Lékařská mykologie - cvičení

1. Izolace mikroskopických hub ze stěru

Materiál: stěr z dutiny ústní

Pomůcky: sterilní vatový tampon, tekuté médium (GPYA - Glucose Peptone Yeast Extract Agar), pevné médium (MA2% – Malt Extrakt Agar nebo Sabouraudův glukozový agar s chloramfenikolem), očkovací klička, podložní skla, kahan, barvící roztoky, termostat na 30 °C

Pracovní postup:

1. Sterilním vatovým tamponem přetřeme odběrové místo.
2. Vatový tampón zanoříme do tekutého média a vymyjeme.
3. Kultivujeme ve tmě, při teplotě 30 °C po dobu 24 - 48 hodin.
4. V případě zákalu zhotovíme preparát barvený podle Grama (úloha č.4).
5. Křížový roztěr pomocí inokulační kličky na pevné médium (MA2% – Malt Extrakt Agar nebo Sabouraudův glukozový agar s chloramfenikolem).

2. Příprava čisté kultury

Materiál: Petriho misky s kulturami po izolaci

Pomůcky: preparační jehla (vláknité houby), inokulační klička (kvasinky), Petriho miska s MA2%, termostat na 30 °C

Pracovní postup:

1. Povrch příslušných médií inokulujeme konidiemi vláknité houby formou vpichu ve středu Petriho misky nebo přeneseme část mycelia. Aby se spory při očkování nerozptýlily po celé půdě, očkujeme misky zespodu, otočené dnem vzhůru.
2. V případě kvasinek provedeme křížový roztěr jedné kolonie pomocí inokulační kličky.
3. Kultivujeme ve tmě, při teplotě 30 °C po dobu 24 - 48 hodin. Vláknité houby při teplotě 25 °C 5-7 dnů.

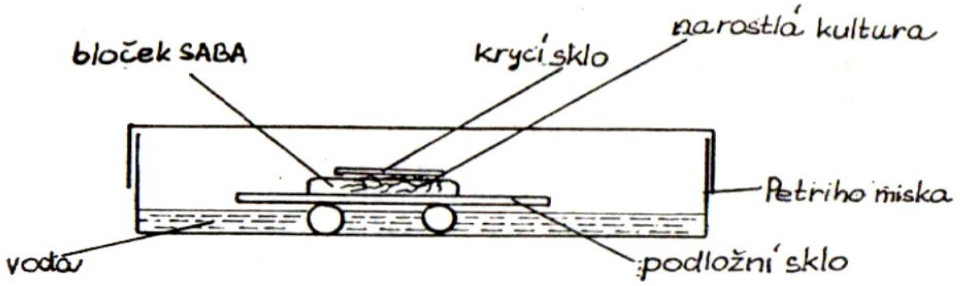
3. Příprava mikrokultury (sklíčkové kultury)

Materiál: Petriho misky s kulturou vláknité houby (*Aspergillus flavus* CCM 8363)

Pomůcky: preparační jehla, Petriho miska s vhodným kultivačním médiem (Malt Extrakt Agar nebo Sabouraudův glukozový agar), sterilní pinzeta, sterilní destilovaná voda, sterilní krycí a podložní skla, sterilní Petriho miska s filtračním papírem.

Pracovní postup:

1. Z tenké vrstvy kultivačního média připravíme bloček o velikosti 1x1 cm.
2. Bloček přeneseme na sterilní podložní sklo umístěné v Petriho misce s filtračním papírem (vlhká komůrka).
3. Vpichem do čtyř stran naočkujeme kulturu a překryjeme krycím sklem.
4. Kultivujeme 2 – 5 dní při teplotě 25 °C.
5. Průběžně sledujeme růst suchým objektivem při zvětšení 60x – 450x.



4. Identifikace kvasinek

Kvasinky můžeme identifikovat na základě makromorfologie (tvar kolonie, tvorba pigmentu), mikromorfologie na agaru s rýžovým extraktem (tvorba pseudomycelia, pravého mycelia, chlamydospor) a na základě utilizace substrátů v biochemických testech (např. Auxacolor2, CANDIDAtest 21, API Candida).

Materiál: kultura kvasinky

I. Preparát barvený podle Grama:

Umožňuje podrobné pozorování mykotických organizmů při velkých zvětšeních a odlišení bakteriální kontaminace.

Pomůcky: podložní skla, kahan, barvící roztoky, očkovací klička
Pracovní postup:

1. Na podložní sklo naneseme kapku sterilní destilované vody.
2. Sterilní kličkou nabereme kulturu a rozmícháme v kapce vody.
3. Preparát usušíme na vzduchu a fixujeme teplem, opakovaným protažením plamenem kahanu.
4. Fixovaný preparát přelijeme krystalovou violetí a necháme působit 1 min.
5. Opláchneme vodou (zbytek vody důkladně setřepat).
6. Převrstvíme Lugolovým roztokem na 1 min.
7. Opláchneme vodou (zbytek vody důkladně setřepat).
8. Odbarvujeme 95% etanolem, dokud odchází modrá barva (cca 20 – 30 sec.).
9. Opláchneme vodou (zbytek vody důkladně setřepat).
10. Dobarvíme zředěným roztokem safraninu 1 – 2 min.
11. Preparát prohlížíme imerzním objektivem při zvětšení 1000x a více.

Kvasinky se při Gramově barvení barví pozitivně. Vzhledem k naprosto rozdílnému složení buněčné stěny však kvasinky za grampozitivní neoznačujeme. Odlišení buněk kvasinek od bakteriálních je obvykle možné podle velikosti a tvaru buněk.

Výsledek: popis kultury, popis preparátu
Příklad:
makromorfologie: kolonie bílé, vypouklé, povrch matný, tvar okrouhlý, okraj hladký
mikromorfologie: blastokonidie oválné, pučící, tvorba pseudomycelia

II. Mikromorfologie na agaru s rýžovým extraktem:

Pomůcky: kultura kvasinky *Candida albicans* CCM 8215**,** Petriho miska s rýžovým agarem, sterilní krycí skla, preparační jehla, pinzeta sterilizovaná vypálením, termostat, světelný mikroskop

Pracovní postup:

1. Kulturu kvasinky naočkujeme krátkým řezem do středu tenké vrstvy agaru.
2. Přikryjeme sterilním krycím sklem.
3. Kultivujeme 24 – 48 hodin v termostatu při teplotě 30°C.
4. Poté kulturu prohlížíme pod mikroskopem.

Kvasinky mají makroskopicky většinou uniformní vzhled. V kultivaci na agaru s rýžovým extraktem lze identifikovat druh *Candida albicans* a *Candida dubliniensis* podle kulovitých chlamydospor (obr. 1).

Obr. 1 *Candida albicans*

III. Identifikace kvasinek pomocí biochemických testů (CANDIDAtest 21).

Souprava CANDIDAtest 21 je určena pro rutinní identifikaci kvasinek, převážně z klinického materiálu. Souprava umožňuje provést identifikaci čtyřiatřiceti druhů kvasinek, pomocí jedenadvaceti biochemických testů (chromogenní substráty, dekarboxyláza a asimilační reakce).

Pomůcky: Petriho misky s kultivačním médiem (Sabouraud-glukózový-(2%)-agar, bez aditiv), přístroj Densi-La-Meter II nebo srovnávací standardy McFarlandovy zákalové stupnice (tabulka č.1), automatická mikropipeta 0,1 ml, sterilní špičky, termostat 30 °C, běžné laboratorní mikrobiologické vybavení (kličky, popisovače, kahan)

Pracovní postup:

1. Postupujeme dle návodu výrobce na příbalovém letáku.
2. Výsledky testu zaznamenáváme do přiloženého formuláře.
3. Vyhodnocení výsledků testu lze provést i za použití TNW software.

Tabulka č. 1: Příprava McFarlandovy zákalové stupnice

Stupeň číslo	0.5	1	2	3	4	5
1.175% roztok chloridu barnatého (ml)	0.05	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5
1% roztok kyseliny sírové(ml)	9.95	9.9	9.8	9.7	9.6	9.5
Přibližná koncentrace bakterií(x 10^8/ml)	0.5	1	2	3	4	5

Zákalová řada se uchovává v temnu při laboratorní teplotě. Za těchto podmínek je stabilní 6 měsíců.

IV. Demonstrace různých druhů kvasinek na chromogenním médiu

Chromogenní médium je určeno pro využití pro předběžnou identifikaci čtyř druhů kandid: *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida glabrata*, *Candida krusei*.

5. Identifikace vláknitých hub (rod *Aspergillus*)

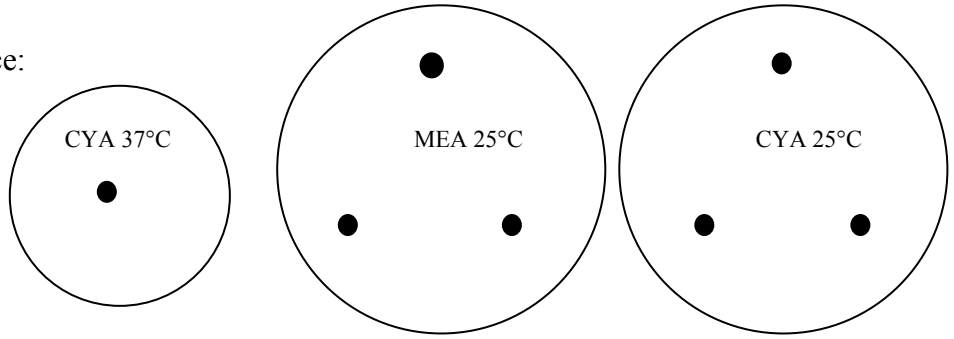
Materiál: Petriho misky s kulturou

Pomůcky: preparační jehla, Petriho miska s CYA (Czapek Yeast Autolysate agar), MEA (Malt Extract Autolysate agar), termostat

Pracovní postup:

1. Povrch příslušných médií inokulujeme konidiemi vláknité houby formou vpichu na třech místech tvořících vrcholy rovnoramenného trojúhelníka (body mají být vzdáleny asi 3 cm od kraje misky). Aby se spory při očkování nerozptýlily po celé půdě, očkujeme misky zespodu, otočené dnem vzhůru.
2. Kultivujeme 7 dnů při teplotě 25 a 37 °C.

Schéma inokulace:



Hodnocení:

po 7 dnech kultivace provedeme vyhodnocení růstu vláknitých hub.
Sledujeme:
znaky makroskopické

- rychlost růstu
- charakter povrchu kolonií
- barvu kolonie
- barvu spodní strany kolonie
- přítomnost pigmentu difundujícího do agaru
- přítomnost a barvu výpotku (exudát)
- přítomnost zvláštních útvarů viditelných okem (plodničky, sklerocia, aj.)
- charakteristický zápach.

V hodnocení vždy uvedeme stáří kultury a použitou kultivační půdu, neboť různé půdy mnohdy modifikují a značně mění charakteristické znaky (jak makroskopické, tak mikroskopické). Čisté kultury připravujeme zpravidla na půdě, na které je popis rodu autorem uveden.

znaky mikroskopické

Ke zjištění mikroskopických znaků nutných pro identifikaci vláknitých hub potřebujeme kromě mikroskopu i binokulární lupu. Pod lupou prohlédneme větší struktury (charakter mycelia, sklerocií, plodniček apod.),

pro studium dalších struktur, na nichž je založena identifikace, připravíme mikroskopický preparát. Jeho příprava a správné posouzení a zhodnocení je mimořádně důležité, neboť morfologické znaky u vláknitých hub jsou základním diagnostickým kritériem při určování rodů a druhů. Identifikace do rodu či druhu na základě makroskopických a mikroskopických morfologických znaků se provádí podle klíčů vypracovaných pro určité taxonomické skupiny.

6. Nativní preparát:

Princip: mikroskopické morfologické znaky vláknitých hub sledujeme v nativním preparátu. Protože se však jejich vlákna špatně smáčejí a v preparátu často bývají vzduchové bubliny, je lépe použít místo vody 10 až 20% vodný roztok glycerolu, který nevysychá tak rychle. Místo glycerolu lze požít i roztok laktofenolu nebo kyselinu mléčnou.

Materiál: kultury vláknitých hub
Pomůcky: podložní a krycí sklo, preparační jehla, kyselina mléčná

Pracovní postup:

1. Na podložní sklo naneseme kapku kyseliny mléčné.
2. Sterilní preparační jehlou přeneseme z kolonie mikromycety malé množství mycelia s fruktifikačními orgány do kapky kyseliny mléčné (nejlépe dvěma preparačními jehlami). U kultur silně sporulujících odebíráme mycelium na rozhraní mezi zbarvenou částí kolonie a bílým okrajem, aby v preparátu nebylo příliš mnoho konidií. Mycelium neroztíráme, abychom nepoškodili fruktifikační orgány – pouze jehlami uvolníme jednotlivá vlákna do kapaliny.
3. Opatrně přikryjeme krycím sklem (nepřitiskujeme!) a přebytečnou kapalinu odsajeme ze strany filtračním papírem.
4. Preparát bez další úpravy prohlížíme suchým objektivem, nejprve slabým zvětšením (objektiv 10x), postupně pak silnějším zvětšením (objektiv 40x a 100x)

Sledujeme:

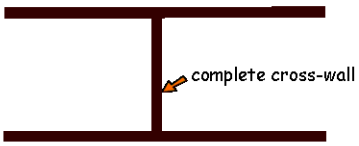
- charakter mycelia (šířku vláken, barvu a strukturu mycelia, přepážky (septa) – přítomnost a rozložení, způsob větvení)
- charakter, způsob tvoření (konidiogeneze) a uspořádání fruktifikačních orgánů (např. sporangiofory, konidiofory, sporangia, kolumela, fialidy, konidie, zygospory, askospory aj.)
- přítomnost a charakter jiných útvarů (chlamydospory).

Mikroskopování

Říše: *FUNGI*
Pododdělení: *MUCOROMYCOTINA*
Řád: *MUCORALES*

- mnohojaderné **coenocytické** mycelium, přehrádky se tvoří pro oddělení rozmnožovacích orgánů nebo ve starších myceliích
- **sporangia** vznikají na větvených či nevětvených **sporangioforech**, jsou většinou mnohosporová (až 1000 spor), u odvozenějších typů vznikají sporangia s malým počtem spor (až jednosporové - nesprávně

označované za "konidii")
- **zygospora** vzniká při pohlavním rozmnožování splynutím dvou různých gametangií



přepážka - *Mucoromycotina*

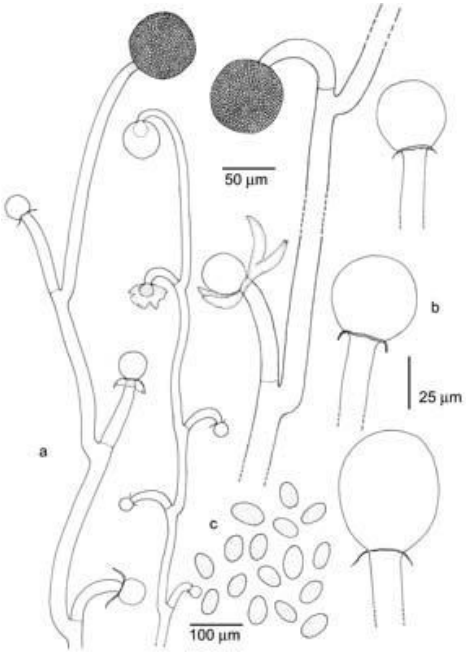
Rod *Mucor*

- sporangiofory větvené či nevětvené, bez rhizoidů a stolonů, ukončeny mnohosporovými sporangii bez apofýzy, s kolumelou kulovitou, oválnou nebo hruškovitou

Preparát č.1: ***Mucor circinelloides* CCM 8328**

Fungi, Zygomycota, Mucoromycotina, Mucorales, Mucoraceae, Mucor

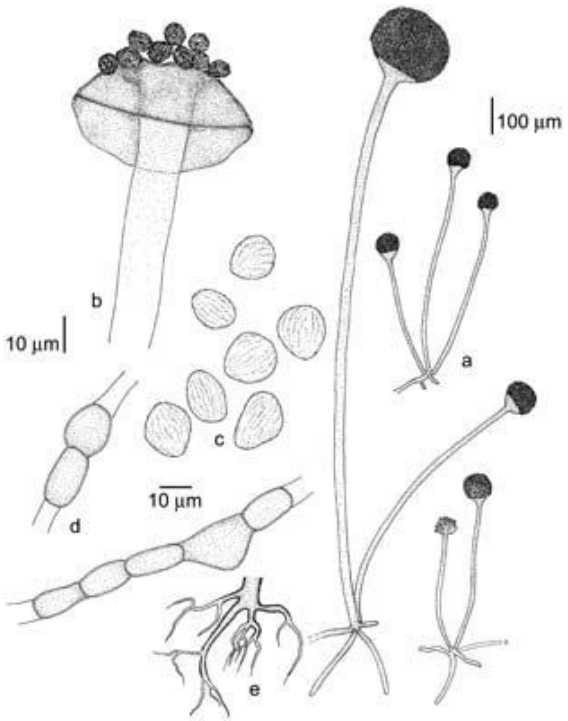
a. sympodiálně větvený circinátní sporangiofory
b. kulovitá kolumela
c. sporangiospory



Rod *Rhizopus*

– sporangiofory se tvoří obvykle ve svazcích a nebývají větvené. Vznikají na stolonech (výhoncích), které tvoří velmi často na pevném podkladu rozvětvené, tmavě hnědé rhizoidy. Kolumela má vyvinutou apofýzu (nálevkovité rozšíření sporangioforu pod sporangiem). Po prasknutí sporangiální stěny se kolumela s apofýzou kloboukovitě obrací.

Preparát č. 2: ***Rhizopus oryzae* CCM 8284**



Fungi, Zygomycota, Mucoromycotina, Mucorales, Mucoraceae, Rhizopus

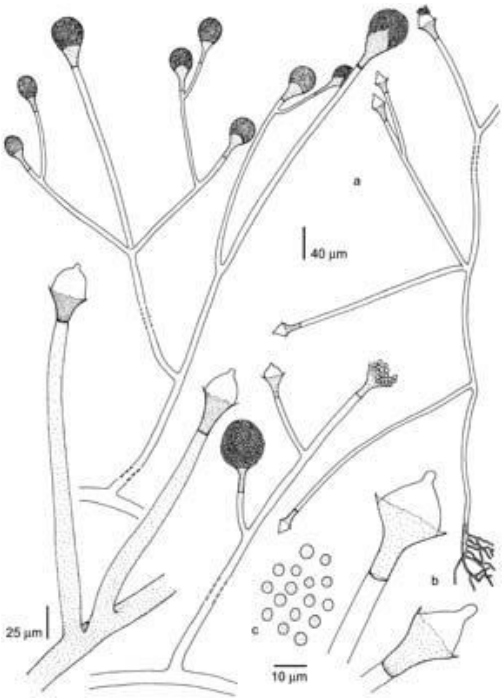
a. nevětvené sporangiofory s rhizoidy
b. kolumela s apofýzou
c. sporangiospory
d. chlamydospory
e. rhizoidy

Rod *Absidia*

– sporangiofory vyrůstají ve svazcích na výhoncích s rhizoidy. Kolumela kuželovitá, často má na vrcholu papilu nebo ostřejší výčnělek. Sporangiofor přechází do sporangia širokou apofýzou.

Preparát č. 3: ***Absidia coerulea* CCM 8230**

Fungi, Zygomycota, Mucoromycotina, Mucorales, Mucoraceae, Absidia

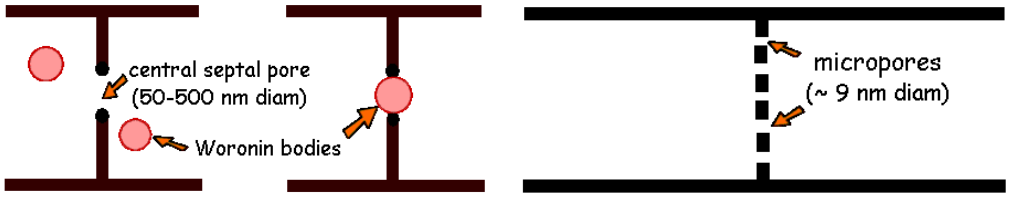


a. větvené sporangiofory s rhizoidy
b. kolumela s apofýzou
c. sporangiospory

Říše: *FUNGI*
Oddělení: *ASCOMYCOTA*

- vegetativní stélku tvoří přehrádkované mycelium nebo pučivé buňky či pseudomycelium
- tvorba sept je centripetální, začíná u stěny hyf a pokračuje ke středu kde ponechá volný pór

přepážka - *Ascomycota* **přepážka - *Sccharomycetes***



Rozmnožování: pohlavní i nepohlavní nebo jen nepohlavní
- stádium, kdy houba vytváří nepohlavní **mitospory**, se nazývá stádium **imperfektní (anamorfa)**
- stádium, kdy houba vytváří pohlavní **meiospory**, se nazývá stádium **perfektní (teleomorfa)**

Nepohlavní rozmnožování
- nejjednodušším způsobem je fragmentace hyf
- buňky vznikající exogenně na specializovaných hyfách - **konidioforech** nazýváme **konidie**
- buňky, které dávají vznik konidiím nazýváme **konidiogenní buňky**

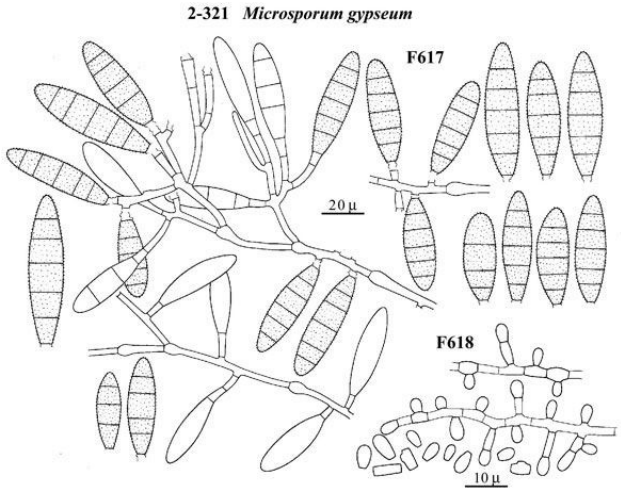
Základní typy konidiogeneze (vzniku konidií):
1. Thalická: již předem vytvořené buňky hyf se rozdělí přehrádkami a rozpadnou se na jednotlivé části. K formování definitivního tvaru dochází po oddělení.

a) Thalicko - arthrická: arthrokonidie

b) Holothalická: thalokonidie (thalokonidiemi jsou v jistém smyslu i **chlamydospory** - tlustostěnné přetrvávající buňky vznikající na myceliu)

Preparát č.4: ***Geotrichum candidum* CCM 8228** – arthrokonidie v rozpadajících se řetízcích
Fungi, Ascomycota, Saccharomycotina, Saccharomycetes, Saccharomycetidae, Saccharomycetales, Dipodascaceae, Geotrichum

Preparát č.5: ***Microsporum gypseum* CCM 8342** – thalokonidie (makrokonidie a mikrokonidie)
Fungi, Ascomycota, Pezizomycotina, Eurotiomycetes, Eurotiomycetidae, Onygenales, Arthrodermataceae, Microsporum



2. Blastická: konidie se formuje dříve než je oddělena přepážkou od konidiogenní buňky

a) Holoblastická - účast všech vrstev buněčné stěny

a) synchronní - produkce více konidií na měchýřku
b) sympodiální - proliferace konidiogenní buňky

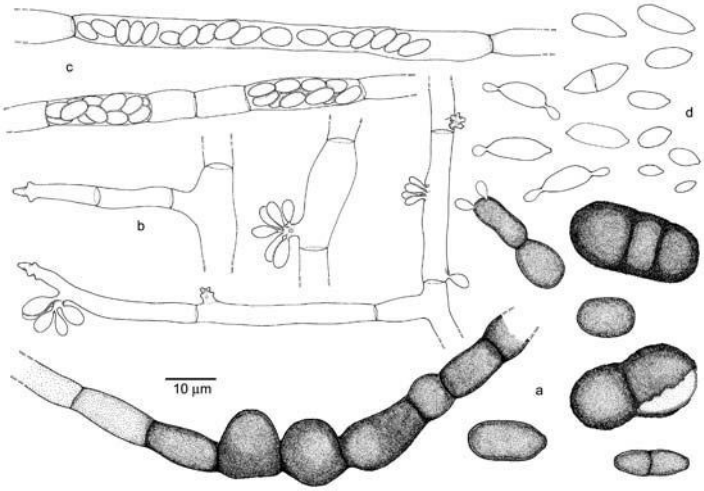
b) Enteroblastická - vnější stěna se protrhne, konidii utváří vnitřní vrstva
a) tretická - vznik **porokonidií**, často s výraznou jizvou na konidiogenní buňce
b) phialidická - konidiogenní buňky **fialidy**
c) annelidická - konidiogenní buňky **anelidy** (límeček)

Preparát č.6.: ***Candida albicans* CCM 8215**
Fungi, Ascomycota, Saccharomycotina, Saccharomycetes, Saccharomycetidae, Saccharomycetales, Candida

- stélka tvořena jednotlivými kulovitými až elipsoidními buňkami (**blastokonidiemi**) se schopností tvorby pučivého **pseudomycelia**

Kultivací na agaru s rýžovým nebo kukuřičným extraktem lze identifikovat druh ***Candida albicans*** a ***Candida dubliniensis*** podle kulovitých **chlamydospor**

Preparát č.7.: ***Aureobasidium pullulans* CCM F-148**
Fungi, Ascomycota, Pezizomycotina, Dothideomycetes, Dothideomycetidae, Dothideales, Dothioraceae, Aureobasidium



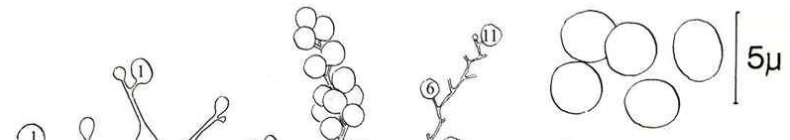
a) interkalární tmavě pigmentované chlamydospory

b) konidie vznikající synchronně na nediferencovaných konidiogenních buňkách

c) endokonidie

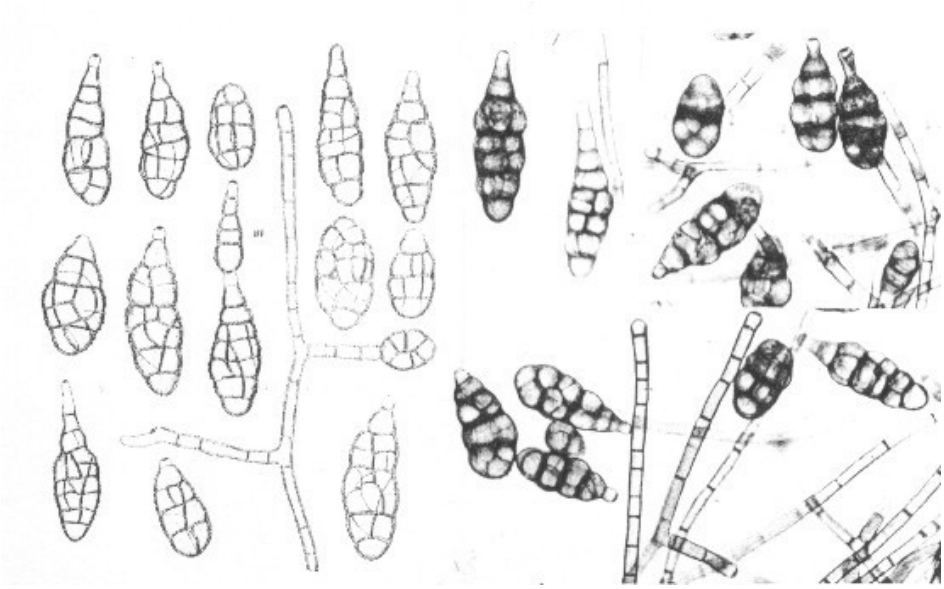
d) pučící buňky

Preparát č.8: ***Beauveria bassiana* CCM F-295 -** sympodiální proliferace konidiogenní buňky
Fungi, Ascomycota, Pezizomycotina, Sordariomycetes, Hypocreomycetidae, Hypocreales, Cordycipitaceae, Beauveria



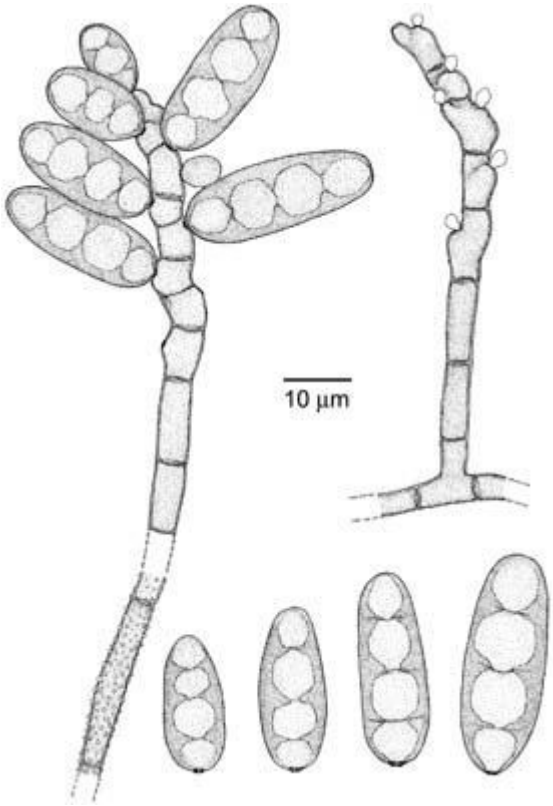
Preparát č.9: ***Alternaria citri*** **CCM F-178** – vícebuněčné konidie (porokonidie)

Fungi, Ascomycota, Pezizomycotina, Dothideomycetes, Pleosporomycetidae, Pleosporales, Pleosporaceae, Alternaria



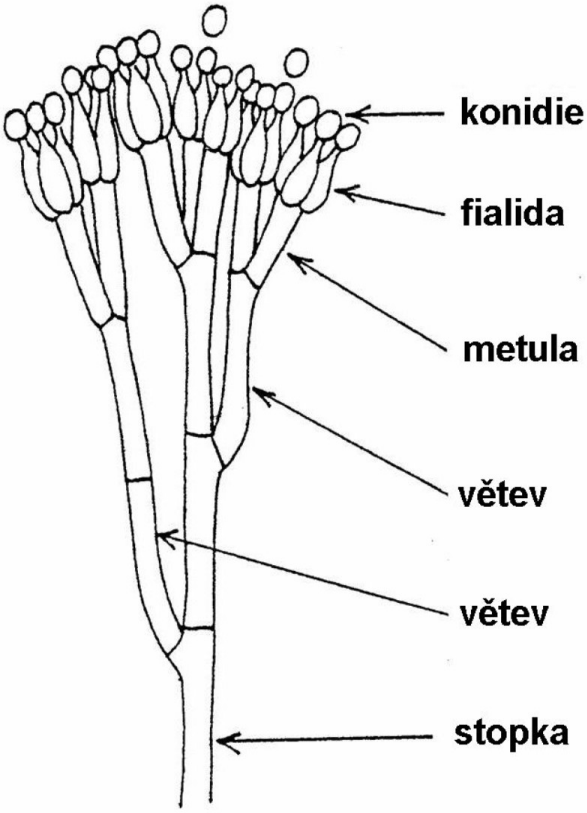
Preparát č.10: ***Bipolaris spicifera*** **CCM F-29** – pseudoseptované konidie (porokonidie)

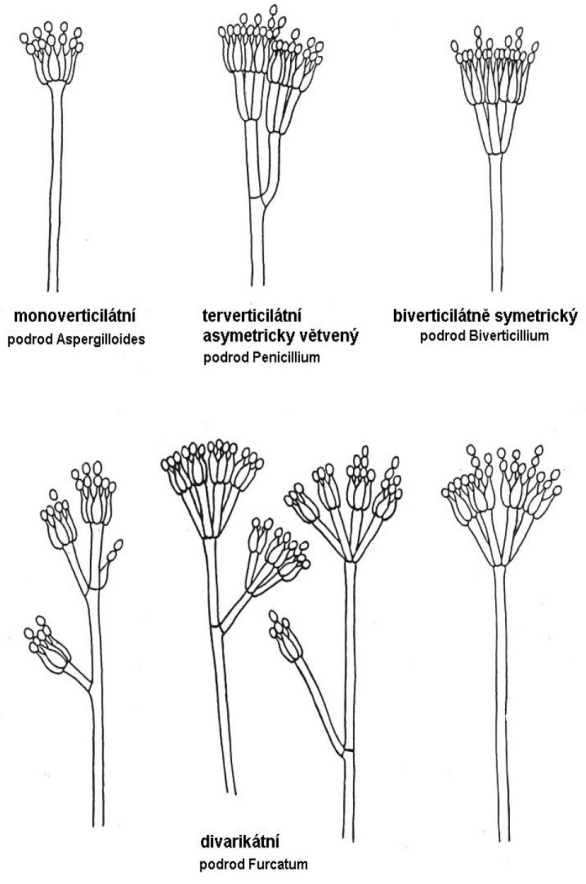
Fungi, Ascomycota, Pezizomycotina, Dothideomycetes, Pleosporomycetidae, Pleosporales, Pleosporaceae, Bipolaris



Rod *Penicillium*

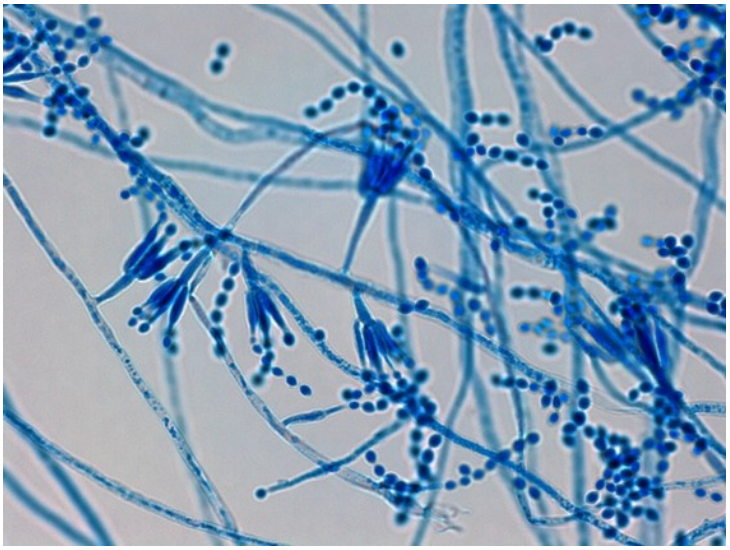
Fungi, Ascomycota, Pezizomycotina, Eurotiomycetes, Eurotiomycetidae, Eurotiales, Trichocomaceae



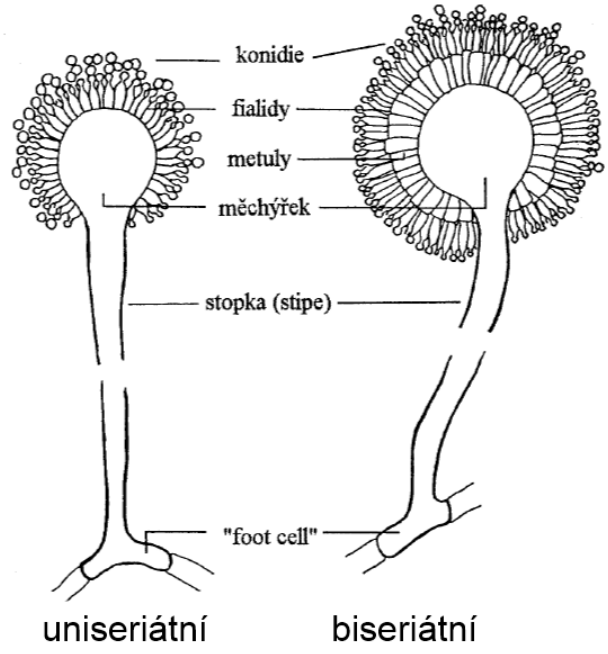


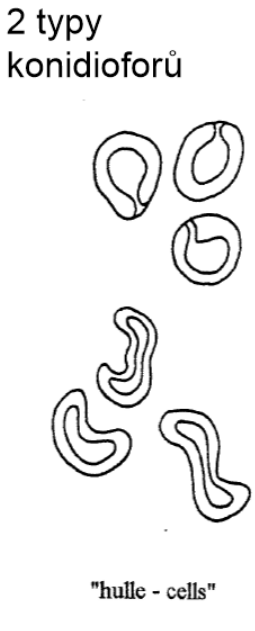
Preparát č.11: ***Penicillium vulpinum* CCM F-639** – terverticilátní, synemata
Preparát č.12: ***Penicillium minioluteum* CCM 8047** – biverticilátně symetrický

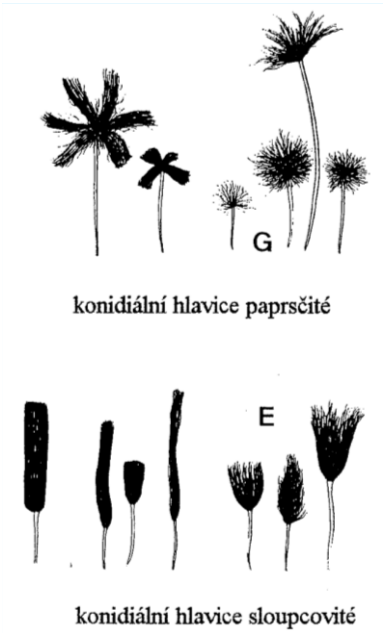
Preparát č.13: ***Paecilomyces lilacinus* CCM F-589** - konidiofory méně pravidelně větvené, fialidy protáhlé v dlouhý krček, konidie
Fungi, Ascomycota, Pezizomycotina, Eurotiomycetes, Eurotiomycetidae, Eurotiales, Trichocomaceae, Paecilomyces



Rod *Aspergillus*
Fungi, Ascomycota, Pezizomycotina, Eurotiomycetes, Eurotiomycetidae, Eurotiales, Trichocomaceae

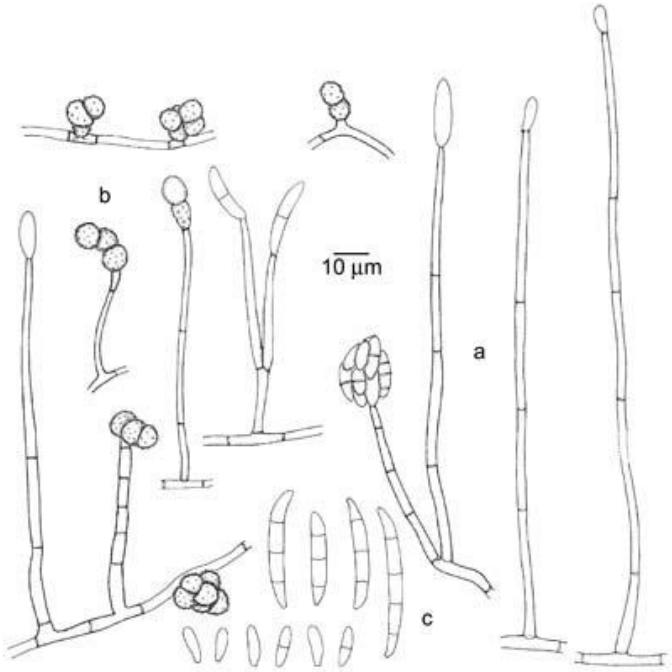




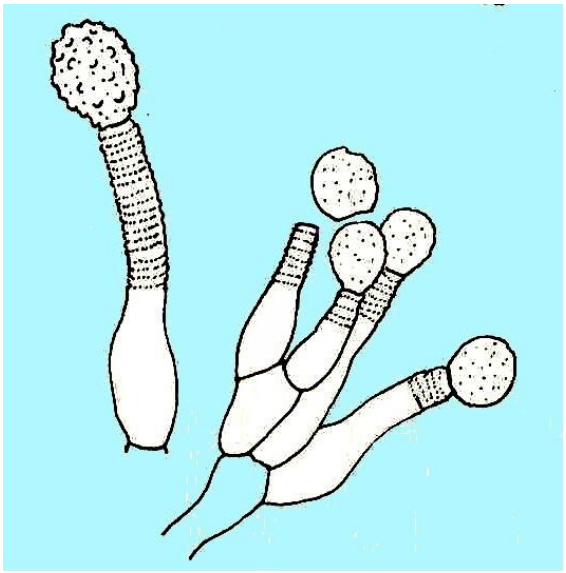


Preparát č.14: ***Aspergillus flavus* CCM 8363** - konidiofor biseriátní i uniseriátní, metuly, fialidy, konidie

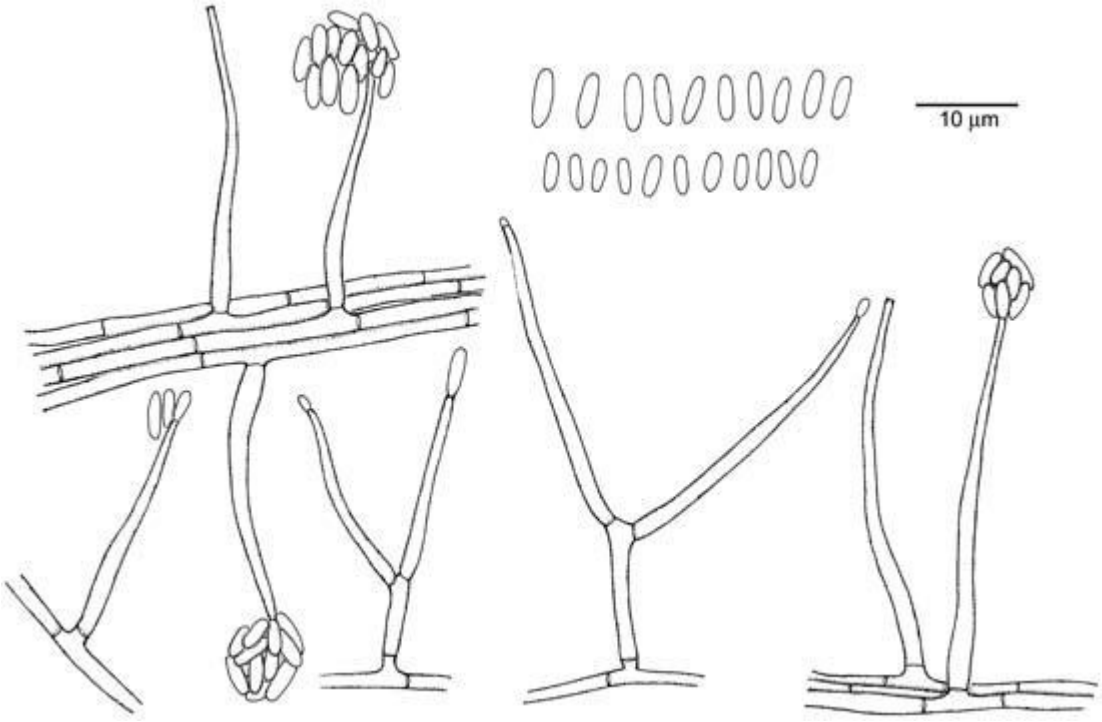
Preparát č.15: ***Fusarium solani* CCM 8014** - konidiofory s monofialidami, makro- a mikrokonidie, chlamydospory, sporodochia (palisáda konidioforů v ložisku na povrchu substrátu)
Fungi, Ascomycota, Pezizomycotina, Sordariomycetes, Hypocreomycetidae, Hypocreales, Nectriaceae, Fusarium



Preparát č.16: ***Scopulariopsis brevicaulis* CCM F-388 -** konidiogenní buňky - anelidy, konidie
Fungi, Ascomycota, Pezizomycotina, Sordariomycetes, Hypocreomycetidae, Microascales, Microascaceae, Scopulariopsis



Preparát č.17: ***Acremonium strictum* CCM F-**280 - tvorba synnemat, fialidy většinou jednotlivé, k vrcholu se zužující (jehlicovité), septum na bázi, konidie jednobuněčné, hladké, hyalinní



Pohlavní rozmnožování

- při pohlavním procesu vznikají **plodnice (askomata)** => v plodnicích pak dochází ke karyogamii v koncových buňkách tzv. **askogenních hyfách** - z nich vznikají vřecka
- spory (**askospory**) vznikají ve **vřecku** (latinsky **ascus**, množné číslo **asci**) obvykle v počtu 8 v jednom vřecku

Typy plodnic:

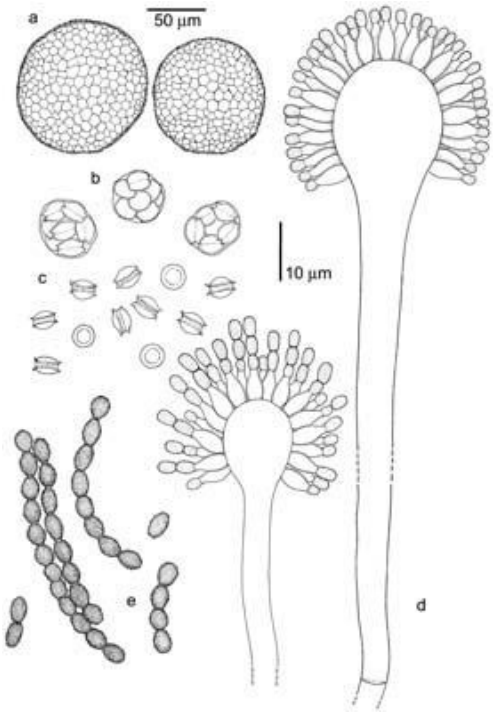
1) Askohymeniální typ
- kleistothecium je uzavřená plodnice s vytvořenou stěnou, otvírá se rozpadem; vřecka nejsou nijak uspořádána
- **perithecium** je kulovitá nebo protáhlá plodnice s úzkým ústím (ostiolem) vystlaným perifýzami, vřecka jsou uspořádána v hymeniu, mezi nimi se tvoří sterilní hyfová zakončení – parafýzy
- **apothecium** je miskovitá plodnice; vřecka jsou uspořádána v hymeniu na povrchu plodnice, parafýzy vytvořeny

2) Askolokulární typ
- **askostroma -** v pseudoparenchymatickém útvaru se diferencují pohlavní orgány, askogenní hyfy a vřecka vrůstají do sekundárně vytvořené lyzogenní dutiny (lokulu)

Preparát č. 18: ***Eurotium chevalieri*** **CCM F-6**

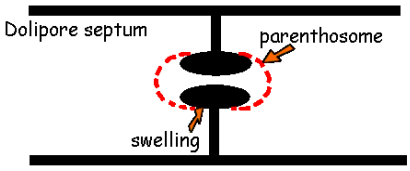
Fungi, Ascomycota, Pezizomycotina, Eurotiomycetes, Eurotiomycetidae, Eurotiales, Trichocomaceae, Eurotium

a. kleistothecium
b. vřecka
c. askospory s ekvatoriálními prstenci
d. konidiofory
e. konidie



Říše: *FUNGI*
Oddělení: *BASIDIOMYCOTA*

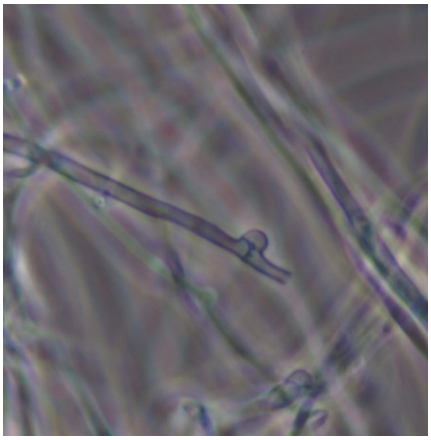
- společným znakem je tvorba **bazidie** (meiosporangium) a **bazidiospor** (meiospor) tvořících se exogenně na **sterigmatech** (stopečkách)
- vegetativní stélku tvoří přehrádkované mycelium, ve stěně přehrádek jsou vytvořeny **dolipóry** (podoba pláště soudku) s **parentozómem**
- **primární mycelium** – vzniká klíčením bazidiospory, jednojaderné, u některých zástupců může chybět
- **sekundární mycelium** – dikaryotické, jeho vznik souvisí se somatogamickou kopulací dvou buněk primárního mycelia, v něm probíhají konjugované mitózy spojené s tvorbou **přezek** (*Uredinales* a někteří zástupci dalších skupin přezky netvoří)
- nepohlavní rozmnožování – uskutečňuje se nejčastěji pomocí fragmentace mycelia (blastospory, arthrospory), vzácněji i dalšími typy konidií



přepážka - *Basidiomycota*

Preparát č.19: ***Schizophyllum commune*** **CCM F-795** - hyfy s přezkami

Fungi, Basidiomycota, Agaricomycotina, Agaricomycetes, Agaricomycetidae, Agaricales, Schizophyllaceae, Schizophyllum



Použitá literatura:

1. Váňa, J.: Systém a vývoj hub a houbových organismů. Karolinum, Praha, 1996.
2. MycoBank, http://www.mycobank.org/
3. De Hoog G.S.: et al.: Atlas of clinical fungi. Utrecht, Reus, 2000.
4. P.W. Crous, G.J.M. Verkley, J.Z. Groenewald, R.A. Samson. CBS Laboratory Manual Series 1, Fungal Biodiversity. CBS, Utrecht, 2009