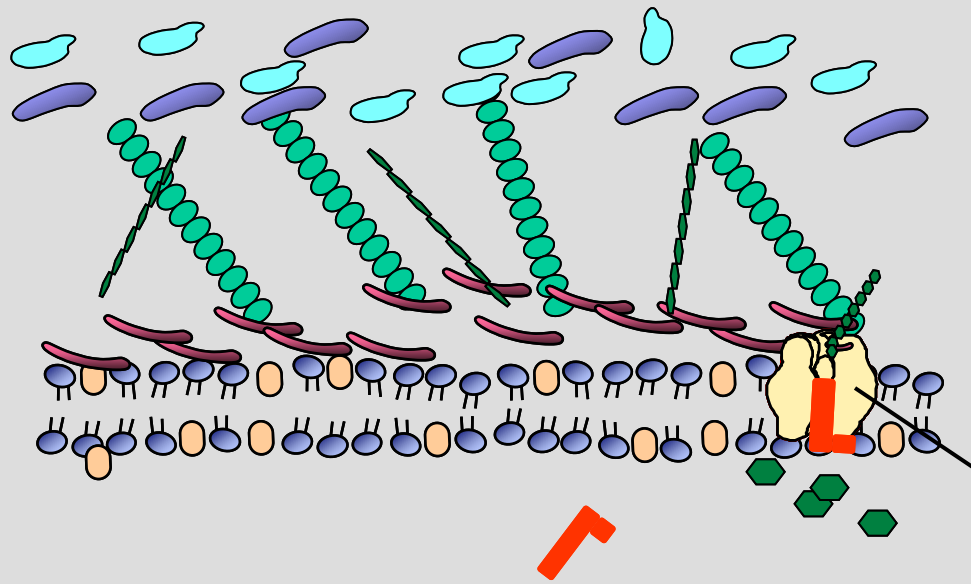
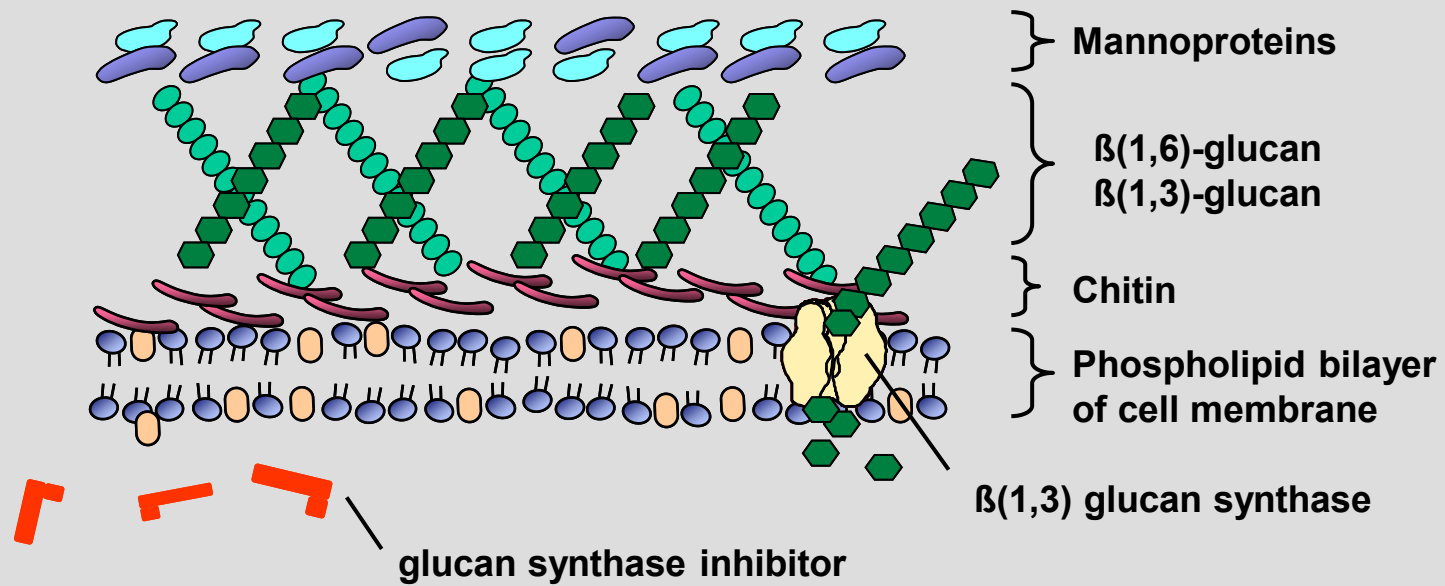


# 3. Azoly – inhibice syntézy ergosterolu (cytochrom P450)



hepatotoxické, mnoho interakcí, monitorace hladin

# 3. Echinokandiny – inhibice syntézy glukanu



takřka bez  
neřadoucích  
účinků, drahé

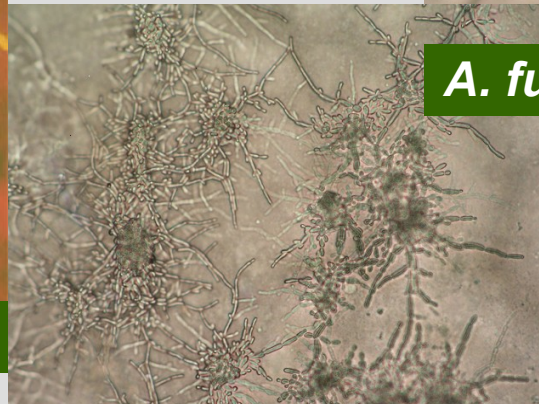
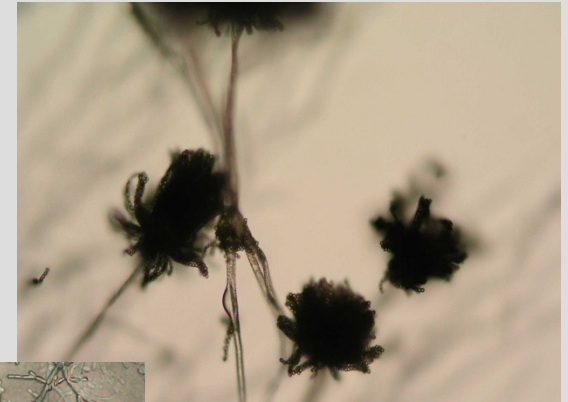
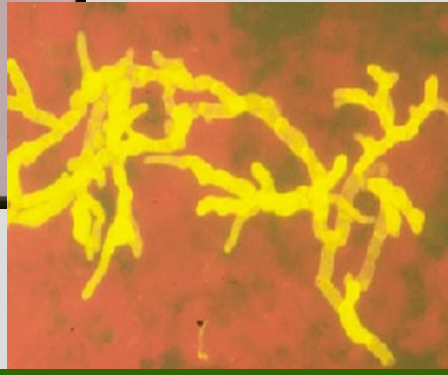
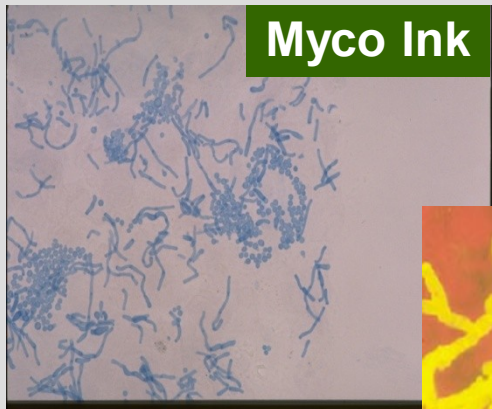
# 4. Vyšetřovací metody v klinické mykologii

1. Mikroskopické metody
2. Kultivační metody
3. Sérologie  
(stanovení antigenu, protilátky)
4. Molekulárně-biologické metody (nestandardní)

# 4. Mikroskopické metody

## A) nativní preparát

- často v KOH, lze dobarvit buď nespecificky (Lugol), nebo specificky (MycoInk, Rylux – vážou se na chitin)
- kultury

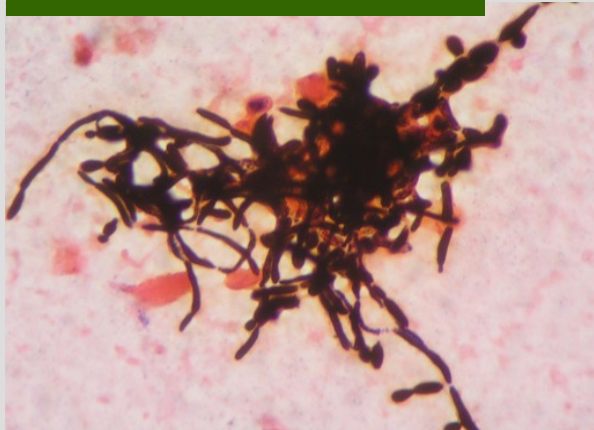


# 4. Mikroskopické metody

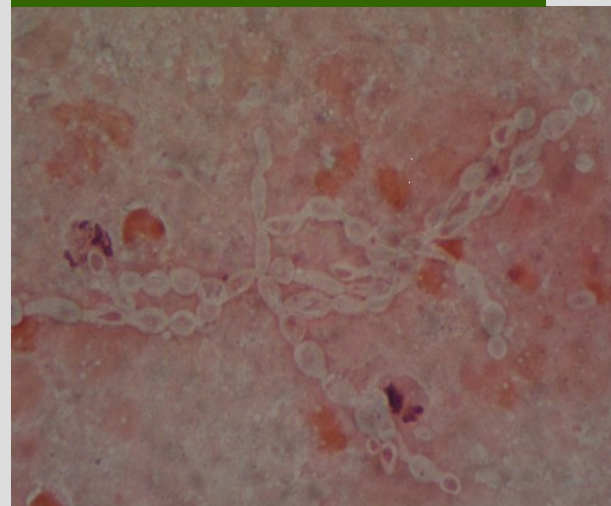
## B) fixovaný preparát

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

Kandidémie - Gram



Punktát z jater - Gram



# 4. Mikroskopie – shrnutí

## Výhody:

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

riziko kontaminace není velké, ale může být pozitivní i v případech, kdy houba již není životaschopná (př.dermatomykóza)

## Nevýhody:

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

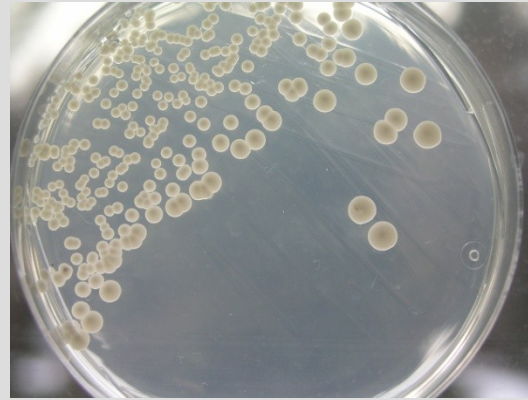
# 4. Kultivační metody

## Kultivační média

- pevná
- tekutá

## Kultivační teplota

37+/-1°C, 30+/-1°C, 25+/-1°C



nejběžnější médium pro mykologii:

**Sabouraudův agar** s glukózou s antibiotiky  
(pro zabránění růstu „rychlejších“ bakterií)

další speciální média:

chromogenní agar (dourčení kvasinek)

rýžový agar (dourčení kvasinek)

RPMI 1640, MH s glukózou a metylenovou modří (testování citlivosti)

Czapek Dox (dourčení aspergilů)

atd.



# 4. Kultivační metody

## zařazení kultivátů do rodu a druhu

- makro a mikromorfologie

(vzhled kolonií, tvorba mycélií a pseudomycélií na rýžovém nebo bramborovém agaru, tvar buněk v mikroskopickém preparátu..)

- biochemické vlastnosti

(utilizace a kvašení cukrů, event. dalších látek, komerční „chromagary“)

- sekvenace (PCR), proteomika (MALDI-TOF)



# 4. Testování citlivosti hub k antimykotikům

- Stále není zcela prokázáný vztah mezi výsledky in vitro a in vivo

houby rostou pomaleji než bakterie (difuze ATM v agaru x růst mikroorganismu)  
stavba buňky (eukaryota) a složení (chitin)

- Existují standardní metodiky – CLSI, EUCAST

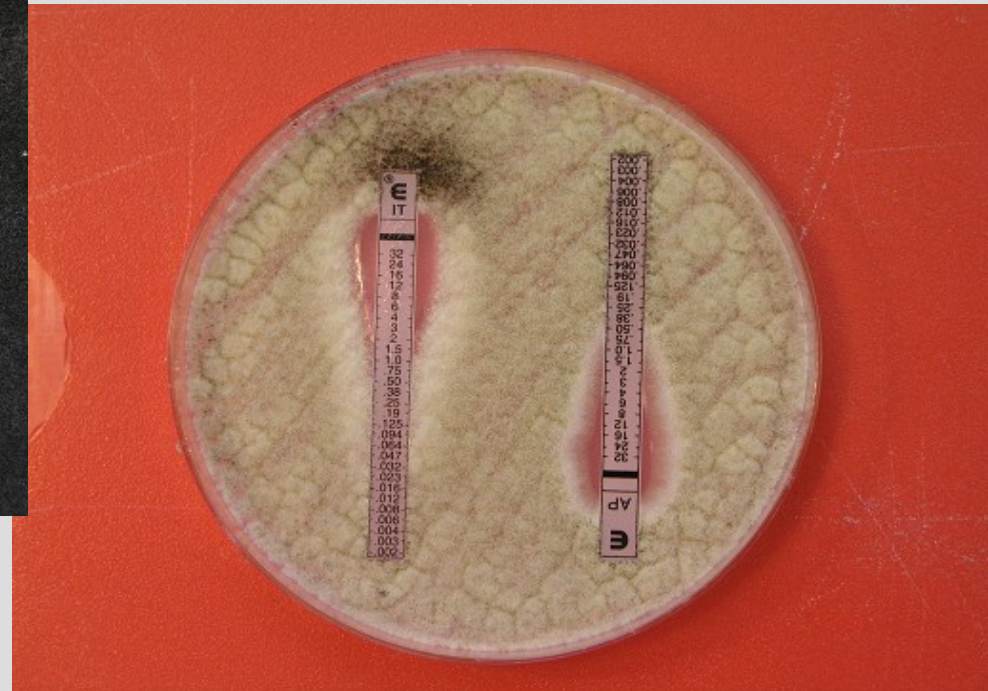
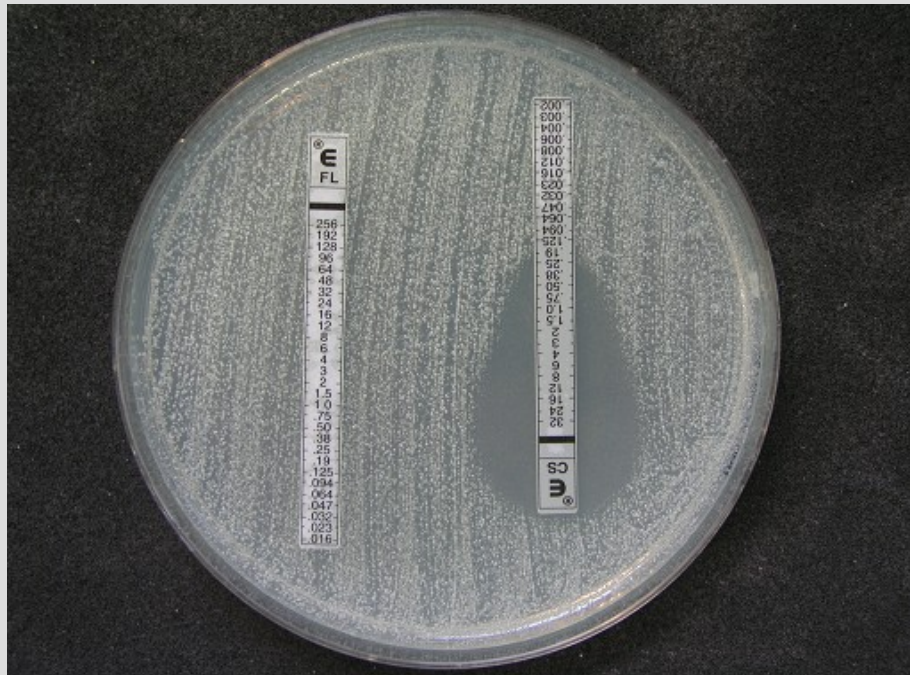
(M27-A pro kvasinky, M37-A pro vláknité houby, M44-A, E7.1)

pracné, drahé a v rutinně nepoužívané (krom DDT, která je ale použitelná jenom pro některá ATM)

- V rutinní praxi lze využít pomocné metodiky s různou shodou se standardními

(E-TEST, Sensititre, NeoSensitabs...)

# 4. Příklad: metodika ETEST (vysoká shoda se standardem)



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

# 4. Kultivace – shrnutí

## Výhody:

- umožní zařadit patogena do rodu i druhu (epidemiologie)
- otestovat citlivost na antimykotika
- specifická (z primárně sterilních materiálů)

## Nevýhody:

- málo senzitivní (ale víc než mikroskopie)
- časově náročnější (dny až týdny)
- riziko kontaminací (pomnožení)
- u nesterilních materiálů obtížná interpretace – rozhodnutí o kolonizaci nebo infekci (moč, sputum etc.)

# 4. Sérologie (dg invazivních mykóz)

## ➤ antigeny buněčné stěny hub (v našich podmínkách)

invazivní **aspergilóza**

galaktomannan

invazivní **kandidóza**

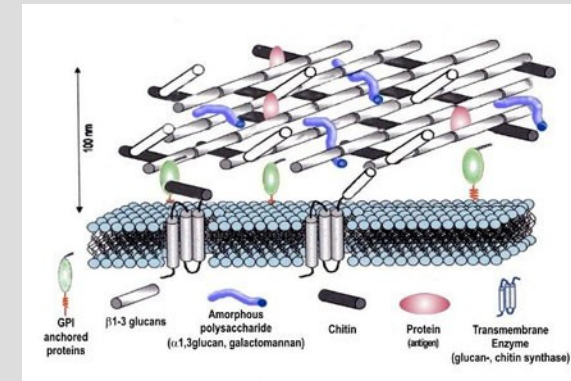
mannan

invazivní **kryptokokóza**

glukuronoxylomannan

invazivní **mykóza**

glukan



## ➤ protilátky

invazivní **kandidóza**

antimannan

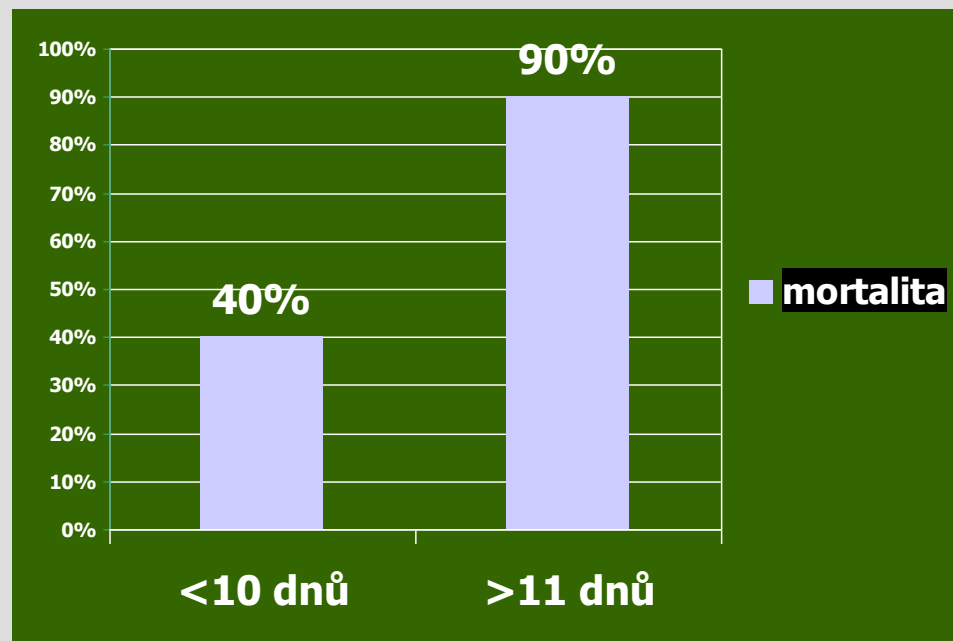
Pro dg invazivních mykóz není stanovení protilátek obvykle přínosné (velká promořenost obyvatelstva)

Výjimka – endemické mykózy (histoplazmóza, kokcidioidomykóza apod.)

# 4. Sérologie (dg invazivních mykóz)

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

mortalita IA & čas  
zahájení léčby

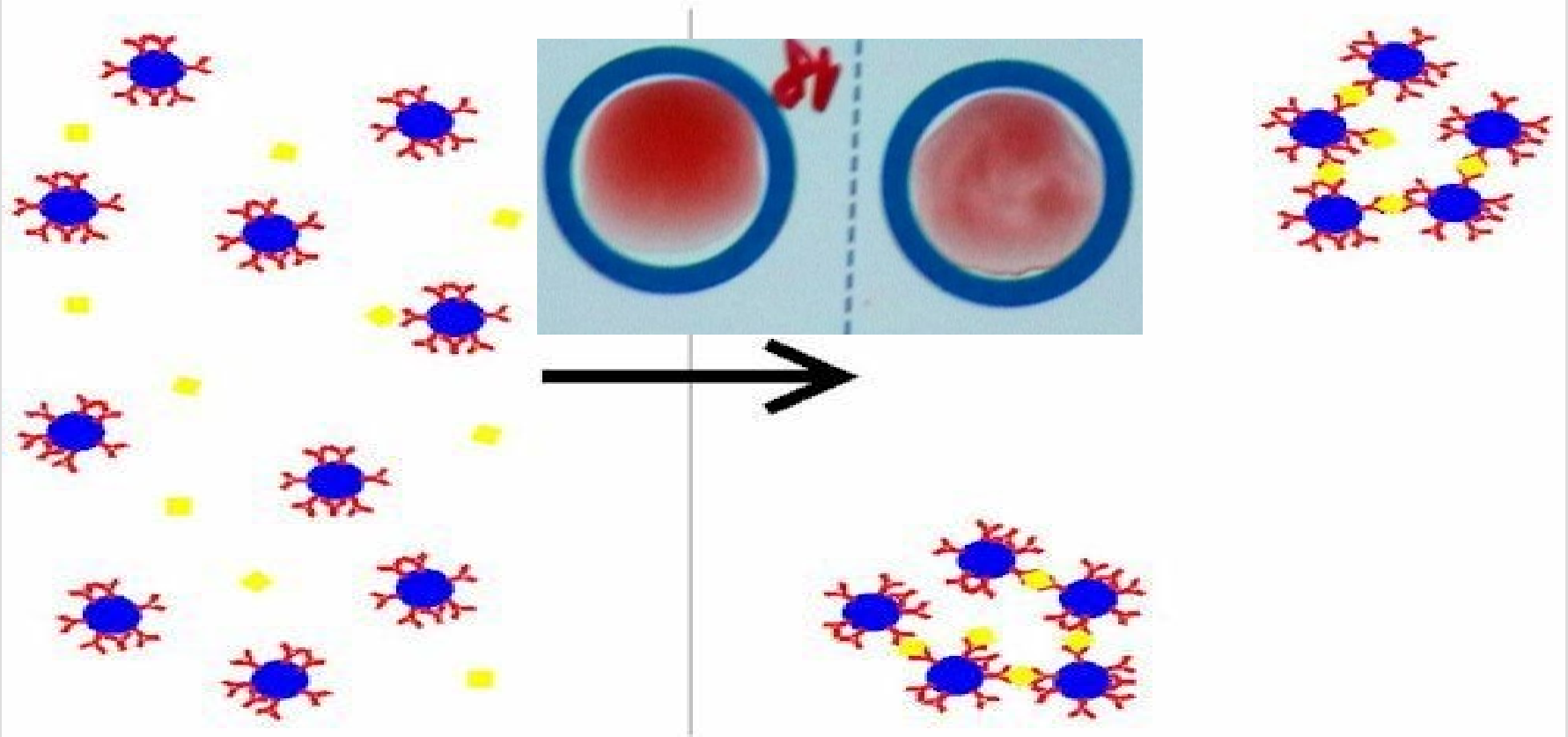


# 4. Používané metody

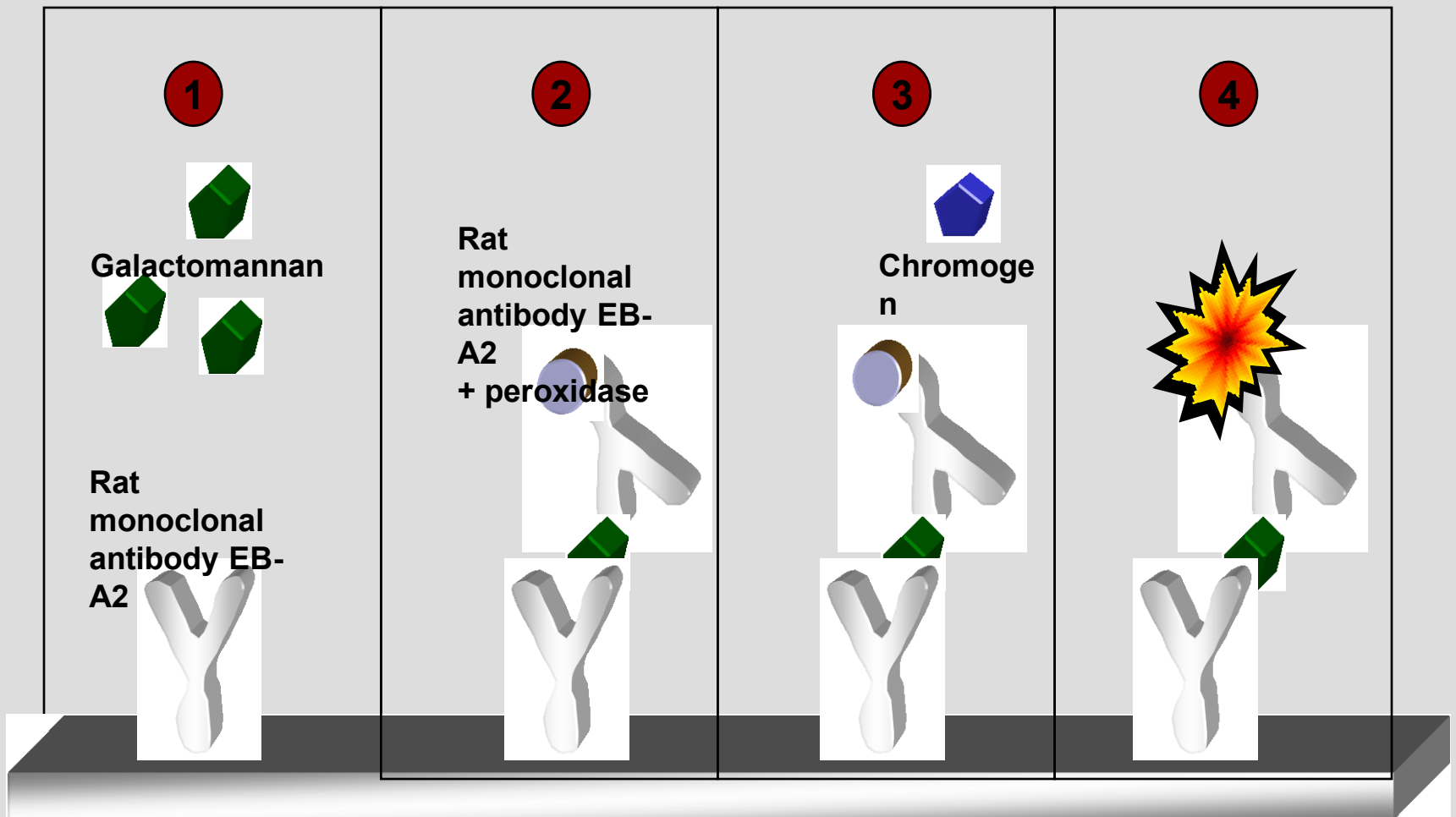
- **Latexová aglutinace**  
(kryptokokóza, histoplazmóza....)
- **ELISA** (enzyme linked immunosorbent assay)  
(kandidóza, aspergilóza.....)
- **G-test** (limulus test)  
(panfungální – vše kromě kryptokoků a zygomycet)
- **Komplement-fixační reakce, hemaglutinace, imunodifuze v gelu..**  
(protilátky mají význam u alergických stavů a endemických mykóz....)

# 4. Latexová aglutinace - princip

v přítomnosti antigenu  
vznik okem viditelného aglutinátu



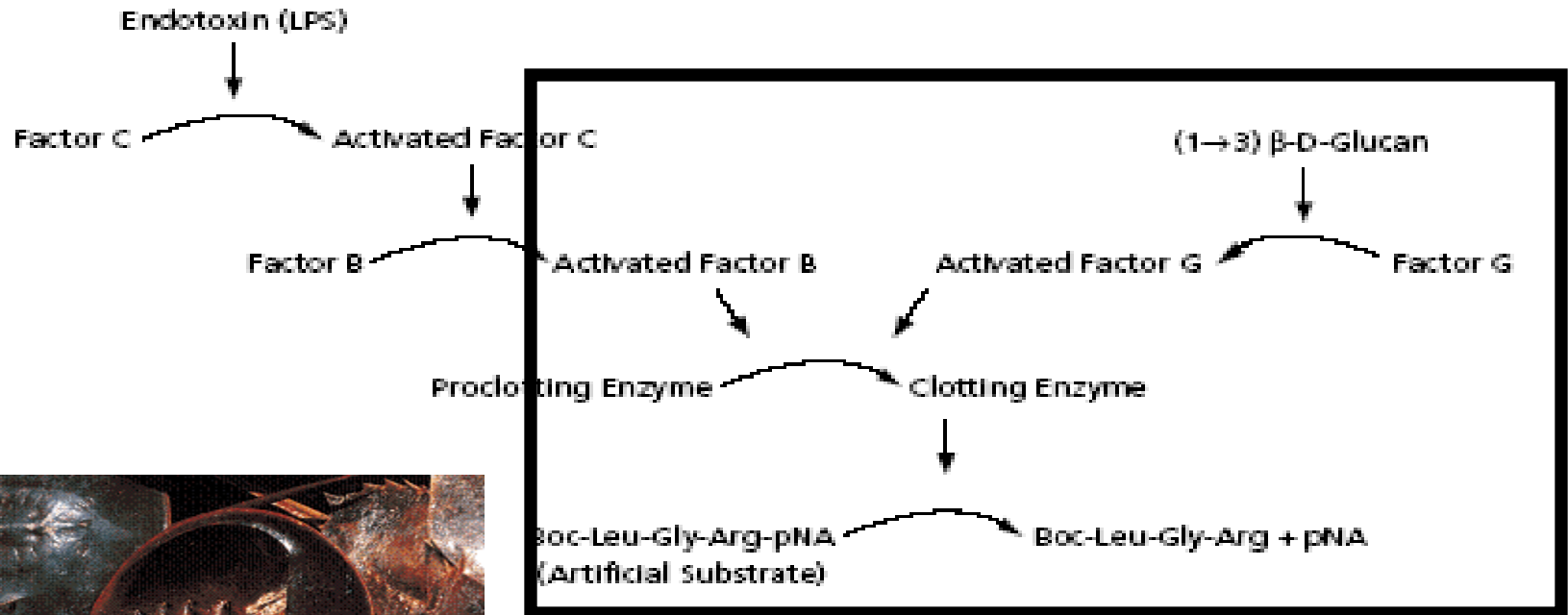
# 4. Sendvičová ELISA – princip





# 4. G-test - princip

Figure 1  
*Limulus Amebocyte Lysate Pathway*



*Limulus polyphemus* (S.Amerika)  
*Tachypleus tridentatus* (JV Asie)

# 4. Nekultivační (sérologické) metody shrnutí

## Výhody:

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

## Nevýhody:

- falešné positivity
- nejednoznačná interpretace (u protilátek)
- cena (G-test)

# 4. Molekulárně biologická diagnostika - výhody

- **velmi citlivá** – může detekovat jen několik kopií genu v reakci a dokonce méně než jeden genom.
- lze využít jak konzervované, tak variabilní úseky genomu a tak navrhnout assay panfungální nebo specifickou pro určité rody nebo druhy.
- kvantifikací lze odlišit kolonizaci od aktivní infekce.
- při použití multiplex PCR lze detekovat více druhů v jedné PCR reakci.
- výsledek je znám během **několika málo hodin**.

# 4. Molekulárně-biologická diagnostika - nevýhody

## Falešné negativy z důvodu:

- málo účinné metodě izolace DNA
- velkému nadbytku humánní DNA ve vzorku (kompetice)

## Falešné pozitivy z důvodu:

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

# 5. Nejčastější mykózy

Kandidózy

Aspergilózy

Zygomykózy

Fusariózy

Kryptokokózy

Pneumocystózy

Dermatomykózy

Vzácné houbové infekce



invazivní

neinvazivní

# 5. Epidemiologie invazivních mykotických infekcí

zastoupení houbových patogenů je různé u různých skupin pacientů.....

(např. u onkologicky nemocných se zvyšuje podíl infekcí způsobených vláknitými houbami)

Table 6. Distribution of invasive fungal pathogens based on the clinical service or underlying condition of the patient.<sup>a,b</sup>

| Pathogen group            | % Infections by clinical service (N) |                 |              |              |              |              |             |                 |                  |
|---------------------------|--------------------------------------|-----------------|--------------|--------------|--------------|--------------|-------------|-----------------|------------------|
|                           | GMED<br>(3,640)                      | HEME<br>(1,010) | SCT<br>(377) | HIV<br>(263) | NICU<br>(54) | SOT<br>(886) | ST<br>(863) | SURG<br>(1,906) | Total<br>(6,031) |
| <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 <sup>c</sup> | 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 <sup>d</sup>  | 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              |

<sup>a</sup>Data compiled from Horn et al. (2007); Horn et al. (2009); Neofytos et al. (2009 a,b).

<sup>b</sup>GMED, 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).

<sup>c</sup>Other yeasts include 6 cases of *Malassezia* spp., 26 *Pneumocystis*, 12 *Rhodotorula*, 21 *Saccharomyces*, and 6 *Trichosporon*.

<sup>d</sup>Other moulds include 2 cases of *Acremonium*, 9 *Alternaria*, 3 *Bipolaris*, 53 *Fusarium*, 10 *Paecilomyces*, 13 *Scedosporium apiospermum*, 6 *S. prolificans*, and 1 *Sporothrix*.

# 5. Epidemiologie neinvazivních mykotických infekcí

## 1. mykózy **kůže a nehtů nohou** (dermatomykózy)

- vůbec nejčastější mykotické onemocnění
- dokonce čtvrté nejčastější onemocnění obecně (po zubních kazech, vysokém tlaku a migréně)

## 2. **vulvovaginální kandidózy** (slizniční kvasinkové infekce)

- druhá nejčastější poševní infekce
- 75% žen prodělá za život alespoň jednu epizodu
- asi polovina z nich onemocní dvakrát
- predispoziční faktory (těhotenství, diabetes mellitus, léčba širokospektrými antibiotiky, chlorované bazény, těsné syntetické prádlo...)

# 5. Kandidóza

## Původci:

- ***C. albicans*** (% v závislosti na populaci pacientů)
- ostatní kandidy – ale i rod *Trichosporon*, *Blastoschizomyces*, *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

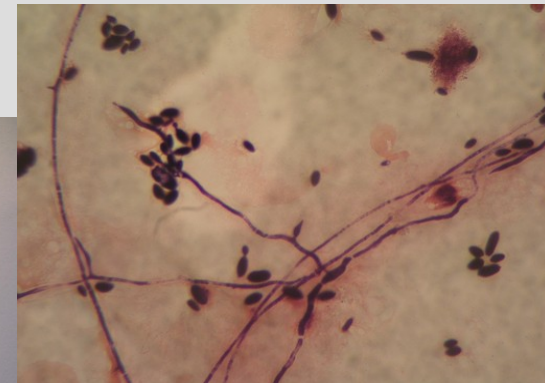
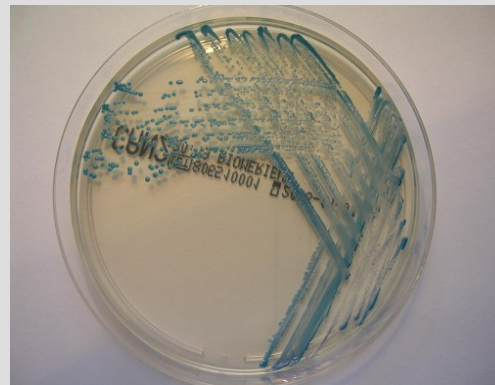
## Mikrobiologická diagnostika:

### kultivace a mikroskopie

- běžné bakteriologické metody

### nekultivační

- glukan
- PCR





# 5. Aspergilóza

## Původci:

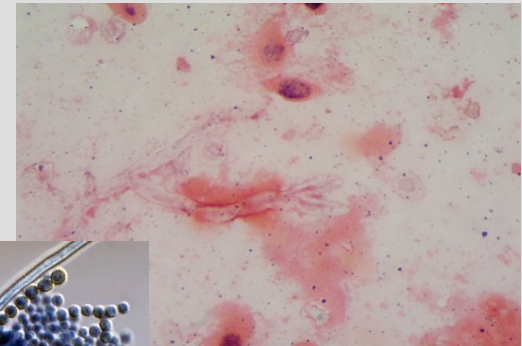
### ***Aspergillus fumigatus* (90%)**

*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!!)



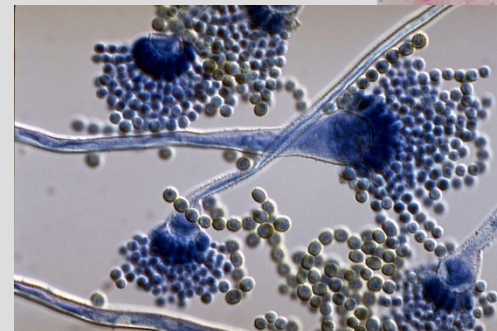
## Mikrobiologická diagnostika:

### **kultivace a mikroskopie**

- ne biochemie - ale mikromorfologie, MALDI

### **nekultivační**

- galaktomanan, glukan
- PCR



# 5. Zygomykóza

## 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

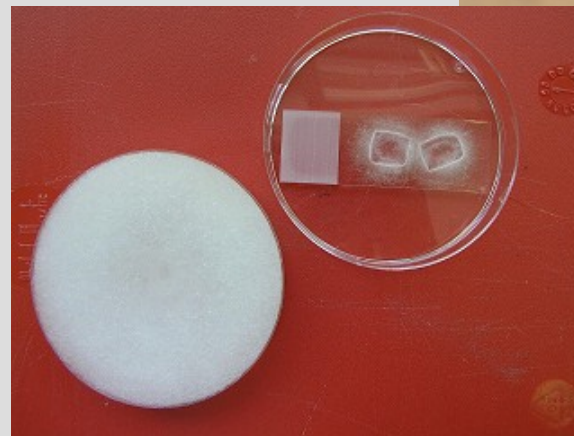
## Mikrobiologická diagnostika:

### kultivace a mikroskopie

- ne biochemie - ale mikromorfologie, MALDI

### nekultivační

- bez serologických metod!!
- PCR



# 5. Fusarióza

## Původci:

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

## Infekce:

### exogenní

kožní, keratitidy (čočky), pneumonie, sinusitidy - u imunokompromitovaných až v 70% diseminace!!

## Mikrobiologická diagnostika:

### kultivace a mikroskopie

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

### nekultivační

- glukan
- PCR?!



# 5. Kryptokokóza (invazivní)

**Původce:**

***C. neoformans, C. gatii***

**Infekce:**

**exogenní** (rezervoár- holubí trus)

primárně plicní, při diseminaci má afinitu k CNS (meningitidy), často první příznak rozvíjejícího se AIDS

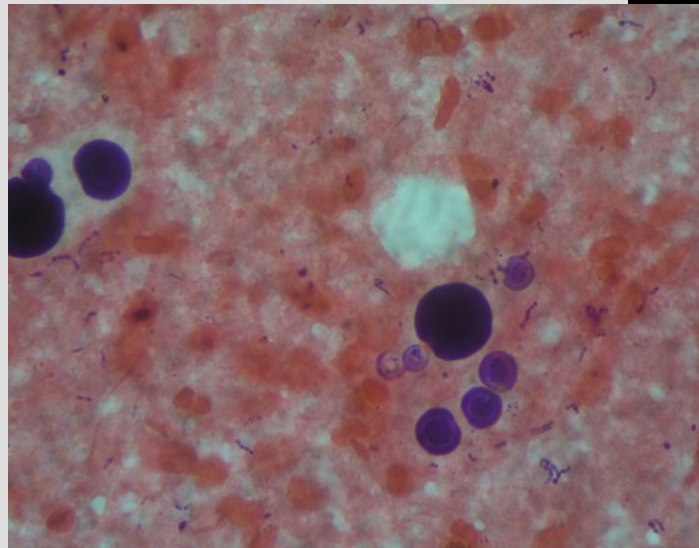
**Mikrobiologická diagnostika:**

**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:

**exogenní** (ubikvitní), plicní, často první příznak rozvíjejícího se AIDS, komplikace u neutropenických pacientů

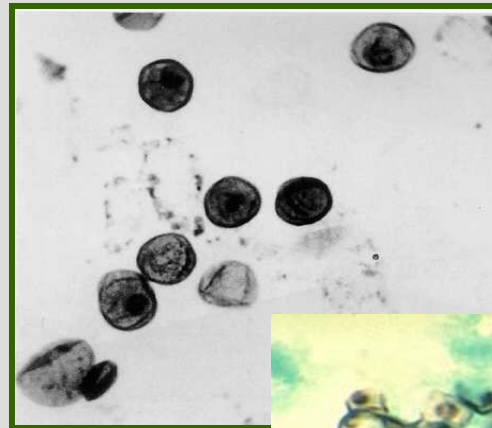
## Mikrobiologická diagnostika:

### kultivace a mikroskopie:

- speciální mikroskopická barvení
- imunofluorescence
- běžně se nekultivuje

### nekultivační:

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



# 6. Povrchové mykózy

## Dle kliniky

- **Dermatofytózy** (tinea – dle lokalizace capitis, corporis, manus, pedis, unguium - onychomykóza...)
- **Kandidózy**
- **Keratomykózy** (Pityriasis versicolor)

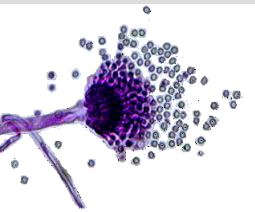
## Dle původce

- **Tinea** (*Trichophyton* spp., *Epidermophyton floccosum*, *Microsporum* spp., *Scopulariopsis* spp.)
- **Kandidóza** (*C. albicans*, *C. parapsilosis*, *T. asahii*, *C. albidus*..)
- **Keratomykóza** (*Malassezia furfur*..)

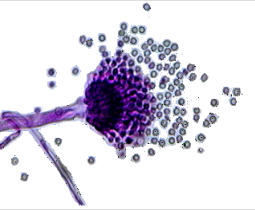
## Mikrobiologická diagnostika

- **Kultivace** (dle původce – obvykle Sabouraudův agar, 25-30°C, až 1-5 týdnů)
- **Mikroskopie** (preparát s Mycolnk a KOH)

# Závěry – co byste měli vědět ☺☺



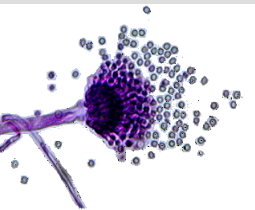
**rozdíl bakterie x houby, jak se dělí**



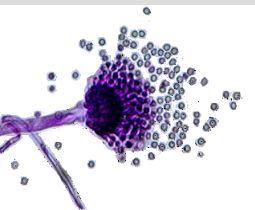
**mikrobiologická diagnostika (mikroskopie, kultivace, sérologie, PCR)**



**mykózy (invazivní x neinvazivní)**



**nejpočetnější (kandidózy, aspergilózy, dermatomykózy)**



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

# Kazuistika k zamyšlení

**Muž, r.1960**

**30.1.2013**

hospitalizován s pneumonií

**31.1.2013**

dg. influenza A nasazen oseltamivir + empiricky piperacilin/tazobaktam pro susp. bakteriální superinfekci

**5.2. 2013**

tekutina z BAL na GM – negativní (odběr pro ne zcela dobrou odpověď na terapii)

**13.2.2013**

přidán anidulafungin (vysazen 21.2.2013)

**26.2.2013**

po předchozím pozvolném zlepšování stavu opět zhoršení s kultivačním nálezem v moči (*E.coli* - cefotaxim)

**28.2.2013**

**pozitivní hemokultura, mikroskopicky kvasinky**

**4.3.2013**

hlášen výsledek *C. neoformans* (API32C, sekvenačně potvrzeno) – změna na amfotericin + flukonazol

**4.3. 2013**

LFA sérum **pozitivní**, **5.3.** LFA moč **pozitivní**

**6.3. 2013**

LFA likvor **pozitivní**, později i kultivačně pozitivní

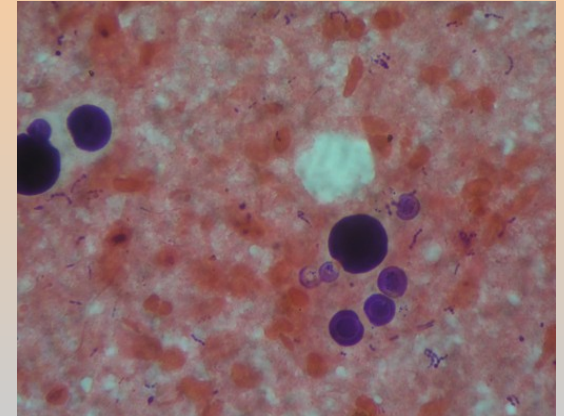
**HIV negativní, bez kortikoidů, bez defektů v buněčné imunitě, v předchorobí bez zvláštností.**

**Navzdory terapii pacient 3.4.2013 umírá**



# Otázky

- ✓ smíšená pneumonie od začátku hospitalizace???
- ✓ původně jenom kolonizace kryptokokem a až následně rozvoj kryptokokózy na terénu poškozeném chřipkou???
- ✓ nozokomiální nákaza???



## Poučení pro nás:

u pacientů dlouhodobě se nelepšících na odpovídající terapii je vhodné brát v úvahu i houbovou etiologii infekce (a to včetně kryptokoka)

bez ohledu na imunitní stav pacienta....