

Základy klinické mykologie

- ▶ Mezi klinicky významné spirochety patří borelie, treponemy, leptospiry
- ▶ Jaké reakce se používají k průkazu boreliózy?
ELISA, WB, PCR
- ▶ Původcem syfilis je
Treponema pallidum subsp. Pallidum
- ▶ Mezi screeningové testy na průkaz syfilis patří
TPHA, RRR
- ▶ Mezi konfirmační testy patří
ELISA, WB, nepřímá imunofluorescence

- ▶ Bakterie patří mezi organismy
Prokaryotické
- ▶ Základem jejich buněčné stěny je
Peptidoglykan (murein)
- ▶ Jaké je složení G+ buněčné stěny?
Peptidoglykan, řetězce kys. Teichoové
- ▶ Jaké je složení G- buněčné stěny?
Tenká vrstva mureinu, nad ní vnější membrána
- ▶ Které bakterie se nebarví podle Grama?
Ty, které nemají buněčnou stěnu, nebo ji mají
hodně jinou než ostatní (acidorezistentní
bakterie, spirochéty)

Obecná charakteristika hub

- Mikroskopické houby= mikromycety
- Houby jsou eukaryotní organismy, na rozdíl od prokaryotních bakterií
- Jejich buněčná stěna je tvořena polysacharidy, má jinou stavbu a složení než buněčná stěna bakterií. Barví se ale fialově („grampozitivně“)
- Většinou mají pomalejší buněčný cyklus než bakterie
→ infekce bývají zdlouhavější
- Nepůsobí na ně většina antibakteriálních látek a musíme používat zvláštní skupinu látek – antimykotika, která zase nejsou účinná při léčbě bakteriálních infekcí

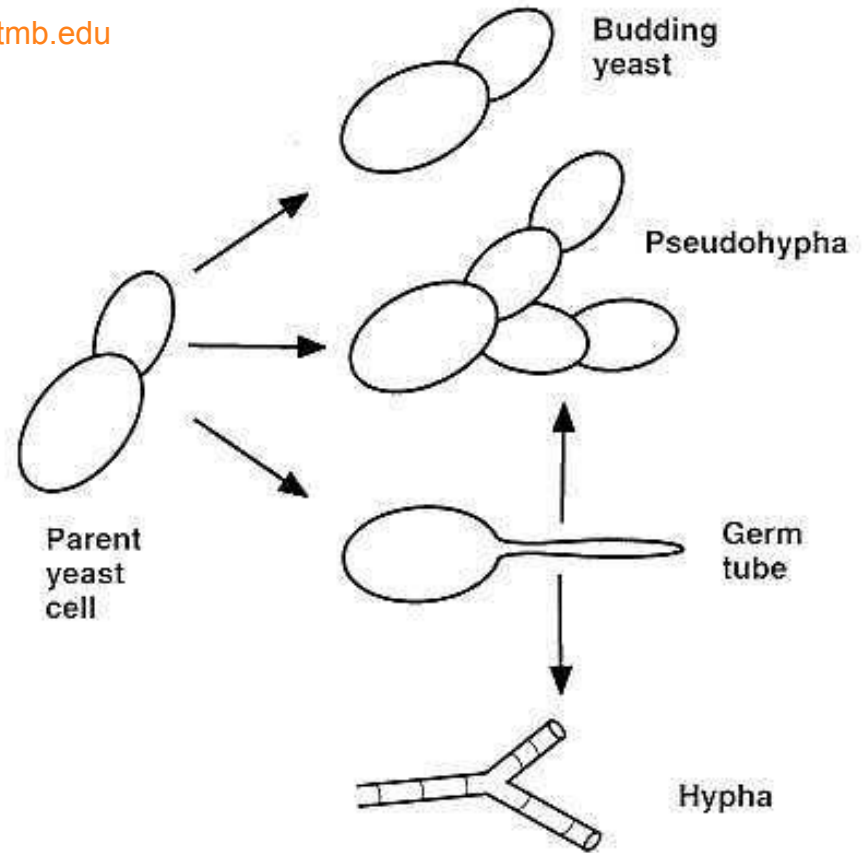
Klinicky významné houby

- Mikroskopické houby v těle působí
 - Mykózy-povrchové (kožní a slizniční) a orgánové či systémové
 - Mykotoxikózy – toxické působení (*Penicillium*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Alternaria*,...)
 - Mykoalergózy – spóry a částičky mycélia působí jako alergeny
 - Mycetismy – houba přítomna v těle, působí jen útlakem okolních tkání

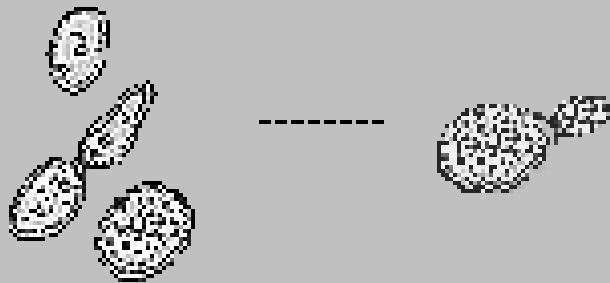
Morfologie hub (mikromycet)

- **Blastokonidie** je oválná nebo kulatá buňka, charakteristická pro kvasinky. Často vidíme pučící blastokonidie (blastospory)
- **Hyfa** je vlákno. Může být větvené, může být septované či bez přepážek. Soubor hyf se nazývá **mycelium** (vegetativní, ukotvující houbu v substrátu nebo generativní nesoucí rozmnožovací struktury houby)
- **Pseudomycelium** je tzv. nepravé mycelium, vzniká pučením buněk, které zůstávají spojeny, u kvasinek

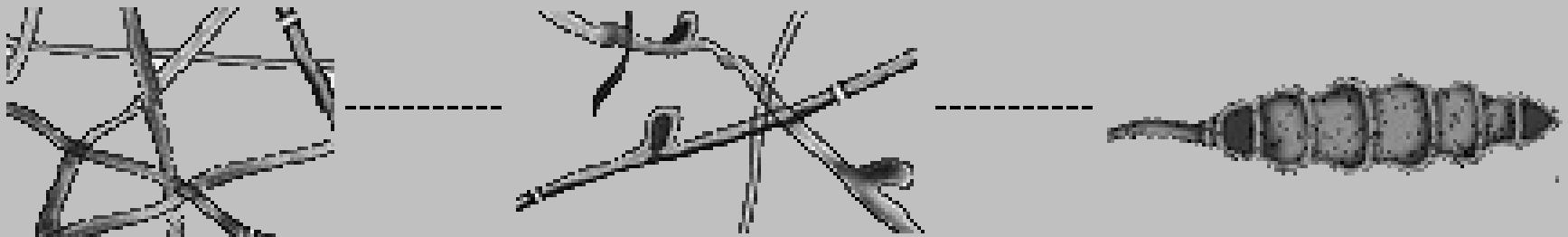
Některé morfologické útvary hub



● yeast cells ----- budding



● mycelium ----- microconidia ----- macroconidium



Rozmnožování hub

- Rozmnožování hub může být pohlavní a nepohlavní
- V současnosti se doporučuje:
 - pro **sexuální** rozmnožovací tělíska hub používat termín **spora**
 - pro asexuální, **vegetativní** reprodukční částice používat termín **konidie**

Typy pohlavních rozmnožovacích tělísek hub

- **Askospory** jsou váčky obsahující vždy sudý počet pohlavních buněk. Týká se většiny klinicky významných mikromycet
- **Oospory** vznikají splynutím velké nepohyblivé buňky samičí s malou pohyblivou buňkou samčí
- **Zygospory** vznikají spojením dvou stejně velkých buněk opačného pohlaví
- Zvláštním typem pohlavního rozmnožování je **spájení hyf** – přiloží se k sobě samčí a samičí vlákno a vytvořeným můstkem dojde k výměně genů

Typy nepohlavních rozmnožovacích tělísek hub

- **Arthrokonidie** vznikají postupným oddělováním koncových částí vláken
- **Blastokonidie** tvoří houby, které tvoří pseudomycelia z pseudohyf – tedy nepravých hyf z protáhlých buněk oddělených zaškrcením
- **Chlamydokonidie** jsou silnostěnné útvary kdekoli v průběhu či na konci hyf
- **Mikrokonidie** jsou kulovitá, oválná či hruškovitá tělíška na konci hyf
- Asexuální reprodukční tělíška v obalech či pouzdrech, například **sporangiokonidie** zygomycet uzavřené ve váčku – sporangiu, či **makrokonidie** u hub čeledi *Dematiaceae*

Fyziologie mikromycet

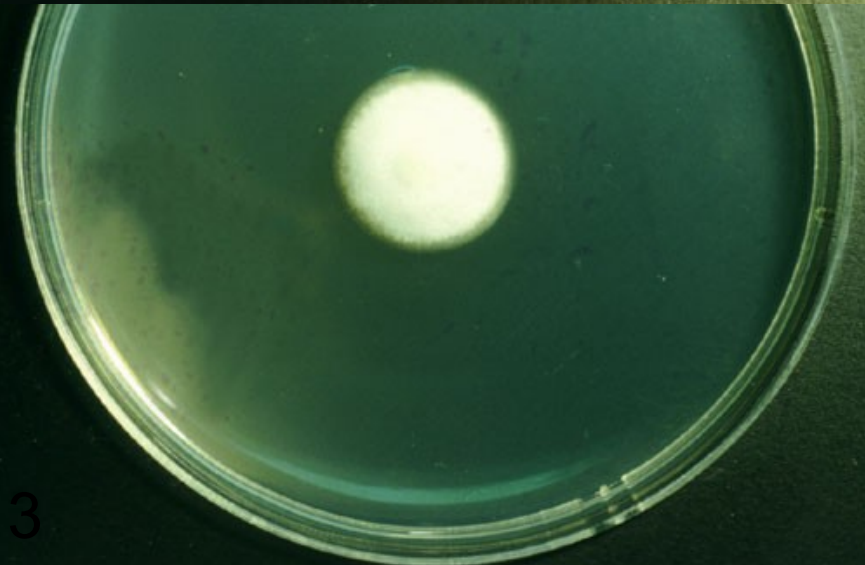
- Houby se množí **většinou pomaleji** než bakterie, jsou však mezi nimi velké rozdíly. Rostou celkem snadno i na chudých půdách
- Většina klinicky významných hub dobře roste i **při nižších teplotách**. Kultivujeme je zpravidla raději při 30 °C než při 37 °C. Druhá možnost je **souběžná kultivace** při 22 °C a 37 °C, vhodná u dimorfních hub
- **Biochemická aktivita** je pestrá hlavně u kvasinkovitých hub

Dermatofyty

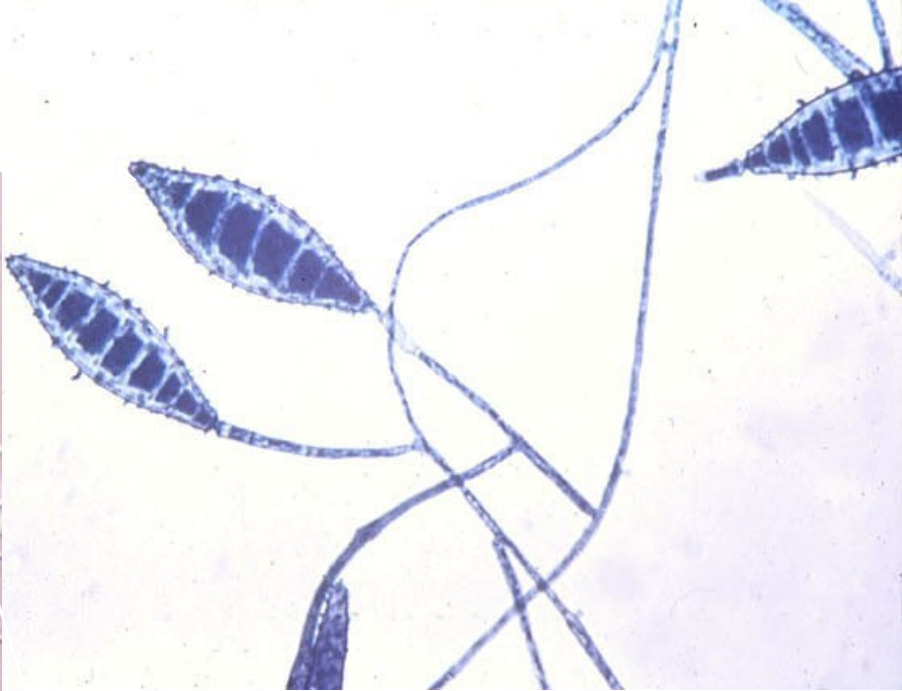
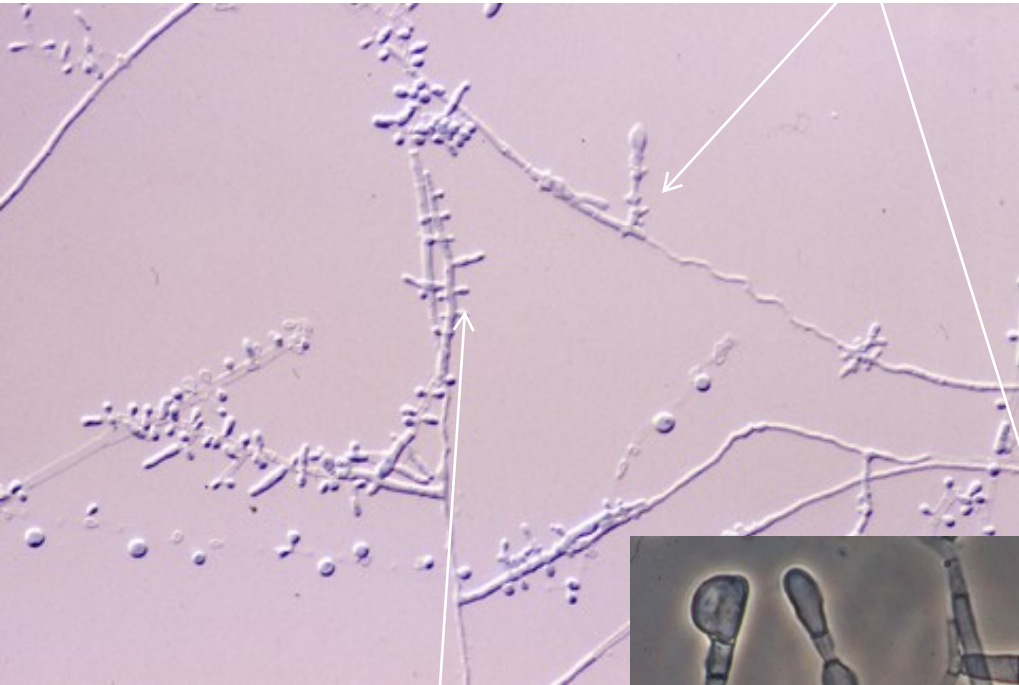
- Tzv. **keratinofilní houby** patří mezi nejběžnější původce kožních mykóz (včetně mykóz kožních adnex, tj. vlasů, chlupů a nehtů)
- Mezi dermatofyty patří rody *Trichophyton*, *Epidermophyton* a *Microsporum*
- Typická morfologie- septovaná větvená vlákna s mikro- a makrokonidiemi, chlamydosporami
- Pomalu rostoucí- delší kultivace
- Podle místa přirozeného výskytu a výběru hostitele se rozdělují na **antropofilní** (přenos mezi lidmi), **zoofilní** (ze zvířat) a **geofilní** (z prostředí)

Dermatofyty

- 1 *Epidermophyton floccosum*
- 2 *Trichophyton rubrum*
- 3 *Trichophyton mentagrophytes*



makrokonidie



mikrokonidie



chlamydospory

Dermatomykózy

Onemocnění mají různé názvy podle toho, které části těla postihují (**tinea manus**, **tinea pedis**, **tinea barbae** a podobně).



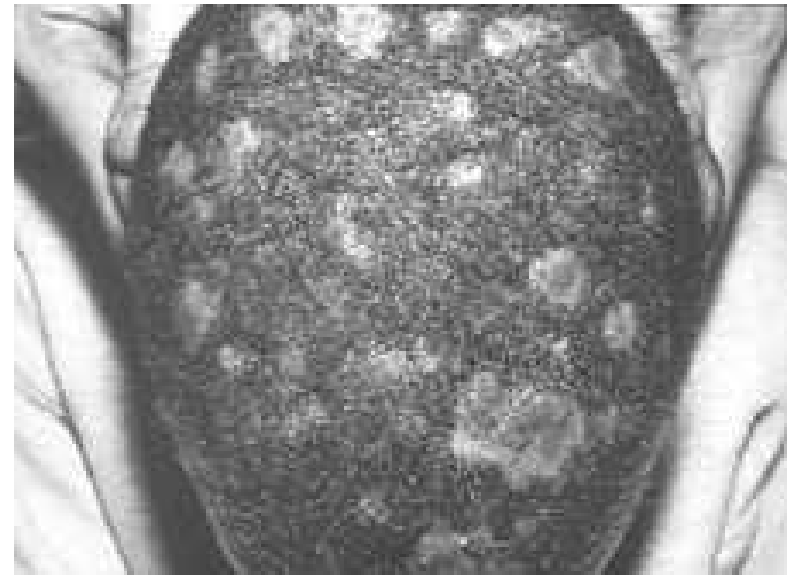
Tinea barbae



Tinea pedis



Tinea capitis

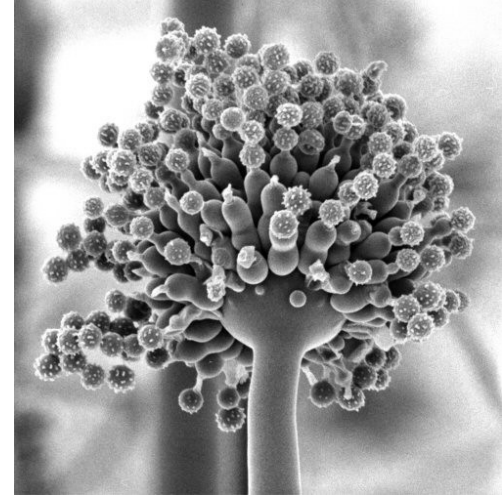


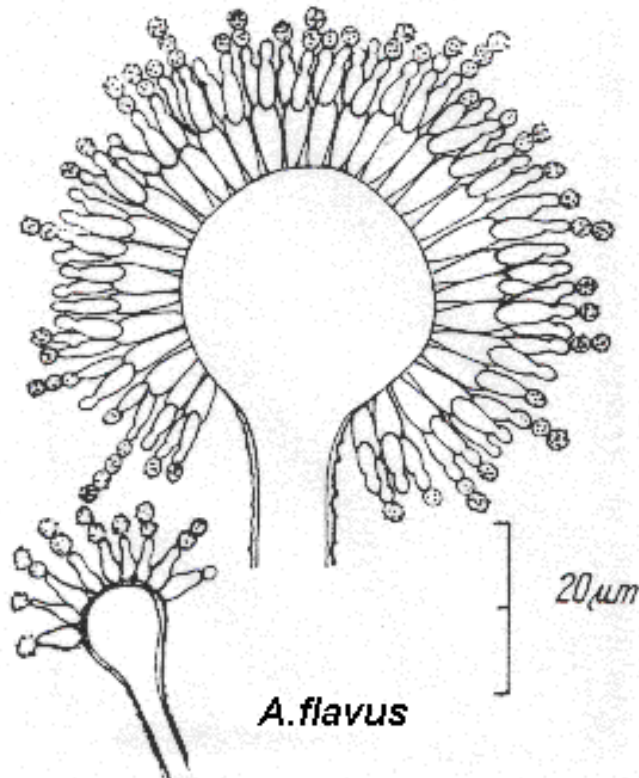
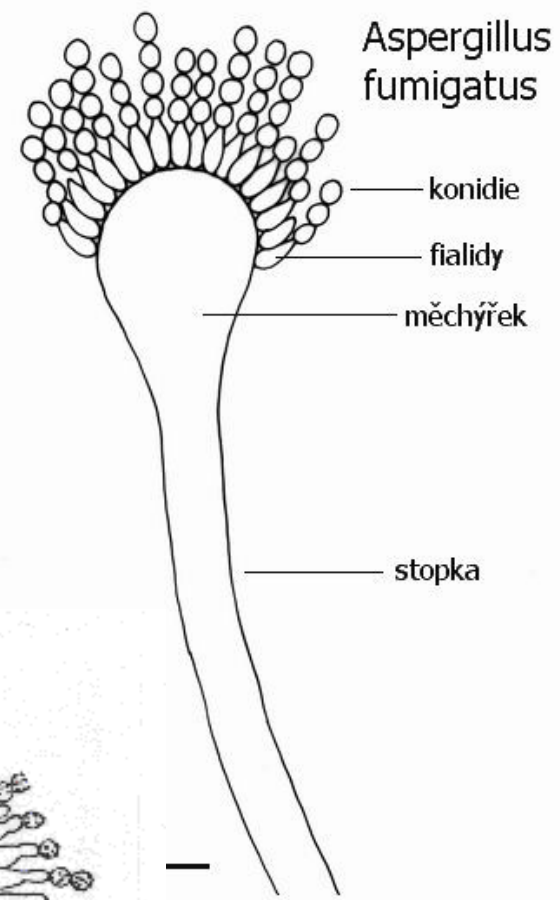
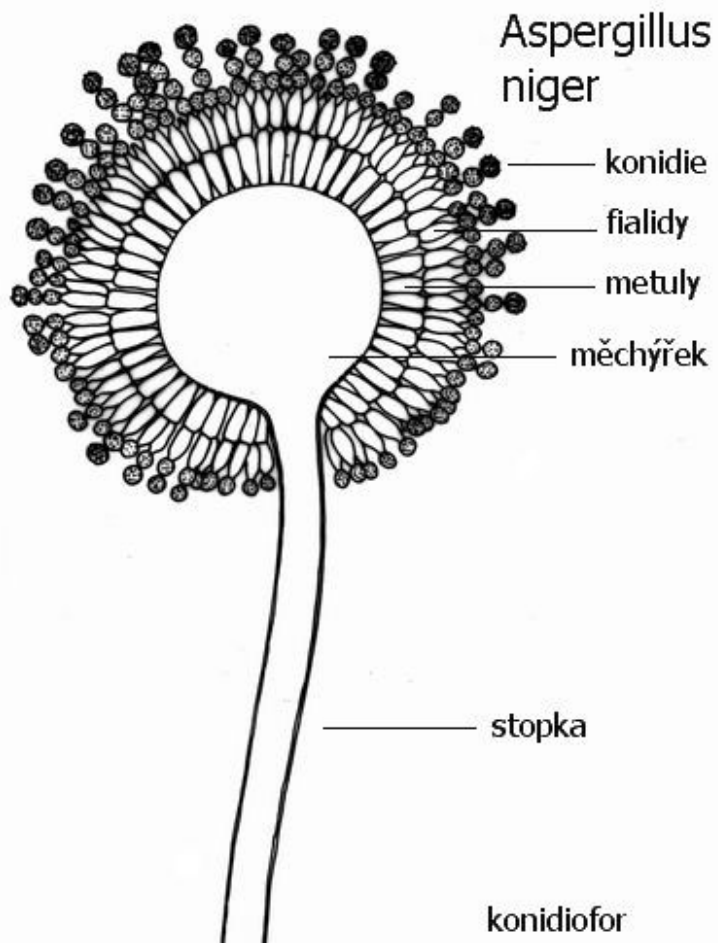
Tinea unguium



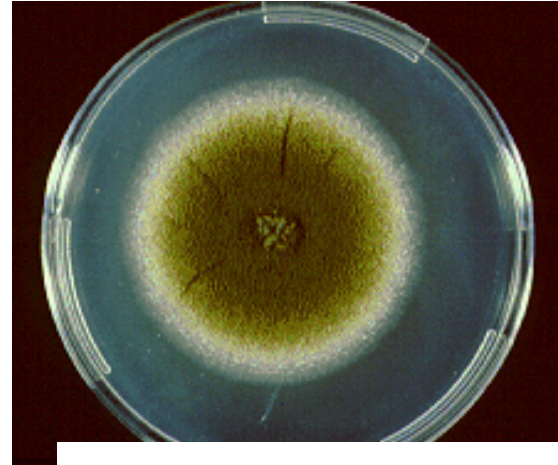
Aspergillus

- Typická morfologie, pestře pigmentované kolonie
- Napadají častěji lidi oslabené, mohou však napadnout i člověka zdravého
- Často se aspergilóza vyskytuje jako **profesní onemocnění** lidí, pracujících ve vlhkých, zaprášených provozech, kde neustále poletují různé plísňové spóry
- Aspergilová onemocnění jsou jedním z příkladů **orgánových, případně systémových mykóz**
- **Produkce různých mykotoxinů (aflatoxin)**

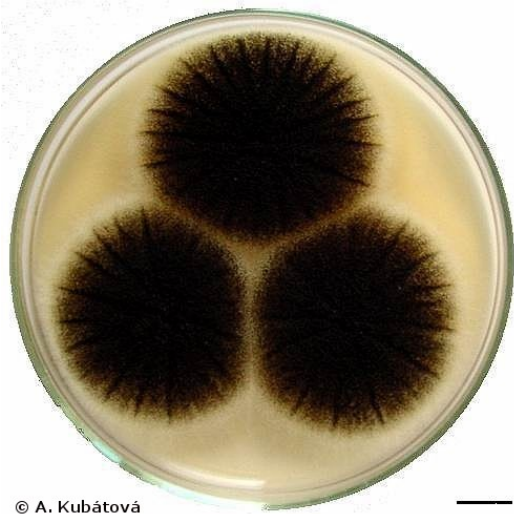




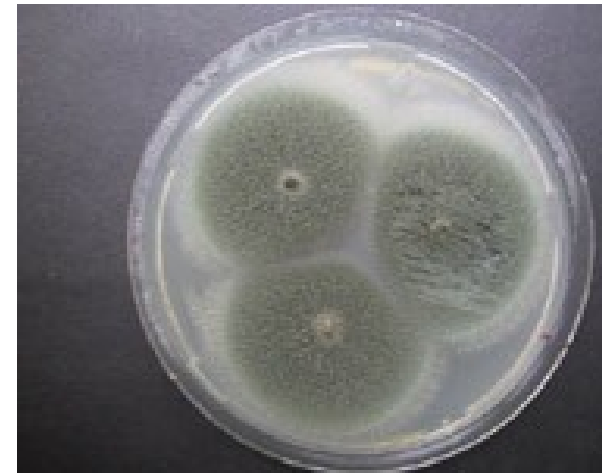
Aspergillus flavus

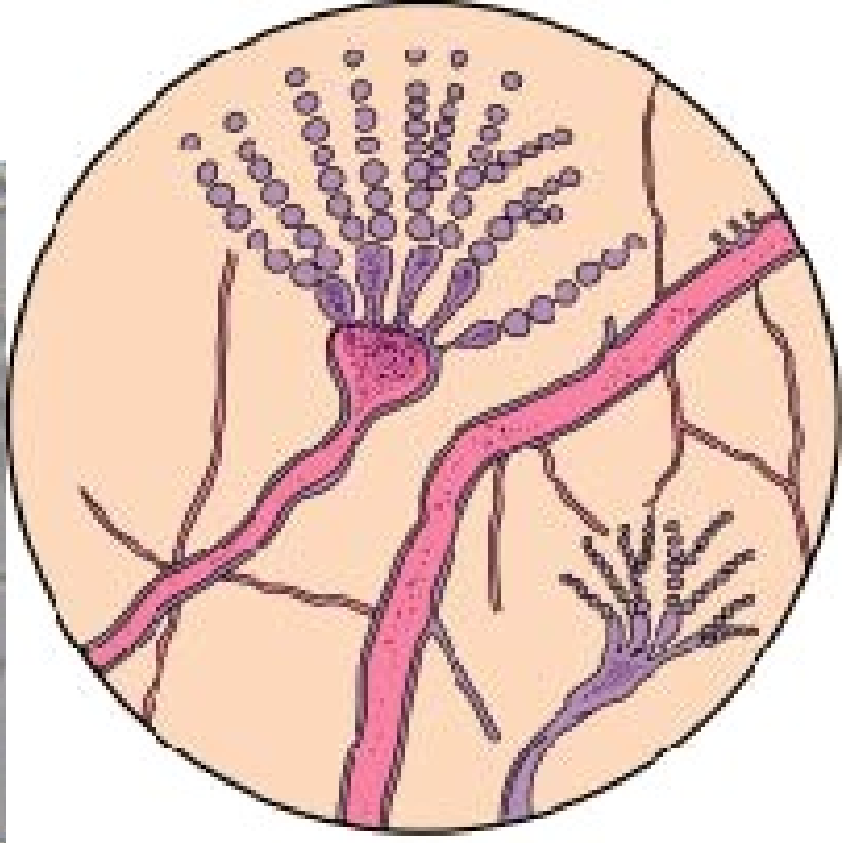


Aspergillus niger

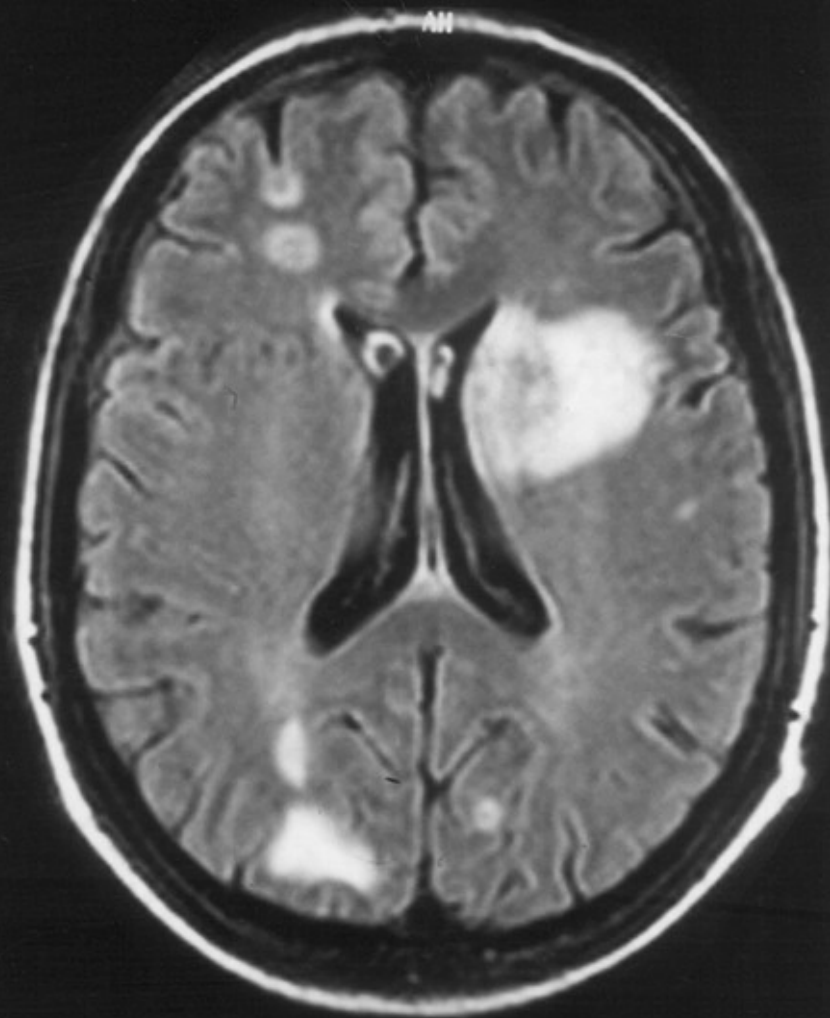
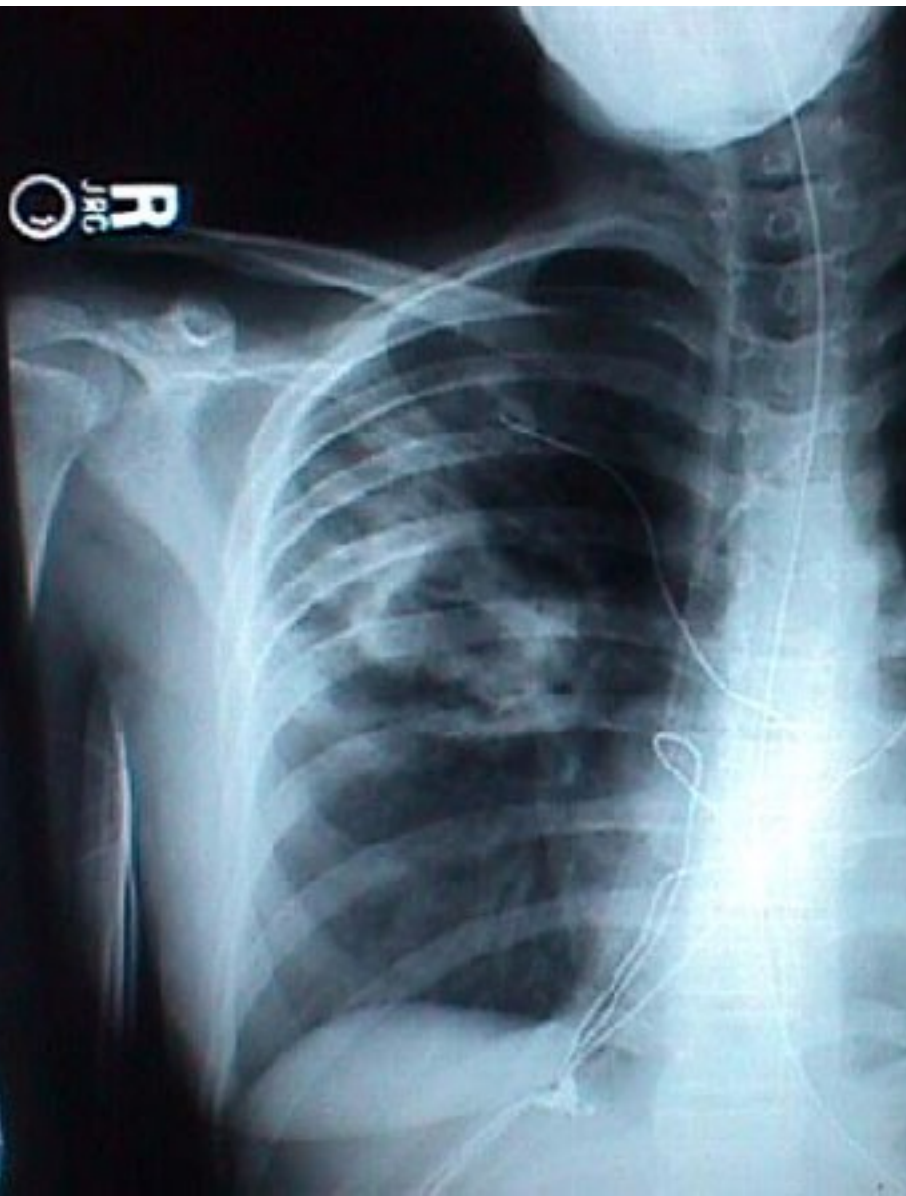


Aspergillus fumigatus



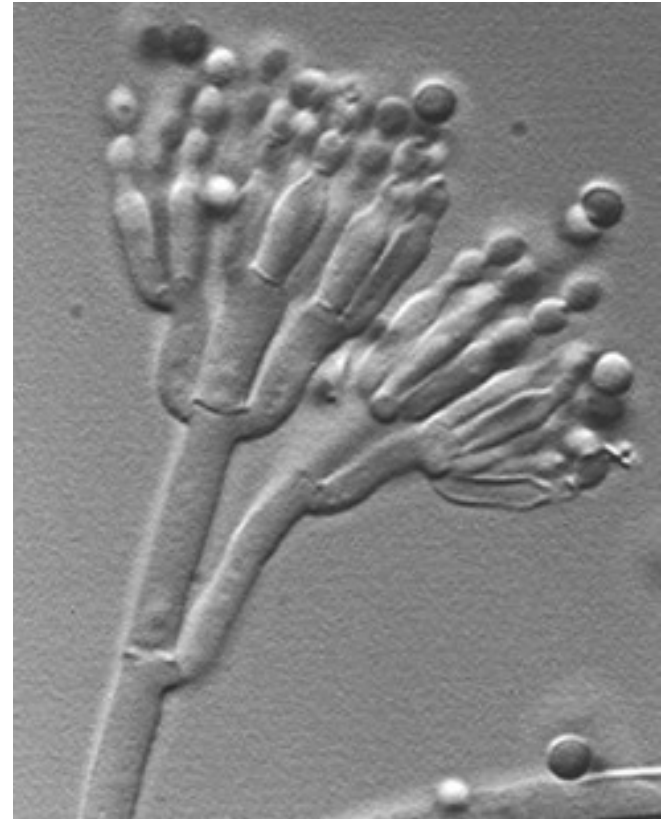
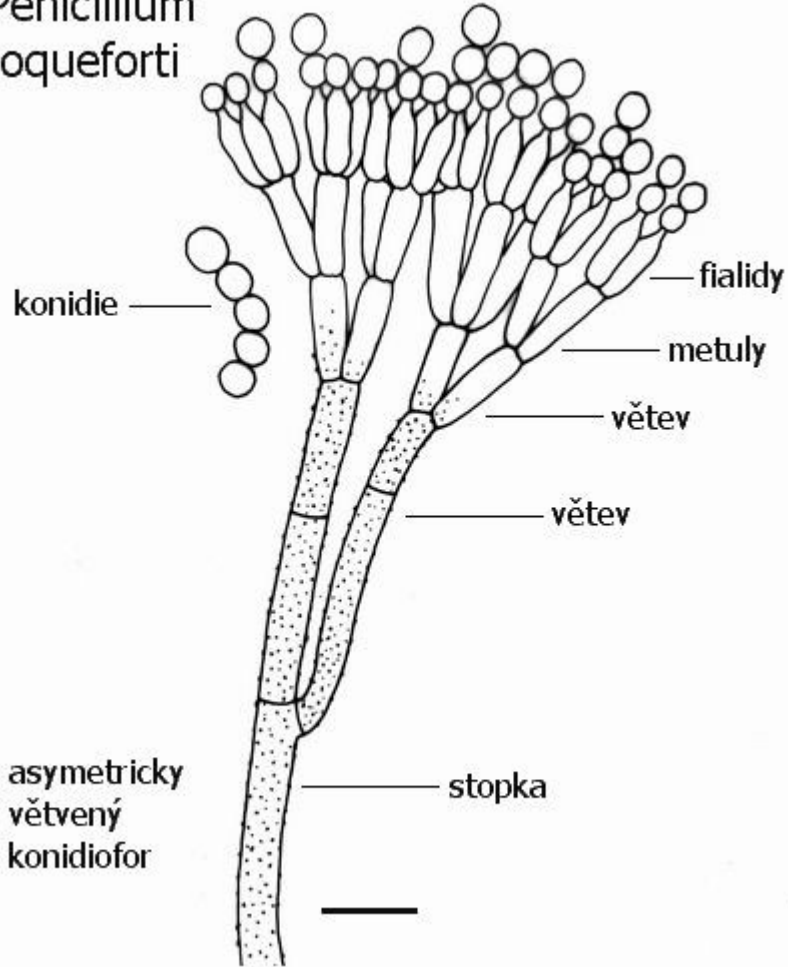


Aspergilózy



Penicillium marneffeii

Penicillium
roqueforti



Zygomycety

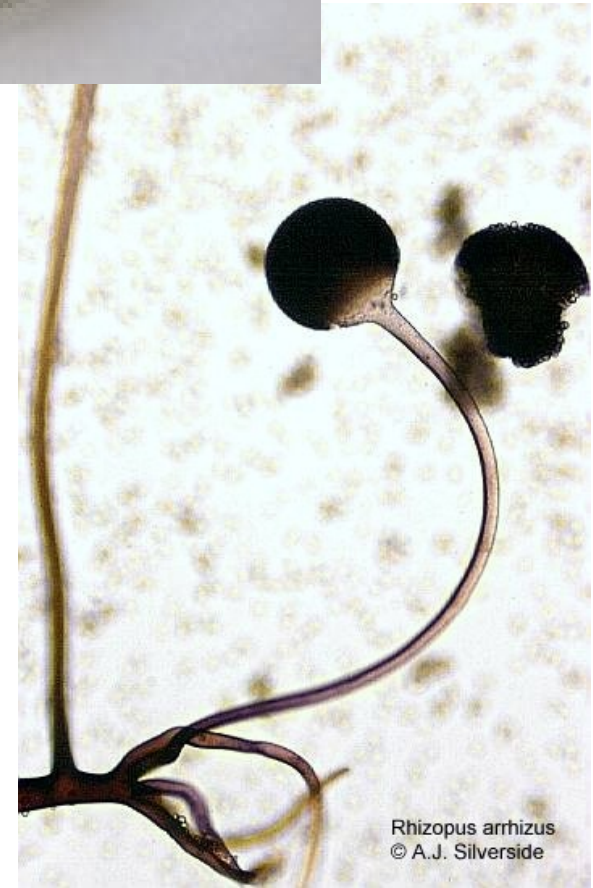
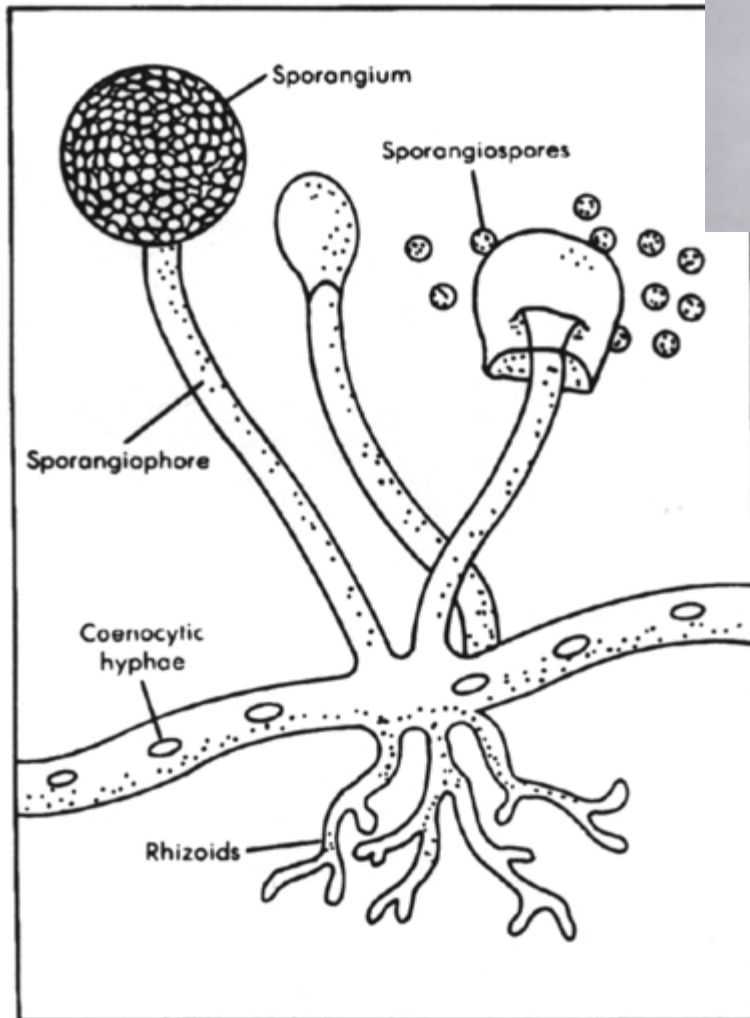
- Pravé plísně- tvoří neseptované hyfy. Tvoří mohutný „kožíšek“, na Petriho misce mohou i nadzvedávat víčko
- Infekce jsou **vzácné**, ale přibývá jich např. u diabetiků
- Normálně se živí saprofyticky např. na ovoci
- Jsou schopny velmi rychlého růstu např. stěnami velkých cév. Mohou způsobit i tzv. **živý trombus** s rychlou smrtí postiženého
- Klasické je také prorůstání **z nosní dutiny do mozku**, a to i během několika hodin
- Nejdůležitější jsou rody *Rhizopus* a *Mucor*



Mucor



Rhizopus



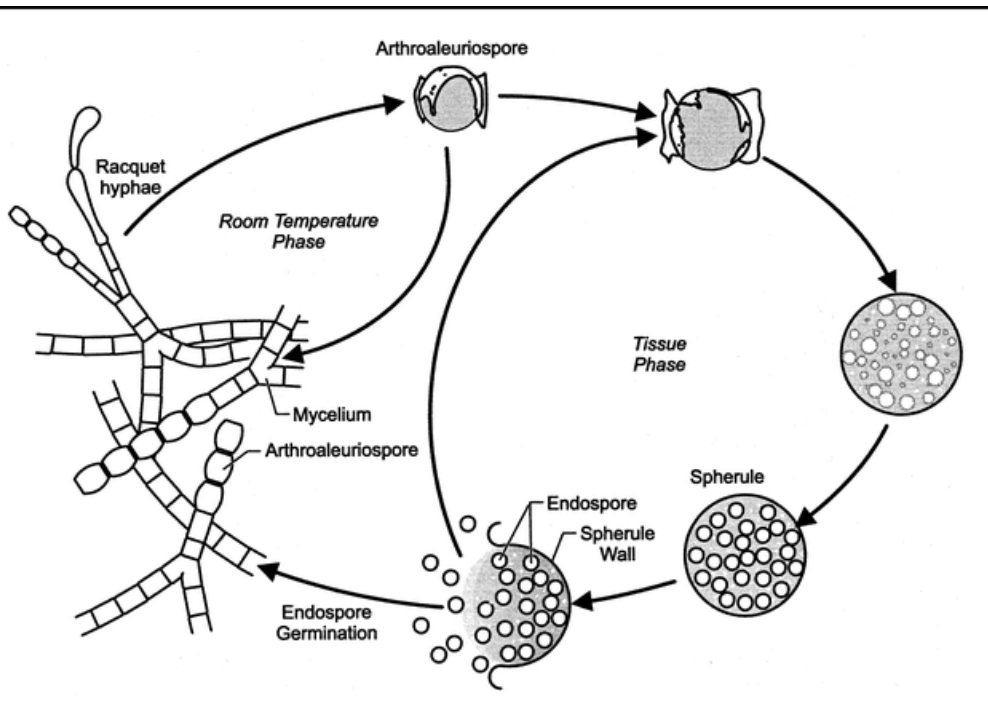
Rhizopus arrhizus
© A.J. Silverside

Dimorfní houby

- Za nižších teplot (do 30 °C) - vláknitá forma, při teplotě kolem 37 °C rostou ve formě kvasinek
- Kultivace velmi dlouhá (7-30 dnů)
- Jsou to původci mykóz u osob s imunodeficity
- Severní Amerika, Afrika
- *Blastomyces*, *Coccidioides*, *Histoplasma*, *Paracoccidioides*, *Sporothrix*

Coccidioides immitis

- Oproti jiným roste poměrně rychle
- U pacientů s mírnými imunodeficity je infekce bezpříznaková či bez závažných příznaků
- Horší je to u osob s rozvinutou chorobou AIDS, kde dochází k primárnímu postižení plic apod.

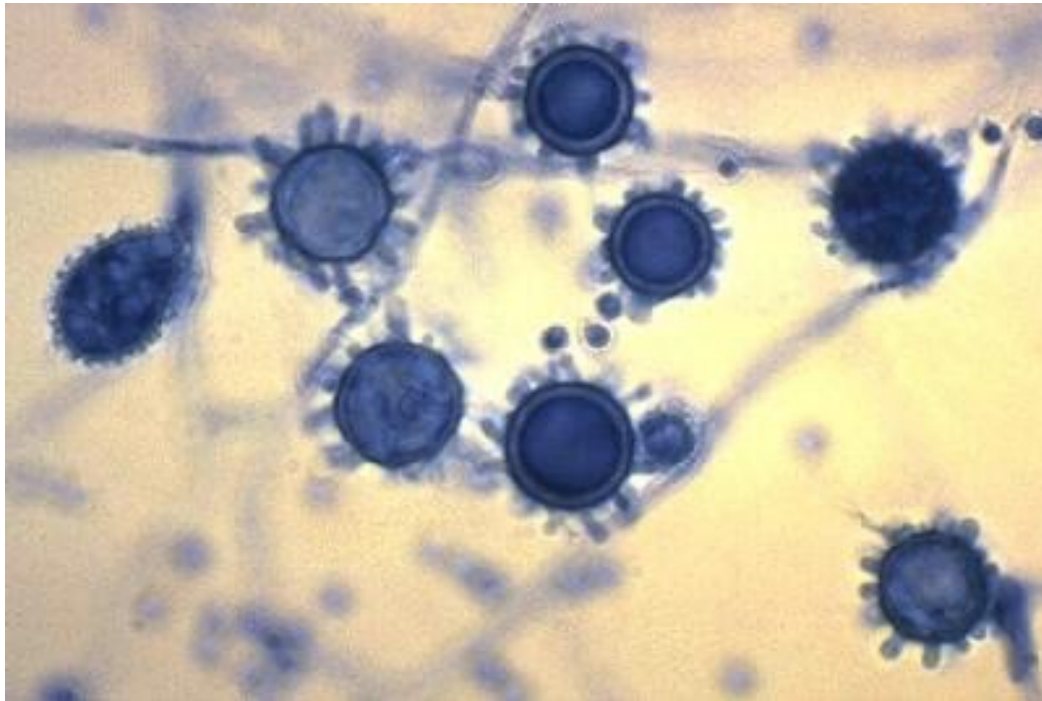


Blastomyces

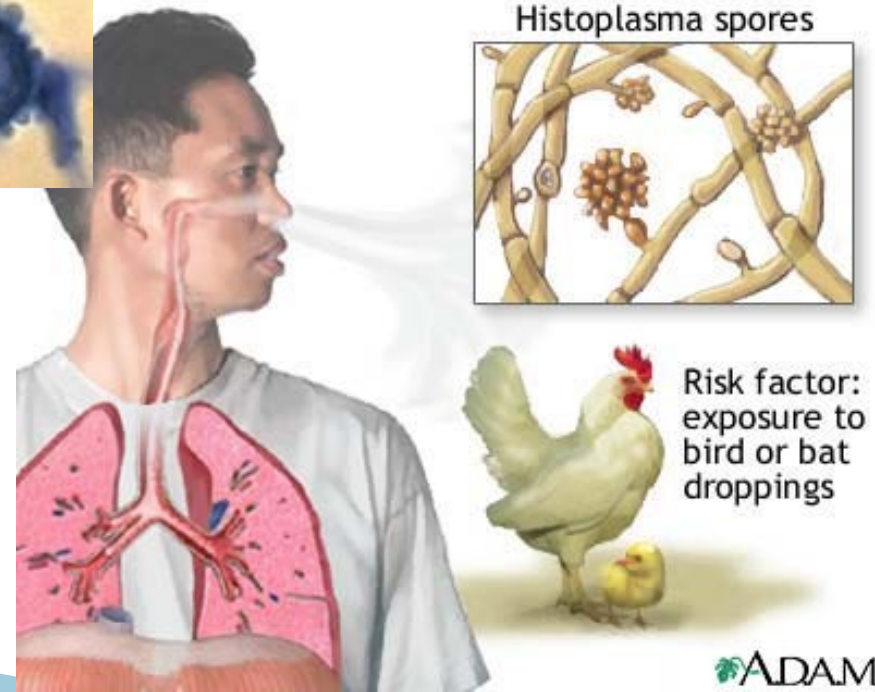
- Blastomykózy – primární plicní onemocnění nebo častější kožní formy



Histoplasma capsulatum



Vyskytuje se hlavně v
USA, ale i v Africe

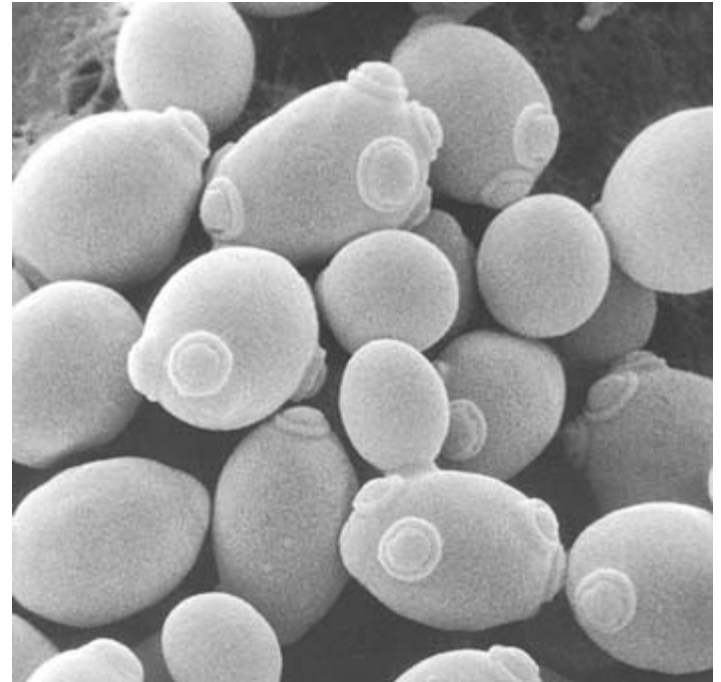


Histoplasma spores

Risk factor:
exposure to
bird or bat
droppings

Kvasinky

- Morfologie: blastokonidie, pseudomycelia, chlamydokonidie
- Pestrá biochemická aktivita
- Oportunní patogeny- původci systémových i povrchových mykóz
- Predispozice:
 - Diabetes mellitus
 - Širokospektrá ATB
 - Nesprávné stravování
 - Oslabená imunita
- Infekce většinou endogenní



Kandidová onemocnění

- **Kandidózy** mohou být **povrchové (kožní, slizniční)** i **systemové**
 - Ze **slizničních kandidóz** se vedle vaginální mykózy vyskytuje také **orální kandidóza** (soor, u kojenců a oslabených osob)
 - **Kožní kandidózy** jsou také časté (například plenková dermatitida u kojenců)
 - **Celkové infekce** se vyskytují především u oslabených osob a u osob léčených kombinací širokospektrých antibiotik
- **Nejběžnější** je *Candida albicans*, dále *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. parapsilosis* a další
- U některých typické **přirozené rezistence** (např. *C. krusei* na flukonazol)

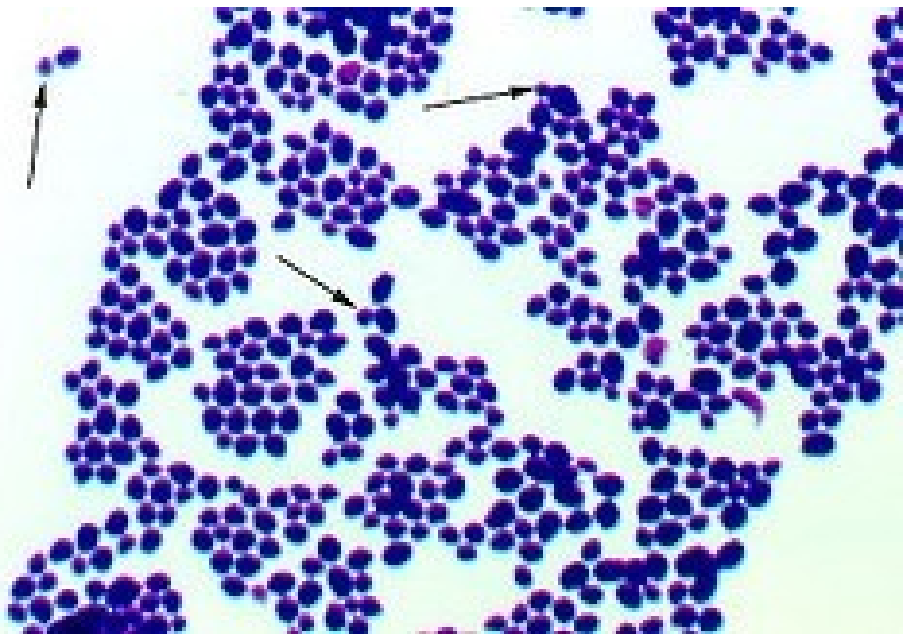


Image Courtesy of M. McGinnis
ation

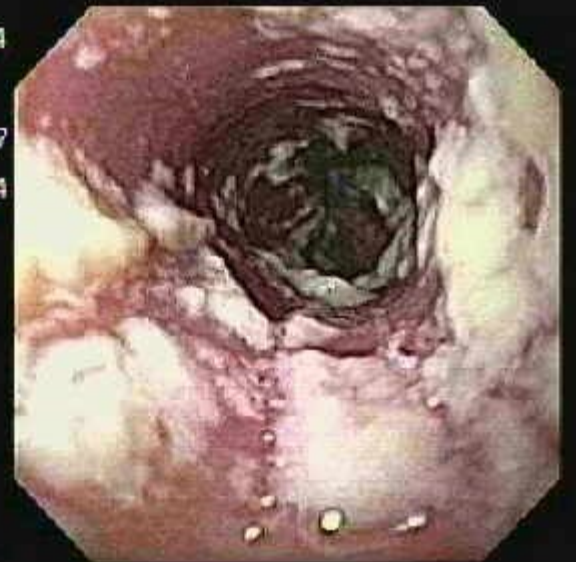


ASM MicrobeLibrary.org ©Wiedbrauk





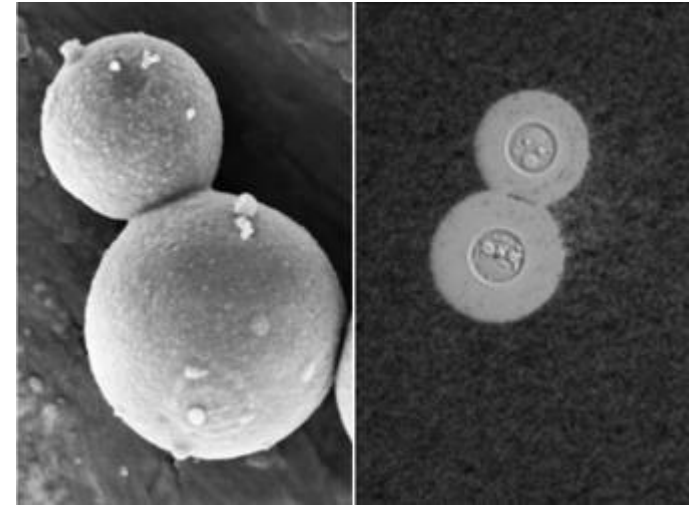
VE 3782004
I
F 27
01/09/1977
06/15/2004
09:29:52
CVP:
D, F:
Er:8 G:H



DR MURRA

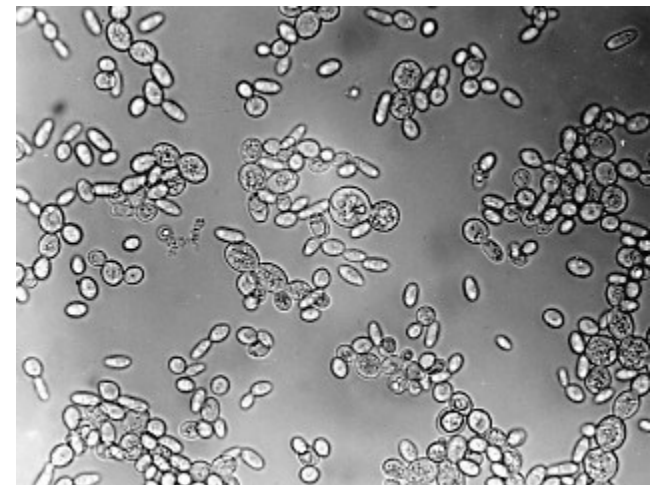
Cryptococcus neoformans

- U oslabených lidí může vyvolávat pneumonie, meningitidy a sepse



Saccharomyces cerevisiae

- Považoval se za nepatogenní, avšak některé studie ho uvádějí např. jako původce 8 % poševních mykóz



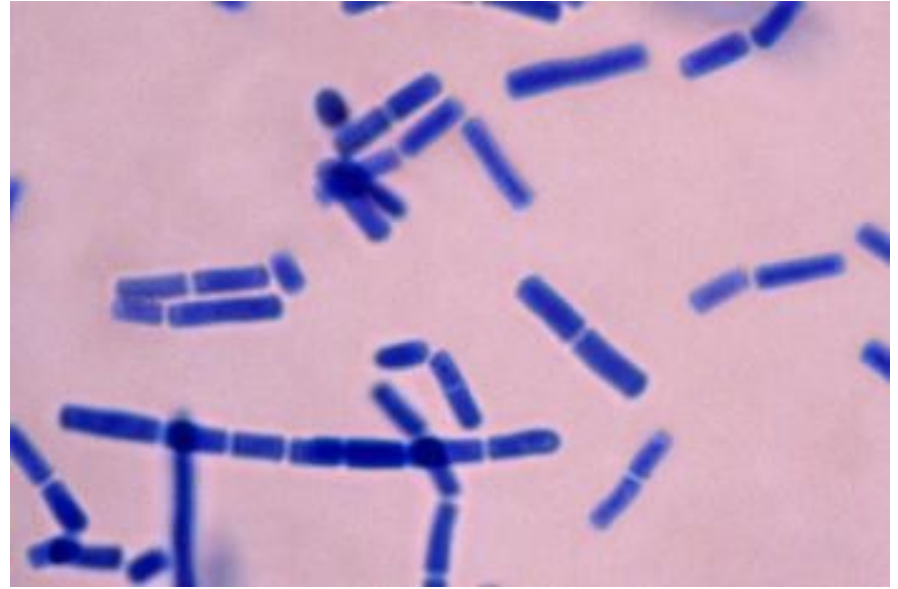
Malassezia furfur

Pityriasis versicolor

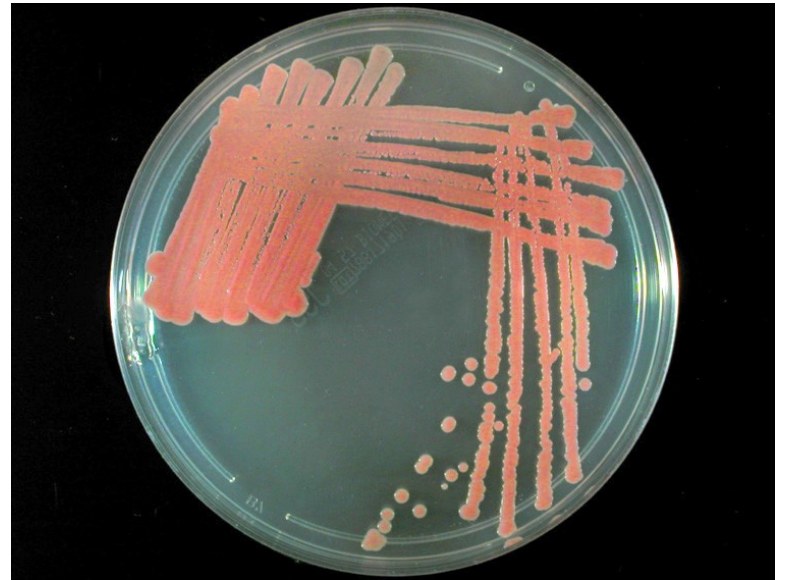


© Mayo Foundation for Medical Education and Research. All rights reserved.

Geotrichum candidum



Rhodotorula



Odběr a diagnostika u povrchových mykóz

- **Odběry:** šupiny z kůže, ústřížky nehtů, vlasů apod.; vždy je potřeba odebrat vzorek tak, aby bylo zachyceno místo, kde je zánět aktivní, a zároveň nezachytit kontaminace; doporučuje se i povrchová desinfekce (likvidace kontaminant z povrchu kůže)
- **Vlastní diagnostika:** mikroskopická (nález vláken ve tkáni) a kultivační. Mikroskopická je důležitější – vykultivovat lze i kontaminaci, ale epitelie, kterou prorůstá hyfa (v mikroskopu) je jasným důkazem skutečné infekce.

Diagnostika systémových mykóz

Kromě vlastní diagnostiky mykózy je třeba vždy vypátrat (pokud to není známo), co je primární příčinou (imunodeficit, diabetes, nádor apod.)

➤ Diagnostika:

- pro přímý průkaz jakýkoli relevantní materiál: krev na hemokultivaci, punktáty, excize apod.
- moderní metody umožňují např. přímý průkaz antigenů (manany, glukany) v krvi
- nepřímý průkaz – protilátky v séru (aspergily)

Diagnostika kandidóz

- Základem diagnostiky je **kultivace** (chromogenní půdy)
- Biochemické metody (využívají se vzájemné rozdíly v metabolismu mezi kandidami)
- **Mikroskopicky** v nativním preparátu, v Gramově či Giemsově či jiném barvení vidíme oválné buňky, často pučící, někdy tzv. pseudomycelia
- Lze i testovat **in vitro citlivost**, ale testy jsou méně spolehlivé než u bakterií

Úkol 1: Gramovo barvení K, L, M, N

- ▶ Gramovým barvením jasně odhalíme, co je kvasinka, a co (jaká) bakterie
- ▶ Pokud by šlo jen o odlišení kvasinek, stačil by nativní preparát či jednoduché barvení
- ▶ Pokud však mikrobiolog v praxi váhá např. mezi stafylokokem, kvasinkou a ještě gramnegativní nefermentující tyčinkou, použije Gramovo barvení
- ▶ Violet' 30 s, lugol 30 s, alkohol 15 (až 20) s, oplach vodou, safranin 60 s, oplach

Úkol 2a: Popis kolonií na krevním agaru. Popište kmeny K, L, M, N

- ▶ Přestože používáme pro houby speciální půdy, mnohé houby rostou i na bakteriologických půdách
- ▶ Některé, hlavně kandidy, volí rafinovaně podobu téměř nerozeznatelnou od kolonií bakteriálních
- ▶ Rozeznat kolonie kandid od kolonií stafylokoků je někdy obtížné. Pomoci může vůně (po chlebu či burčáku); když nepomůže nic jiného, volíme zpravidla nátěr (mikroskopii)

Úkol 2b: Selektivní půda – K, L, M, N

- ▶ Typická půda pro kvasinky, Sabouraudův agar, není sama o sobě selektivní a mohly by na ní růst i mnohé bakterie
- ▶ Pro kultivaci na mykoorganismy ovšem používáme Sabouraudův agar s antibiotiky, který růst bakterií téměř vylučuje

Chromogenní půdy

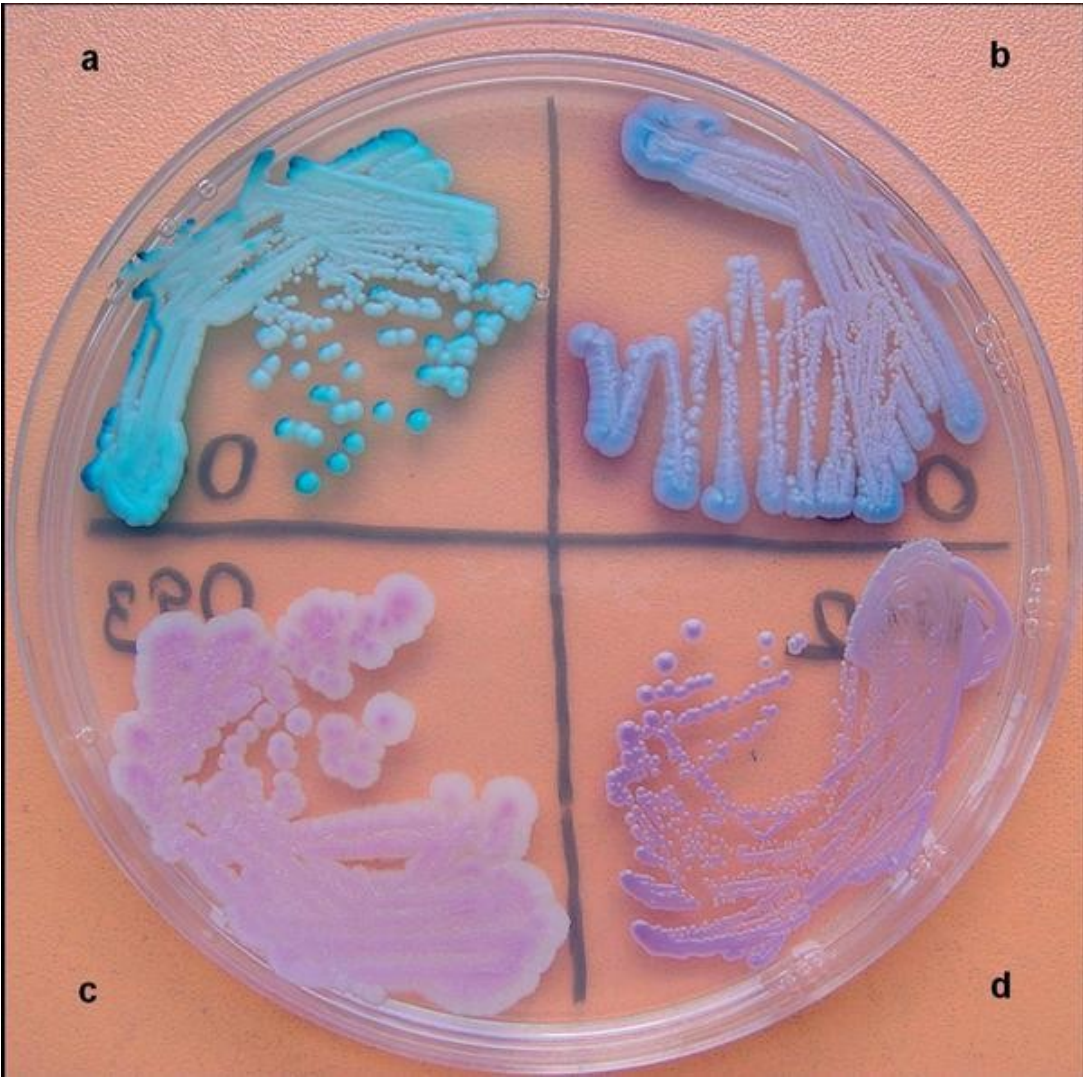
- ▶ CHROMOGENNÍ půdy obsahují látku, která je původně nebarevná (chromogen)
- ▶ Barevnost se objeví jen při specifické reakci (odštěpení substrátu)
- ▶ Půda může obsahovat více chromogenů s navázanými substráty specifickými pro různé bakterie nebo houby
- ▶ FLUOROGENNÍ půdy jsou principiálně podobné, ale s fluorescenčním barvivem

Úkol 2c: Chromogenní půda při diagnostice kandid

- ▶ Používají se různé chromogenní půdy. Některé odliší pouze *Candida albicans* od ostatních, jiné rozliší vzájemně několik druhů kandid
- ▶ Na půdě, kterou máme k dispozici, je *C. albicans* zelenavá, *C. tropicalis* modrá, *C. glabrata* hladká růžová a *C. krusei* drsná růžová
- ▶ Pokud se některý kmen nepodaří určit chromogenní půdou, musíme použít jiný způsob, např. biochemické určení, viz Úkol 3

C. albicans

C. tropicalis



C. krusei

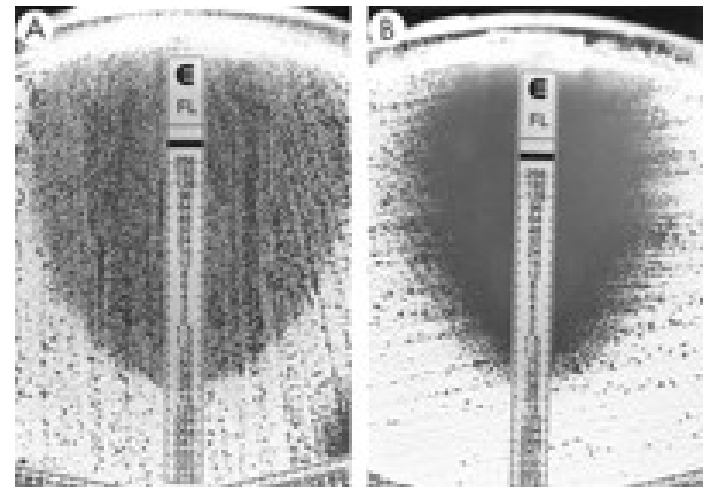
C. glabrata

Úkol 3: Biochemická identifikace kvasinek

- ▶ Tak jako bakterie, i kvasinky (ne však vláknité houby) se dají identifikovat biochemicky
- ▶ Pokuste se určit předložené kmeny pomocí přiloženého návodu a porovnáním s tabulkou
- ▶ Kromě testů POX a HEX je žlutá pozitivní, modrá negativní
- ▶ U testu HEX je žlutá pozitivní, bezbarvá negativní
- ▶ U testu POX je hnědá pozitivní, bezbarvá negativní
- ▶ „V“ = variabilní – může vyjít „+“ i „-“
- ▶ Pozor! Vyjdou tři možnosti výsledku, ALE:
 - *Candida albicans* to není, ta by byla zelená na chromagaru
 - *Rhodotorula glutinis* to také nebude, protože ta by byla pigmentovaná na Sabouraudově agaru
 - Je to tedy ta třetí možnost

Úkol 4: Difúzní diskový test citlivosti na antimikrobiální látky

- ▶ Všimněte si, že houby nekultivujeme na MH, ale na Sabouraudově agaru
- ▶ U amfotericinu B se za citlivý považuje i kmen, který má malou zónu, pokud uvnitř této zóny nejsou viditelné kolonie
- ▶ U ostatních antimykotik (těch, co končí na „-konazol“) naopak musí být zóna dost velká, ale připouští se i přítomnost „čehosi“ uvnitř zóny, pokud to „cosi“ svou intenzitou nepřesahuje 20 % intenzity růstu kolem zóny



Úkol 5: Mikroskopie vláknitých hub

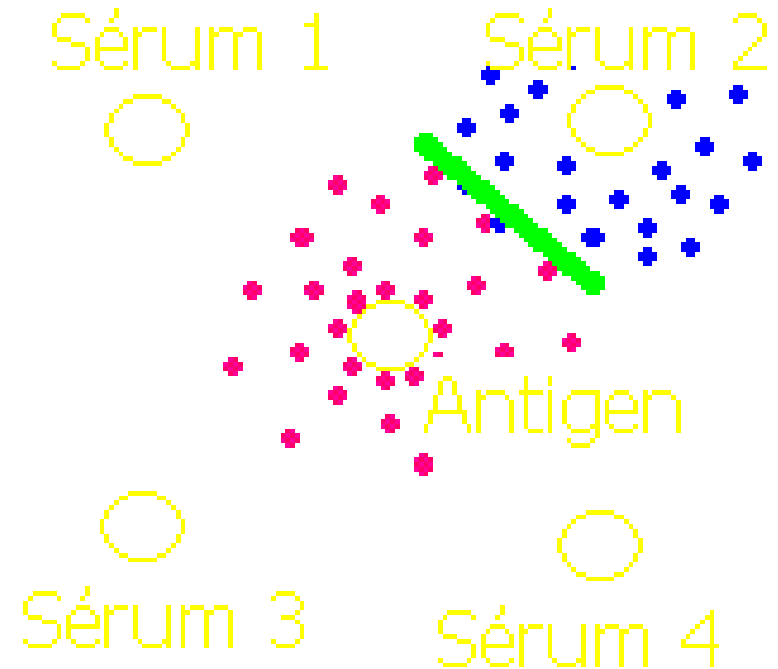
- ▶ Diagnostika vláknitých hub se poněkud liší od diagnostiky kvasinek i co se týče **mikroskopie**. Ta tu má větší význam než u kvasinek
- ▶ Lze pozorovat různé typy spor a konidií
- ▶ Prohlížejte bez imerze, objektivem zvětšujícím 4 či 10 , popřípadě 40 .

Úkol 6: Kultivace vláknitých hub

- ▶ **Vzhled výsledků kultivace** je u vláknitých hub oproti kvasinkám značně odlišný, jak na Sabouraudově agaru, tak případně i na agaru krevním
- ▶ **Zakreslete tři kmeny** (kultury na Sabouraudově agaru ve zkumavkách)
- ▶ *Některé z nich, zejména dermatofyty, rostou velmi pomalu. To kvůli nim se Sabouraudův agar nalévá do zkumavek*
- ▶ *Biochemické rozlišení se u nich, na rozdíl od kvasinek, zpravidla neuplatňuje*

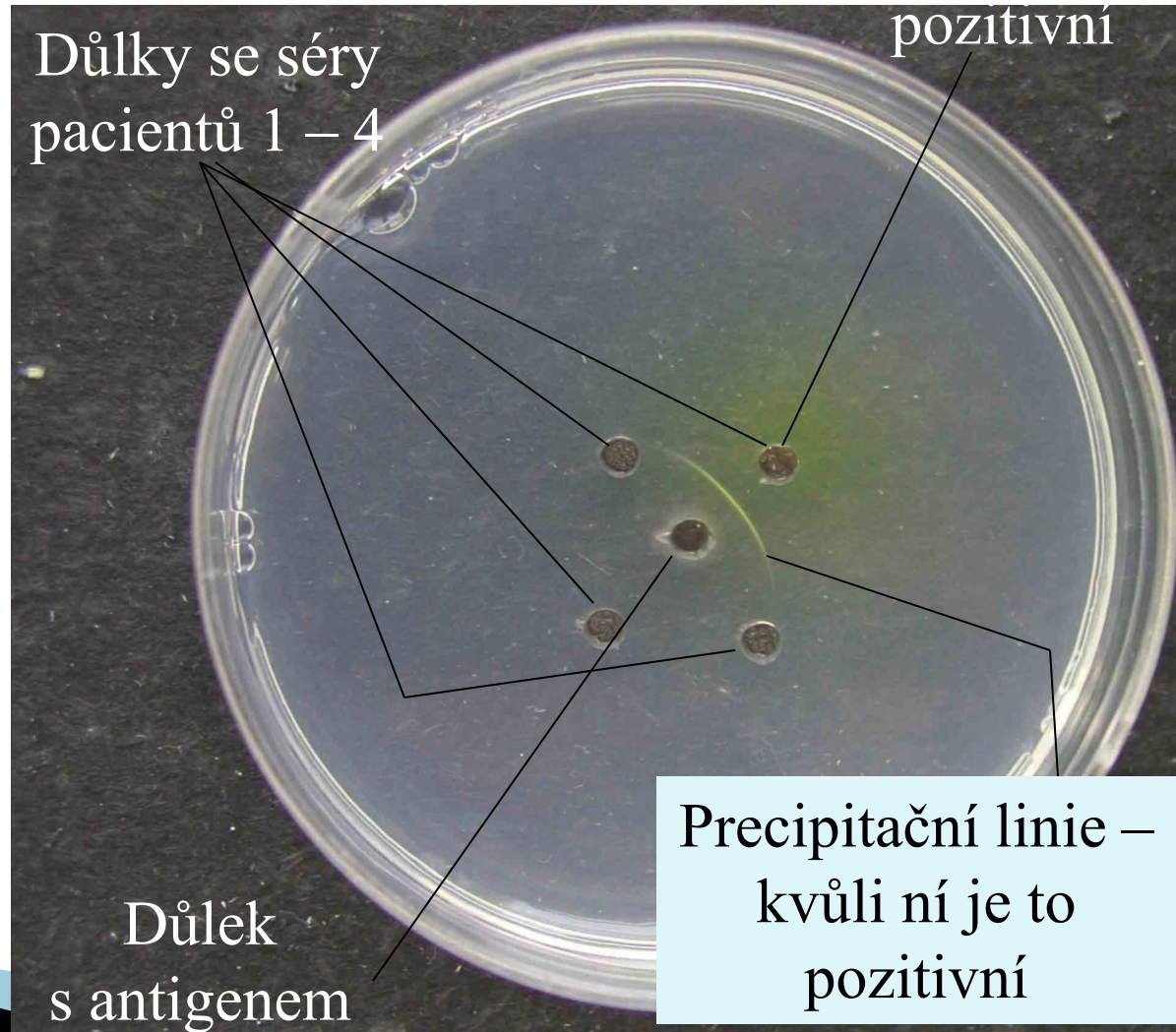
Úkol 7: Mikroprecipitace v agaru

- ▶ Z prostředního důlku difunduje antigen (červeně)
- ▶ Z pozitivního důlku se sérem číslo 2 difunduje protilátka (modře)
- ▶ Z negativních důlků (séra číslo 1, 3, 4) samozřejmě žádná protilátka nedifunduje
- ▶ V místě střetu antigenu s protilátkou vzniká precipitační linie (zeleně)



Nepřímý průkaz

Jednou z mnoha možností, jak jej provádět, je mikroprecipitace v agaru. Precipitační linie se tvoří mezi důlkem s antigenem a důlkem s protilátkou



Úkol 8: Odběr na dermatomykózy

- ▶ Prohlédněte si videoklip a запиšte si hlavní zásady odběru:
 - nezasílat pouze stěr, nýbrž šupiny (kousek nehtu, vlasu apod.)
 - provést povrchovou desinfekci
 - povrchovou vrstvu neposílat, nýbrž vyhodit
 - u plošných ložisek odebírat z okraje (zde je houba aktivní)