

Patogenní kvasinky



Kvasinkové patogeny

Candida
Cryptococcus
Malassezia
Trichosporon
Rhodotorula

Hansenula
Torulopsis
Geotrichum
Saccharomyces

- 70 – 90 % onemocnění kvasinkami jsou kandidózy
- počet druhů působících jako etiologické agens a účastnících se patologických procesů u člověka, se zvyšuje
- Většina kvasinkových druhů je nepatogenní, patogenními se stávají v podmínkách poruch imunitní odpovědi

Přehled onemocnění způsobených patogenními houbami

Aspergillosis (Aspergillus sp.)

Blastomycosis (Blastomyces sp.)

Candidiasis (Invasive) (Candida sp.)

Coccidioidomycosis

Cryptococcosis (Cryptococcus sp.)

Histoplasmosis (Histoplasma caps)

Mucormycosis (Mucor)

Paracoccidioidomycosis

Sporotrichosis (Sporothrix schenckii)

➤ Mykózy:

- primární
- oportunní (u imunokompromitovaných pacientů – AIDS, leukémie, diabetes, popáleniny, terapie kortikosteroidy, imunosupresivy)
- Systémové – plíce, játra, srdce, mozek, slezina
- Lokální – kůže, ústní dutina, vagina aj

➤ forma a závažnost infekce závisí na:

- infekčním agens (druh, množství)
- způsobu a bráně infekce
- stavu imunitního systému hostitele

- endogenní infekce (autoinfekce) zdrojem jsou komenzálové člověka – při porušení homeostázy, vnímavosti a rezistence
- povrchové mykózy – nakažlivé

Některé mykózy mají charakteristickou geografickou distribuci:

Coccidioidomycosis: jihozápad USA a severní Mexiko

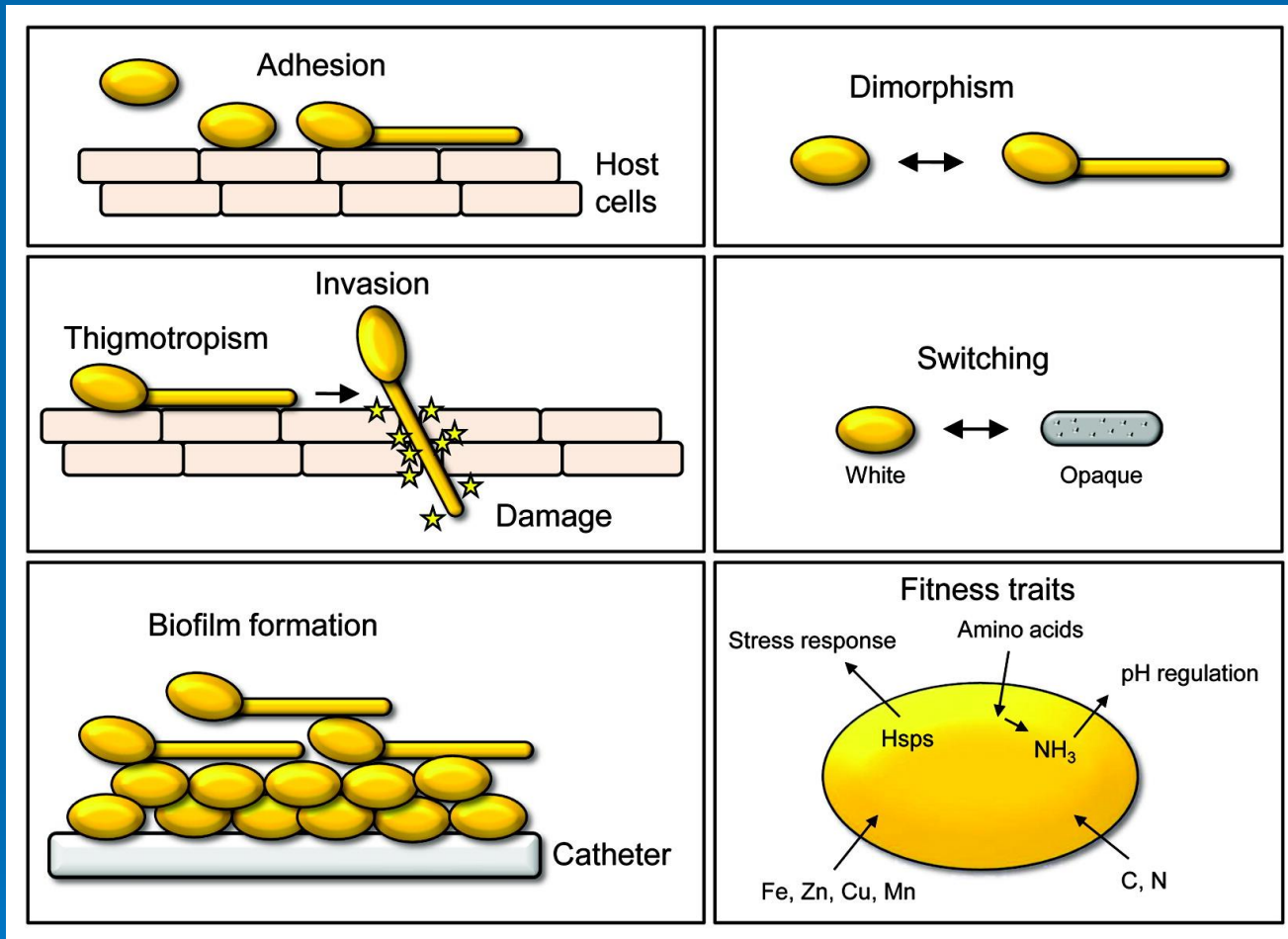
Histoplasmosis: jižní oblasti USA

Blastomycosis: USA a Afrika

Paracoccidioidomycosis: Jižní Amerika

Sporotrichosis: Střední Amerika, Mexiko

Mechanismus patogenicity



Sekretované houbové hydrolázy napomáhají invazi do tkání

Tvorba biofilmu chrání kvasinky

Switching (změna exprese genů, hyfální růst) napomáhá modulovat antigenicitu

Diagnostika:

- kombinace klinického pozorování a laboratorního vyšetření
- Laboratorní vyšetření:
 - mikroskopický průkaz
 - kultivační průkaz
 - sérologické metody

Mikroskopický průkaz

povrchové mykózy - šupinky kůže, části nehtů, seškrab kštice s vlasovými kořínky a kožními šupinami

kandidóza – stěry sliznic

systemové infekce – vzorky tkání z více míst

přímá mikroskopie:

- ve vlhkých preparátech po natrávení tkáně 10-20% hydroxidem draselným
- infekce sliznic – Gramovo barvení
- morfologie buněk

histologické vyšetření

kultivace

- většina kvasinek snadno kultivovatelná
- Sabouraudův agar
(glukóza, sladidlový agar, hydrolyzát kaseinu + chloramfenikol nebo gentamycin)
- Czapek – Doksův agar a jiné

- současně při 25 – 30°C a 37°C
- doba kultivace 1 – 5 dnů



C. albicans

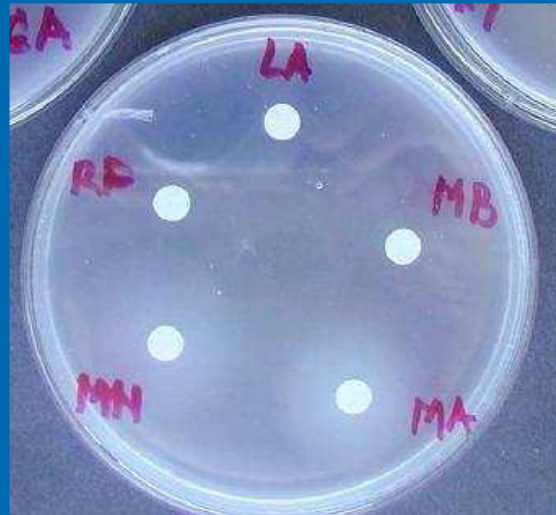


C. glabrata



Levné ale pracné a časově náročné

auxanogram – test na asimilaci cukrů a dusíkatých látek (zdroj C), provádí se na miskách (použití cukerných disků)



zymogram – test na zkvašování cukrů, provádí se v skumavkách anebo v mikrotitračních destičce (barevná změna acidobazického indikátoru)

Komerční testy

rychlé dostupné identifikační soupravy

jamky obsahují dehydratované substráty (cukry, organické kyseliny, aminokyseliny), test na stanovení citlivosti k cykloheximidu a jeden kolorimetrický test (eskulin)

Nárůst kvasinky v jednotlivých jamkách lze hodnotit buď vizuálně nebo pomocí automatického čtecího zařízení



Test ID32 C (BioMerieux, Francie)

Další testy: pH indikátor, chromogenní média

sérologie

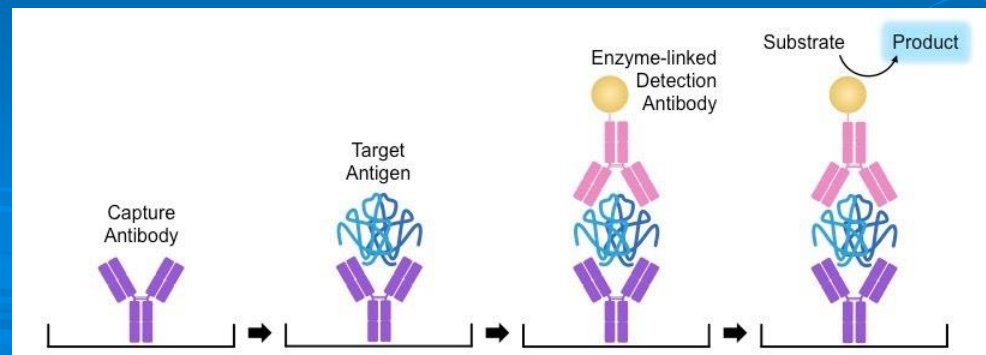
Průkaz specifických protilátek:
(protilátková odpověď slabá)

Protilátky proti kandidám jsou často přítomny i u zdravých osob, protože každý jedinec se během svého života setká s kvasinkami

Dojde-li však k rychlému vzestupu titru protilátek, svědčí to o přítomnosti kandidové infekce

Průkaz antigenu: detekci hlavního glykoproteinu buněčné stěny
kandid – mananu, systémové kandidózy

ELISA: imunoenzymatická metoda



Antimykotika:

kvasinky - eukaryontní buňky – běžná antibakteriální antibiotika jsou neúčinná

Terčové struktury antimykotik:

buněčná stěna (glukan, manoproteiny, chitin)

plasmatická membrána (místo cholesterolu obsahuje ergosterol)

cytoskelet (kvasinky neobsahují intermediální filamenta)

RNA (narušení syntézy bílkovin)

Antimykotika → toxický účinek na hostitele

- **Příklady antimykotik**

- **perorálně:** ketokonazol, terbinafin

- **parenterálně:**

 - amfotericin B, mikonazol...

 - (malá vstřebatelnost z trávicího ústrojí)

- **parenterálně i perorálně:**

 - flukonazol, itrakonazol, flucytozin...

azolové deriváty

a) 2-nitroimidazoly :

klotrimazol

mikonazol

ketokonazol

b) triazoly :

itrakonazol (kandidózy, kryptokokózy)

flukonazol (perorálně – kryptokoková

meningitida)

- existuje primární i získaná rezistence
k azolovým sloučeninám

kyselina benzoová

(Whitfieldova mast) – povrchové mykózy

polyeny

– toxické, ukládají se v nově tvořeném keratinu

nystatin (kandidózy)

amfotericin B (kandidózy, kryptokokózy)

griseofulvin – proti dermatofytům

imidazoly

kyselina nalidixová

fluoropyrimidiny

kandicidin

kombinace antimykotik

Chemická skupina Antimykotikum	Mechanismus účinku
Polyenová antibiotika Amfotericin B Nystatin	fungicidní účinek in vitro; vazba na ergosterol v cytoplazmatické membráně, vznik pórů, únik iontů a bílkovin (enzymů) a přesun jiných molekul do buňky
Azolové deriváty Imidazoly Mikonazol Ketokonazol Triazoly 1. generace Flukonazol Itrakonazol Triazoly 2. generace Vorikonazol Posakonazol Ravukonazol	převážně fungistatický účinek celé skupiny (cidní účinek vorikonazolu na aspergily), společný mechanismus účinku, blokáda enzymatických systémů závislých na cytochromu P450 (inhibice 14- α -demetylázy); inhibice syntézy ergosterolu, poškození funkčnosti plazmatické membrány, zpomalení až zástava růstu
Antimetabolity Flucytosin (5FC)	vstup 5-FC do buněk pomocí membránové cytosin-permeázy; deaminace na 5-fluorouracil; zabudování jako falešný prekurzor do RNA houby na místo cytosinu; blokáda proteosyntézy a thymidylát syntetázy (inhibice syntézy DNA)

Echinokandiny Kaspofungin Anidulafungin Mikafungin	inhibitory buněčné stěny hub (specifické nekompetitivní inhibitory β -(1,3)-glukan syntázy); deplece β -(1,3)-glukanu a osmotická destabilizace buněčné stěny houby
Allylaminy Terbinafin Naftifin	specifická vazba na skvalen epoxidázu; inhibice biosyntézy ergosterolu
Thiokarbamáty Tolnaftát Tolciclát	specifická vazba na skvalen epoxidázu; inhibice biosyntézy ergosterolu
Morfoliny Amorolfin	specifickou vazba na Δ^{14} reduktázu/ Δ^7 - Δ^8 izomerázu, inhibice biosyntézy ergosterolu
Benzofurany Griseofulvin	interference s mitotickým vřeténkem, inhibice mitózy a poškození syntézy nukleových kyselin

Povrchové mykózy

Povrchová kandidóza:

- postižení kůže, nehtů, sliznic úst a pochvy (infekce sliznic – „moučnivka“)
- 80 – 90% *Candida albicans*, zbývající případy další druhy (*C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata*...)
- 20% lidské populace – *C. albicans* součást komensální flóry pokožky a sliznic
- výskyt závisí na stavu organismu – bakteriální či virová infekce, těhotenství, aj

Candida albicans - Corn
meal agar, MMBC-UTMB



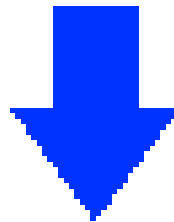
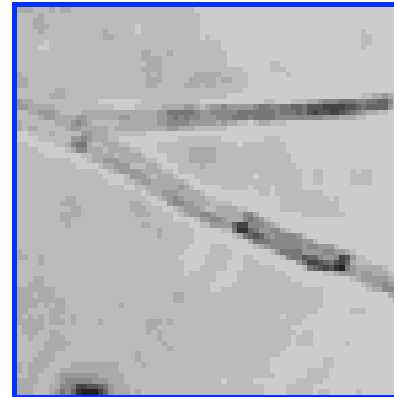
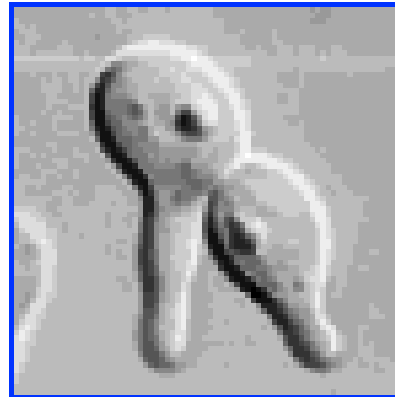
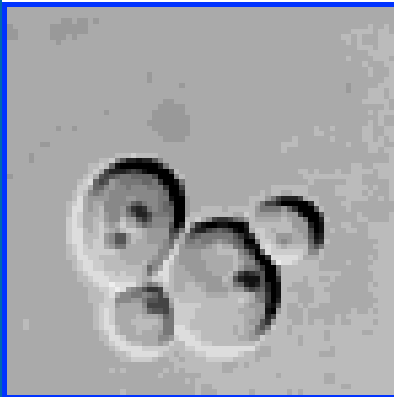
25°C

Yeast
Levures

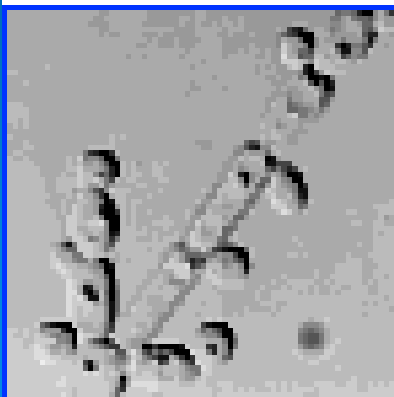
37°C



Hypha
Hyphes



37°C



Pseudohyphae
Pseudohyphes



Candida albicans
Sabouraudův agar



Identifikace:

- **Sabouraudův glukózový agar** – kvasinková fáze (oválné buňky, 3-8 μm), kolonie za 1-2 dny při 25°C
- **in vivo** – směs kvasinkových buněk, pseudomycelia a pravého mycelia
- **po obarvení dle Grama: grampozitivní** oválné pučící buňky

- ***Candida albicans*** – tvorba charakteristických klíčků (po 90–120 minutách inkubace v séru při 37°C)
- další identifikace: soupravy, testy fermentace a utilizace cukrů a zdrojů dusíku

Léčení:

- **lokální terapie** nystatinem, amfotericinem B, mikonazolem
- **vaginální kandidóza** – azolové deriváty, azolové poševní čípky u recidivujících případů

infekce sliznic:

- nejčastější povrchové kandidózy
- na sliznici ohraničené bílé skvrny, mohou splývat a vytvářet pseudomembrány (tvarohový vzhled)
- **infekce dutiny ústní:**
 - bukální sliznice, tvrdé patro, okolí bílých skvrn zarudlé
 - kojenci, staré osoby, osoby se sníženou imunitou (AIDS)
 - umělý chrup – infekce pod protézou

infekce kůže a nehtů:

- v tříslech, mezi prsty, v podpažní jamce, pod prsy (v místech vlhké zapáčky)
- postižení nehtu a nehtového lůžka – při častém máčení rukou (ošetřovatelky, myčky nádobí)



Mykotické plaky na zubech

Původce: většinou *Candida albicans*, souvislost se stravovacími návyky



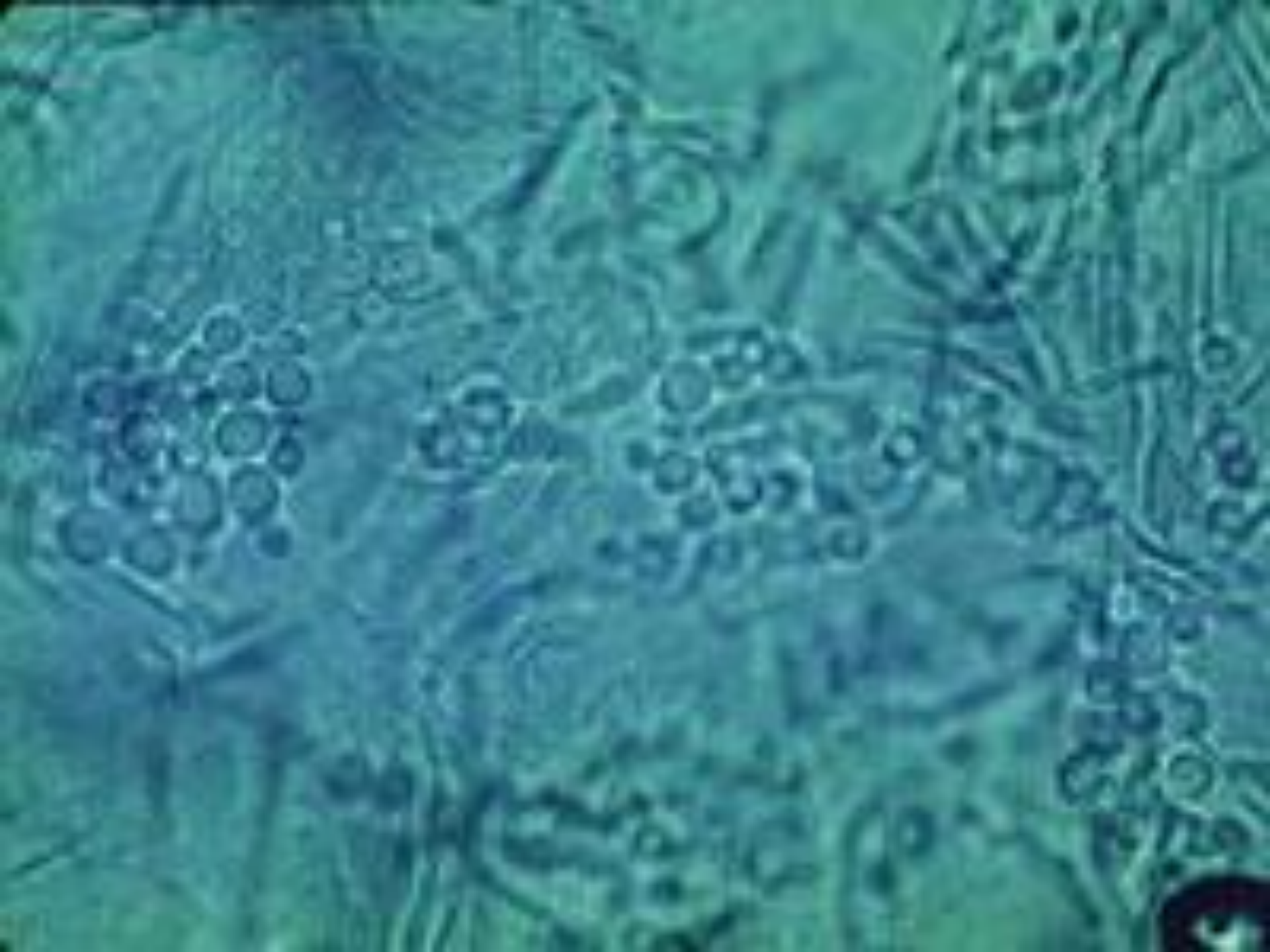
Pityriasis versicolor

- chronická infekce způsobená lipofilní *Malassezia furfur*
- odbarvené skvrny na kůži

M. furfur

- běžný komenzál na kůži, většina infekcí je endogenní
- vyžaduje k růstu lipidy; monopolárně pučící (jediný rod)
- oválné lahvovité buňky, velikost 2-3 x 4-6 μm , při *pityriasis versicolor* kvasinkovité buňky s krátkými hyfami
- kultivace – speciální půdy s Tweenem nebo lipidy (37°C)
- podílí se na tvorbě lupů a seboroické dermatitidě





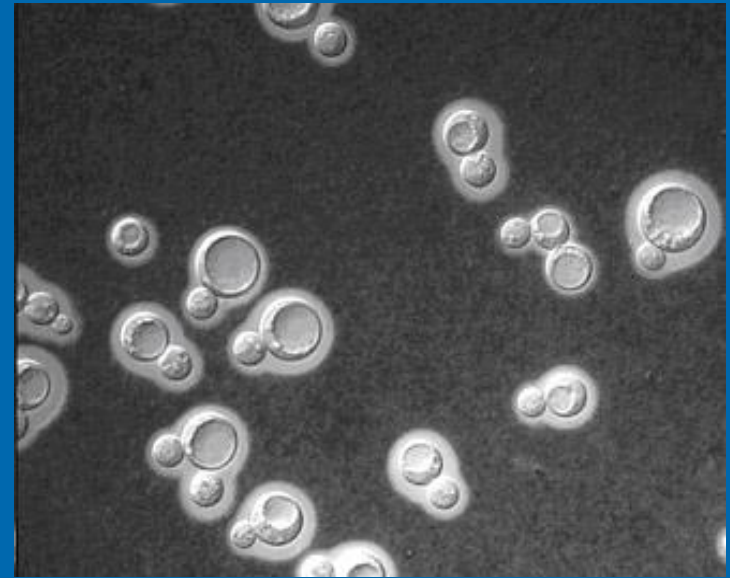
Systemové mykózy

Kryptokokóza:

- způsobuje ***Cryptococcus neoformans*** vytvářející hladké lesklé kolonie, kolem buněk silné pouzdro
- onemocnění CNS a plic
- sporadicky po celém světě, nejčastější u pacientů s AIDS (u 10%)
- prostředí – alkalické substráty bohaté na dusík

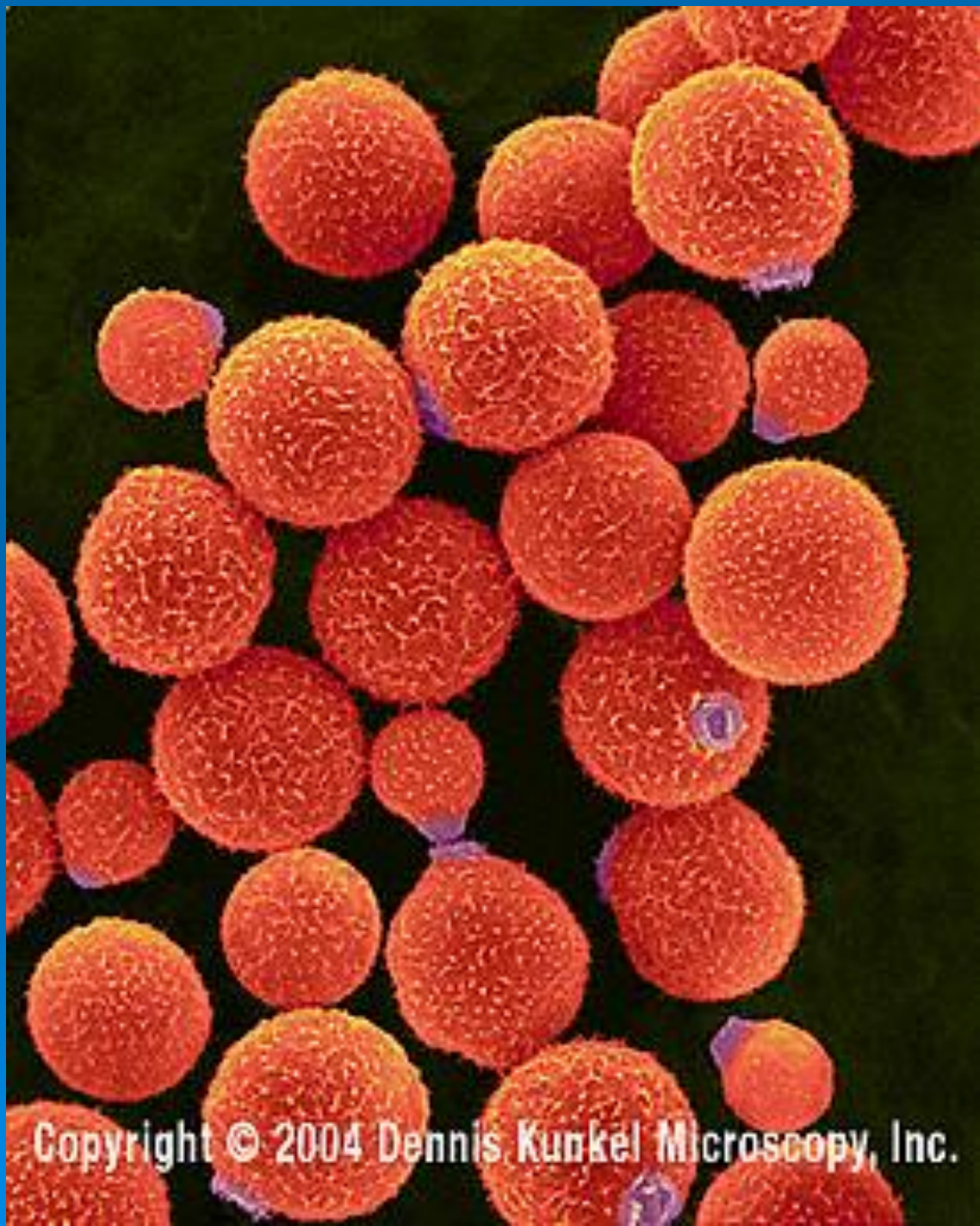


Kožní infekce



Fázový kontrast





Copyright © 2004 Dennis Kunkel Microscopy, Inc.



Průkaz:

mikroskopicky: v mozkomíšním moku a dalším klinickém materiálu - kulovité buňky 2–10 μm s mukopolysacharidovým **pouzdem** (až 60 % izolátů) – po smíšení mozkomíšního moku s tuší se pouzdro jeví jako jasný dvorec kolem buněk

kultivace: - na Sabouradově agaru při 25–30°C a 37°C za 2-3 dny

- smetanově bílé až žlutohnědé mukózní kolonie (neopouzdržené kmeny – suché)

- netvoří pseudomycelium ani mycelium

- nefermentuje cukry, silná produkce ureázy, asimilace inozitolu

Blastoschizomyces capitatus

(dříve *Trichosporon capitatum*)

- diseminované infekce
 - oslabení neutropeničtí pacienti se zhoubnými lymfomy
- asimilace pouze glukózy a galaktózy

Geotrichum candidum

- infekce u diabetiků,
imunosuprimovaných osob

Saccharomyces cerevisiae

- sepsy a plicní infekce
- původce vaginálních mykóz (8,5 %)



Rhodotorula

- barevné kolonie (oranžové, červené)
- neasimuluje inositol



Dimorfní houby


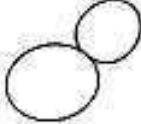
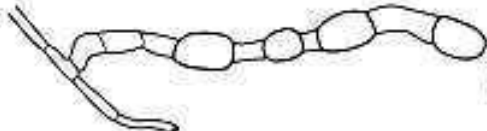
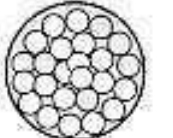
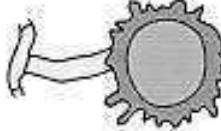
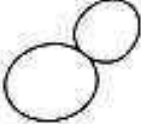


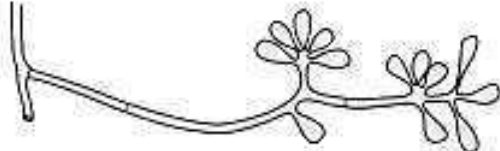
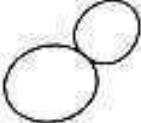
vláknitá fáze

- většinou saprofytická (průnik přes kůži a sliznice)

kvasinková fáze

- infekční (hluboké infekce tkání a orgánů)
- **kvasinkový** růst podporují bohatější půdy (krevní agar) a teplota 35–37°C
- tvorba **hyf** – teplota 25–30°C

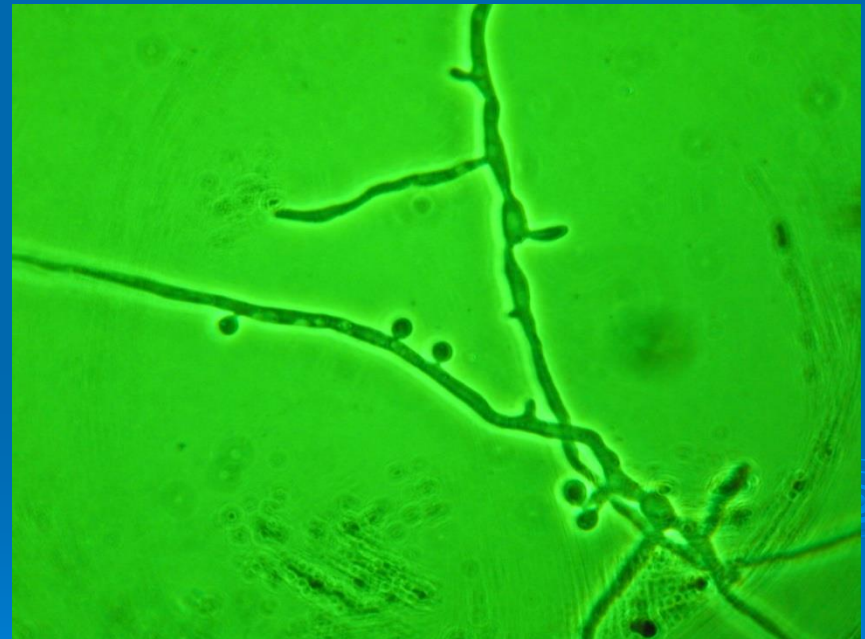
Dimorfní patogenní kvasinky

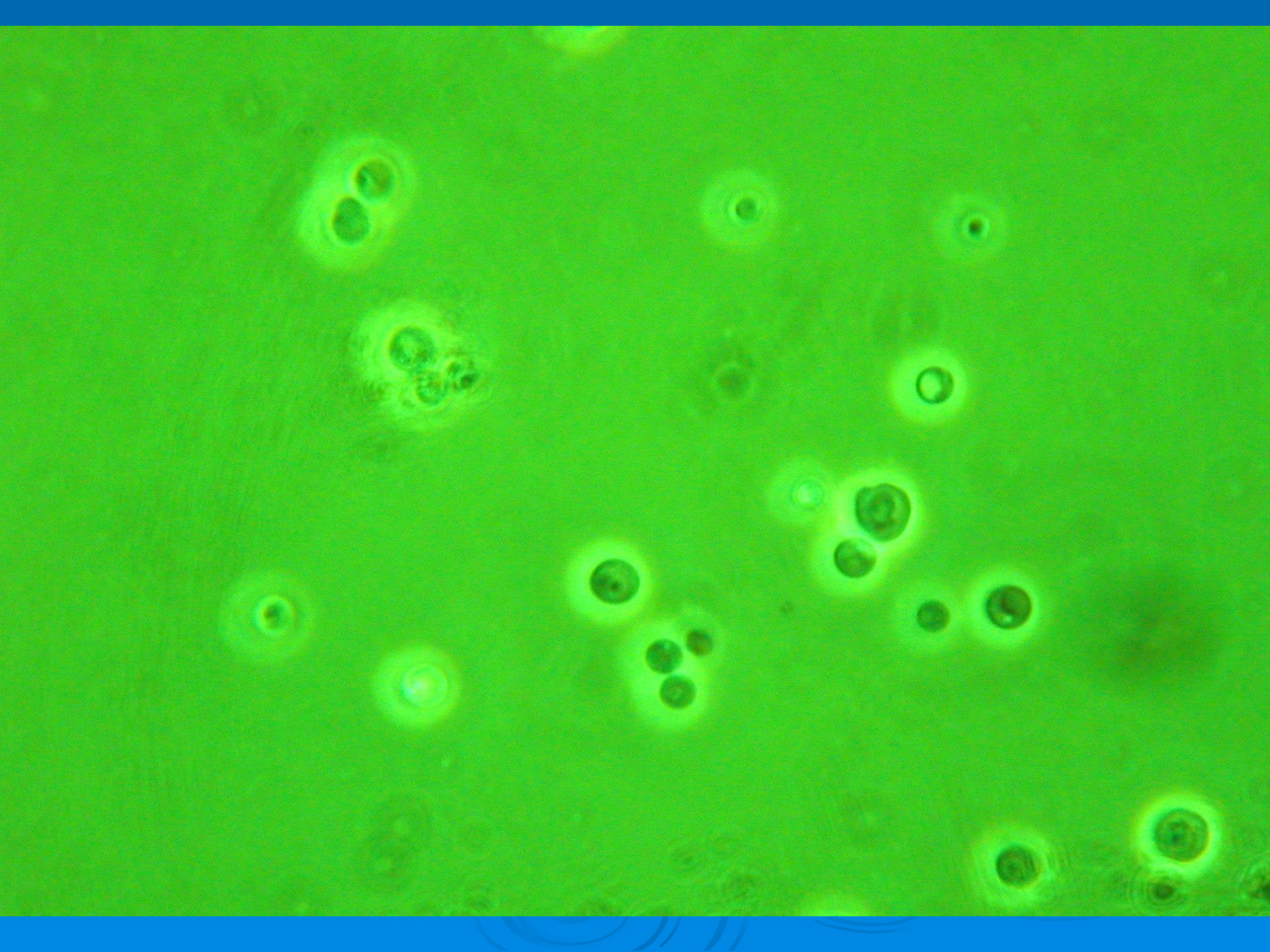
Fungus	In vitro (25° C)	In vivo (37° C)
<i>Blastomyces</i>	 Mold	 Yeast
<i>Coccidioides</i>	 Mold	 Spherule
<i>Histoplasma</i>	 Mold	 Yeast
<i>Paracoccidioides</i>	 Mold	 Yeast
<i>Sporothrix</i>	 Mold	 Yeast

Blastomykóza, kokcidiomykzá, sporotrichóza etc.

Sporothrix schenckii

buňky ve fázovém kontrastu – hyfy a konídie





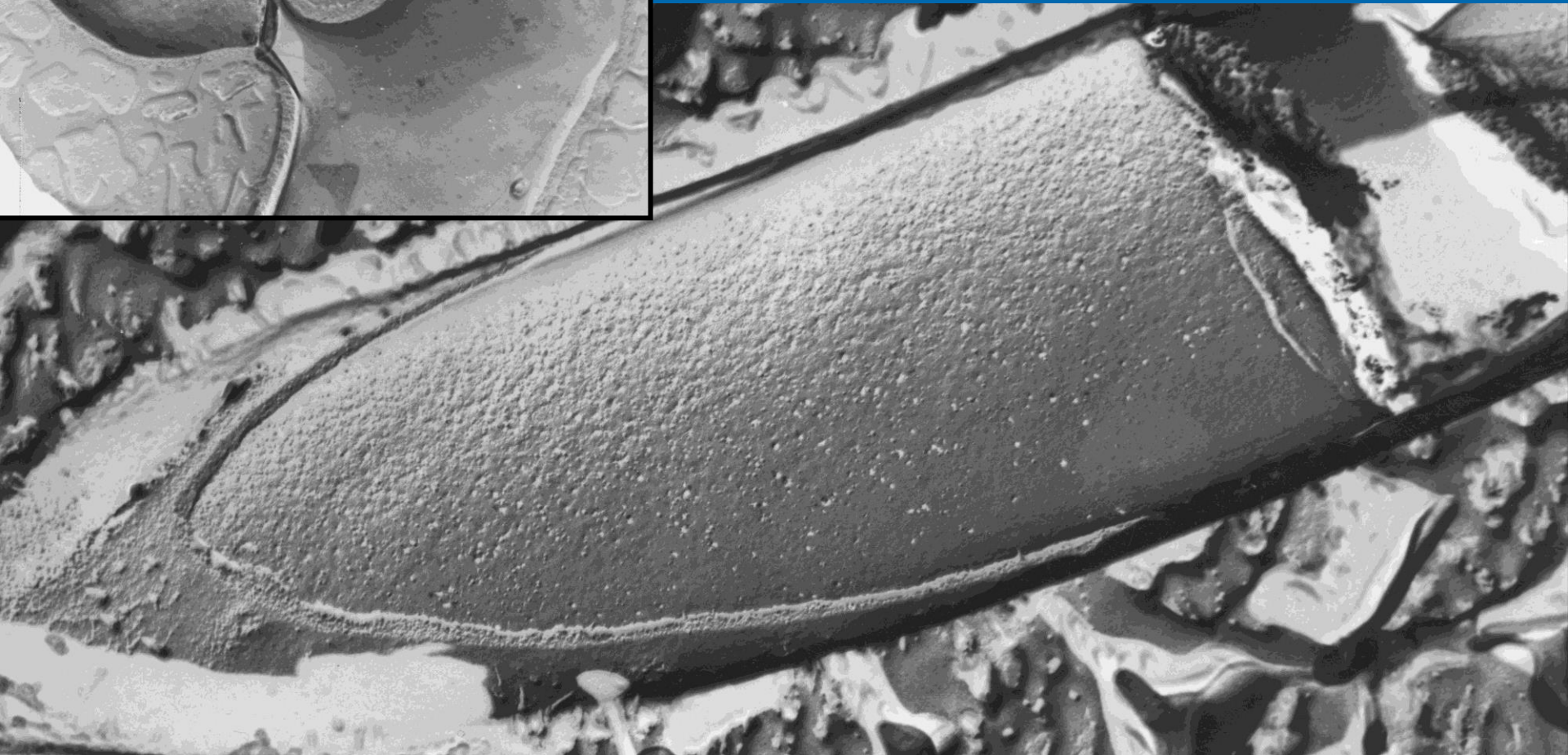
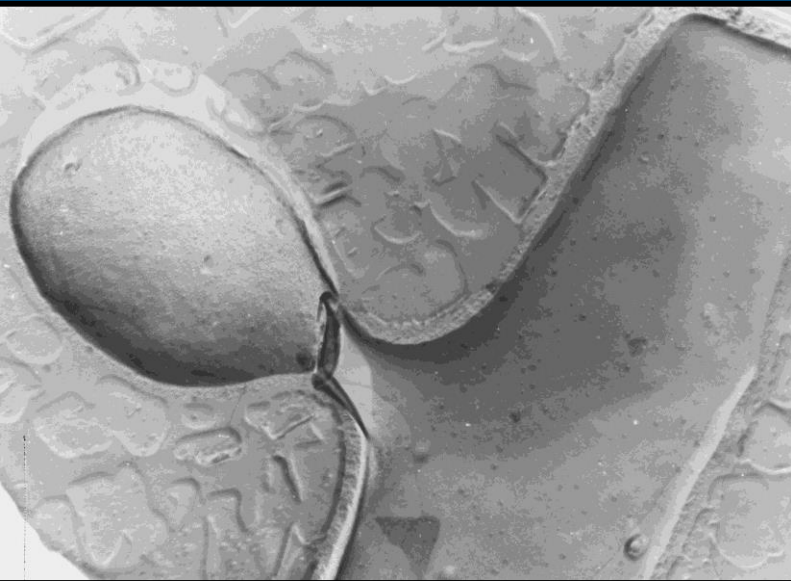
Sporothrix schenckii

studie buněk freeze fracture technikou

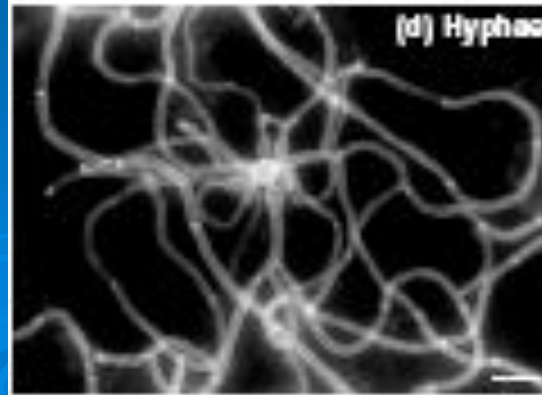
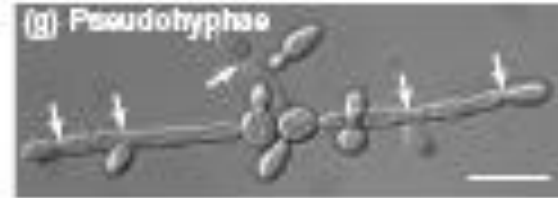
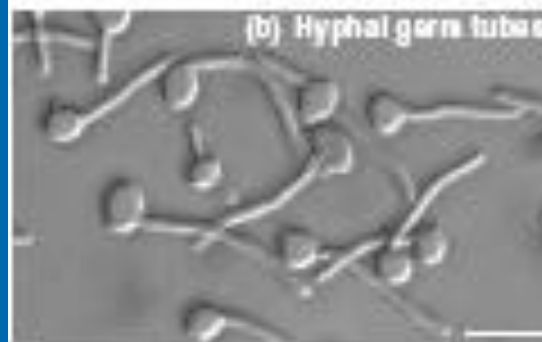
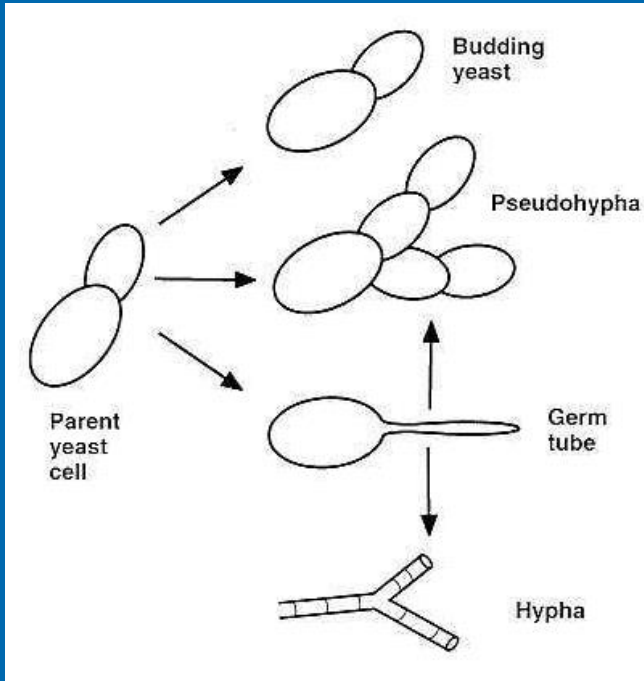


Sporothrix schenckii

studie buněk freeze-fracture technikou



Candida albicans



Candida albicans

studium vlivu antibiotika nystatinu na morfologii
plasmatické membrány





Blastomyces dermatitis



Image Courtesy of M. McGinnis
Copyright © 2000 Doctorfungus Corporation

LABORATORNÍ DIAGNOSTIKA KANDIDOVÝCH INFEKČÍ.
Marcela Vejsová 2009, Disertační práce

