

J13

Základy klinické mykologie

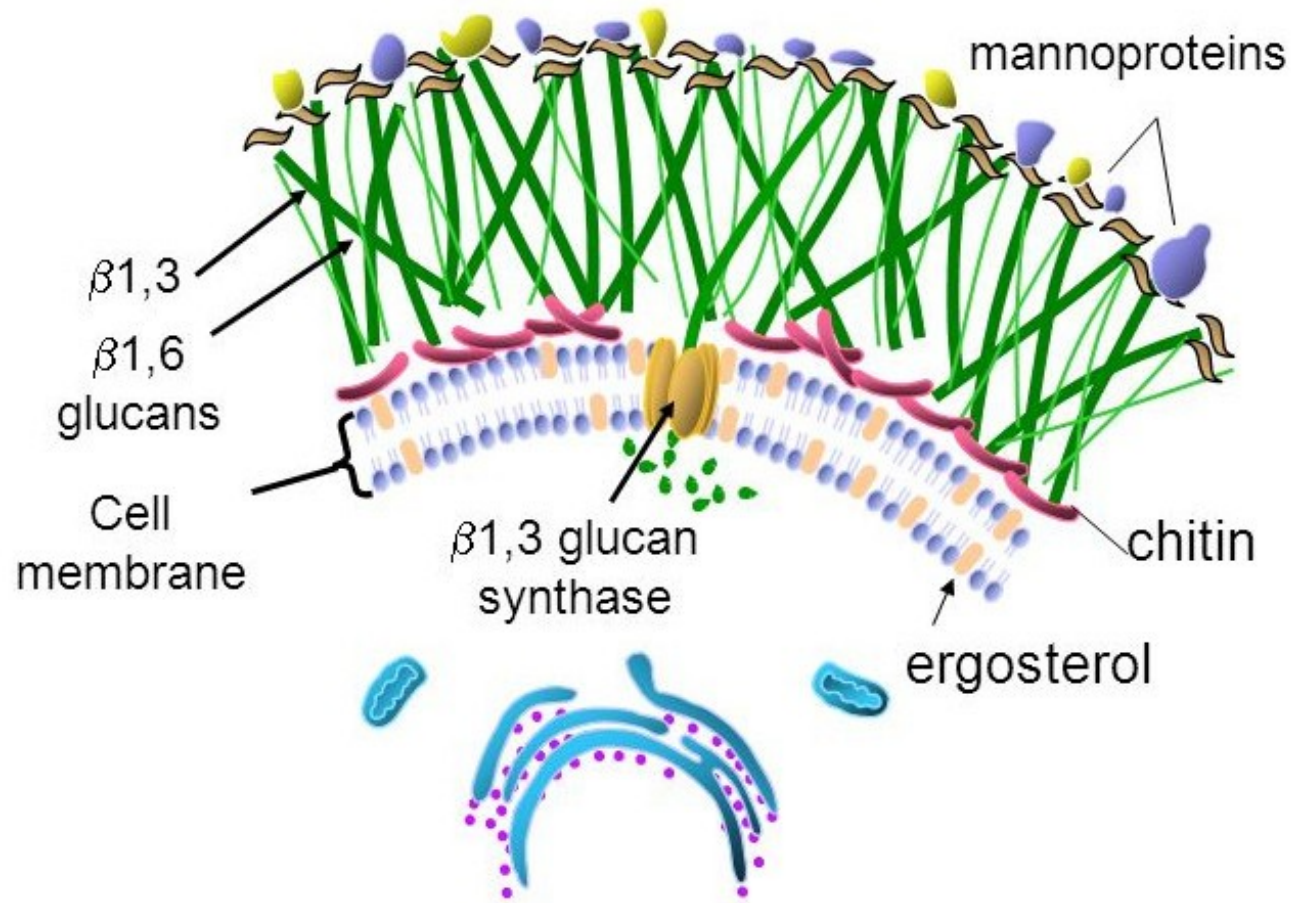
Osnova

- obecné vlastnosti hub
- morfologie a fyziologie mikromycet
- způsob odběru a zpracování mykologických vzorků
- diagnostika mykóz
- příklady povrchových a systémových mykóz

Obecné vlastnosti hub

- **eukaryota** (bakterie prokaryota)
- **buněčná stěna** obsahuje složité **polysacharidy a proteiny** (jiné než bakteriální stěna), obvykle **chitin**, chitosan, mannany, glukany apod. (význam pro **diagnostiku**)
- **steroidní látky** v plazmatické membráně (**ergosterol**, u člověka cholesterol), **cíl antimykotik**
- Gramovo barvení: „**grampozitivní**“ (tzn. fialové)
- pomalejší buněčný cyklus → **zdlouhavější kultivace i infekce**
- **střídání** pohlavního a nepohlavního **rozmnožování**
- **antimykotika** (antibiotika na ně obvykle nepůsobí)

Buněčná stěna hub

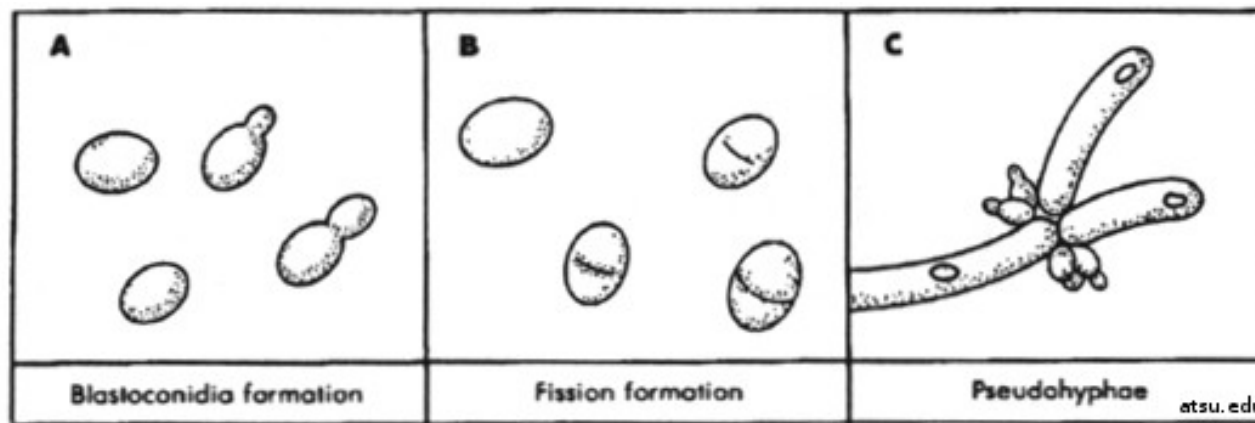


Atlas of fungal Infections, Richard Diamond Ed. 1999
Introduction to Medical Mycology. Merck and Co. 2001

slideplayer.com

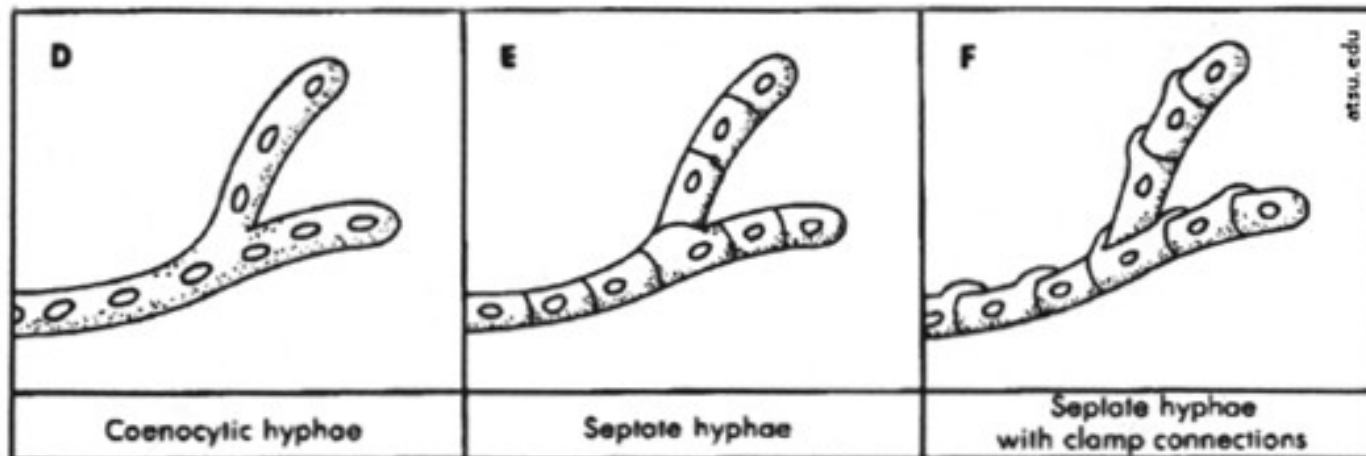
Morfologie mikromycet

- **blastokonidie**
 - **ovální nebo kulatá buňka**
 - charakteristická pro kvasinky
- **pseudohyfa**
 - protáhlý, vláknitý útvar připomínající hyfu, je však tvořen zřetěžením jednotlivých buněk
- **pseudomycelium** = soubor pseudohyf



Morfologie mikromycet (2)

- **hyfa**
 - **vlákno** (může být větvené, s přepážkami apod.)
- **mycelium** = soubor hyf
 - vegetativní (ukotvení houby do substrátu)
 - generativní (vzdušné) – nese rozmnožovací struktury

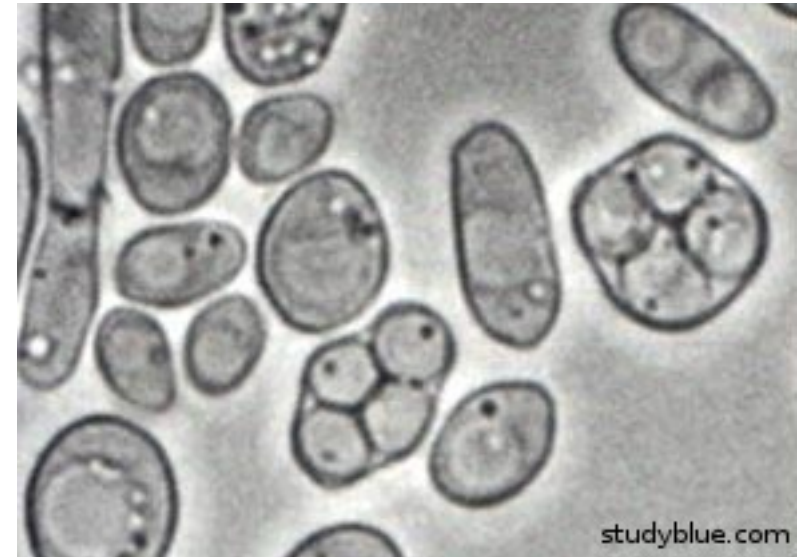
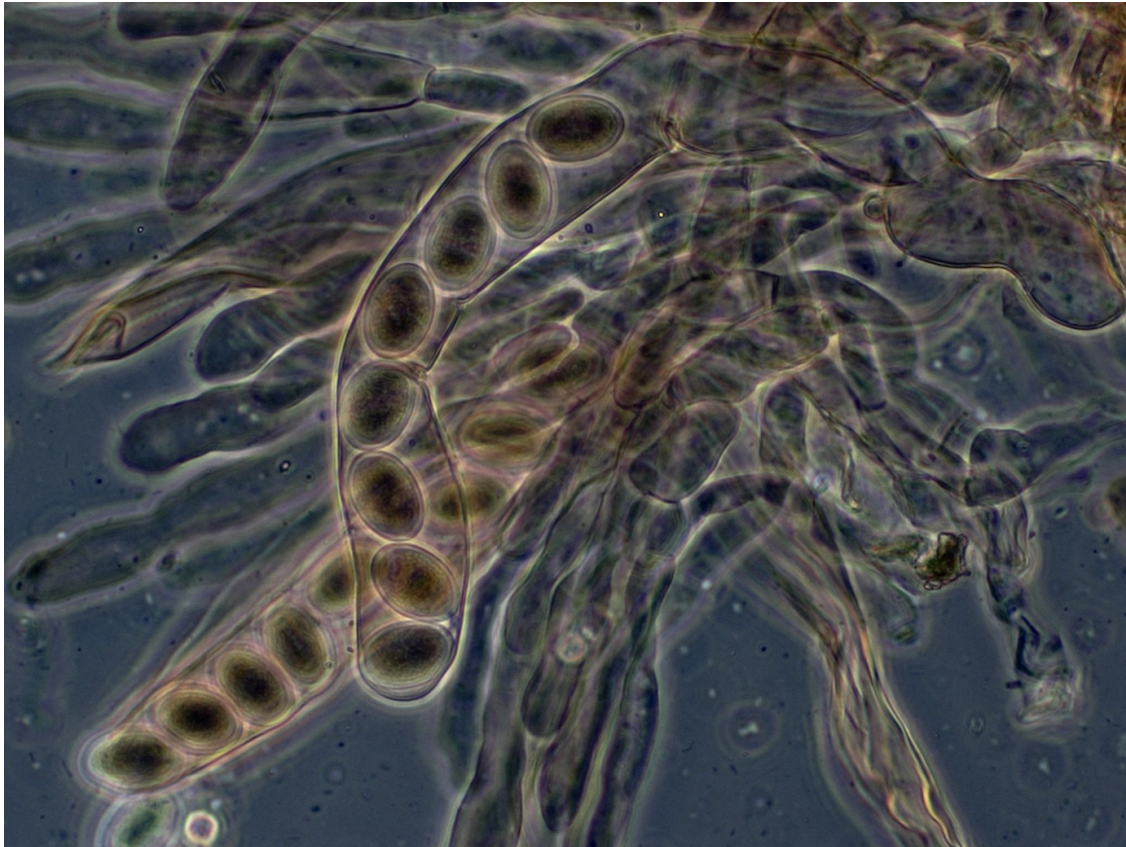


Rozmnožování mikromycet

- **pohlavní a nepohlavní rozmnožování**
- **pohlavní rozmnožovací elementy: spory**
 - **askospory** (váček se sudým počtem pohlavních buněk)
 - **oospory** (vznik splynutím velké samičí buňky a malé samčí buňky)
 - **zygospory** (splynutím dvou stejně velkých pohlavních buněk opačného pohlaví)
 - **spájení hyf** (zvláštní typ, přiložení samčího a samičího vlákna → vznik můstku → výměna genů)

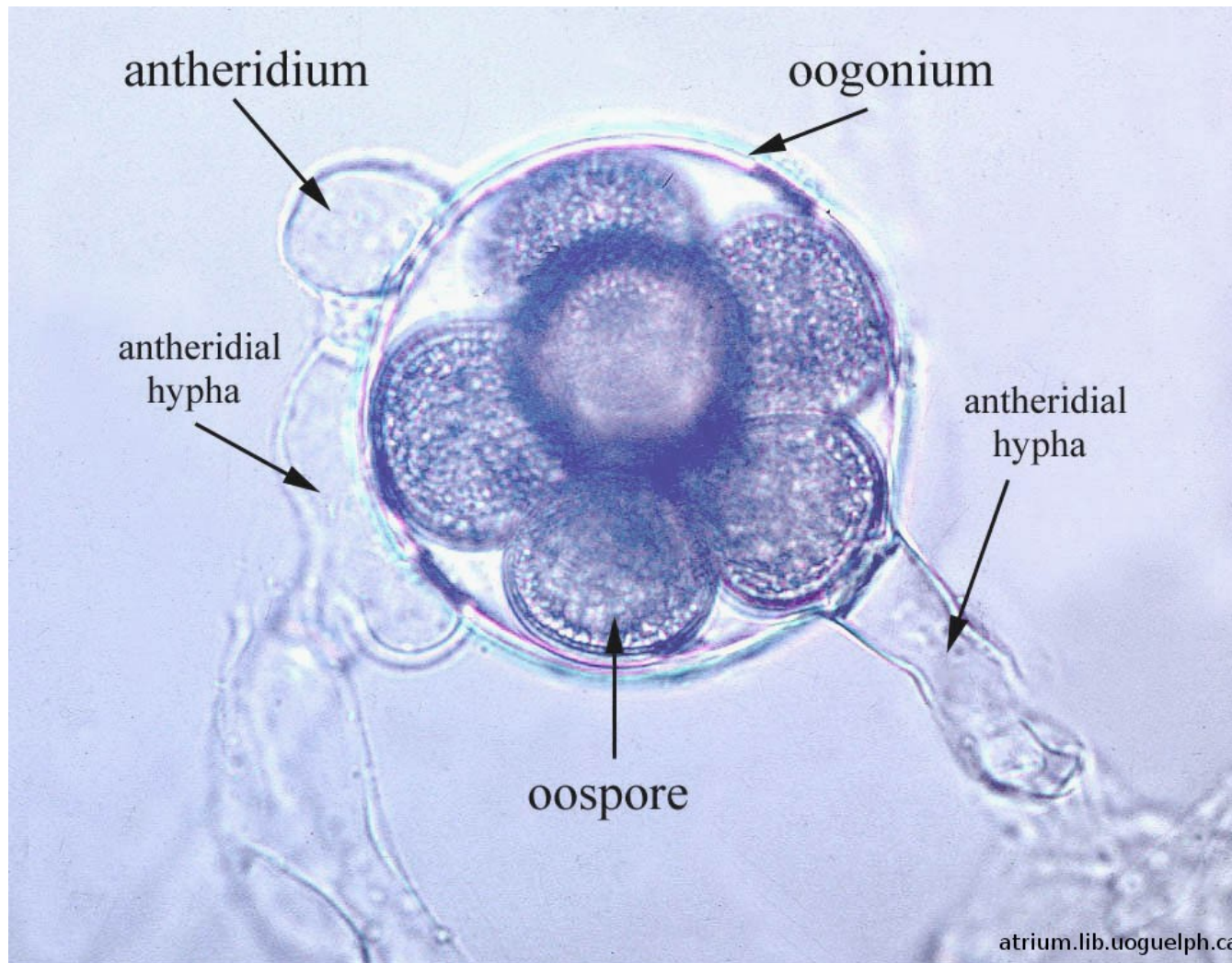
Rozmnožování mikromycet (2)

- **askospory v asku** (výtrusy ve vřecku) smrže a *Saccharomyces cerevisiae*



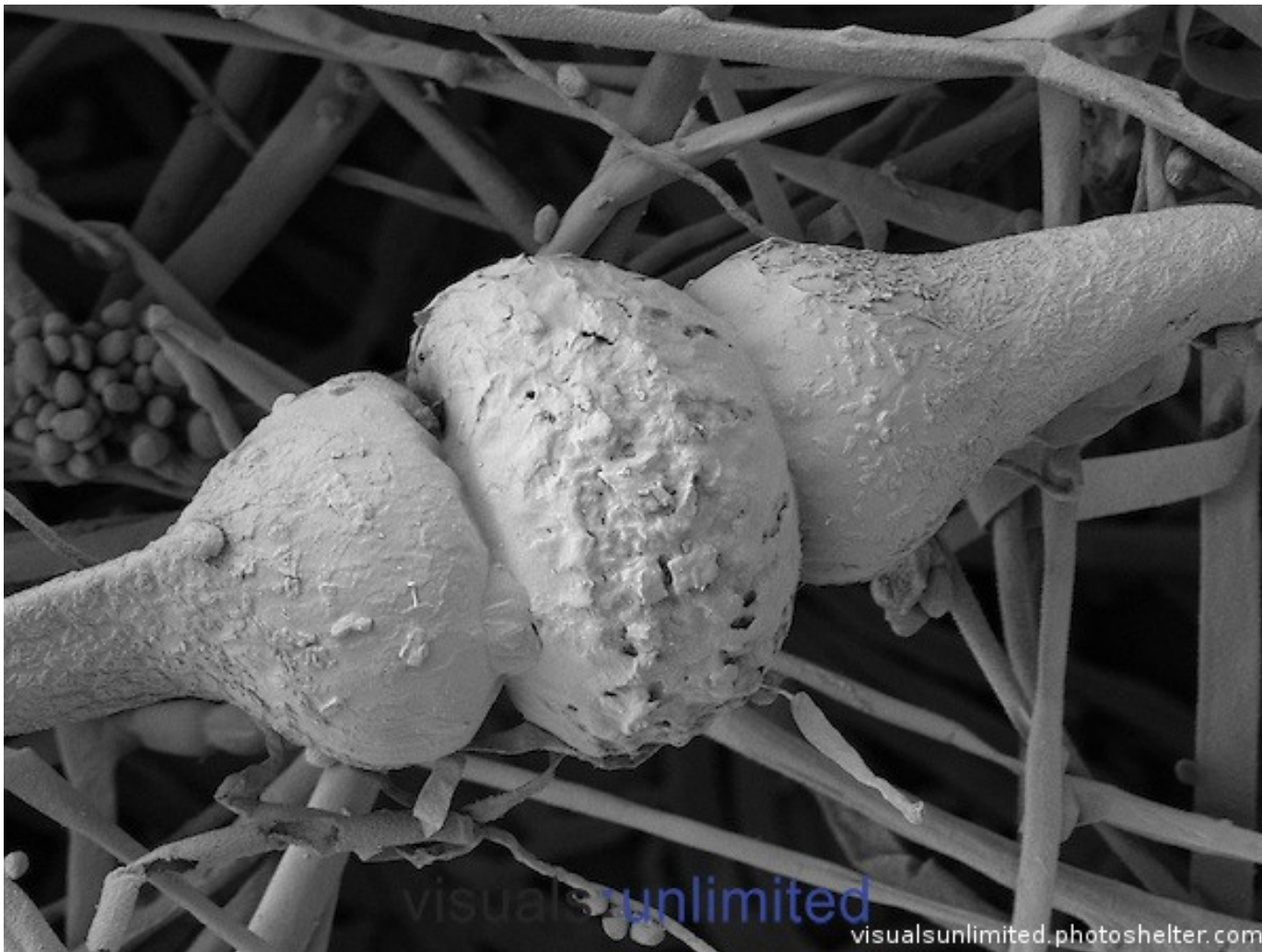
Rozmnožování mikromycet (3)

- oogonie s oosporami



Rozmnožování mikromycet (4)

- **zygospora** *Rhizopus sp.*

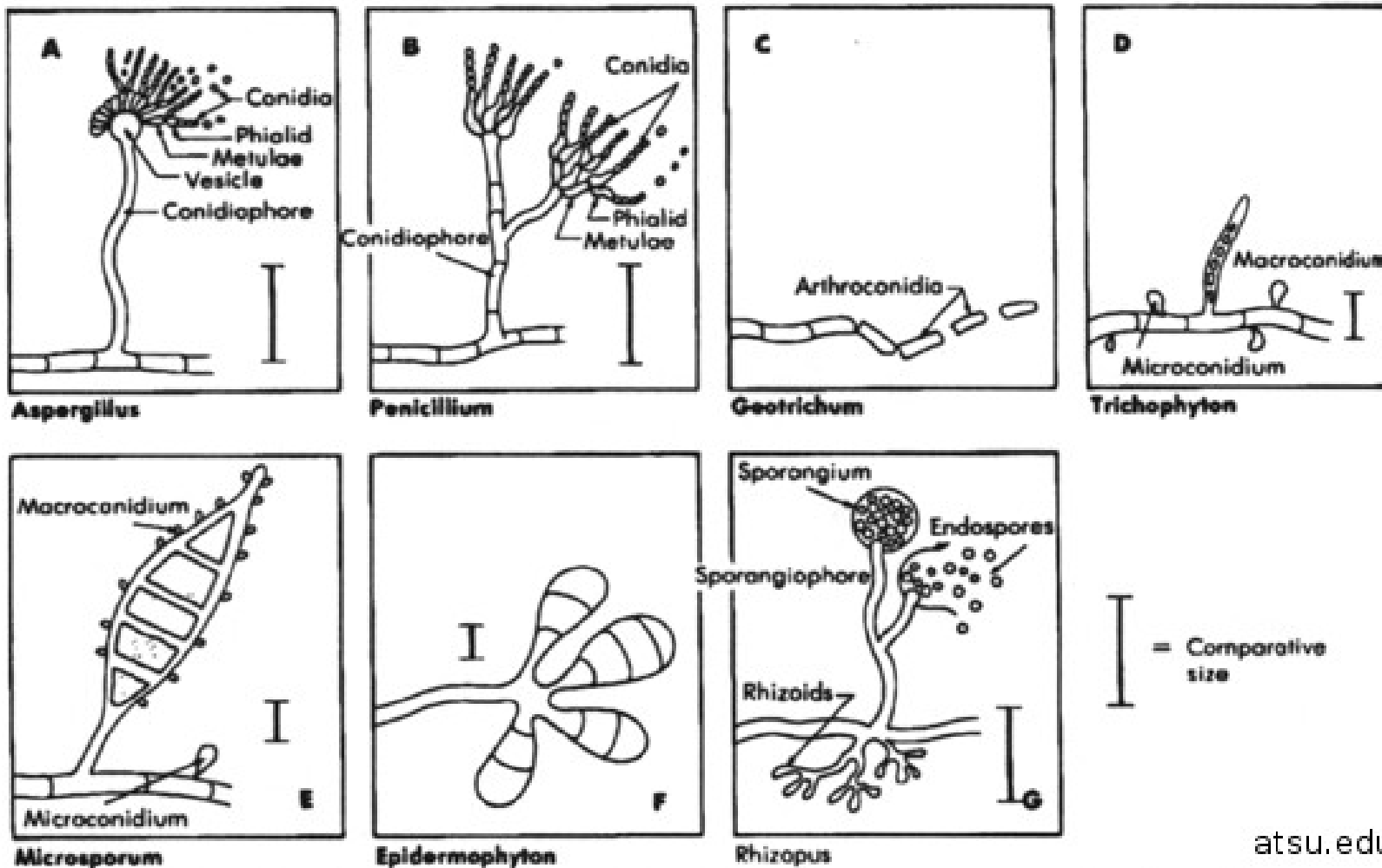


Rozmnožování mikromycet (5)

- **nepohlavní rozmnožování převládá**
- **nepohlavní rozmnožovací elementy: konidie**
 - **arthrokonidie** – oddělování koncových částí **hyf**
 - **blastokonidie** – oválné či kulaté buňky na koncích **pseudohyf**
 - **chlamydokonidie** – **silnostěnné útvary** kdekoli v průběhu či na konci hyf nebo pseudohyf
 - **mikroskonidie** – oválná, kulovitá či hruškovitá tělíška rozmístěná jednotlivě nebo ve svazečcích **kdekoliv v průběhu hyf**
 - **sporangiokonidie** = konidie v pouzdře
 - **makrokonidie** = konidie v pouzdře s přepážkami

Rozmnožování mikromycet (6)

- nepohlavní rozmnožovací elementy



Fyziologie mikromycet

- pomalejší buněčný cyklus → **zdlouhavější kultivace i infekce**
- rostou snadno i na chudých půdách
- **kultivace při nižší teplotě** (zpravidla **30 °C**) nebo souběžná kultivace při 22 °C a 37 °C (dimorfní houby)
- **Sabouradův agar** (s 2 – 4 % glukózy, **přídavkem ATB pro potlačení růstu bakterií** – nejčastěji chloamfenikol nebo amikacin+vankomycin)
- **pestrá biochemická aktivita:**
 - **auxanogram** (asimilace různých látek)
 - **zymogram** (štěpení cukrů)
- **antigenní struktury** pro přímou diagnostiku

Odběr a zpracování materiálu

- **krev, hnis, punktáty, sputum, výtěry** (systémové mykózy)
- **šupiny kůže, nehtů, vlasty, chlupy** (povrchové mykózy)
 - doporučena povrchová **dezinfekce**
 - **odběr z okraje ložiska** (větší životaschopnost původce)
 - **vlasý a chlupy** zasílat i s kořenovými **váčky**
 - z **nehtů** posílat **seškraby** nikoliv celé nehty
 - **nedoporučuje se vkládat do transportních médií** (vysoké nároky dermatofytů na kyslík)
 - **kandidy transportní půdy** (FungiQuick, C.A.T.)

Diagnostika mykóz

- **největší význam má mikroskopie**
 - **rychlé výsledky**, odlišení mykóz od bakteriálních infekcí
 - **preparáty nativní** (projasnění louhem – KOH)
 - **preparáty barvené**
 - inkoust Parker (barví buněčné stěny mikromicet tmavě modře až černě)
 - barvení dle Grama nebo Giemsy
 - barvení Ryluxem (fluorescenční barvení, buněčné stěny září žlutozeleně)

Diagnostika mykóz (2)

- **kultivace:**
 - **při nižší teplotě** (zpravidla **30 °C**) nebo souběžná kultivace při 22 °C a 37 °C (dimorfní houby)
 - **Sabouradův agar** (s 2 – 4 % glukózy, **přídavkem ATB pro potlačení růstu bakterií** – nejčastěji chloamfenikol nebo amikacin+vankomycin)
 - **dlouhá doba růstu** → **kultivace v uzavřených zkumavkách** (kvůli vyschnutí)
 - **krátká doba růstu** → kultivace na misce (kandidy), možné využití **chromogenních půd**
- **přímý průkaz antigenů** (mannany)
- **nepřímý průkaz protilátek** (aspergily)

Třídění mikromycet dle morfologie

- **kvasinkovité mikromycety:**
 - **blastokonidie** (někdy pseudohyfy, chlamydokonidie)
 - *Candida sp.*, *Cryptococcus neoformans*, *Malassezia furfur*, *Rhodotorula rubra*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Pneumocystis jiroveci*, ...
- **dimorfní mikromycety:**
 - za nižší teploty (do 30 °C) rostou ve vláknité formě, při 35–37 °C kvasinkovitá forma
 - *Histoplasma capsulatum*, *Coccidioides immitis*, *Blastomyces dermatitis*, ...
- **vláknité mikromycety:** *Aspergillus sp.*, *Penicilium sp.*, *Rhizopus sp.*, *Mucor sp.*, *Epidermophyton sp.*, ...

Chorobné stavy vyvolávané mikromycetami

- **mykózy**
 - **pravá infekční onemocnění, nejrozšířenější**
 - **povrchové** či superficiální (kůže a její adnexa a sliznice)
 - dermatofytózy, pityriasis versicolor, kožní kandidózy...
 - **hluboké** či viscerální (orgánové či systémové)
 - aspergilóza, kandidóza, kryptokokóza, ...
- **mykotoxikózy** (toxické metabolity)
- **mykoalergózy** (přecitlivělost na houby, metabolity)
- **mycetismy** (dráždění mechanicky → útlakem tkání)

Povrchové mykózy

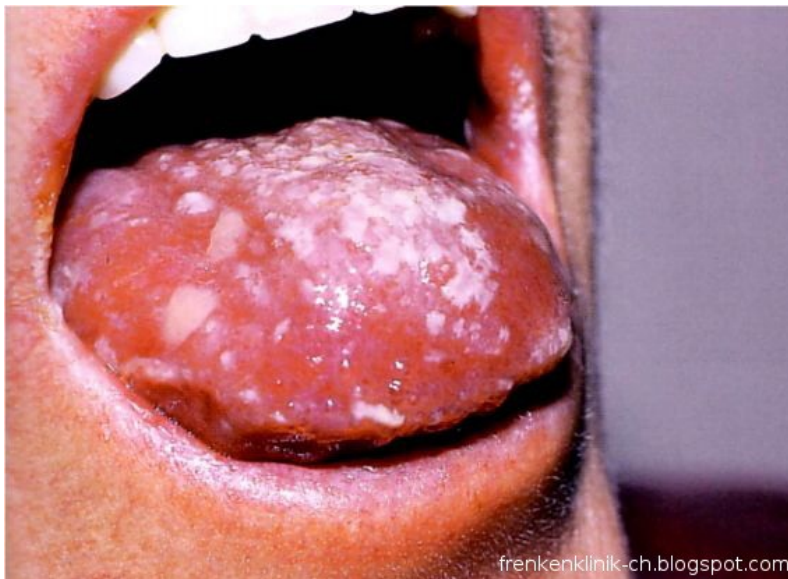
- **mikromycety se množí jen v keratinových vrstvách** kůže a jejích adnex
- **dermatofyta** nejvýznamnější (rody *Trichophyton*, *Epidermophyton* a *Microsporum*)
- **tinea** = infekce kůže dermatofyty
 - názvy podle lokalizace (*tinea capitis*, *tinea corporis*, *tinea pedis*)
- **diagnostika: seškraby** → mikroskopie, kultivace
- **léčba**: zpravidla **lokální** (krémy, roztoky);
u onychomykóz případně velkých kožních ložisek léčba po dobu několika týdnů až měsíců

Candida albicans

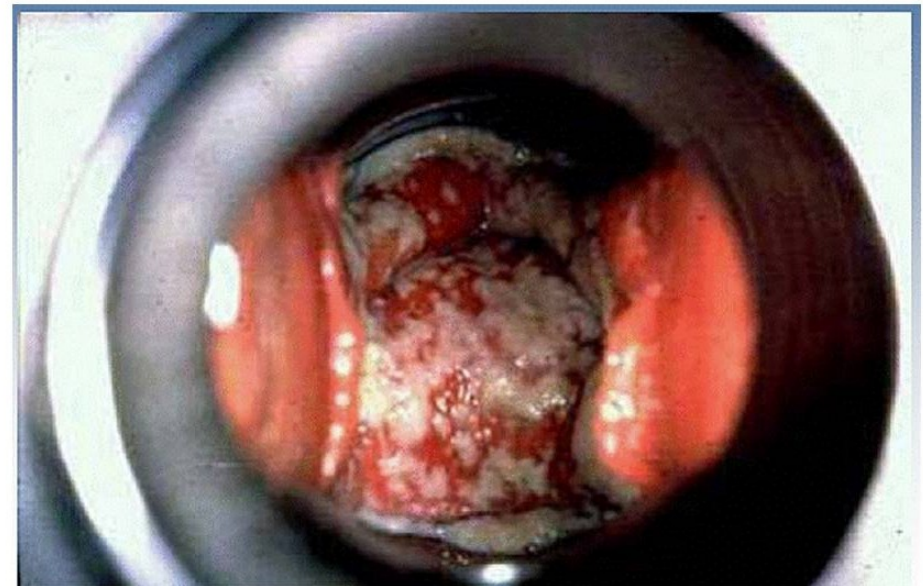
- **nejběžnější** z klinicky významných kvasinek
- saprofyté na kůži, v dutině ústní, ve vagíně či ve střevě člověka (střevo jako rezervoár opakující se infekce!)
- **postihuje především kůži a sliznice**, hluboké infekce u oslabených (cystitida, pyelonefritida, meningitida, ...)
- **kandidy** se uplatňují **jako patogeny**:
 - u **novorozenců** a nedonošených dětí
 - za **hormonálních změn** (těhotenství, diabetes mellitus)
 - déle **trvajících ATB** léčba (porušení přirozené mikroflóry)
 - **oslabení odolnosti** (imunoprese, terminální stádia)
 - **posušení bariér** (chirurgie, kanyly, katetry)

Candida albicans (2)

- nejčastější projevy:
 - **soor** (moučnivka) – bílý povlak na jazyku nebo sliznici tváří a patra; děti do dvou let
 - **vulvovaginitis candidosa**– zarudlá sliznice, otok vulvy, silné svědění, bělavé povlaky a výtok; infekce z konečníku



frenkenlinik-ch.blogspot.com



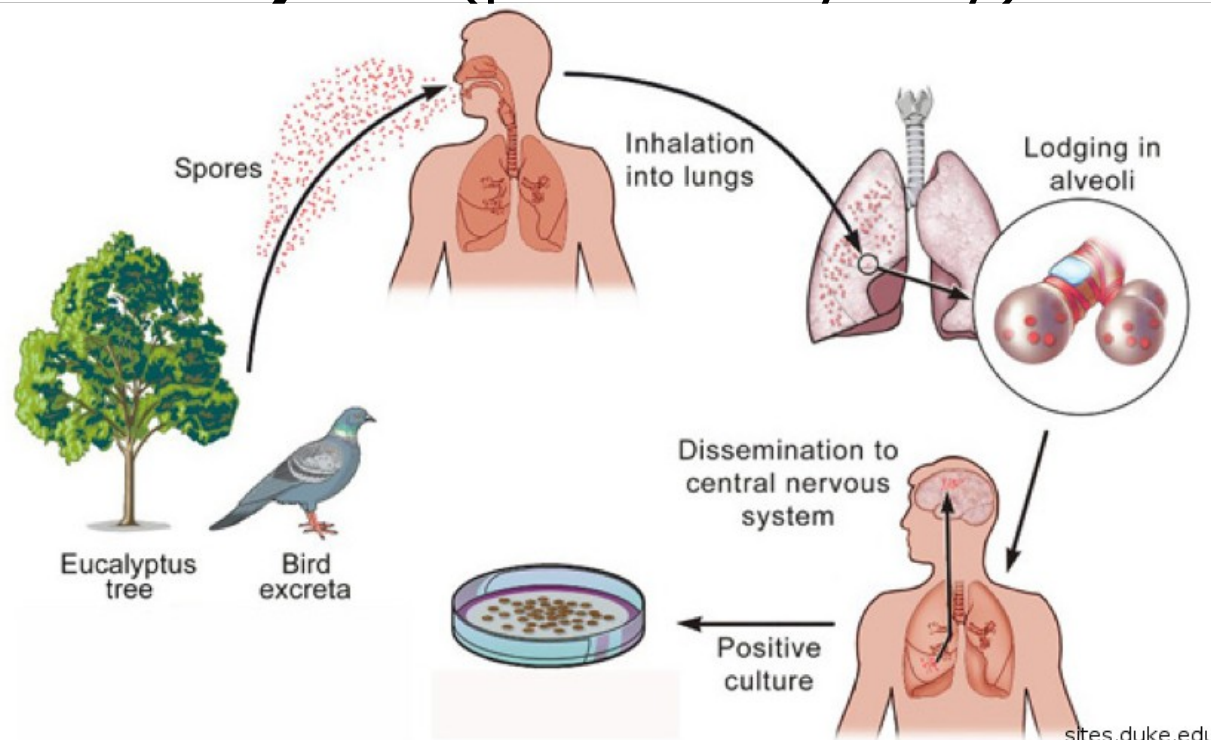
Vaginitis por *Cándida albicans*

Ostatní kandidy

- ***C. tropicalis*** (infekce střev, koplitidy, respirační infekce)
- ***C. parapsilosis*** (paronychia, endokarditidy, ...)
- ***C. glabrata*** (urogenitální infekce)
- ***C. krusei*** (imunokompromitovaní, hematologické malignity)
- *C. dubliniensis, C. lipolytica, C. kefyr, C. lusitaniae, ...*

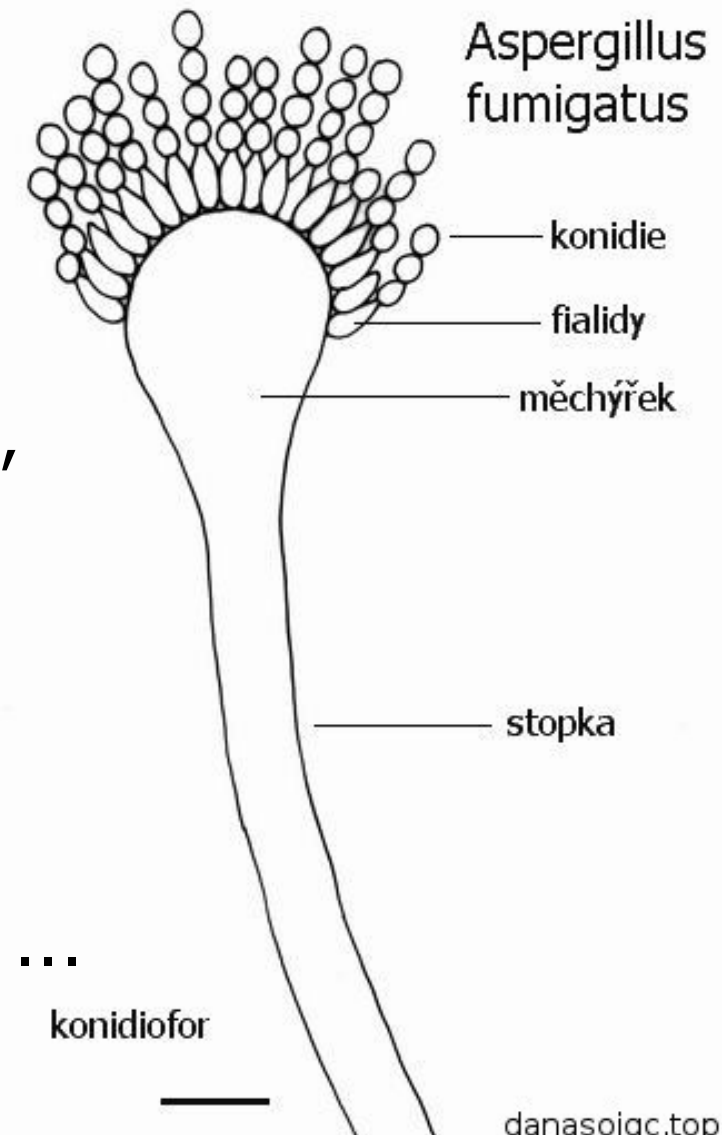
Ostatní kvasinkovité organismy

- ***Cryptococcus neoformans*** (ptačí výkaly; u oslabených pneumonie, meningitidy a sepse)
- ***Pneumocystis jiroveci*** (pneumocystová pneumonie u nedonošených dětí a imunokompromitovaných)
- rod ***Saccharomyces*** (poševní mykózy)



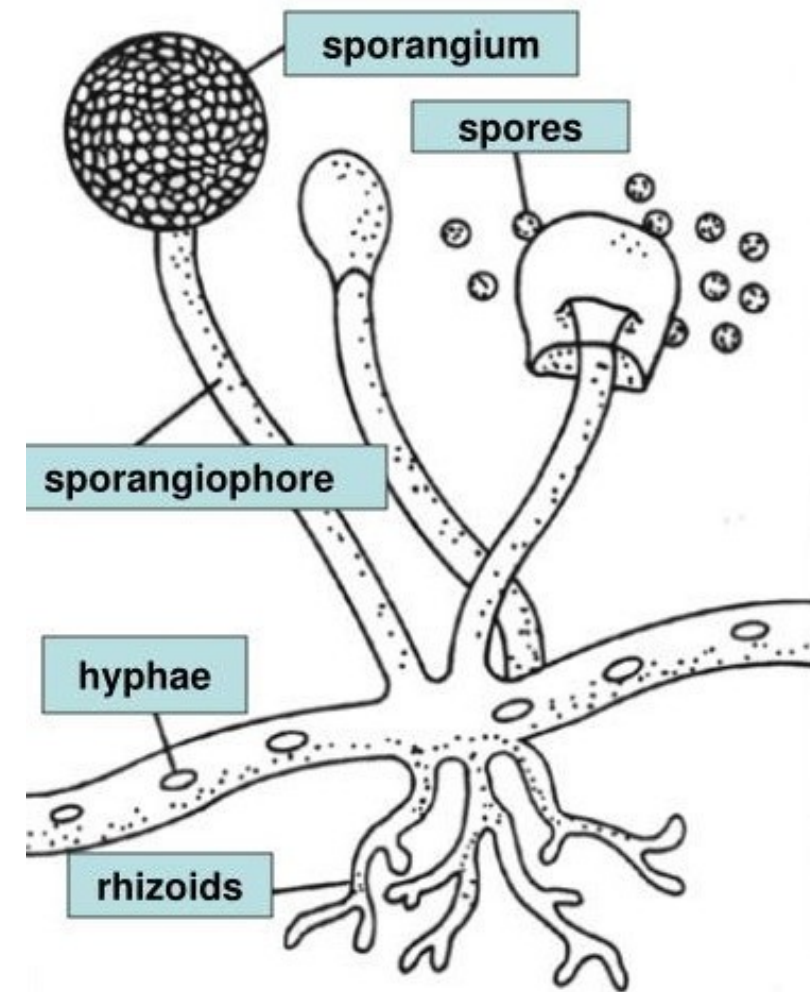
Rod *Aspergillus*

- **rychle rostoucí** mikromycety
- septované **hyfy zakončené konidiofory** s výběžky (fialidy) nesoucí **řetízky konidií**
- **systemové mykózy** (endokarditidy, plicní aspergilóza, abscesy, ...)
- **povrchové mykózy** (onychomykózy, otomykózy, ...)
- **alergie, mykotoxiny** (aflatoxin)
- ***A. fumigatus*, *A. niger*, *A. flavus*, ...**



Zygomycety

- saprofyté, **závažné systémové mykózy**
- rychlý **růst ve stěnách velkých cév** → vytvoření „živého“ trombu → embolie → smrt
- **rhinocerebrální** (z nosní dutiny do mozku už za několik hodin) a **pulmonární zygomykózy**, **infekce těžkých popálenin**, **sepse**
- rody *Mucor*, *Rhizopus*, *Absidia*, ...



Rhizopus stolonifer

suggest-keywords.com

Úkol 1: Mikroskopie kmenů bakterií a kvasinek

- **obarvěte** předložené kmeny **Gramovým barvením** (krytalová violet → Lugolův roztok → alkohol → oplach vodou → safranin)
- použijte **imerzní mikroskopii** (tj. objektiv 100x)
- **všimněte si rozdílů ve velikosti, tvaru a barvě**

Úkol 2: Kultivace bakterií a kvasinek

- popište kolonie daných kmenů na **krevním agaru**
- zhodnoťte růst na **Sabouraudově agaru s chloramfenikolem**
- zhodnoťte růst na **chromogenní půdě**:
 - chromogenní půdy pro kvasinky umožňují **rozlišení** nejdůležitějších **druhů rodu *Candida***
 - pomocí kontrolních kmenů **se pokuste určit druh kandidy** pomocí chromogenní půdy
 - jsou-li **kolonie bílé** (není tedy přítomno žádné barvivo), znamená to, že kmen touto chromogenní půdou **nelze určit**

Úkol 2: Kultivace bakterií a kvasinek (2)

- **chromogenní půda:**
 - **bezbarvý chromogen (substrát + chromofor)**
 - při **odštěpení substrátu** z chromogenu dojde ke specifickému **zbarvení** podle druhu mikroorganismu
 - na půdě, kterou máme k dispozici:
 - ***C. albicans*** zelenavá
 - ***C. tropicalis*** modrá
 - ***C. glabrata*** hladká růžová
 - ***C. krusei*** drsná růžová
 - pokud se druh **nepodaří určit (bílé zbarvení)** použijeme **jiné metody**
- **fluorogenní půdy (fluorescenční barviva)**

Úkol 2: Kultivace bakterií a kvasinek (3)



C. albicans



C. glabrata



C. tropicalis



C. krusei

Úkol 3: Identifikace zbylého kmene kvasinky

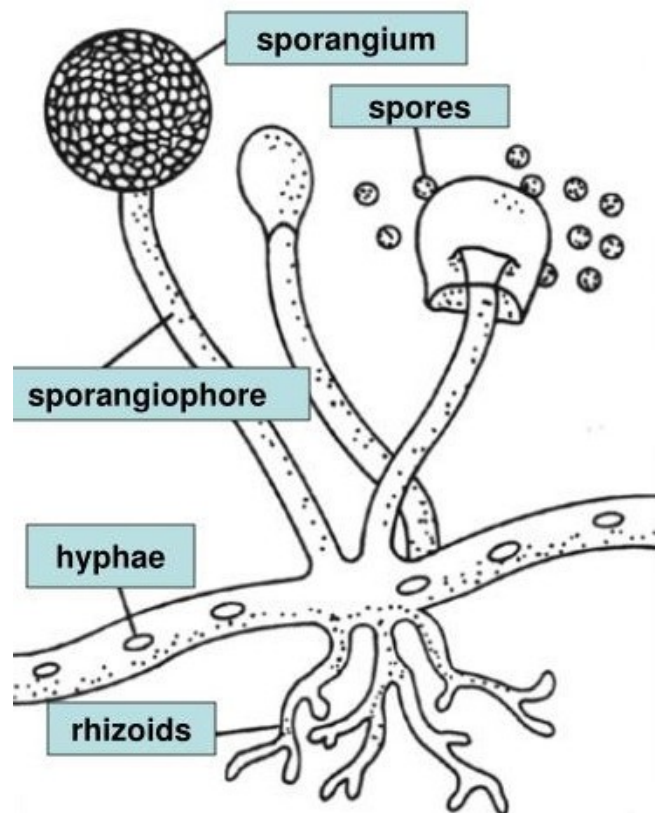
- **odečtěte výsledek auxacoloru** u kmene, který se nepodařilo identifikovat chromogenní půdou a **porovnejte výsledek s identifikací pomocí MALDI**
- kromě testů POX a ACT je **žlutá pozitivní, modrá negativní**
- **test ACT je žlutá pozitivní, bezbarvá negativní**
- **testu POX je hnědá pozitivní, bezbarvá negativní**
- **„V“ = variabilní – může vyjít „+“ i „-“**
- nepočítá se kód, **výsledek se porovnává s tabulkou**
- pokud vyjde více taxonů:
 - ***C. albicans*** by byla v úkolu 2c **zelená**
 - ***Rhodotorula*** by v úkolu 2b měla **červený pigment**

Úkol 4: Určení citlivosti na antimikrobiální látky

- **určete citlivosti na antimykotika a antibiotika**
- mikromycety se kultivují na MH agaru s methylenovou modří
- **v prvním kroku** se rutinně vyšetřuje citlivost pouze na **flukonazol**
- v případě rezistence se testuje citlivost na další antimykotika

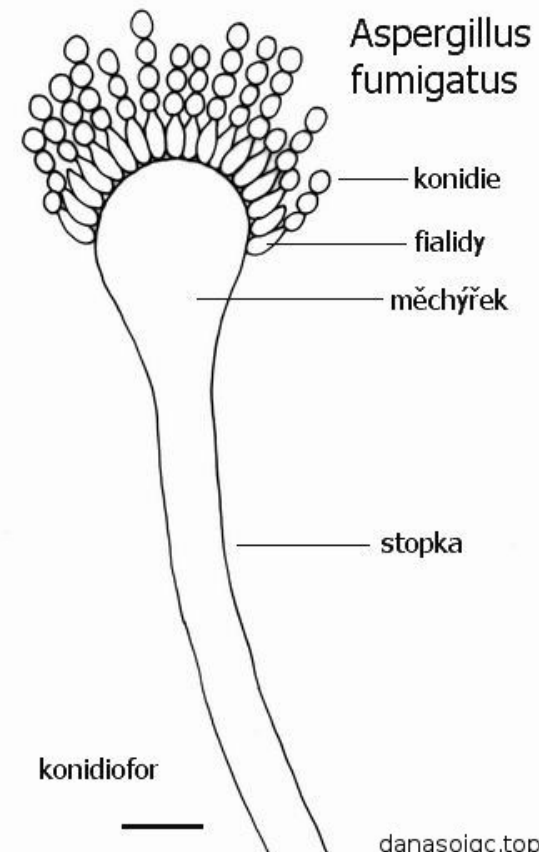
Úkol 5: Mikroskopie plísní

- **nativní preparát**, zvětšení objektivu 4× až 40× (bez imerze!)
- **zakreslete a popište předložené druhy mikromycet**



Rhizopus stolonifer

suggest-keywords.com



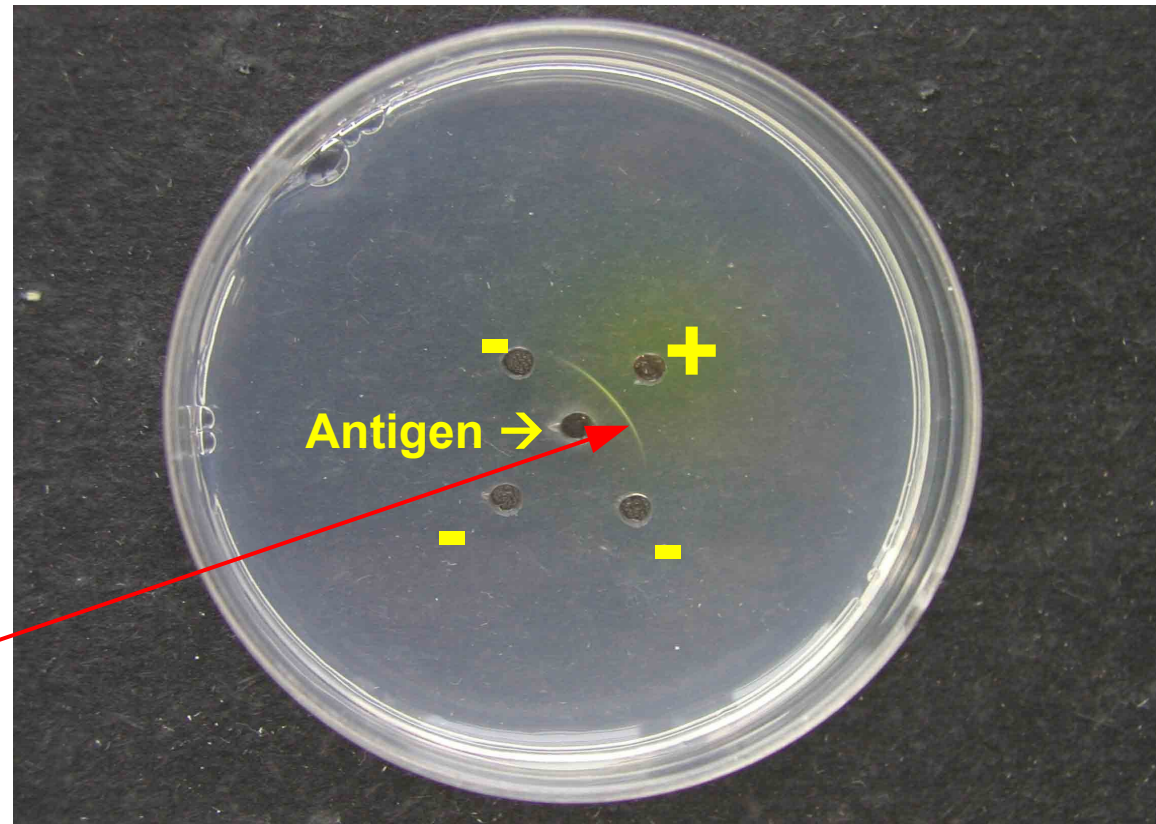
danasoigc.top

Úkol 6: Kultivace plísní

- **popište vzhled výsledků** kultivace vláknitých mikromycet (oproti kvasinkám značně odlišný), jak na Sabouraudově agaru, případně i na krevním agaru
- **zakreslete tři kmeny** (kultury na Sabouraudově agaru ve zkumavkách)
- některé z mikromycet (zejména dermatofyty), **rostou velmi pomalu** → **Sabouraudův agar** nalévá **do zkumavek** (kvůli vyschnutí)
- **biochemické rozlišení** se u nich, na rozdíl od kvasinek, **zpravidla neuplatňuje**

Úkol 7: Nepřímá diagnostika aspergilózy

- **zakreslete výsledek a označte pozitivní a negativní pacienty**
- mikroprecipitace v agaru dle Ouchterlonyho
- do důlku uprostřed je nalita tekutina obsahující antigen
- Ag difunduje agarem, obsahuje-li sérum Ab, difundují proti němu a na jejich styku vznikne **precipitační linie**



Úkol 8: Přímá detekce mananu v diagnostice systémové kandidózy

- **testování pomocí reakce ELISA**
- **umožňuje stanovit hladinu mananu v pg/mL**
- pro vyhodnocení výsledku **sestavujeme kalibrační křivku**
 - **vyznačíme hodnoty absorbance kalibrátorů, spojíme je liniemi**
 - **zaneste hodnoty pozitivní a negativní kontroly a vzorky pacientů**
 - **odečtete množství mananu v séru a interpretujte**

Úkol 9: Odběr na mykózy

- **prohlédněte si video** „Odběr materiálu na povrchové mykózy“ a **zapište hlavní zásady odběru** u kožních mykóz:
 - nezasílat pouze stěr, nýbrž **šupiny z ložiska** (stěr by mohl stačit u kandidóz)
 - provést **povrchovou desinfekci**
 - **povrchovou vrstvu neposílat**, nýbrž vyhodit a poslat až další vrstvu
 - u plošných ložisek **odebírat z okraje** (zde je mikromyceta aktivní)

Po tomto cvičení byste měli umět:

- rozeznat od sebe bakterie a mikromycety (jak kvasinkové formy, tak vláknité)
- popsat zpracování mykologických vzorků mykologickou laboratoří
- popsat jaké metody jsou využívány pro diagnostiku mikromycet
- popsat hlavní zástupce způsobující povrchové i hluboké mykózy