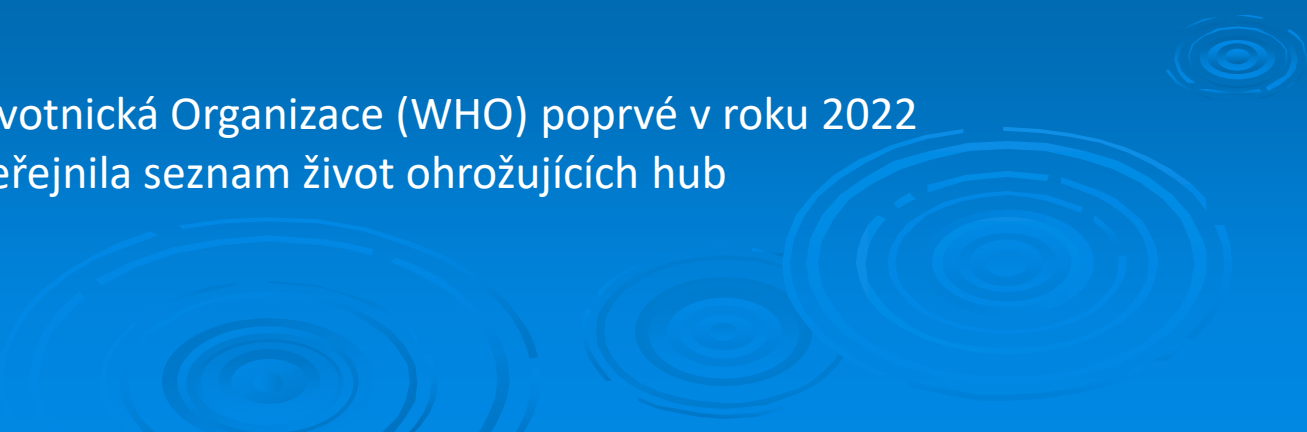


# Patogenní kvasinky

Světová Zdravotnická Organizace (WHO) poprvé v roce 2022  
uveřejnila seznam život ohrožujících hub



úspěchy moderní medicíny způsobily rozmach kvasinkových/houbových infekcí (používání imunosupresiv, kortikoidy, nadužívání antimykotik)

1/10,000 ze ~ 5 milionů odhadovaných druhů hub které obývají naši planetu může napadnout a způsobit nějakou formu onemocnění u člověka (300 známých druhů, 2 miliony mrtvých ročně)

Houby/kvasinky způsobující choroby u lidí pocházejí ze skupiny způsobující nekrózy u rostlin (nekrotrofy) anebo je požírají již mrtvé (saprotrofy), kdežto symbiotické houby rostlin jen málokdy napadají lidi

Lidi jako endotermní savci jsou přirozeně rezistentní vůči kvasinkám, velmi málo hub dokáže růst nad teplotou 37 C

*Candida auris* nejnovější patogen (celosvětová hrozba)

- **multi-rezistentní** vůči běžným antimykotikům;
- je **obtížně identifikovatelná** běžnými laboratorními metodami, může dojít k záměně s jinými kvasinkami;
- **snadno se šíří** ve zdravotnických zařízeních

# 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

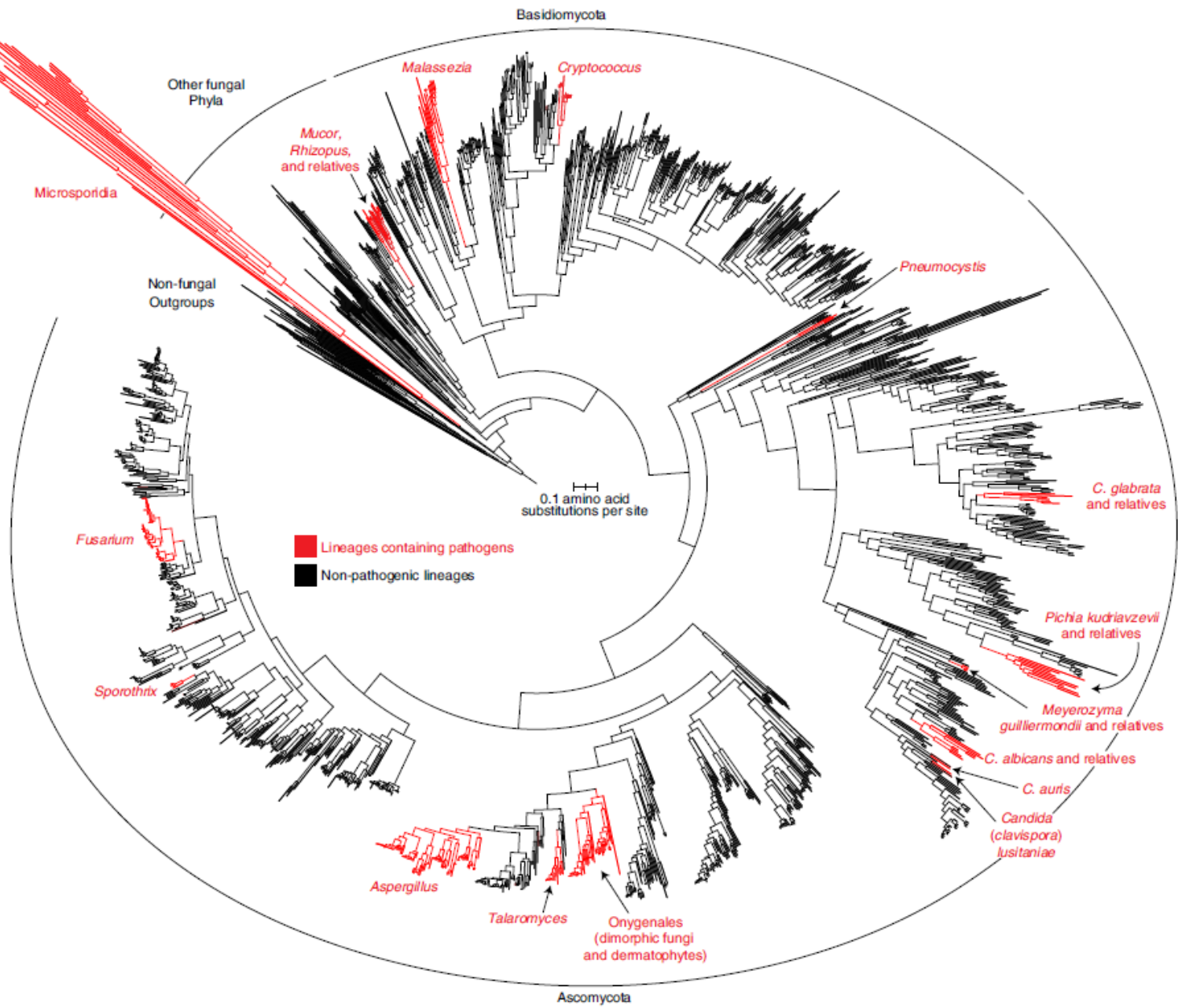
Cryptococcosis (Cryptococcus sp.)

Histoplasmosis (Histoplasma caps)

Mucormycosis (Mucor)

Paracoccidioidomycosis

Sporotrichosis (Sporothrix schenckii)



Fylogenetická analýza 1,644 druhů, červené jsou patogení

- Mykózy:
  - **primární**
  - **oportunní** (u imunokompromitovaných pacientů – AIDS, leukémie, diabetes, popáleniny, terapie kortiko-steroidy, 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 (přírodně se vyskytující kvasinky v tele člověka) – při porušení homeostázy, vnímavosti a rezistence
  
- povrchové mykózy – nakažlivé

Některé mykózy mají charakteristickou geografickou distribuci:

Coccidioidomycosis: jihozápad USA a severní Mexiko

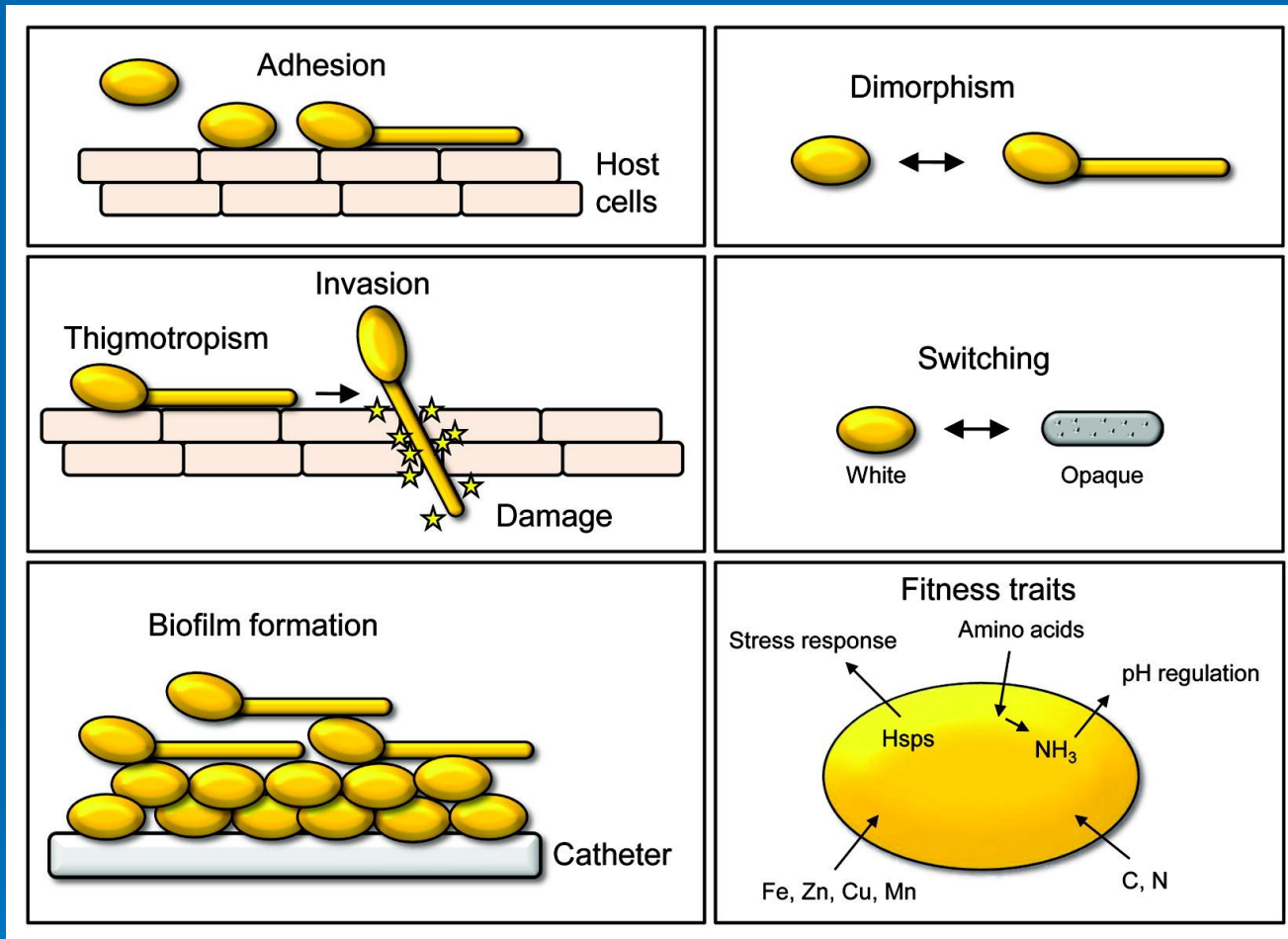
Histoplasmosis: jižní oblasti USA

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
  - kulturační průkaz
  - sérologické metody

## Mikroskopický průkaz

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

**kandidóza** – stěry sliznic

**systémové 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, sladivový 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*

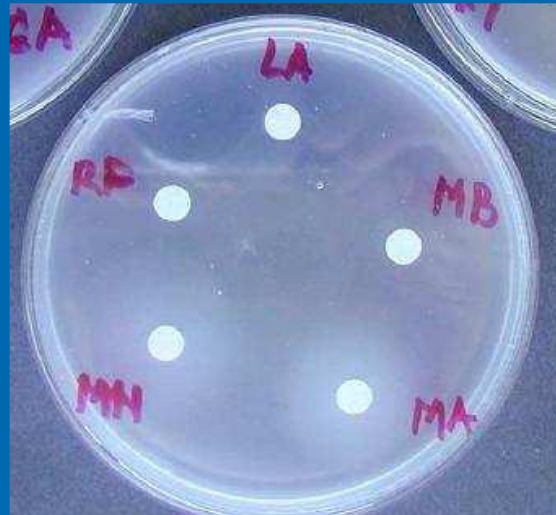


*C. glabrata*



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)



# Sérologie

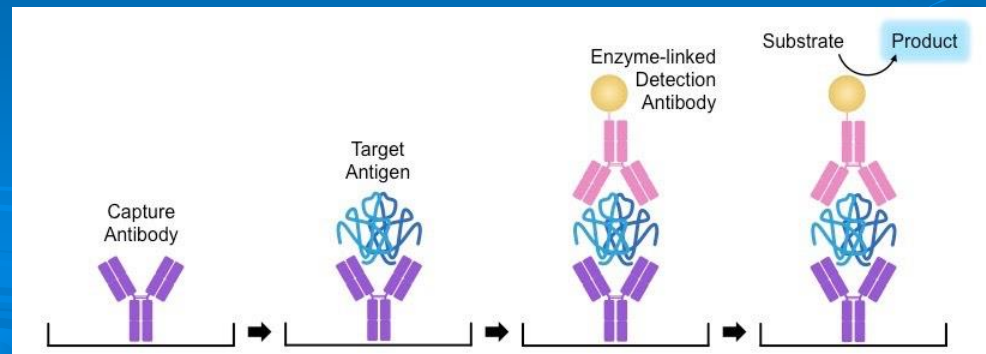
Průkaz specifických protilátek:  
(protilátková odpověď slabá)

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



# Molekulárně-biologické metody

**velmi citlivá a rychlá** – detekce jen několika kopií genu (24-72 hodin),  
nested PCR

Použití pro konzervované, ale i variabilní úseky genomu - specificita pro určité rody nebo druhy (rDNA, mitochondriální DNA, jiné DNA)

kvantifikací lze odlišit kolonizaci od aktivní infekce (real time PCR)

použitím multiplex PCR lze možná detekovat více druhů v jedné PCR reakci

## **Časté falešné negativy:**

neúčinná metoda izolace DNA

nadbytek lidské DNA ve vzorku (kompetice)

Testy jsou zatím nestandardní

## Metody ve fázi testování

matrix-assisted laser desorption ionization (MALDI)

fluorescence *in situ* hybridization (FISH)

# 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 (injekce/infuze):**  
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<br>Antimykotikum   | Mechanismus účinku  |
|---|---|
| Polyenová antibiotika<br>Amfotericin B<br>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<br>Imidazoly<br>Mikonazol<br>Ketokonazol<br>Triazoly 1. generace<br>Flukonazol<br>Itrakonazol<br>Triazoly 2. generace<br>Vorikonazol<br>Posakonazol<br>Ravukonazol | převážně fungistatický účinek celé skupiny (cidní účinek vorikonazolu na aspergily), společný mechanismus účinku, blokáda enzymatických systémů závislých na cytochromu P450 (inhibice 14- $\alpha$ -demetylázy); inhibice syntézy ergosterolu, poškození funkčnosti plazmatické membrány, zpomalení až zástava růstu |
| Antimetabolity<br>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<br>Kaspofungin<br>Anidulafungin<br>Mikafungin | inhibitory buněčné stěny hub (specifické nekompetitivní inhibitory $\beta$ -(1,3)-glukan syntázy); deplece $\beta$ -(1,3)-glukanu a osmotická destabilizace buněčné stěny houby |
| Allylaminy<br>Terbinafin<br>Naftifin                        | specifická vazba na skvalen epoxidázu; inhibice biosyntézy ergosterolu  |
| Thiokarbamáty<br>Tolnaftát<br>Tolciclát                     | specifická vazba na skvalen epoxidázu; inhibice biosyntézy ergosterolu  |
| Morfoliny<br>Amorolfin                                      | specifickou vazba na $\Delta^{14}$ reduktázu/ $\Delta^7$ - $\Delta^8$ izomerázu, inhibice biosyntézy ergosterolu  |
| Benzofurany<br>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



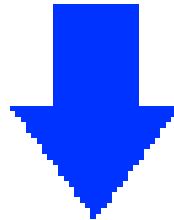
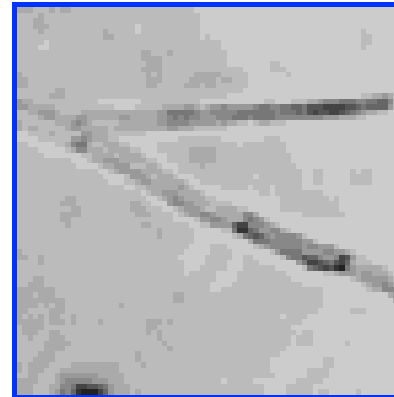
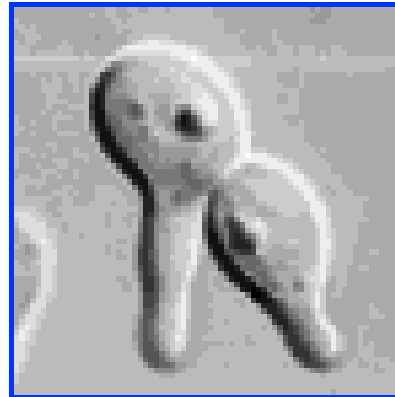
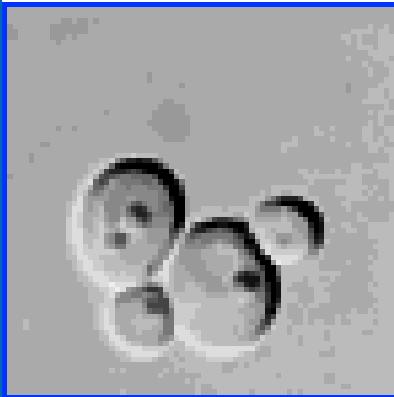
25°C

**Yeast**  
Levures

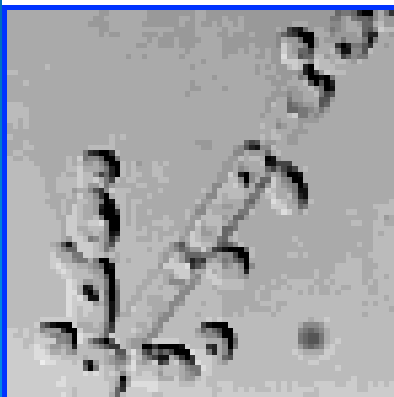
37°C



**Hypha**  
Hyphes



37°C



**Pseudohyphae**  
Pseudohyphes



Candida albicans  
Sabouraudův agar





## Identifikace:

- **Sabouraudův glukózový agar** – kvasinková fáze (oválné buňky, 3-8  $\mu\text{m}$ ), kolonie za 1-2 dny při 25°C
- **in vivo** – směs kvasinkových buněk, pseudomycelia a pravého mycelia, parasexuální cyklus (fúze hýf, diploidizace, rekombinace, mitotický crossing-over, haploidizace)
- **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



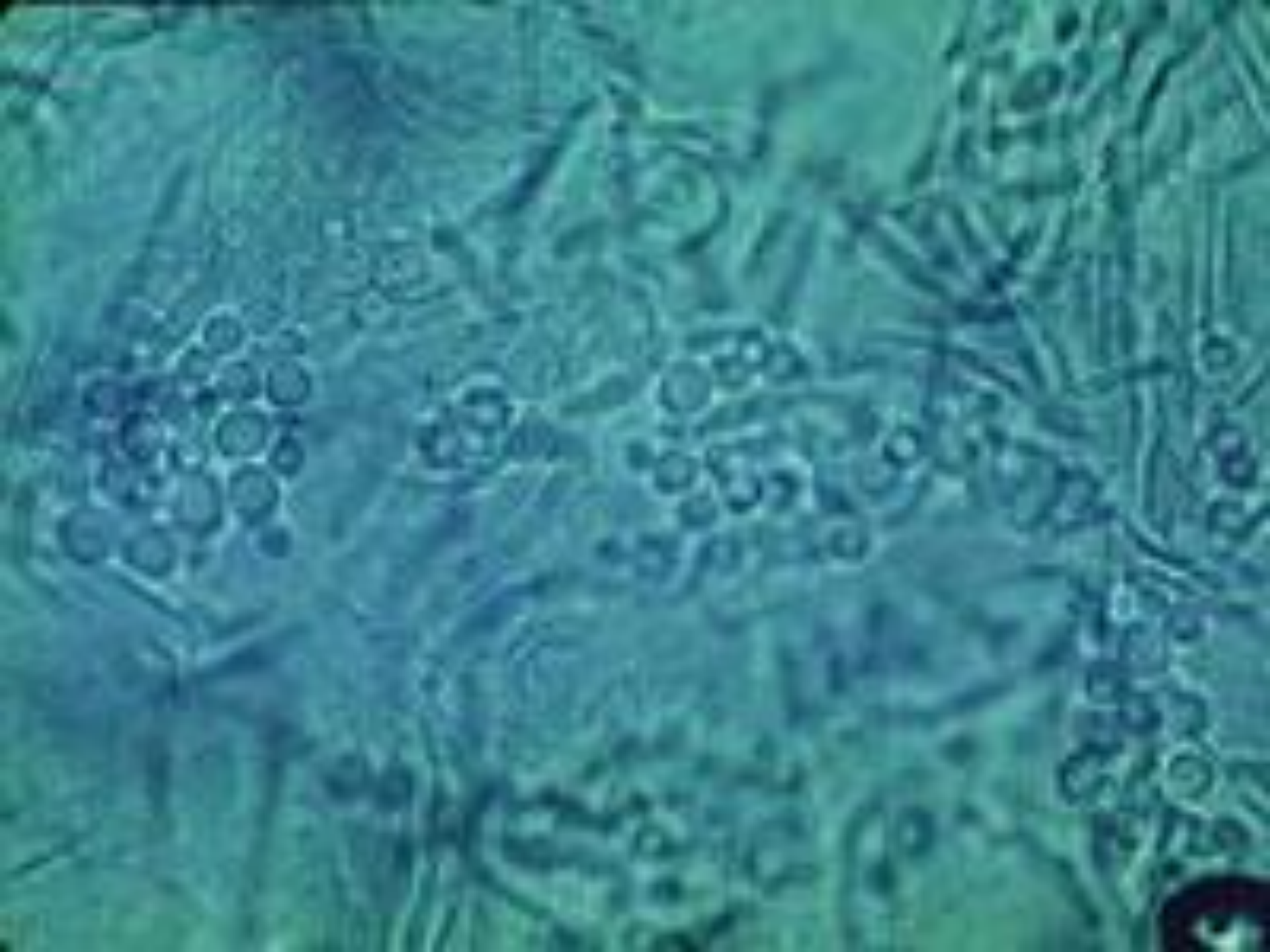
# *Pityriasis versicolor*

- 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  $\mu\text{m}$ , 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

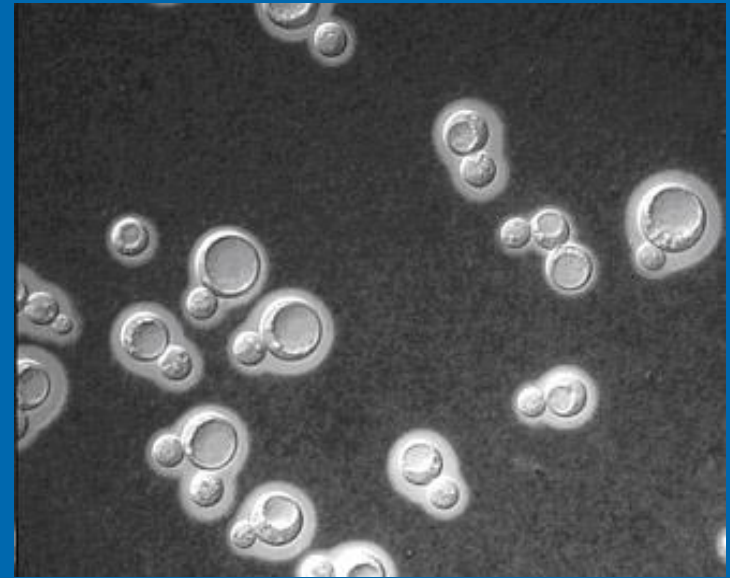
## Kryptokokóza:

- 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



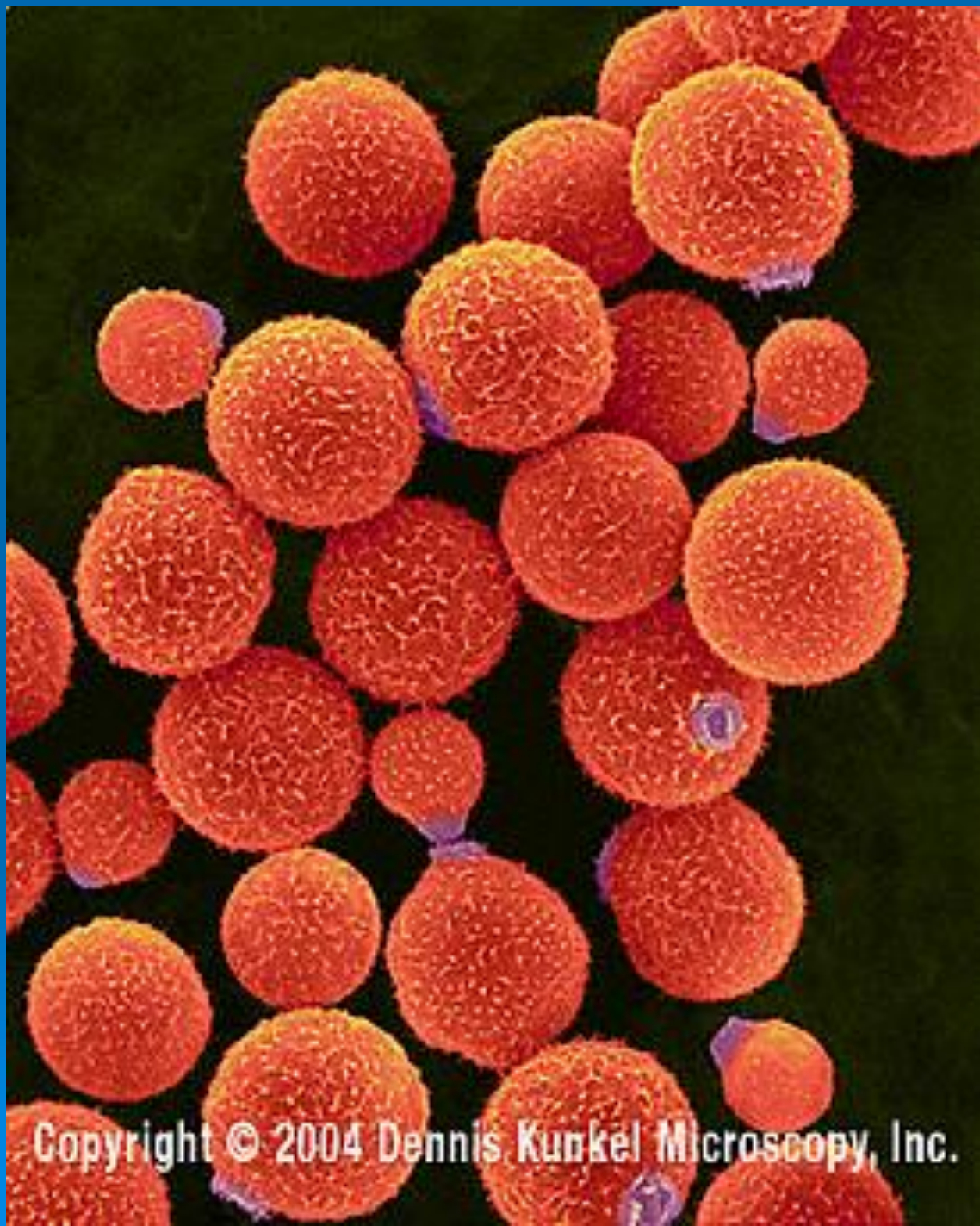


Kožní infekce



Fázový kontrast





Copyright © 2004 Dennis Kunkel Microscopy, Inc.



# Průkaz:

**mikroskopicky:** v mozkomíšním moku a dalším klinickém materiálu - kulovité buňky 2–10  $\mu\text{m}$  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


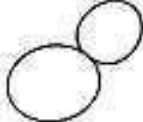
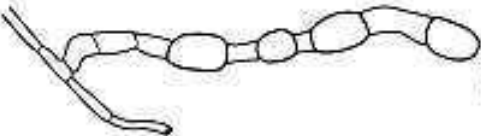
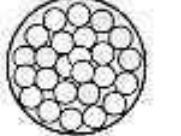

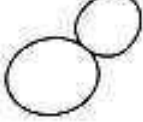
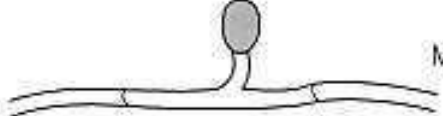


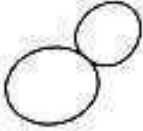
## vláknitá fáze

- 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

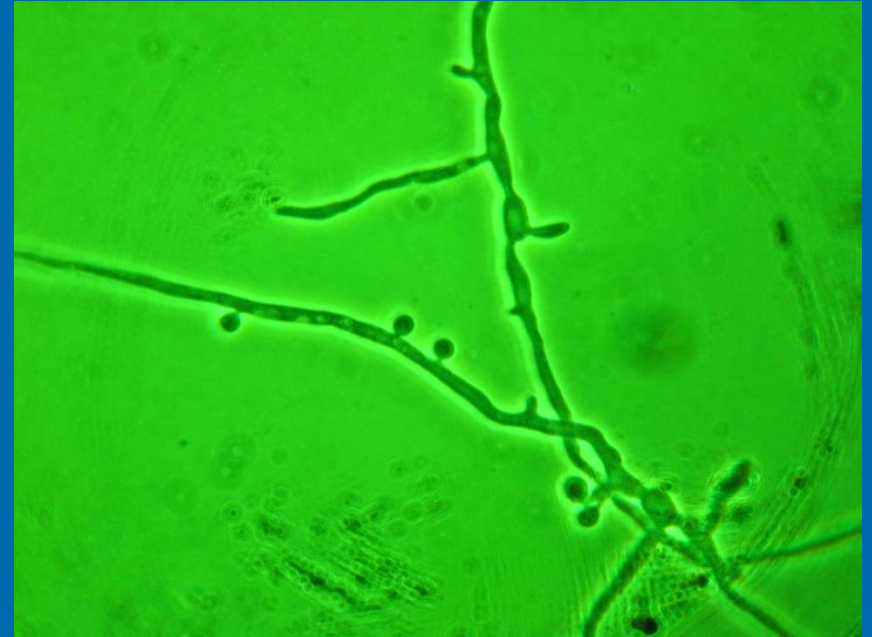
| Fungus                  | In vitro (25° C)  | In vivo (37° C)  |
|-------------------------|---|--|
| <i>Blastomyces</i>      |  Mold   |  Yeast    |
| <i>Coccidioides</i>     |  Mold   |  Spherule |
| <i>Histoplasma</i>      |  Mold   |  Yeast    |
| <i>Paracoccidioides</i> |  Mold  |  Yeast   |
|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

Blastomykóza, kokcidiomykzá, sporotrichóza etc.



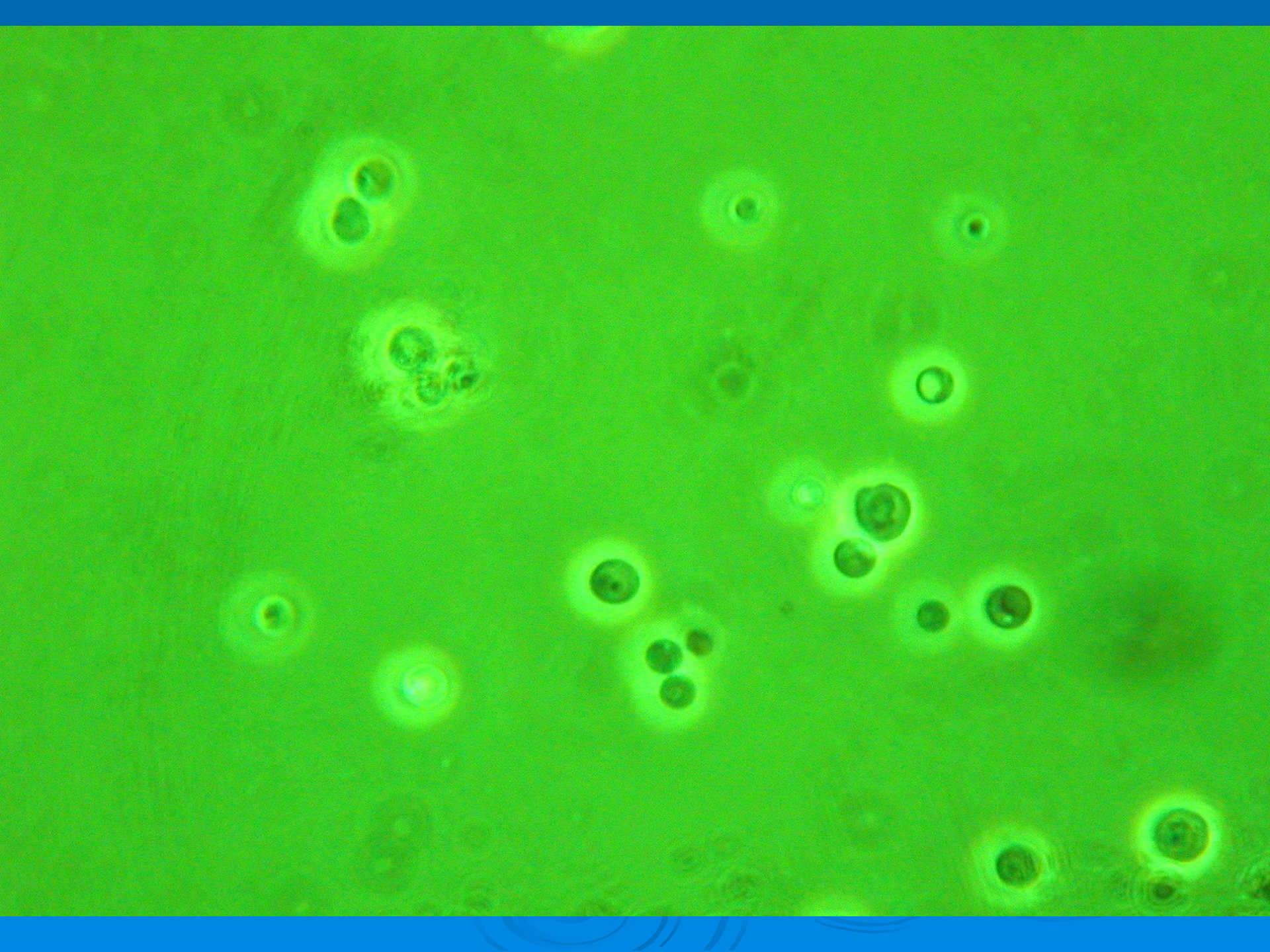
# Sporothrix schenckii

buňky ve fázovém kontrastu – hyfy a konídie



Sporotrichóza (**rose handler's disease**)

S. Schenckii se přirozeně vyskytuje v půdě, hnoji, na rašelinících a rostlinách (např. růže)



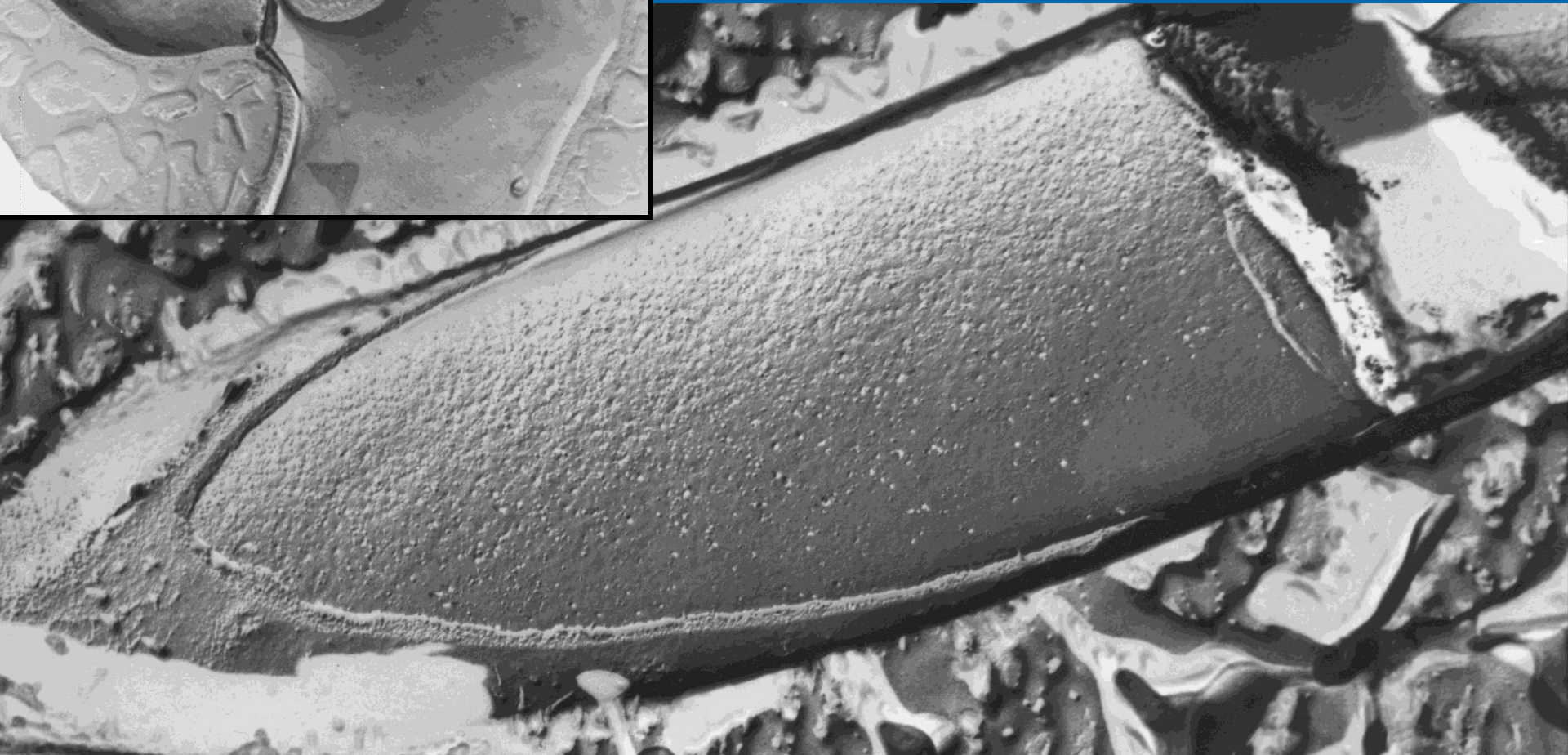
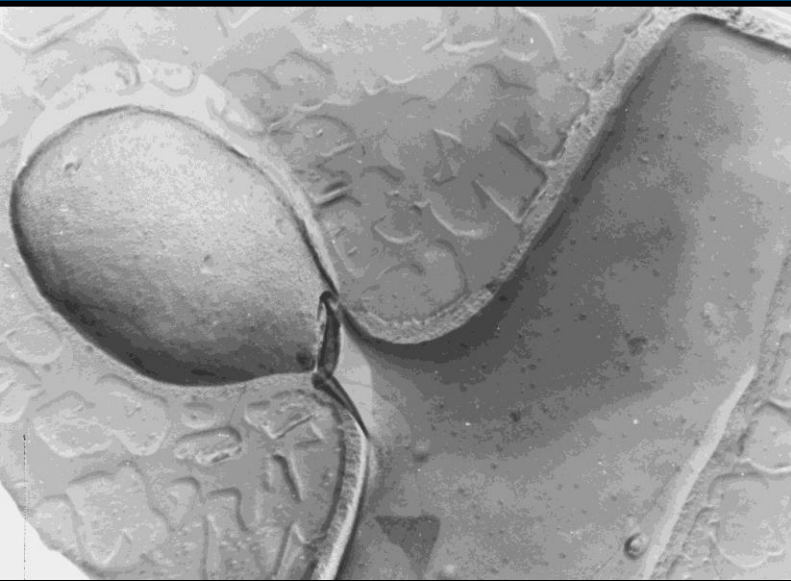
# Sporothrix schenckii

studie buněk freeze fracture technikou

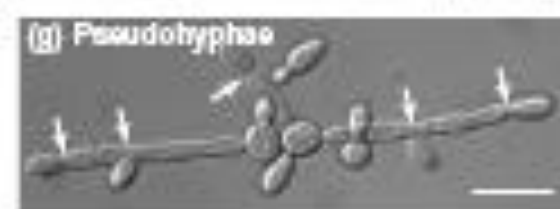
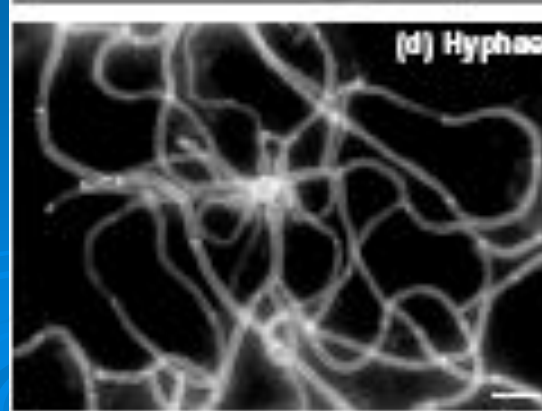
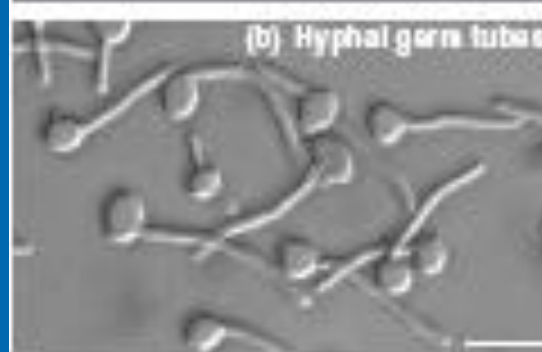
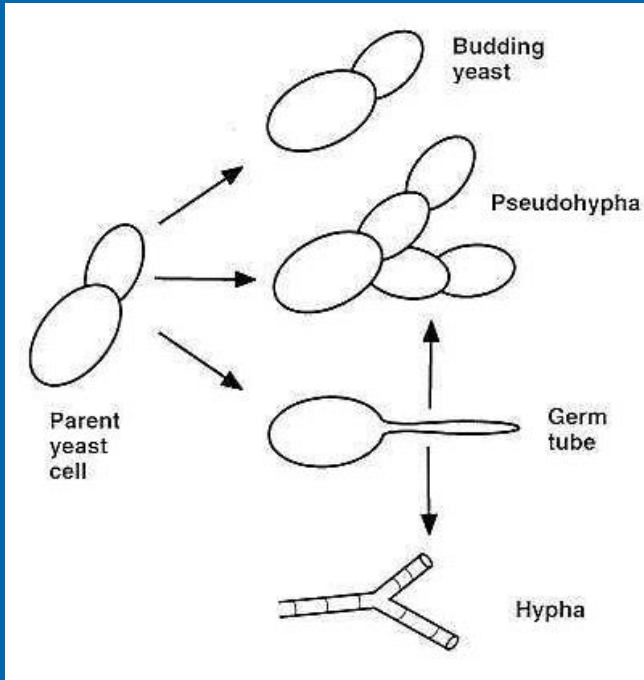


# Sporothrix schenckii

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