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.

/za rok

zdroj: WHO

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

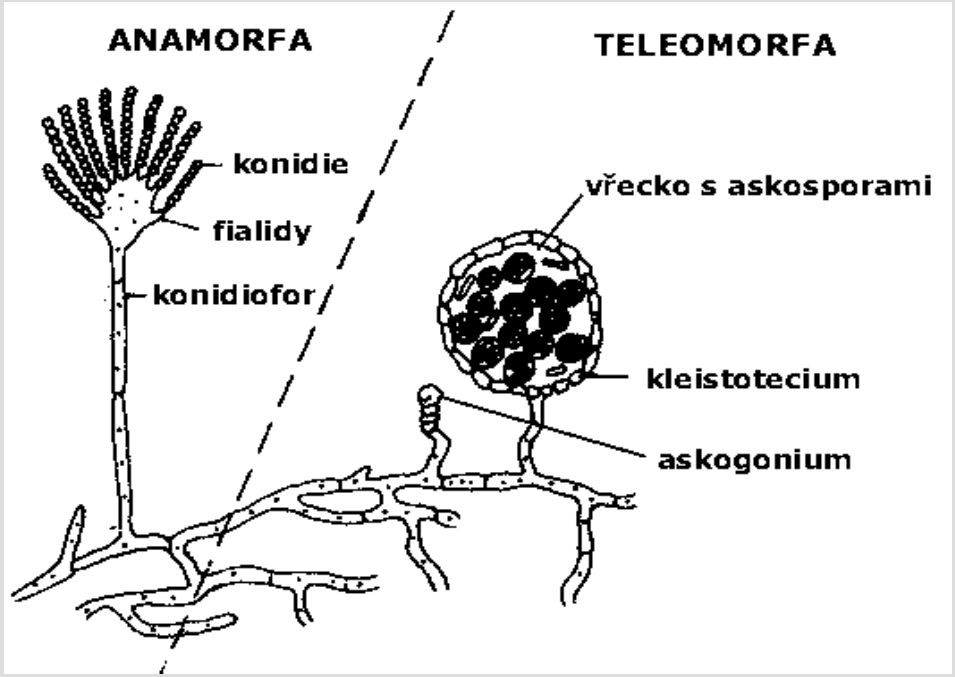
Mycelium: jen vegetativní část, žádný reprodukční orgán, zajišťuje výměnu látek a energie mezi houbou a prostředím

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

1. Rozmnožování hub

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

mitóza (konidie)



meióza (spory)

Penicillium repens (anamorfa) a Eurotium repens (telemorfa) - zdroj:www.myko.cz

1. Názvosloví hub

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

teleomorfa	anamorfa
Eurotium, Emericella, Petromyces, Neosartoria	*Aspergillus*
Eupenicillium, Talaromyces	*Penicillium*
Pseudoallescheria boydii	*Scedosporium apiospermum*
Issatchenkia orientalis	*Candida krusei*

1. Názvosloví hub

…ale – „one fungus – one name“

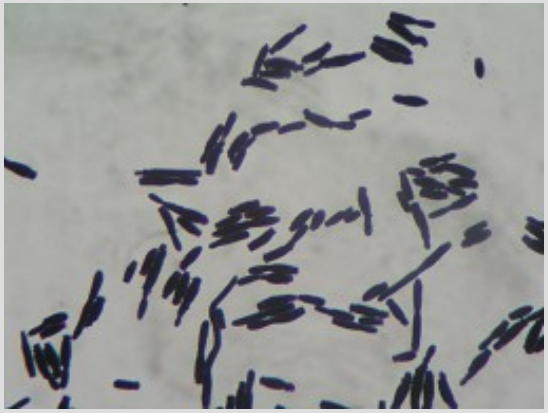
International Code of Nomenclature for algae, fungi, and plants (Melbourne Code) adopted by the Eighteenth International Botanical Congress Melbourne, Australia, July 2011.

teleomorfa	**anamorfa**
Eurotium, Emericella, Petromyces, Neosartoria	*Aspergillus*
Eupenicillium, Talaromyces	*Penicillium*

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 prvoků 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

sepse (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…)

- **antimetabolity**

(flucytosin)

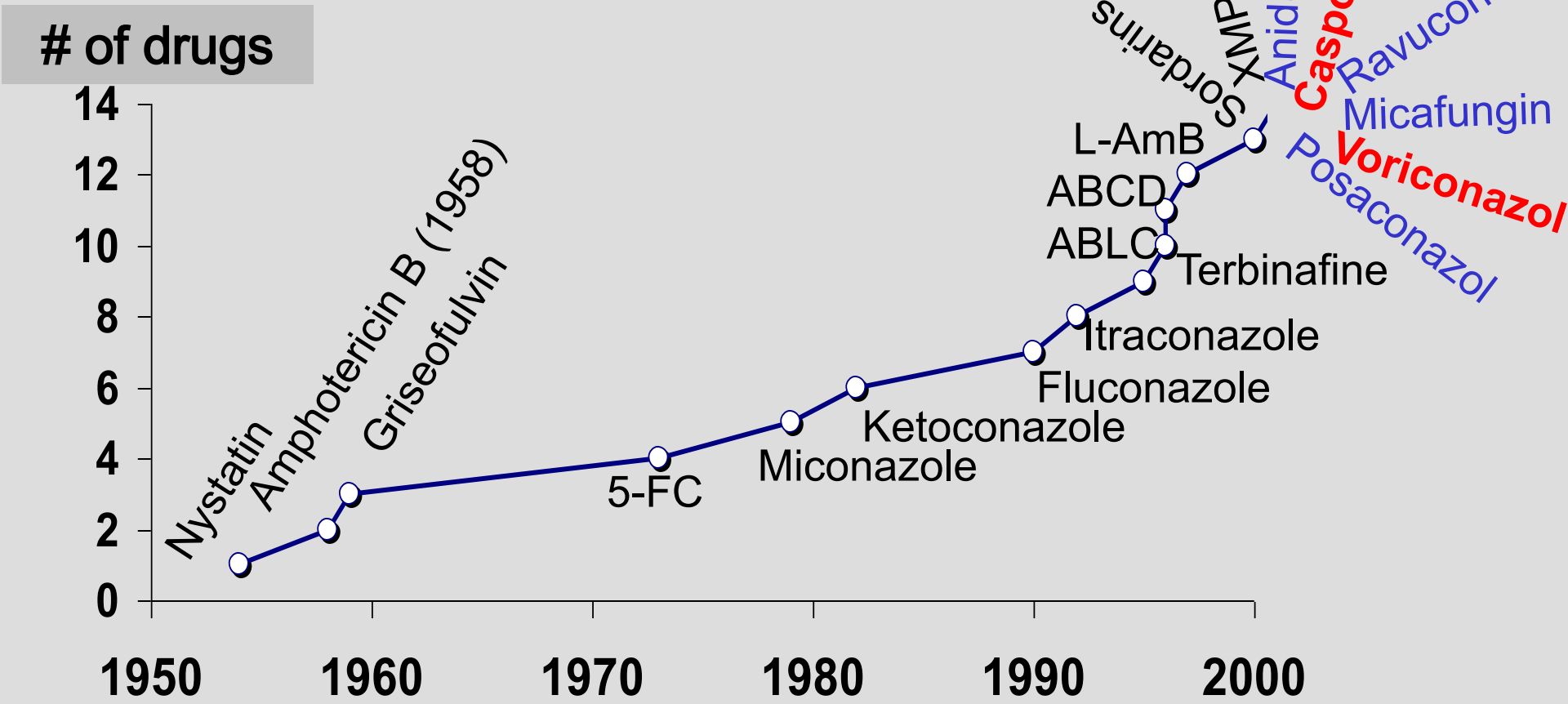
- **alylaminy**

(terbinafin)

- **ostatní**

(k.undecylová, ciclopiroxolamin)

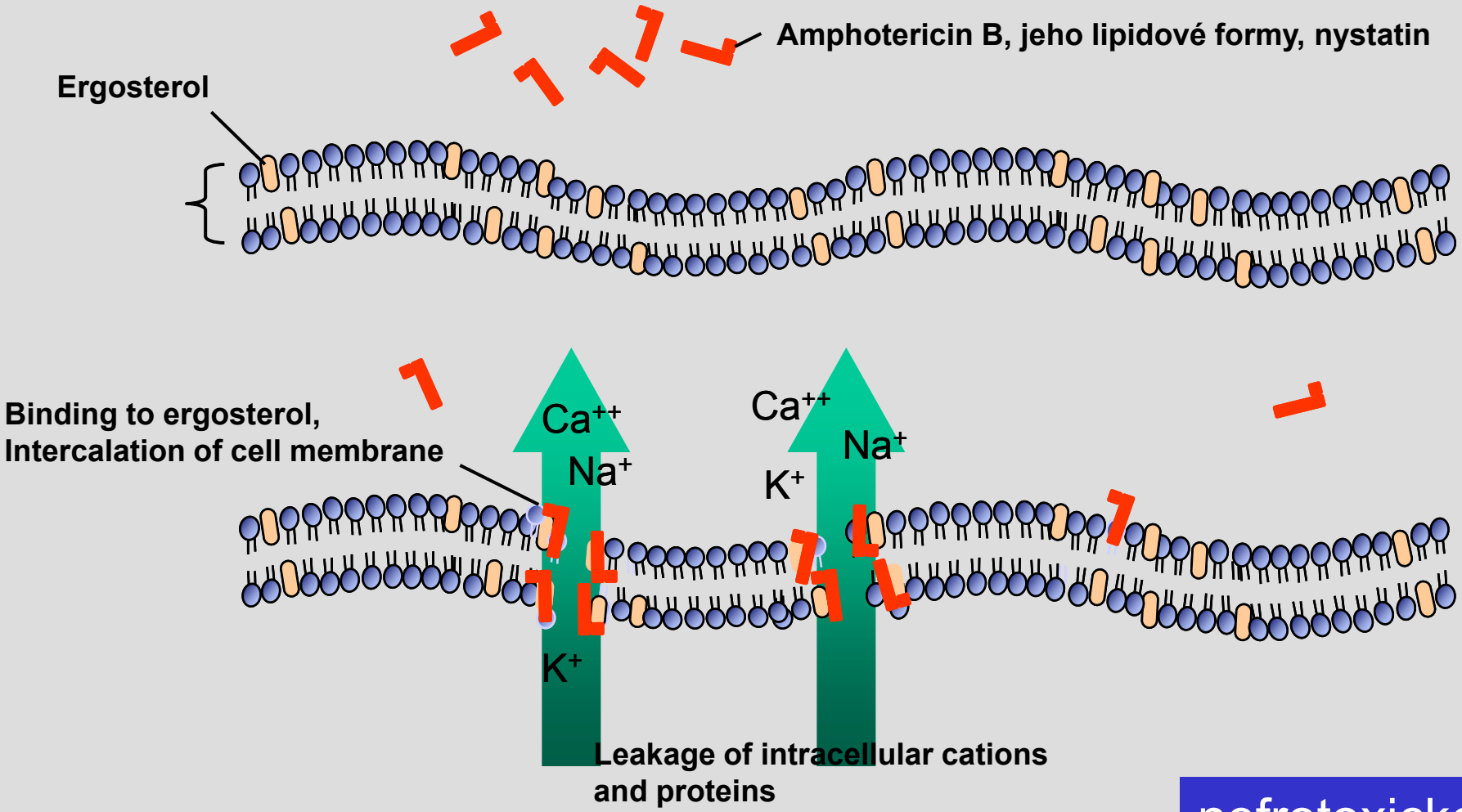
Medical Mycology: The Last 50 Years



Denning, 2002

3. Alyeny

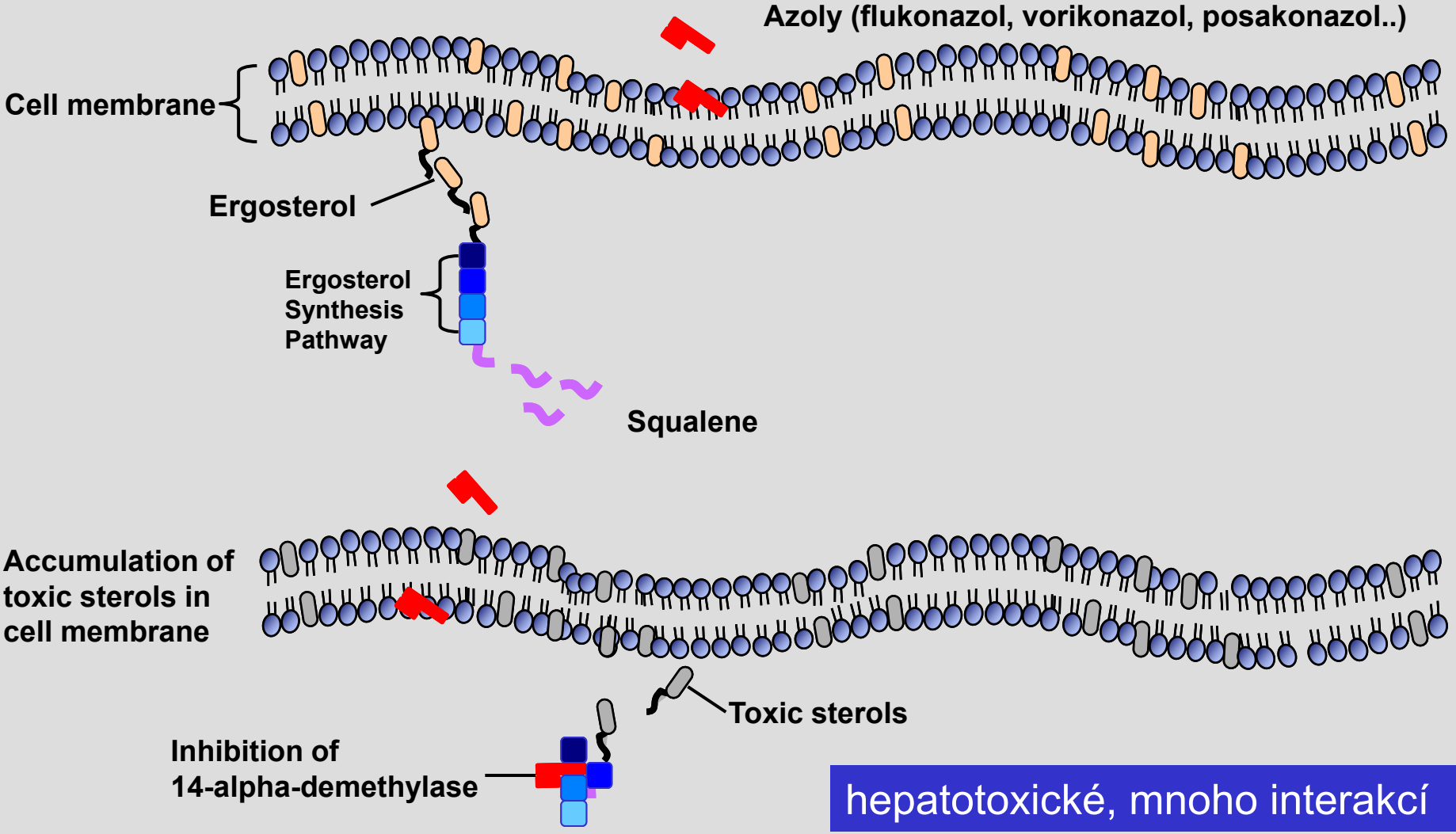
Princip – změna permeability buněčné membrány



nefrotoxické

3. Azoly

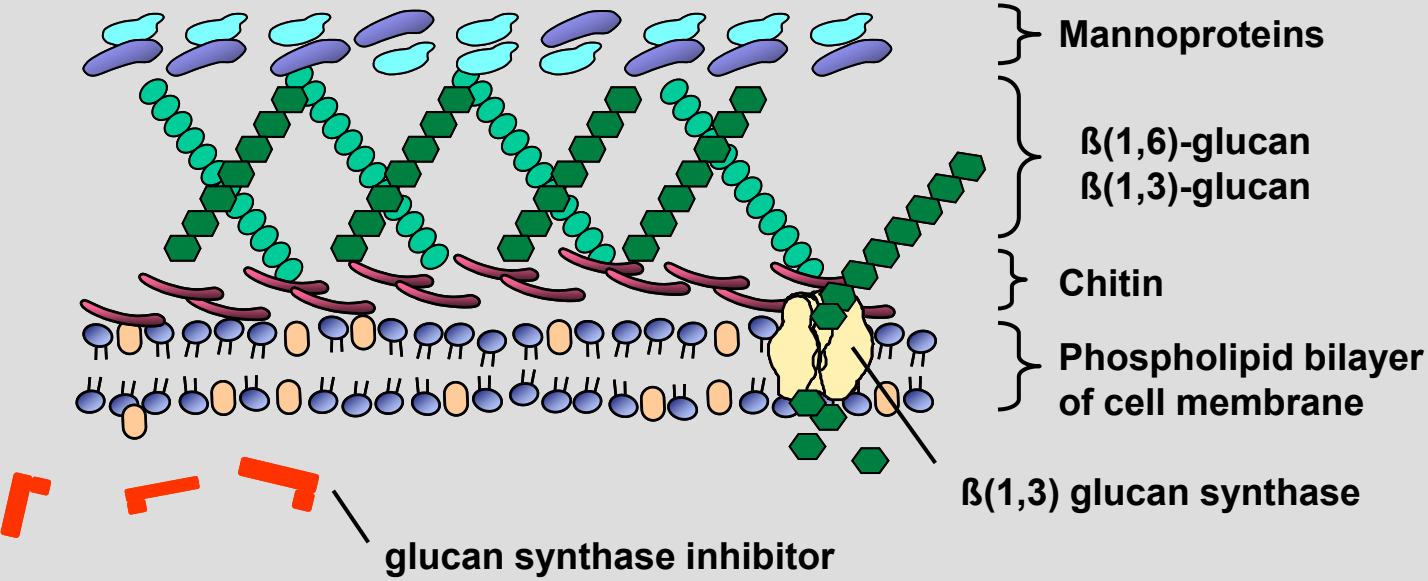
Princip – inhibice syntézy ergosterolu (cytochrom P450)

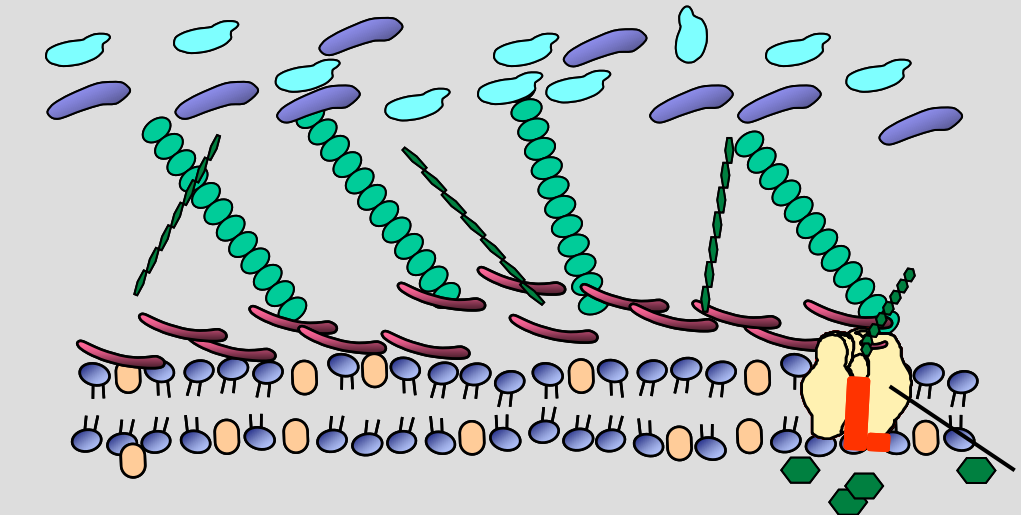


hepatotoxické, mnoho interakcí

3. Echinokandiny

Princip – inhibice syntézy glukanu





takřka bez nežádoucích účinků, drahé

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

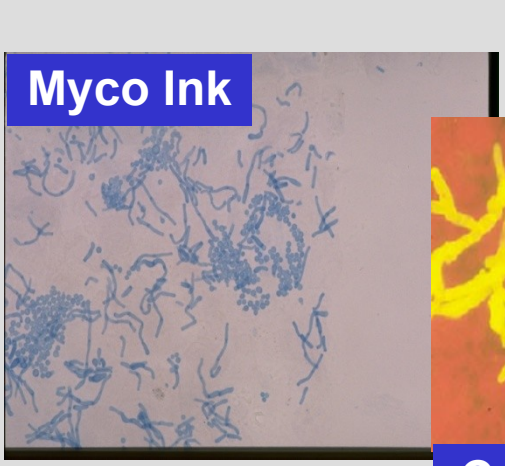
4. Mikroskopie

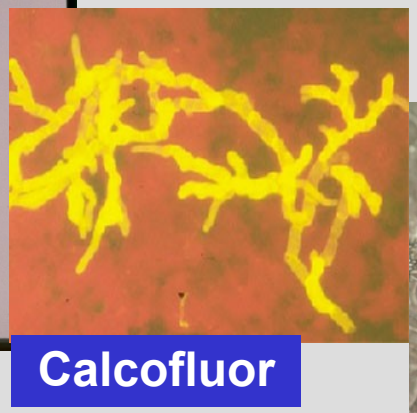
a) nativní preparát

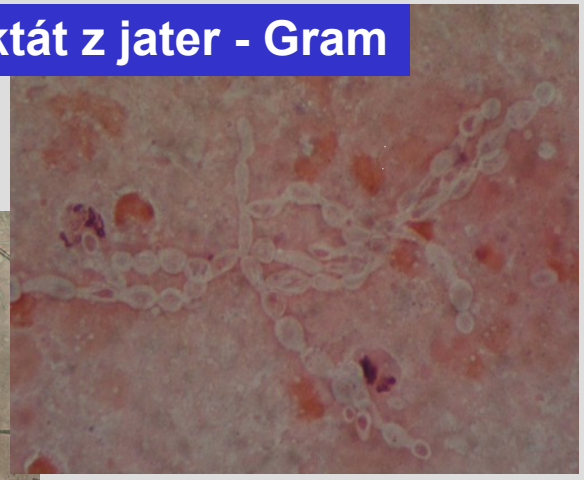
- kultury
- nespecifická barvení (Lugol),
- specifická barvení (MycoInk, Rylux – vážou se na chitin)

b) fixovaný preparát

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







4. Mikroskopie - shrnutí

Výhody:

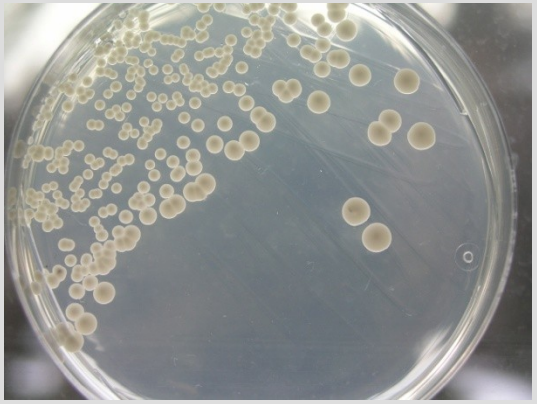
- rychlost (minuty)
- relativně nízká cena vyšetření
- specificita

  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+/-1ºC

30+/-1ºC

25+/-1ºC

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)

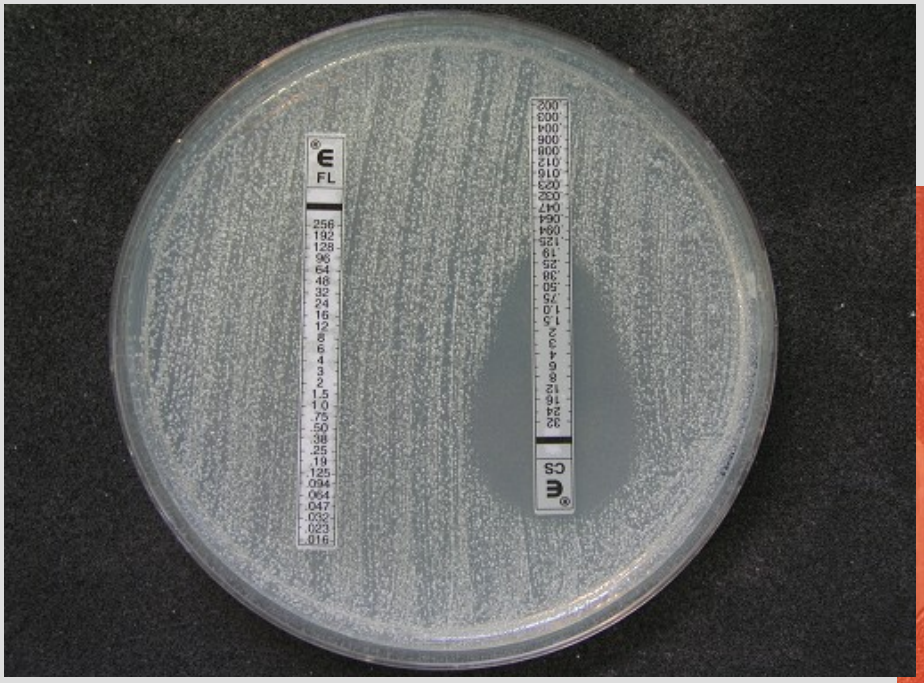
….otestovat jeho citlivost k antimykotikům

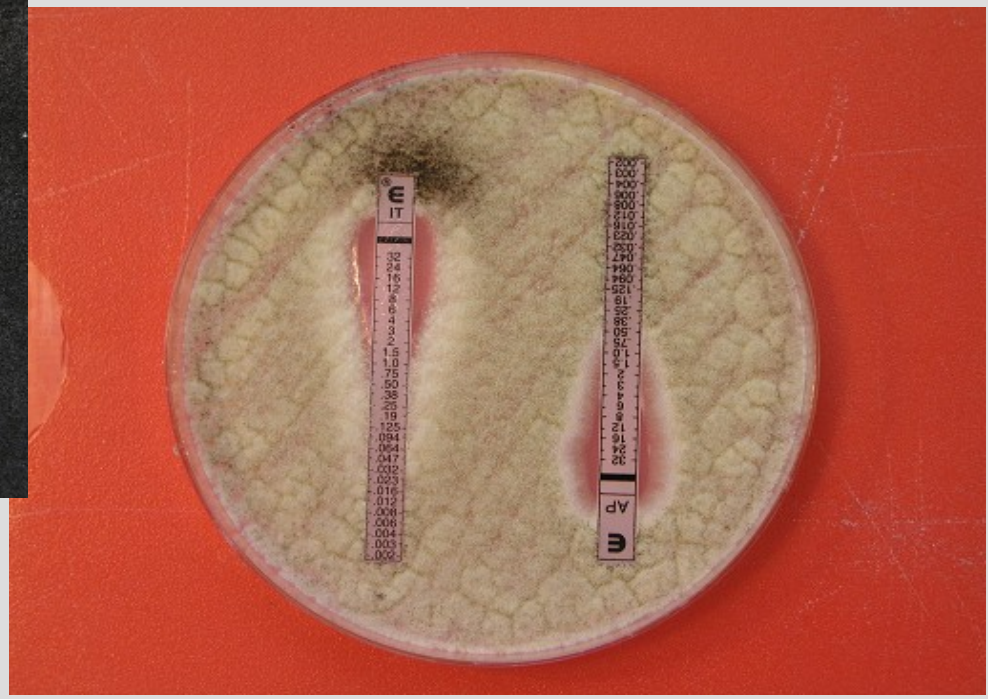
(stále není zcela prokázaný vztah mezi výsledky in vitro a in vivo – vliv pomalého růstu hub, stavba jejich buňky etc.)

- standardní metodiky – CLSI, EUCAST (pracné, drahé a rutinně nepoužívané)
- v rutinní praxi pomocné metodiky s různou shodou se standardními (ETEST, Sensititre, NeoSensitabs…)
- nicméně problematická interpretace (chybí breakpointy; jen epidemiologické cutoff)

ETEST :

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





4. Kultivace – shrnutí

Výhody:

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

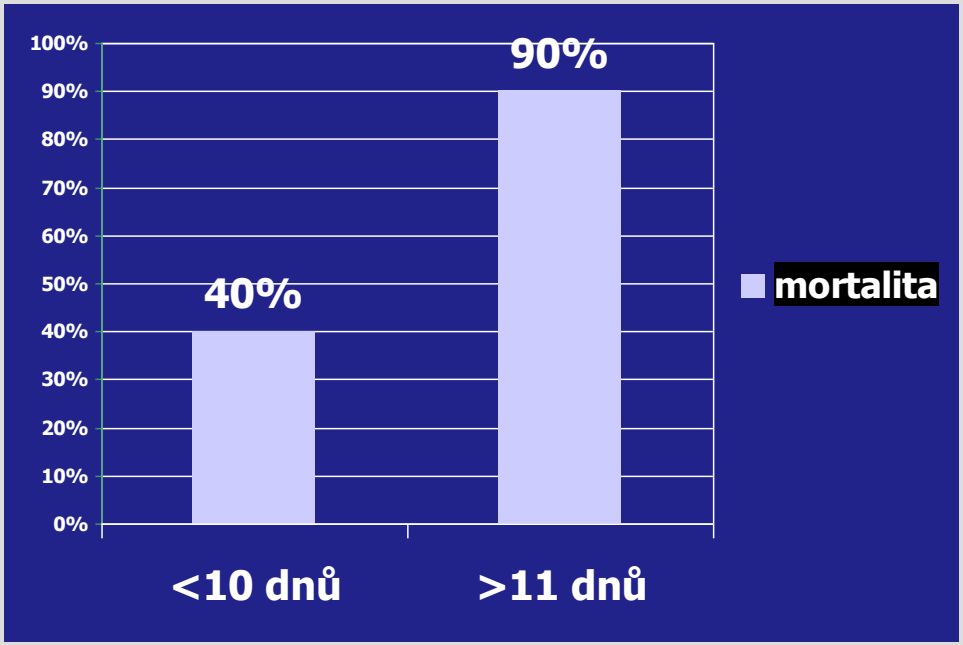
Nevýhody:

- málo senzitivní (ale víc než mikroskopie)
- časově náročnější (dny až týdny)
- obtížná interpretace, zejména u primárně nesterilních materiálů

  (musíte se rozhodnout mezi kolonizaci, kontaminací nebo infekci)

…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

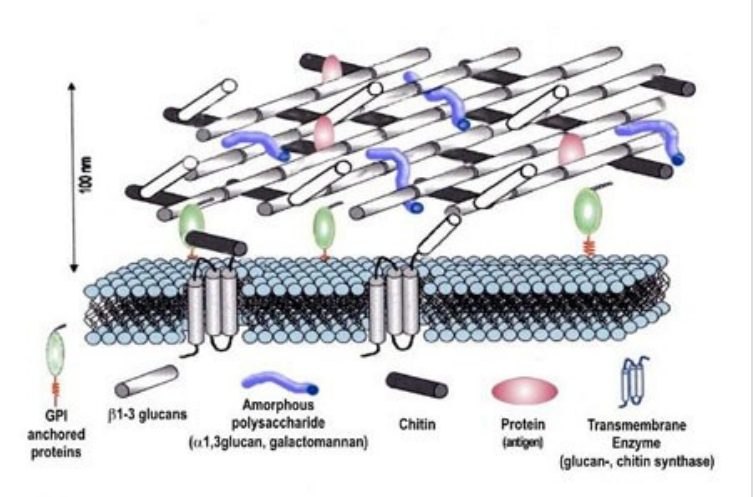


Von Eiff, Respiration, 1995

4. Imunologické metody

a) antigeny buněčné stěny hub

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



b) protilátky

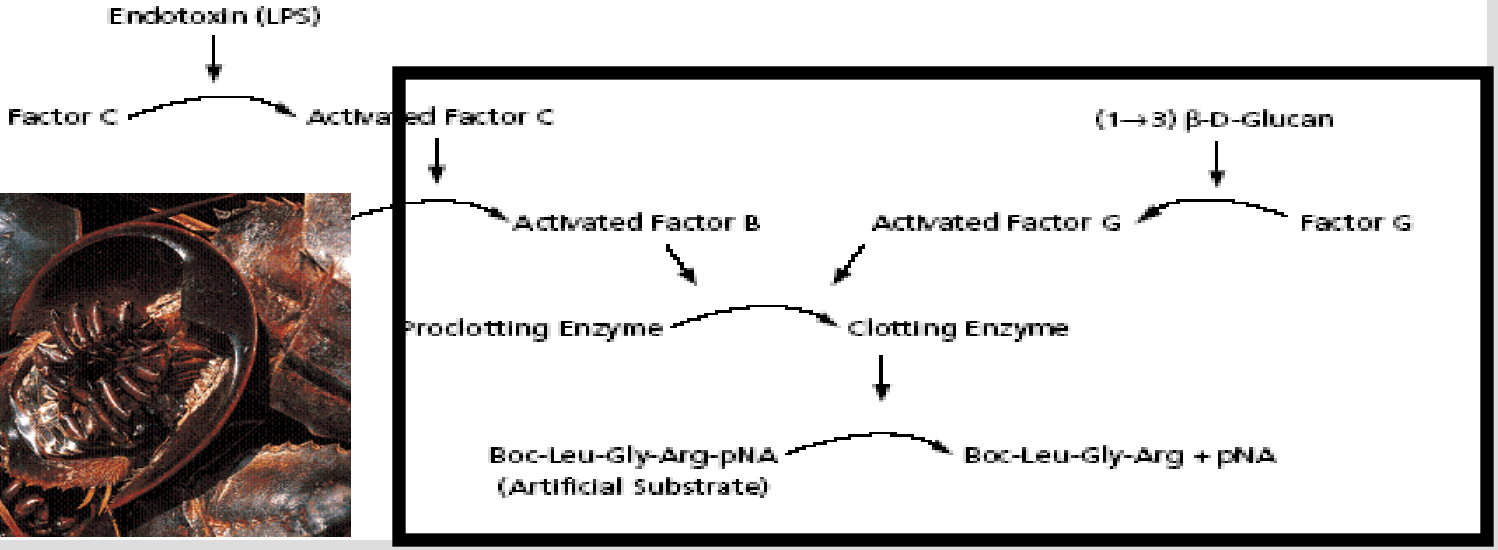
- endemické mykózy (histoplazmóza, kokcidioidomykóza..)
- alergické stavy
- invazivní mykózy?

(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
- G-test (limulus test)
- LFA, LFD (imunochromatografie)
- 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 pozitivity
- 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 specificita

  (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 plíce, 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, Donnelly, CID 2019

Epidemiologie – ČR
(lokální i invazivní infekce)

Table 3 Summary of fungal burden in the Czech Republic.

Infection	Number of infections per underlying disorder per year					Total burden	Rate /100 000
	None	HIV/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]	–	–		
SAFS	–	–	6581[3]				
Hypersensitivity pneumonitis			1050				
Chronic pulmonary aspergillosis	–	–	365[4]	–	–		
Invasive aspergillosis	–	–	–	91	208		
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]	

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.

[1]Rate per 100 000 adult women.

[2]Best estimate, range 1316–14 712.

[3]Best estimate, range 5641–16 814.

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

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

1. kandidové infekce

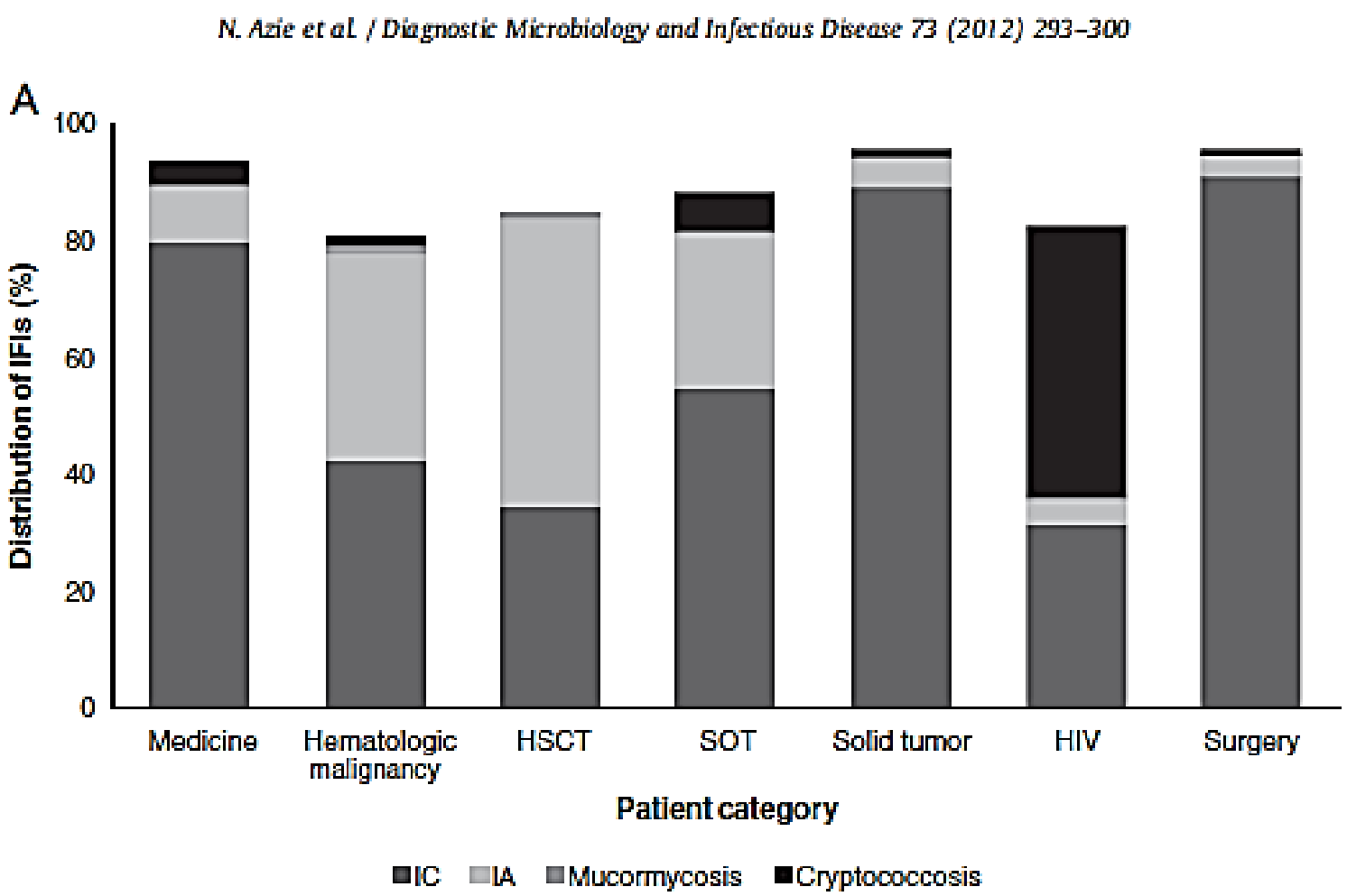
2. aspergilové infekce

1,67% houbových infekcí/rok

(UZIS; publikované práce)

Chrdle 2015

Epidemiologie - invazivní mykózy



7 526 IFD; S. Amerika; 2004-2008

Azie 2012 – PATH - Prospektive antifungal therapy)

5. Kandidóza

Původci:

C. albicans (% v závislosti na populaci)

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

Infekce:

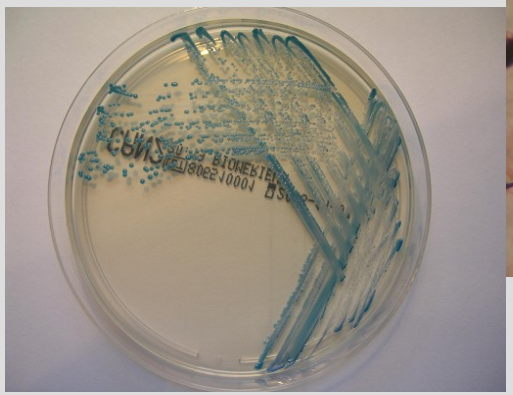
- invazivní – sepse nebo diseminovaná infekce
- neinvazivní - onychomykóza, kožní kandidóza, vaginální kandidóza…

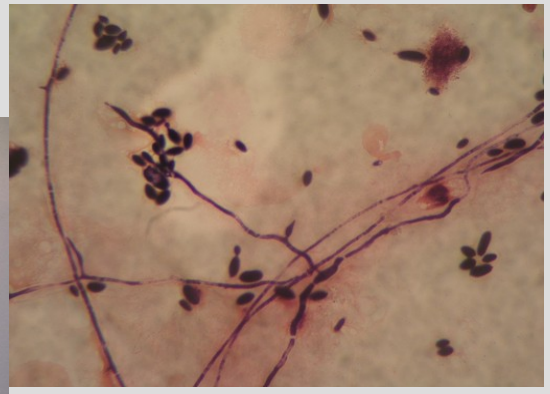
V malém množství patří kvasinky do běžné flóry kůže či GIT, z čehož plyne, že kandidózy jsou obvykle endogenního původu

Mikrobiologická diagnostika:

a) kultivace a mikroskopie

b) nekultivační
- glukan (BG)
- PCR





5. Invazivní kandidóza

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

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

5. Aspergilóza

Původci:

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

Aspergillus niger, Aspergillus flavus, Aspergillus tereus…

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!!)

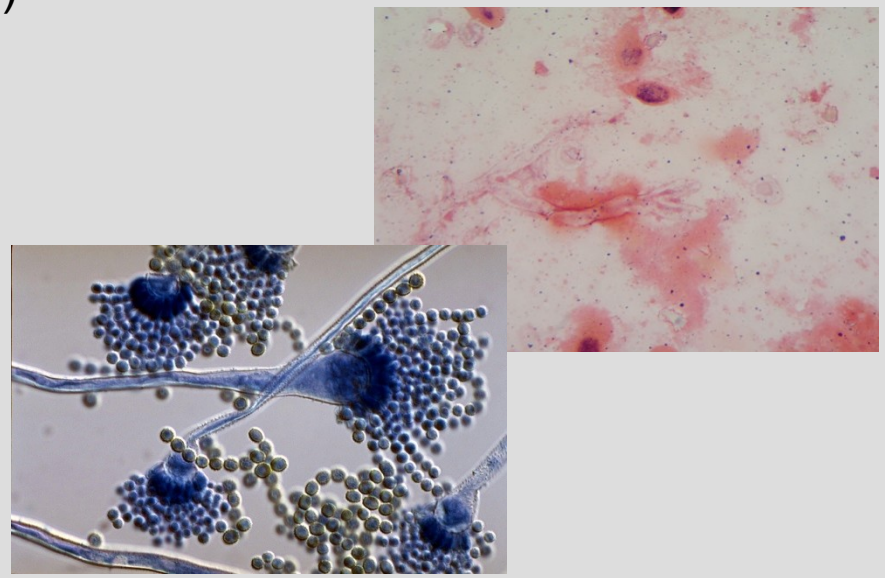
Mikrobiologická diagnostika:

a) kultivace a mikroskopie

- ne biochemie - ale mikromorfologie, MALDI, sekvenace

b) nekultivační

- galaktomanan, glukan
- PCR



5. Invazivní aspergilóza

nejčastější mezi invazivními infekcemi způsobenými vláknitou houbou, zřídka disseminovaná

nejvyšší incidence u pacientů:

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

	% Infections by clinical service (N)								
Pathogen group	GMED (3,640)	HEME (1,010)	SCT (377)	HIV (263)	NICU (54)	SOT (886)	ST (863)	SURG (1,906)	Total (6,031)
Candida spp.	81.7	42.6	31.6	32.7	96.3	57.2	89.2	91.2	75.0
Cryptococcus 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
Aspergillus 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

[a]Data compiled from Horn et al. (2007); Horn et al. (2009); Neofytos et al. (2009 a,b).

[b]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).

[c]Other yeasts include 6 cases of *Malassezia* spp., 26 *Pneumocystis*, 12 *Rhodotorula*, 21 *Saccharomyces*, and 6 *Trichosporon*.

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

Pfaller 2010

5. Zygomykóza

Původci:

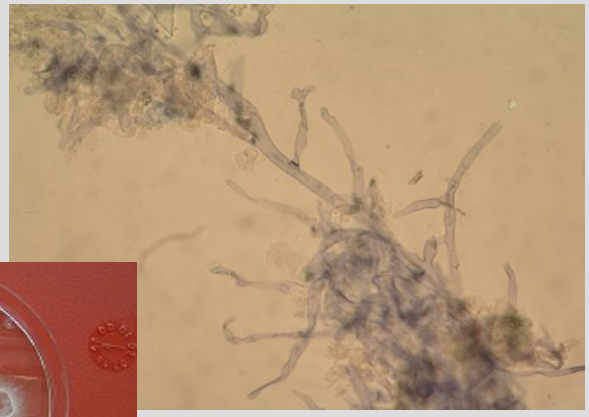
***Rhizopus* spp. (až 50%)**

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



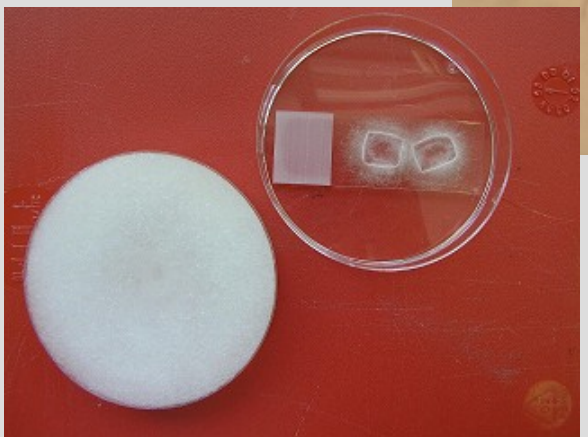
Mikrobiologická diagnostika:

a) kultivace a mikroskopie

- ne biochemie - ale mikromorfologie, MALDI, sekvenace

b) nekultivační

- bez serologických metod!!
- PCR



5. Fusarióza

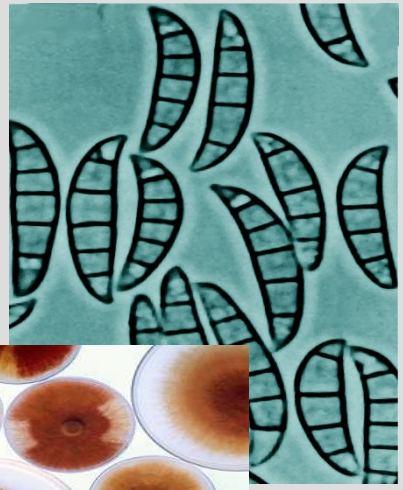
Původci:

***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:

a) kultivace a mikroskopie
- ne biochemie – ale mikromorfologie, MALDI, sekvenace
- u diseminovaných pozitivní hemokultura!!

b) nekultivační
- glukan (BG)
- PCR

5. Kryptokokóza

Původce:

C. neoformans, C. gatii

Infekce:

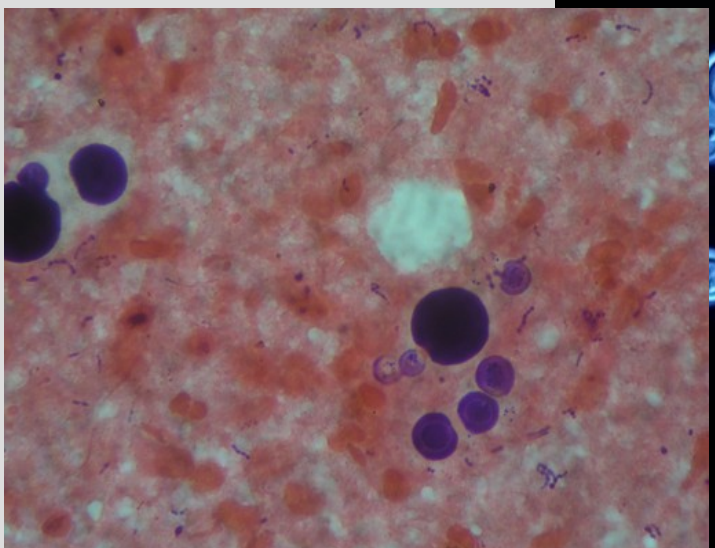
- invazivní - primárně plicní, při diseminaci má afinitu k CNS (meningitidy), často první příznak rozvíjejícího se AIDS (Afrika!)
- neinvazivní - kožní

exogenní (rezervoár- holubí trus), raritní

Mikrobiologická diagnostika:

a) kultivace a mikroskopie

- v mikroskopickém preparátu typické polysacharidové pouzdro



b) nekultivační

- glukuronoxylomanan
- PCR

5. Pneumocystová pneumonie

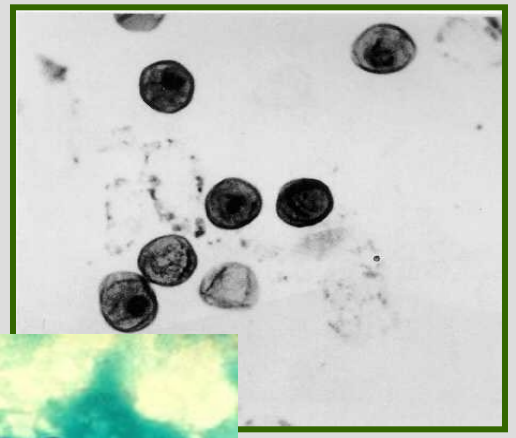
Původce:

P. jiroveci (na počest českého parazitologa prof.Jírovce) – původně prvok, 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



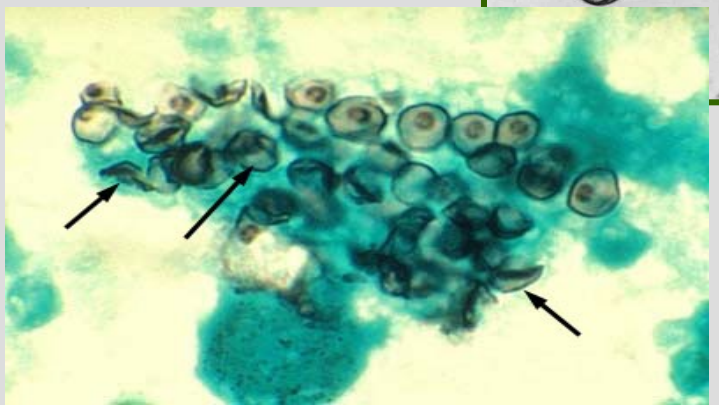
Mikrobiologická diagnostika:

a) kultivace a mikroskopie:

- jen mikroskopie

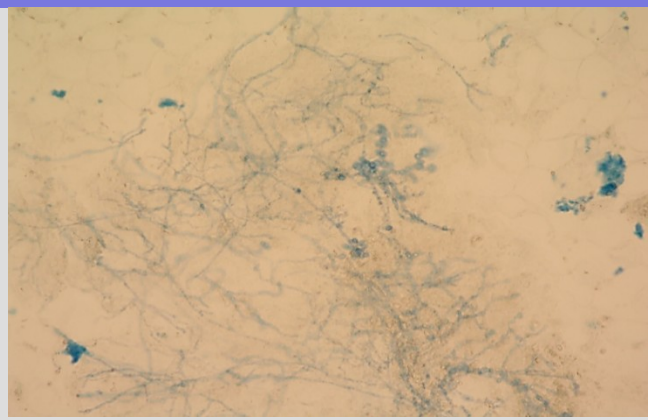
b) nekultivační

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



© E.Keiser

5. Dermatomykózy a ostatní



Původce:

Trichophyton spp., Microsporum spp., Epidermophyton floccosum)

Infekce:

tinea – dle lokalizace capitis, corporis, manus, pedis, unguium - onychomykózy)

(pozn. dermatofyta mohou vzácně způsobit i hlubokou mykózu u imunokompromitovaných pacientů (mechanické zanesení houby do podkoží), případně diseminovanou mykózu (od 1884 cca 70 popsaných případů))

keratomykózy *(Malassezia furfur…)*

Mikrobiologická diagnostika:

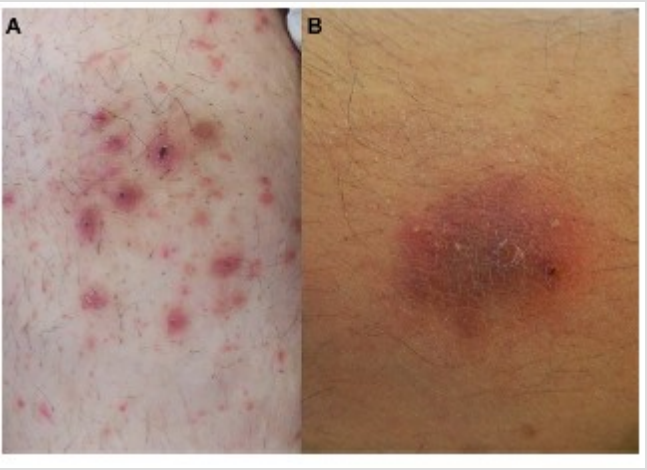
a) kultivace a mikroskopie:

- mikroskopie (speciální barvení)
- kultivace až 6 týdnů

b) nekultivační

- neprovádí se (případně u diss.infekcí glukan)

Klinický obraz



Boral 2018 (MG)

Inaoki 2015

Lanternier 2013

Kershenovich 2017