

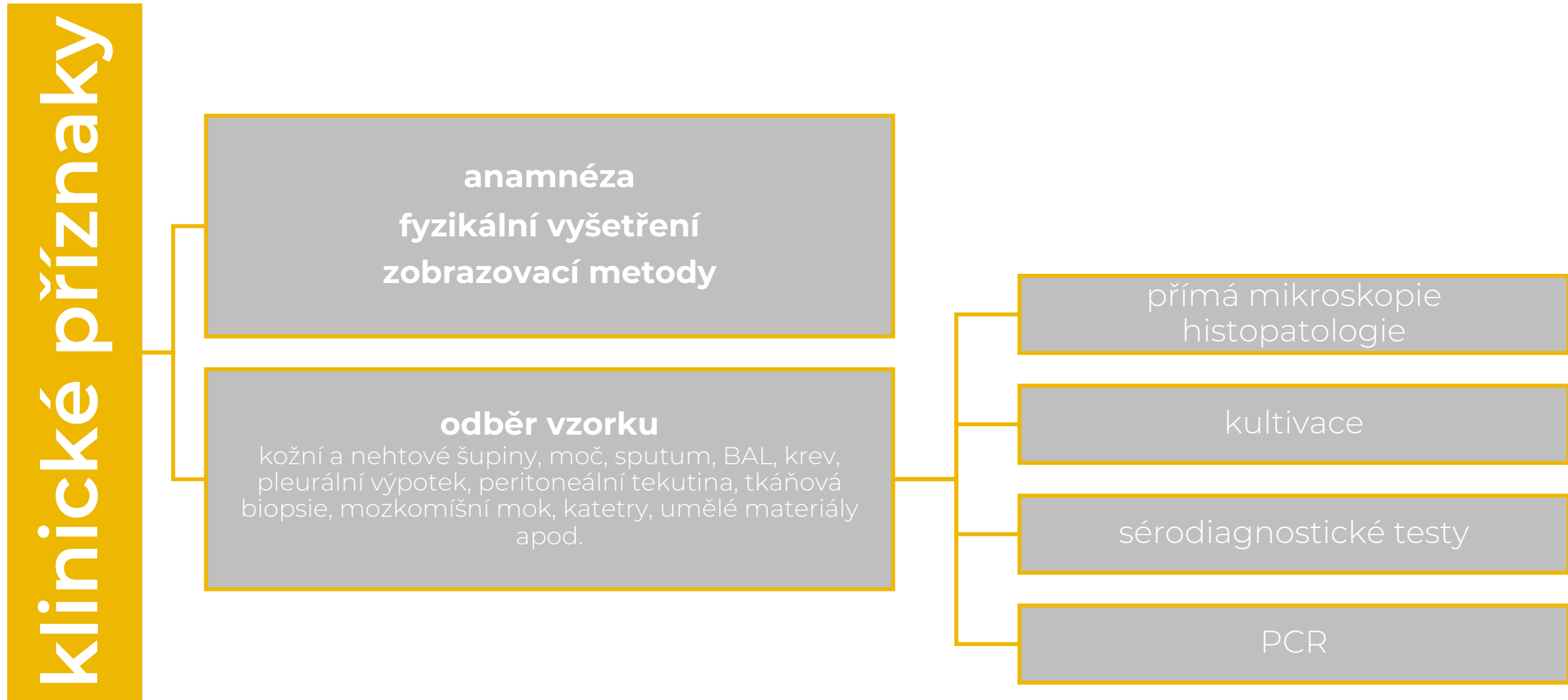
MYKOLOGICKÉ VYŠETŘOVACÍ METODY A ZPRACOVÁNÍ MATERIÁLU

LÉKAŘSKÁ MYKOLOGIE



Vit Hubka, M.D., MSc., Ph.D.
Charles University

DIAGNOSTIKA FUNGÁLNÍCH INFEKČÍ



ANAMNÉZA

- Základní data o pacientovi

- **Nynější onemocnění (NO)**

postupný vznik a vývoj subjektivně pocíťovaných příznaků a jejich vztah k činnostem, které nemocný prováděl, jak se nemocný snažil postupovat před tím, než vyhledal lékařskou pomoc

- Alergologická anamnéza (AA)
- Abúzus / Toxikologická anamnéza (TA)
- Rodinná anamnéza (RA)
- Osobní anamnéza (OA)

prodělaná onemocnění, horečnaté stavy, úbytky na váze, nechutenství, apod.

- Gynekologická anamnéza (GA)
- Farmakologická anamnéza (FA)
- Pracovní anamnéza (PA)
- Sociální anamnéza (SA)

- **Epidemiologická anamnéze (EA)**

cestování (místo, délka pobytu), zájmy (bazény, zahradničení, bojové sporty), kontakt se zvířaty, pobyt v lese, kontakt s potenciálně infikovanými osobami apod.)

Soubor všech údajů (relevantních situací) o zdravotním stavu pacienta od narození do současnosti



FYZIKÁLNÍ VYŠETŘENÍ

chorobopis (základní zdravotnická dokumentace pacienta) - **anamnéza, výsledek objektivního vyšetření při přijetí, diagnóza;** doplněn dekursem (průběh nemoci a její léčba za hospitalizace); výsledky vyšetření; archivace

Fyzikální vyšetření - pomocí vlastních smyslů a jednoduchých pomůcek; systematické vyšetření orgánových systémů a zaznamenání (ne)přítomnost specifických příznaků

- Pohled (*Aspekce, Inspekce*)
- Poslech (*Auskultace*)
- Poklep (*Perkuze*)
- Pohmat (*Palpace*)

Celkový vzhled pacienta, měření TK, tělesné t, výška, váha, BMI, bolesti a jejich charakter, orientačně i psychické vlastnosti a poruchy nemocného, ...

Postup vyšetření od hlavy, přes orgánové soustavy po končetiny



KLINICKÉ PŘÍZNAKY INVAZIVNÍCH MYKÓZ

příznaky často nespecifické a opožděné

→ u vysoce rizikových pacientů je třeba tuto infekční komplikaci předvídat

závažná základní onemocnění (+ imunosupresivní léčba)

- hematologická onemocnění, hlavně s neutropenií nebo po transplantaci krvevorných bb.
- po transplantaci solidních orgánů
- terapie cytostatiky / imunosupresivy z různých indikací
- HIV, aj. imunodeficity zapříčiněné infekčními onem.



porušená funkce imunity

→ klasické klinické i laboratorní známky infekce (zánětu) se nemusí rozvinout nebo nastupují opožděně / s jinou intenzitou

ZÁKLADNÍ LABORATORNÍ VYŠETŘENÍ

Odběr krve, separace séra

Krevní obraz (infekce, záněty, leukémie, alergie, aj.)

Cholesterol, glykémie

Jaterní testy (ALT, AST)

Urea, kreatinin (funkce ledvin)

acidobazická rovnováha, krevní plyny, laktát

parametry koagulace

PROTEINY AKUTNÍ FÁZE

C-reaktivní protein (CRP) - bakteriální infekce (ale někdy i u systém. mykóz)

prokalcitonin (PCT) - bakteriální inf. (u mykóz se téměř nezvyšuje, nebo jen mírně)



KLINICKÉ PŘÍZNAKY INVAZIVNÍCH MYKÓZ

PŘÍZNAKY IFD INVASIVE FUNGAL DISEASE

Invazivní kandidóza

- většinou pod obrazem **kandidémie** (příznaky nespecifické, často jediným příznakem je přetrvávající horečka nebo septický stav nereagující na podávání širokospektrých ATB)

další formy:

- pneumonie (zápal plic)
- infekční endokarditida (zánět srdečních chlopní)
- infekční artritida (zánět kloubu)
- osteomyelitida (kostní dřeň)
- encefalomeningitida
- diseminovaná, aj.



PŘÍZNAKY IFD INVASIVE FUNGAL DISEASE

Invazivní (plicní) aspergilóza (IPA)

- většinou ve formě **plicní aspergilózy** (příznaky nespecifické, obvykle dominance kašle, bolesti na hrudníku, horečka, dušnost, hemoptýza, pleurální třecí šelest)

	IPA n = 47 (%)	Kontroly n = 49 (%)	P
Klinika			
horečka	77	65	0,2
trvalá horečka	49	37	0,2
kašel	64	45	0,06
hemoptýza	26	18	0,4
dušnost	79	84	0,5
pleurální bolest	28	12	0,06
paranazál. sinusitida	13	8	0,5
třecí šelest	11	2	0,11
epistaxe	9	2	0,2

Klinické příznaky IA jsou nespecifické:

porovnání s pacienty, kteří zemřeli na pneumonii jiného původu

Hachem *et al.* (2006)



ZOBRAZOVACÍ METODY

RTG - zánětlivá ložiska v plicích, orgánech, měkkých tkáních, kostech

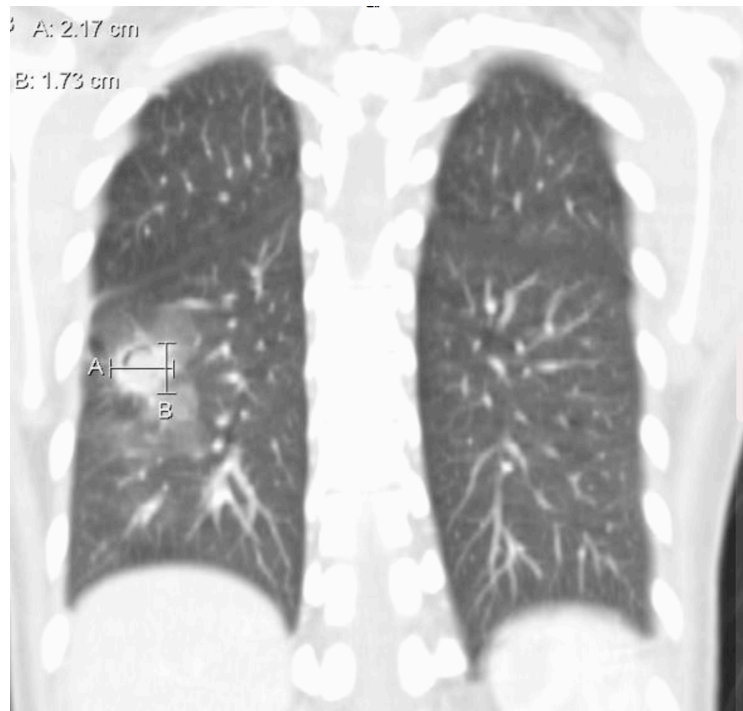
osteomyelitida: nepravidelnosti ve struktuře metafýzy a později diafýzy – osteopenie, osteolýza, periostální změny; subperiostální formace nové kosti - proniknutí infekce přes kortex; dif. dg. od fraktur a tumorů

Nálezy na RTG hrudníku při invazivní aspergilóze (IA) (relativně nespecifické):

- mnohočetná ložiska
 - ostře ohraničené uzly
 - bronchopneumonie
 - rozpadové dutiny (mikro- až makroabscesy)
 - pleurální výpotek
 - plicní infarkt
 - oboustranné i jednostranné nálezy
 - normální nálezy
-
- morfologie různorodá, patologický nálezy často až pozdně
 - **při negativě RTG nálezu nelze plicní mykózu vyloučit**
 - nutné indikovat CT vyšetření



Srovnání RTG a CT vyšetření u stejného pacienta s IA



ZOBRAZOVACÍ METODY

Výpočetní tomografie (Computed Tomography, CT)

- **CT má oproti RTG významně má vyšší senzitivitu pro IA plic (89% vs. 58%)**
- morfologie CT nálezu u rizikových nemocných s angioin vazivní plicní aspergilózou je natolik charakteristická, že na jejím základě lze vyslovit „pravděpodobnou diagnózu“ IA
- dif. dg. angioin vazivní mukormykóza, plicní tuberkulom, metastázy některých tumorů, aktinomykóza, aj.



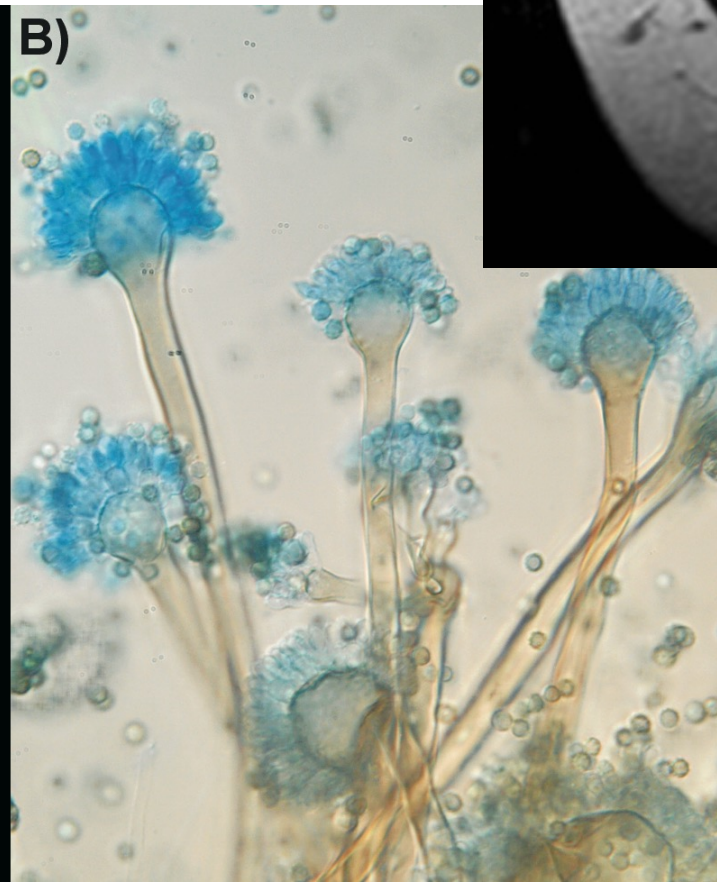
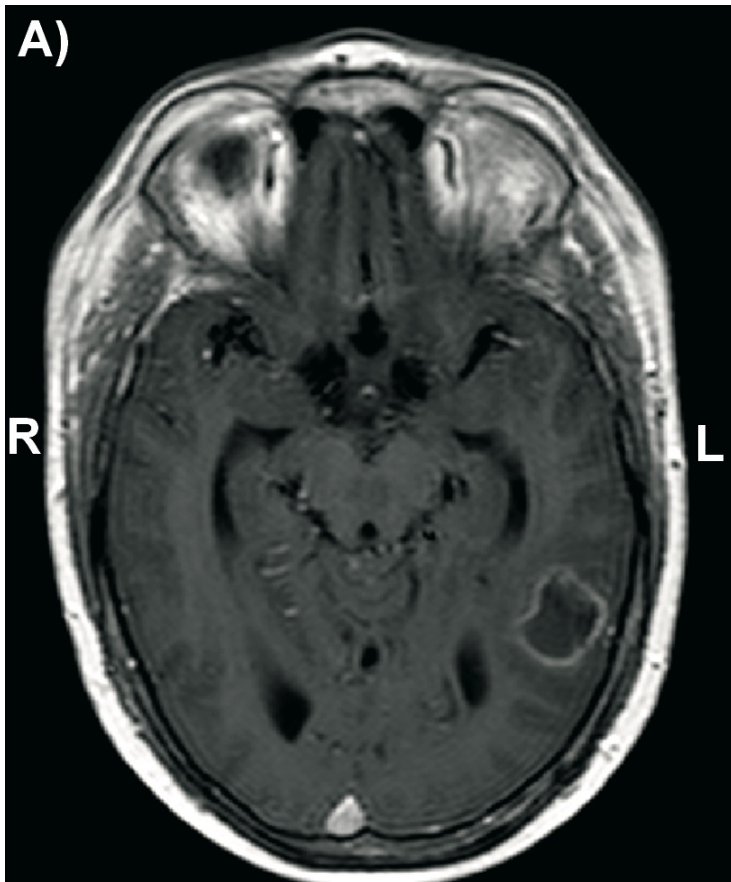
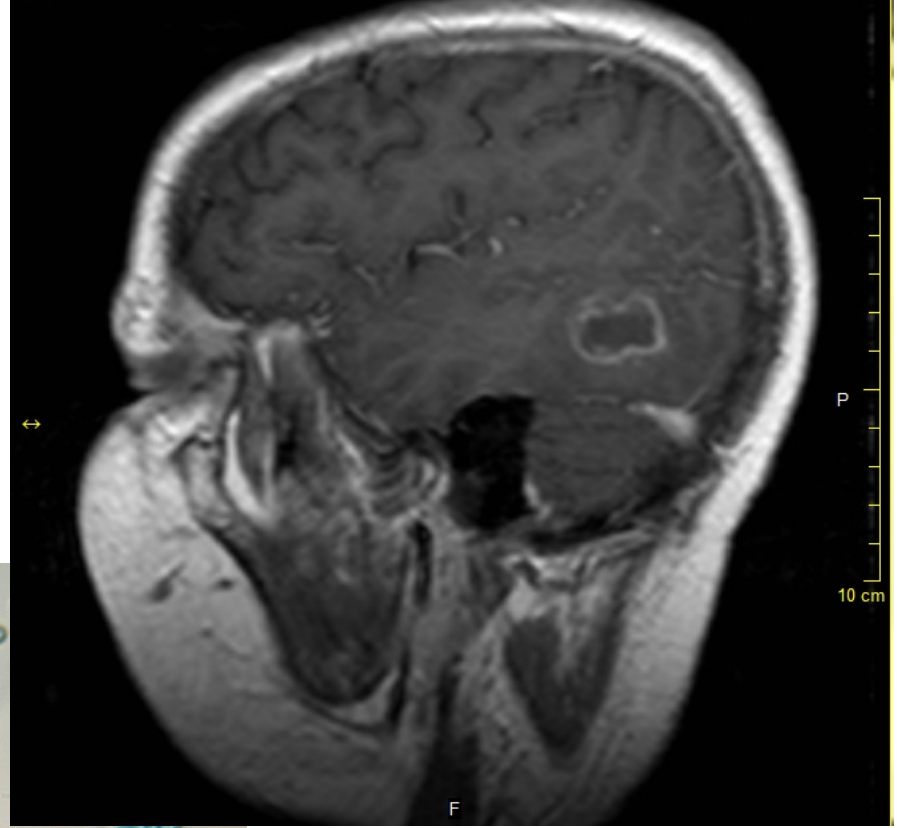
Marr et al. (2001)

Angioin vazivní aspergilóza - typický počáteční nález „**halo sign**“ (světlejší zóna charakteru mléčného skla - krvácení do alveolů - obkružuje nodulární konsolidaci plicní tkáně = nekrózou v důsledku **angioin vazie aspergilových hyf**). Postupným vývojem dochází k retrakci ložiska, s **absorbí nekrotických hmot na periferii** a vzniklý **prostor je následně vyplněn vzduchem** = „**aircrescent sign**“. Diagnostický význam má jen u odpovídajícího klinického stavu imunoalterovaných nemocných



Výskyt CNS postižení u nemocných po alogenní HSCT s prokázanou IA může dosahovat až 50 %.

100 % pacientů s CNS invazivní aspergilózou má postižen alespoň jeden další orgán.



ODBĚR MATERIÁLU A ANALÝZA VZORKŮ

ODBĚR MATERIÁLU PRO MYKOLOGICKÉ VYŠETŘENÍ

FAKTORY MÍRY ÚSPĚŠNOSTI MIKROBIOLOGICKÉHO VYŠETŘENÍ

VALIDNÍ KLINICKÉ + ANAMNESTICKÉ ÚDAJE



VALIDNÍ VZOREK

- ze správného místa
- optimální množství materiálu
- ve správný čas (před terapií)
- správnou technikou odběru (lege artis, asepticky)
- do správných souprav
- dodržení podmínek skladování a transportu

KVALITNÍ LABORATORNÍ PROCES
SPRÁVNÁ INTERPRETACE VÝSLEDKU



PREANALYTICKÁ FÁZE



ANALYTICKÁ FÁZE



správná terapie a epidemiologická opatření

PREANALYTICKÁ FÁZE - ODBĚR MATERIÁLU

Odběr materiálu:

- **asepticky***
- **před zahájením antimykotické terapie !!!**
- tekutý materiál/tkáň upřednostnit před odběrem tampónem
(kontaminace z kůže/sliznic, nedostatečné inokulum)
- transport ideálně do několika hodin, pokojová teplota (mox 37°C)
- uchovávat při 4°C při transportu delším než 12-14 hodin jinak hrozí přerůstání G-bakteriemi a kontaminujícími houbami

***asepse** opatření a postupy bránící kontaminaci sterilního prostředí (odebíraného vzorku) mikroorganismy; používání sterilních nástrojů, zajištění sterilního prostředí, rozdělení pracovišť na septickou a aseptickou část, dezinfekce a používání ochranných pomůcek – roušek, sterilních rukavic



ODBĚR MATERIÁLU PRO MYKOLOGICKÉ VYŠETŘENÍ

Typ materiálu	Způsob odběru	Množství vzorku	Transportní soupravy
krev	venepunkcí: na kultivaci do injekční stříkačky, poté do hemokultivační lahvičky; na sérologii a genetiku do zkumavky	kultivace: 10 ml dospělí, 1–5 ml děti; sérologie: 4–10 ml; genetika: 2–10 ml	kultivace: hemokult. lahvičky sérologie: zkumavky s akcelerátory koagulace genetika: zkumavky s EDTA
likvor (CSF)	lumbální punkcí	1–3 ml	sterilní zkumavka
sputum	vykašláním, event. indukce	10–15 ml	nádobka se širokým hrdlem a pevným uzávěrem
bronchoalveolární laváž (BAL)	výplach bronchů fyziologickým roztokem pomocí bronchoskopu	10–15 ml z 1.– 3. porce výplachu	sterilní zkumavka
hnis, exsudát, punktát	po incizi, perforaci nebo punkci aspirací do stříkačky		stříkačka se zátkou, sterilní zkumavka



ODBĚR MATERIÁLU PRO MYKOLOGICKÉ VYŠETŘENÍ

Typ materiálu	Způsob odběru	Množství vzorku	Transportní soupravy
tkáň z biopsie /pitvy	skalpelem, punkční jehlou		sterilní zkumavka (do sterilní vody)
rohovka	vzorky tkáně očním skalpelem		mikroskopická sklíčka, kultivační půdy, případně zkumavka (se sterilní vodou)
vnitřní oko (endoftalmitida)	po punkci sklivce aspirací do stříkačky		sterilní zkumavka (do sterilního FR)
sliznice (nosní, orofarynx, pochva)	stěr tamponem		odběrové soupravy s TP
moč	střední proud, cévkováním, suprapubickou punkcí	5–10 (25–50) ml	sterilní nádobka s pevným uzávěrem
zevní zvukovod	výtěr tamponem, případně výškrab lancetou		tampony (případně s TP), sterilní zkumavka

ODBĚR MATERIÁLU PRO MYKOLOGICKÉ VYŠETŘENÍ

Typ materiálu	Způsob odběru	Množství vzorku	Transportní soupravy
kůže	suchá – seškrab skalpelem nebo stěr zvlhčeným tamponem se sekrecí – stěr suchým tamponem abscesy – po perforaci jehlou stěr suchým tamponem	min. cca 30 šupinek	sterilní zkumavka, tampony (případně s TP)
vlasy, vousy, chlupy	vytažení folikulární části pinzetou	nejméně 10	sterilní zkumavka
nehty	výškrab hmoty z vnitřní části nehtové ploténky skalpelem	větší počet drobných šupin	sterilní zkumavka

ANALYTICKÁ FÁZE



NEPŘÍMÝ PRŮKAZ
detekce protilátek

PŘÍMÝ PRŮKAZ
mikroskopie
kultivace
průkaz antigenu
průkaz DNA

ANALYTICKÁ FÁZE - NEPŘÍMÝ PRŮKAZ

- **průkaz protilátek**
- **hlavní složka protihoubové imunity je buněčná**, detekce protilátek má pouze omezený význam
- **u imunokompromitovaných pacientů není dostatečná imunitní odpověď**
- protilátky v séru nemusí značit aktuální onemocnění, ale jen fakt, že se hostitel s patogenem setkal - vysoká promořenost populace v případě běžných patogenů - výjimka endemické mykózy



ANALYTICKÁ FÁZE - NEPŘÍMÝ PRŮKAZ

Candida

- detekce anti-mannanu
- precipitace, ELISA
- nízká senzitivita a specificita
- pozitivita u kolonizovaných pacientů
- výtěžnost testu je maximalizována v kombinaci s kandidovým antigenem mannanem pro průkaz invazivní kandidózy

dimorfní patogeni – špatná dostupnost testů v ČR

Blastomyces dermatitidis

Coccidioides species

Cryptococcus neoformans

Histoplasma capsulatum



ANALYTICKÁ FÁZE



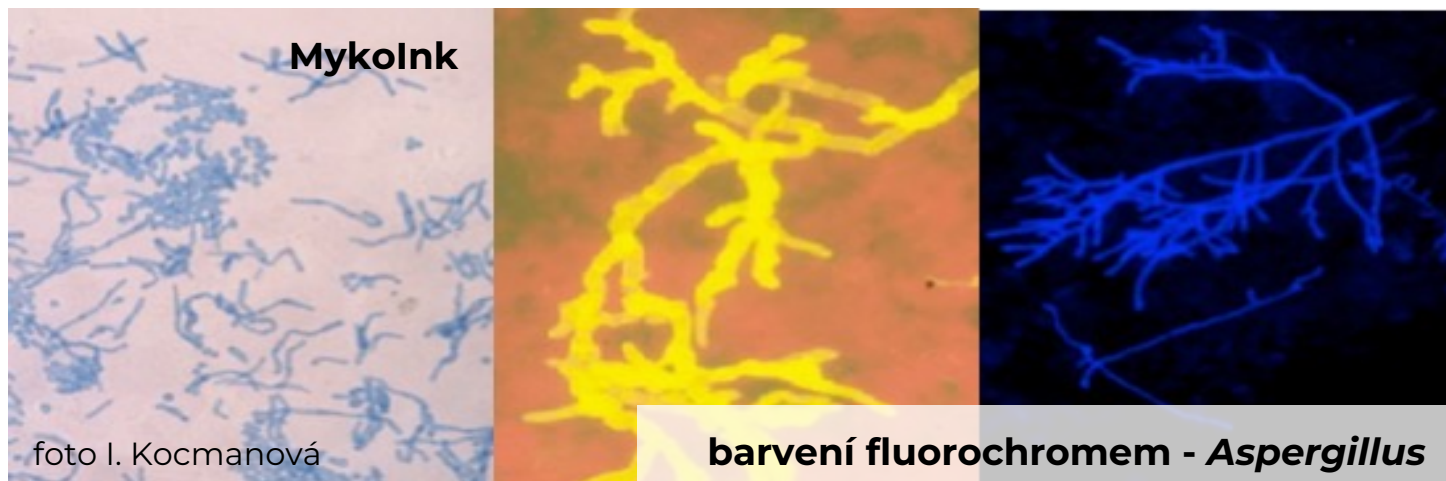
NEPŘÍMÝ PRŮKAZ
detekce protilátek

PŘÍMÝ PRŮKAZ
mikroskopie
kultivace
průkaz antigenu
průkaz DNA

PŘÍMÝ PRŮKAZ - MIKROSKOPIE

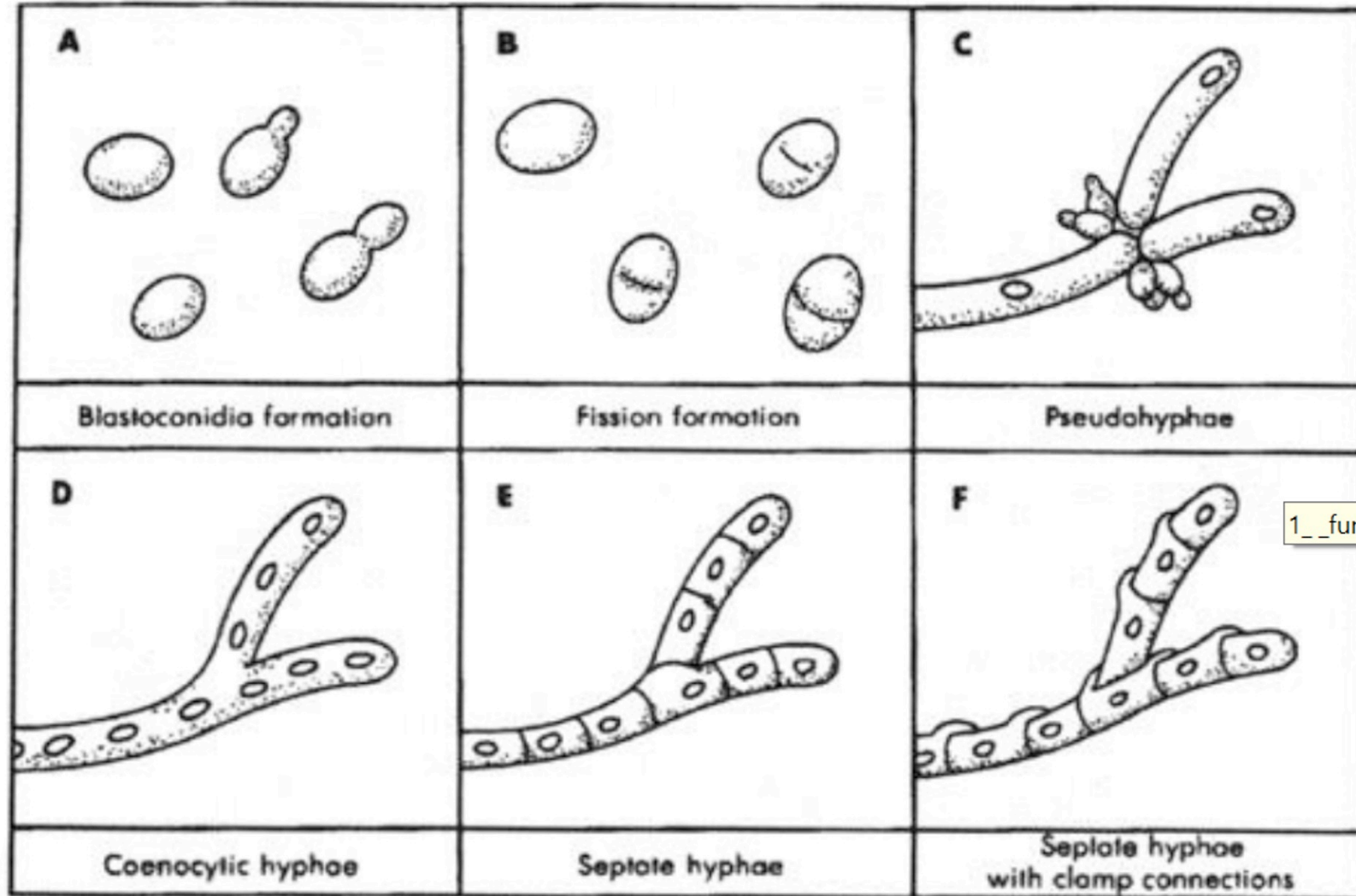
Nativní preparát - často v KOH

- **Ize dobarvit nespecificky (Lugolovo činidlo** - roztok elementárního jodu a jodidu draselného ve vodě, barví škrob a polysacharidy)
- **dobarvit specificky:**
 - **Mycolnk** (světelný mikroskop) - váže se na **chitin**
 - **Rylux** (fluoresc. mikr.) - **chitin**
 - **Calcofluor** - **chitin a celulóza** (fluoresc. mikr.)
 - **Blankophor** - různé polysacharidy (fluoresc. mikr.)



PŘÍMÝ PRŮKAZ - MIKROSKOPIE

1) Nativní preparát

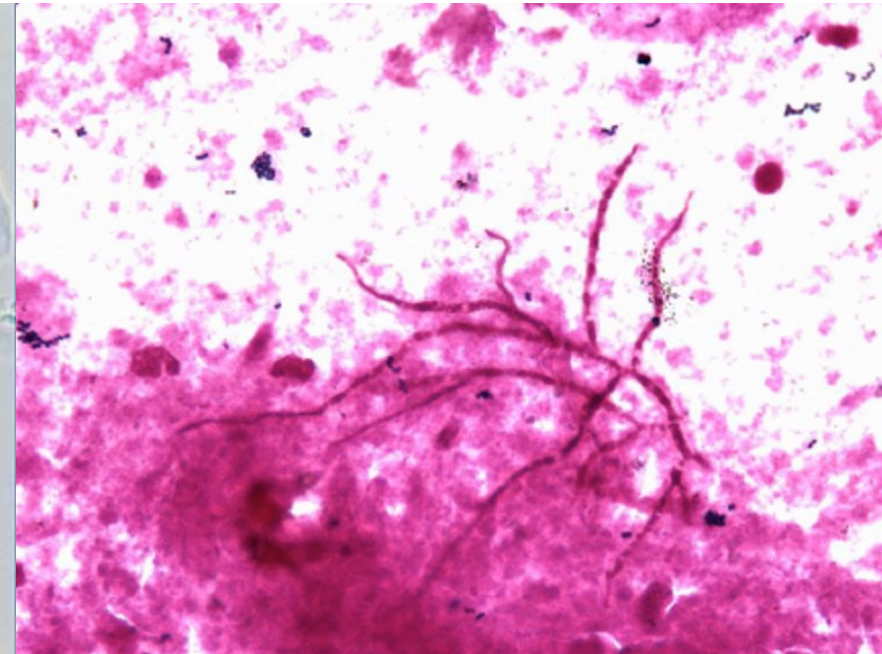
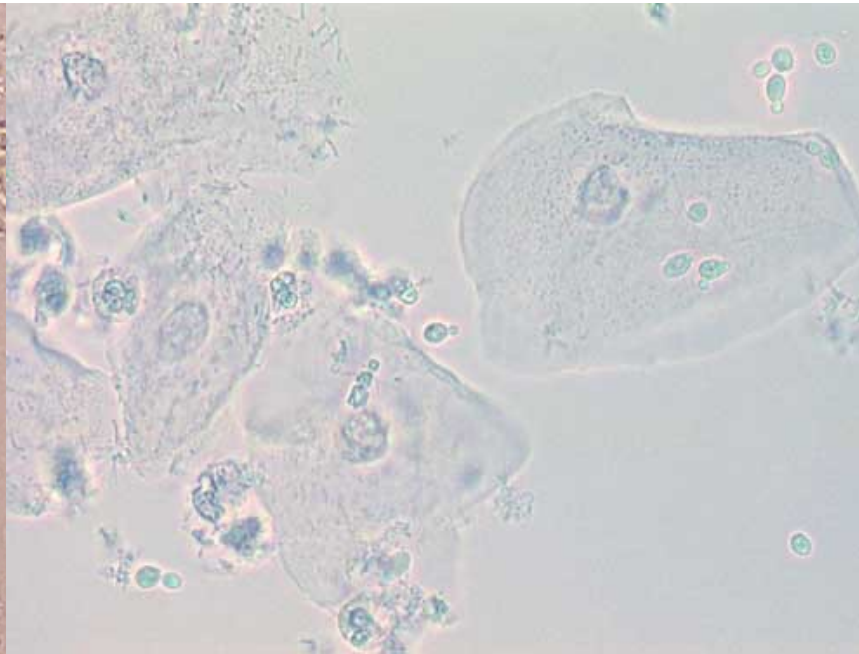
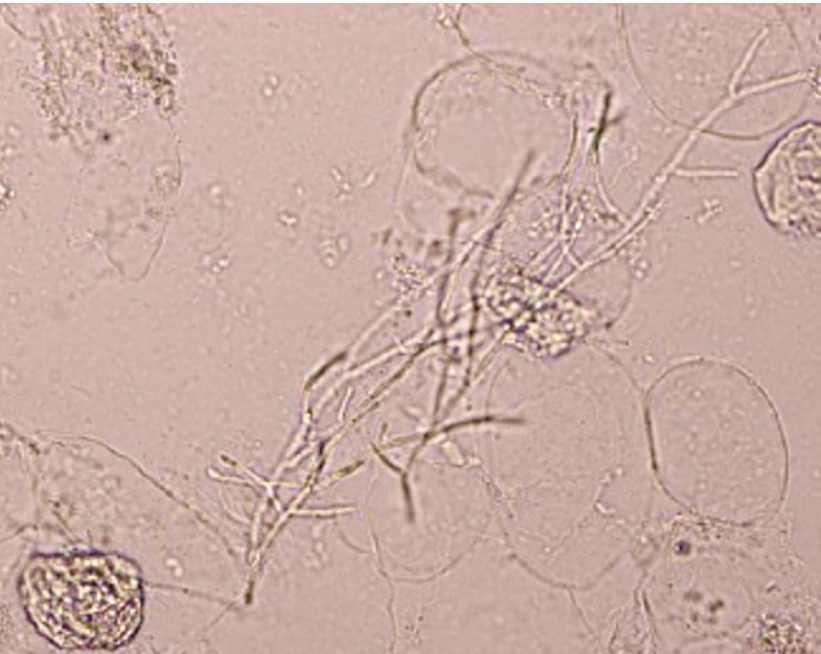


1_func

PŘÍMÝ PRŮKAZ - MIKROSKOPIE

Nativní preparát - *Candida* spp.

kulaté nebo oválné buňky, často pučící nebo s pseudomyceliem (nepravá vlákna)



PŘÍMÝ PRŮKAZ - MIKROSKOPIE

Nativní preparát - *Mukormycety* (zygomycety)

neseptovaná široká vlákna s pravoúhle odstupujícím větvením, připodobňovaná ke zmačkané stuze × aspergily: septovaná mycelia často dichotomického větvení (tvar „V“)

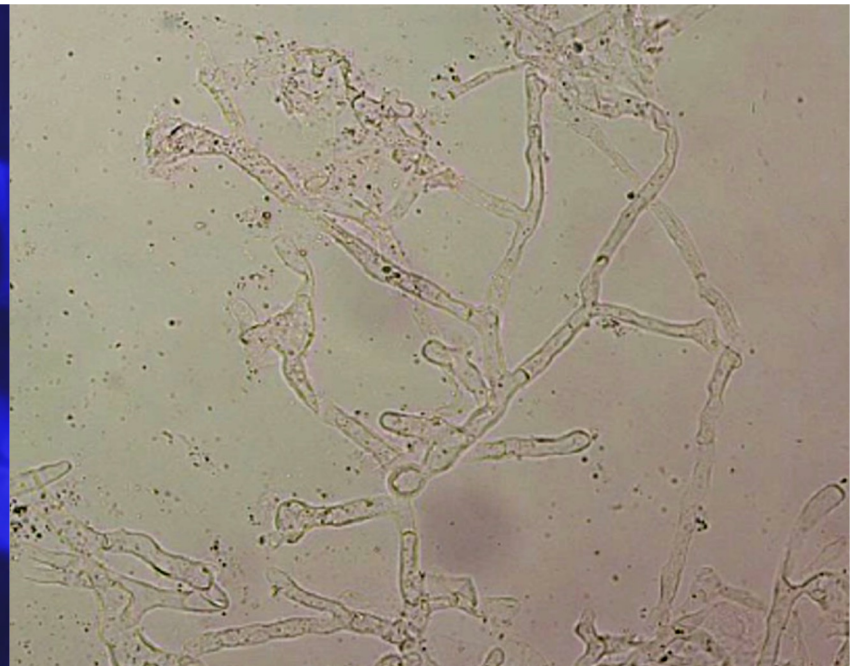
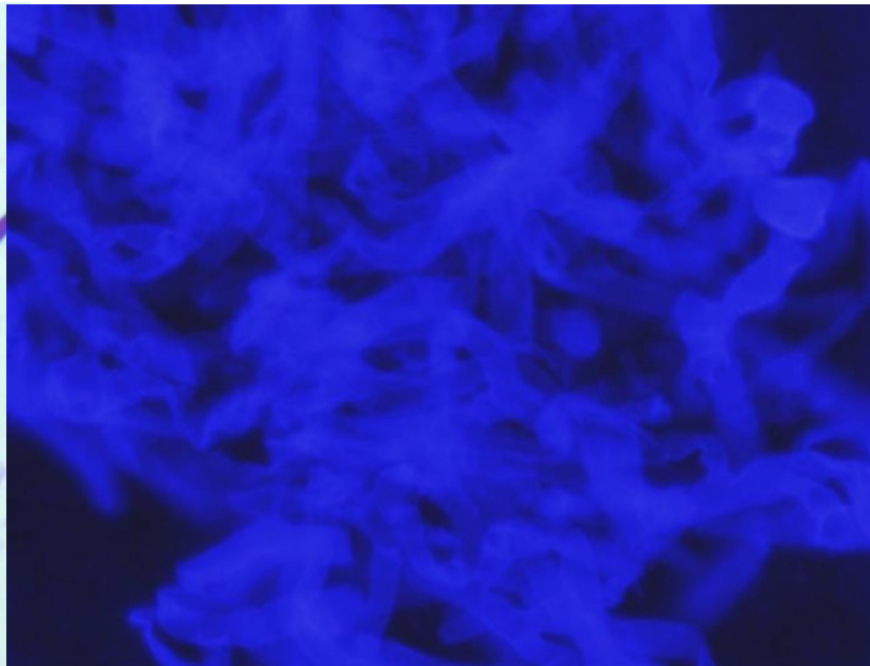
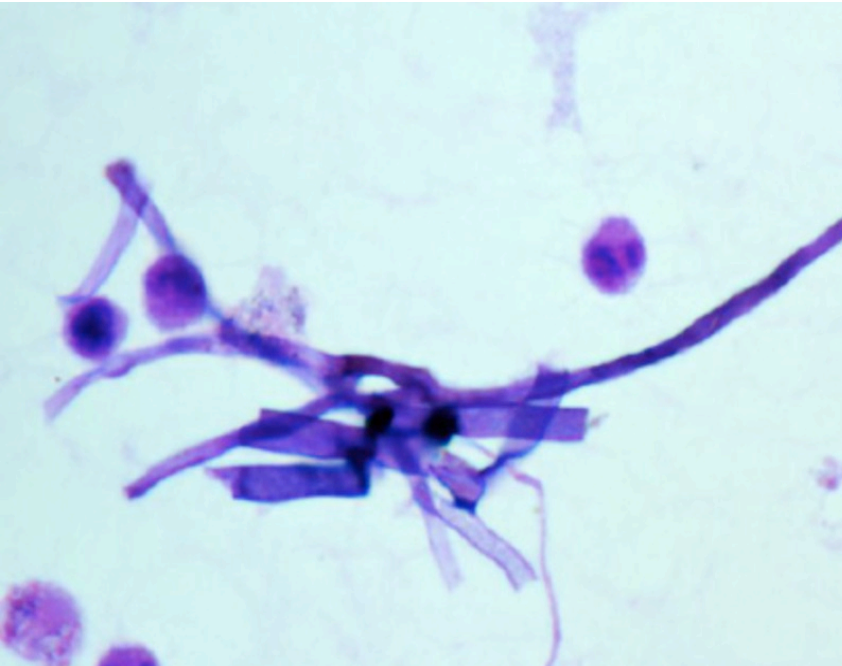


foto V. Chrenková

PŘÍMÝ PRŮKAZ - MIKROSKOPIE

Fixovaný preparát

- **obecná barvení** (Gram)
- **speciální barvení** (imunofluorescence, Groccot, Gram-Weigert ...)

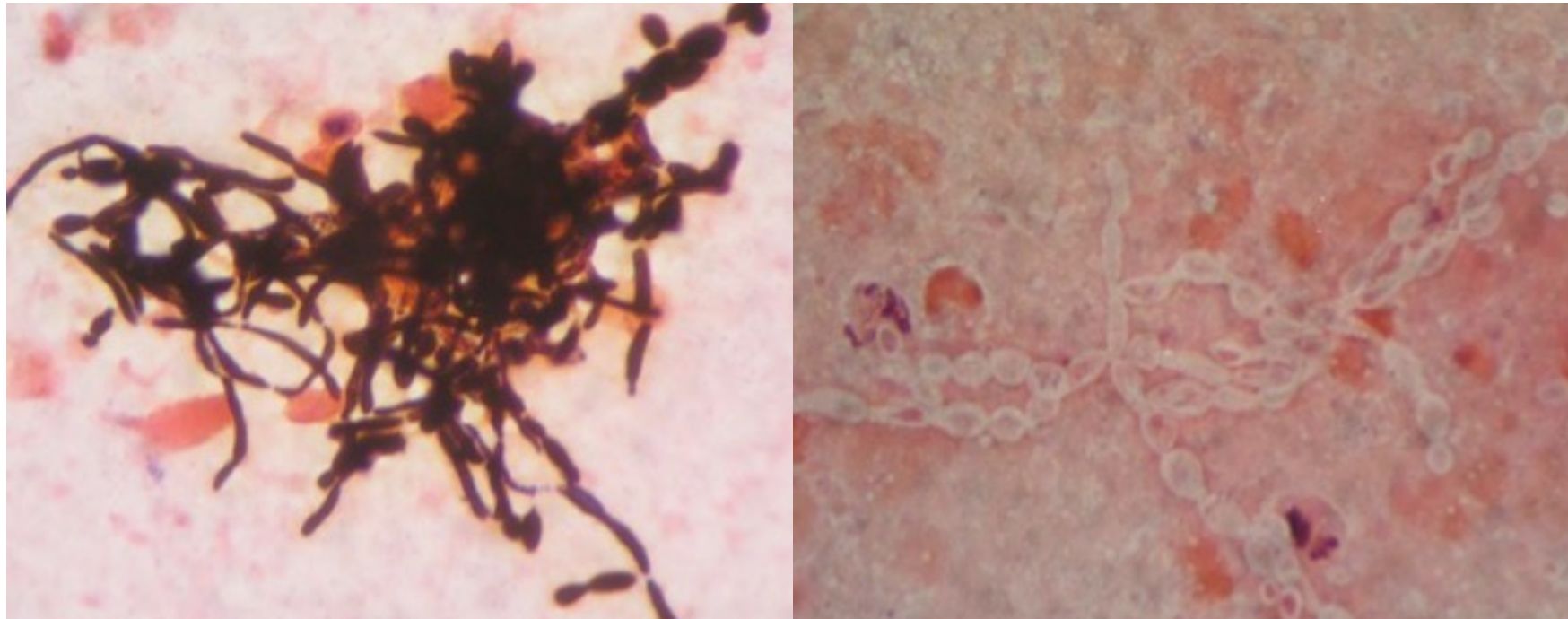


foto I. Kocmanová

barvení podle Grama (Kandidové infekce)

PŘÍMÝ PRŮKAZ - MIKROSKOPIE

Výhody

- **rychlost (minuty), u fixovaných preparátů desítky minut až 1-2h**
- **relativně nízká cena vyšetření**
- **specifita**, riziko kontaminace není velké, ale může být pozitivní i v případech, kdy houba již není životaschopná (např. dermatomykóza)

Nevýhody

- **malá senzitivita**, pozitivní obvykle až pozdějších stádiích onemocnění
- v materiálu lze většinou jen **orientačně zařadit patogena do rodu nebo skupiny** (septované x neseptované)



PŘÍMÝ PRŮKAZ - KULTIVACE

zlatý standard – izolace, identifikace, citlivost

INKUBAČNÍ TEPLOTA: 25/37°C (Buchta 2011) X **30°C** (Isenberg 2009)

KULTIVAČNÍ PŮDY

- běžné **bakteriologické** – krevní agar, BHI - brain heart infusion (pro kult. náročné)
- **mykologické** – **Sabouraudův glukózový agar** (\pm ATB), SGA s cykloheximidem (dermatofytózy), tekutý Sabouraud
- **selektivně diagnostické** – chromogenní půdy (dourčení někt. kvasinek)

DÉLKA KULTIVACE

- kvasinky: 3-5 dní
- oportunní vláknité houby: 7-14 dní
- dermatofyty, dimorfní houby: 3-6 týdnů



PŘÍMÝ PRŮKAZ - KULTIVACE

identifikační půdy

Malt extrakt agar, rýžový agar, chromogenní půdy, ureázový agar, ovesný agar, Čapkův agar (Czapek-Dox), bramborový agar...

diagnostická kultivace – „mikrokultura“



C. albicans
tvorba chlamydospor na rýžovém agaru

Chromogenní medium (bioMérieux)
ve směru hodinových ručiček
C. albicans
Trichosporon asahii
C. krusei
C. parapsilosis
C. tropicalis
C. glabrata

PŘÍMÝ PRŮKAZ – SÉROLOGIE

glukan (G-test)

galalaktomanan

manan

glukuronoxylomanan



PŘÍMÝ PRŮKAZ - SÉROLOGIE

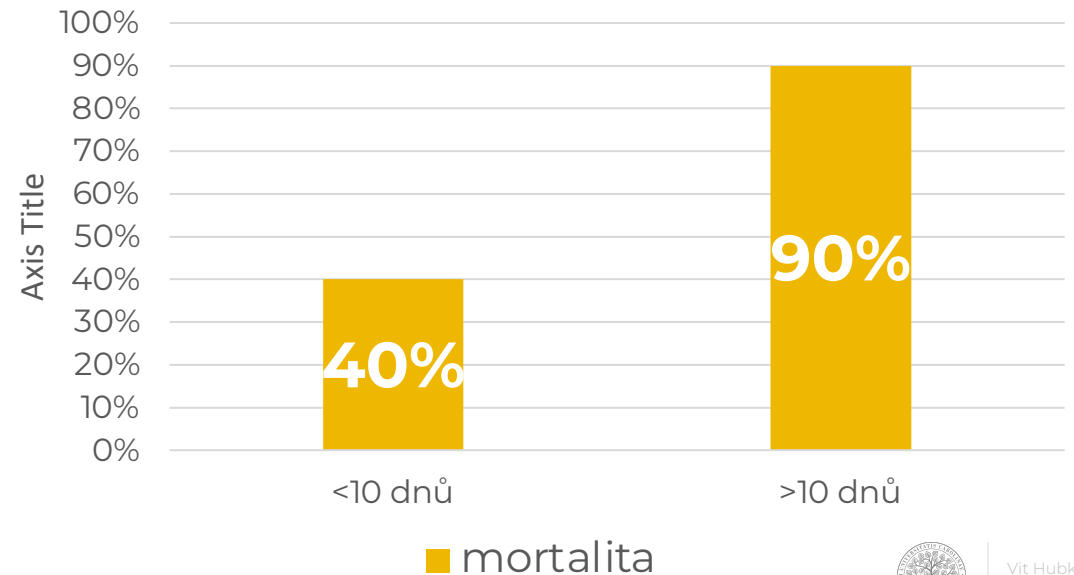
zásadní význam v diagnostice invazivních mykóz - rychlost, poměrně vysoká senzitivita → časná cílená léčba

antigeny buněčné stěny hub - v našich podmínkách:

- **INVAZIVNÍ MYKÓZA: glukan**
- **INVAZIVNÍ KANDIDÓZA: mannan**
- **INVAZIVNÍ ASPERGILÓZA: galaktomannan**
- **INVAZIVNÍ KRYPTOKOKÓZA: glukuronoxylomannan**

Pro prognózu pacienta s invazivní mykózou je zásadní časné zahájení léčby. Velký důraz je kladen na časnou diagnostiku (tj. serologické a molekulárně-biologické metody).

mortalita IA vs. čas zahájení léčby →



PŘÍMÝ PRŮKAZ - SÉROLOGIE

Limulus - Ostrorep

- pobřeží USA
- roční kvóta např. pro Maryland cca 250,000 ostrorepů
- odebráno cca 30% krve → stejný den vypuštění (označení schránky)
- ostrorep si vytvořil obranný mechanismus, aby zabránil šíření infekce v hemofymfě

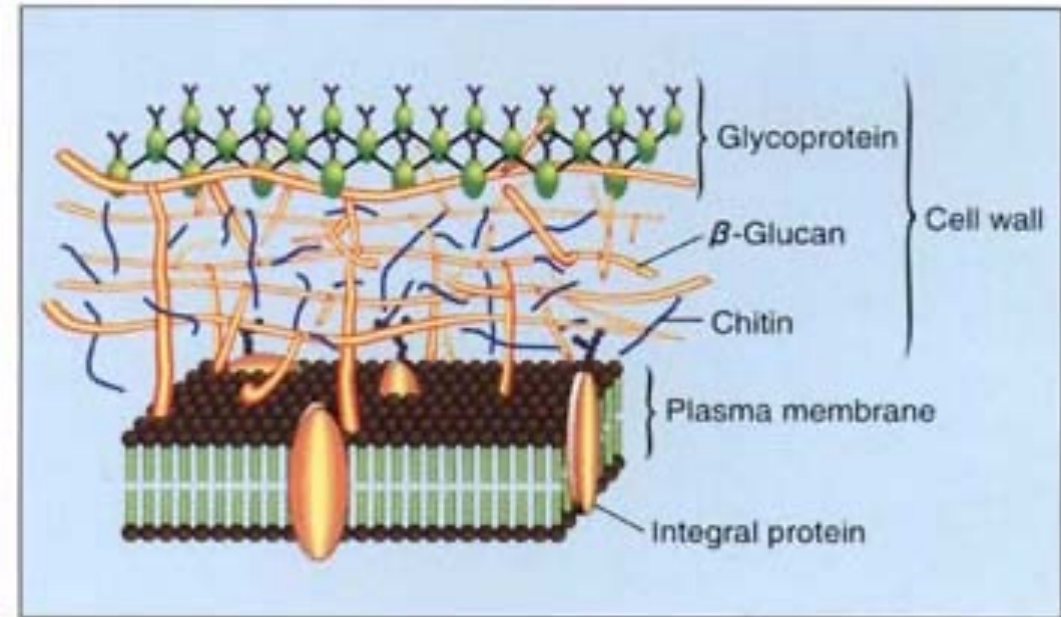
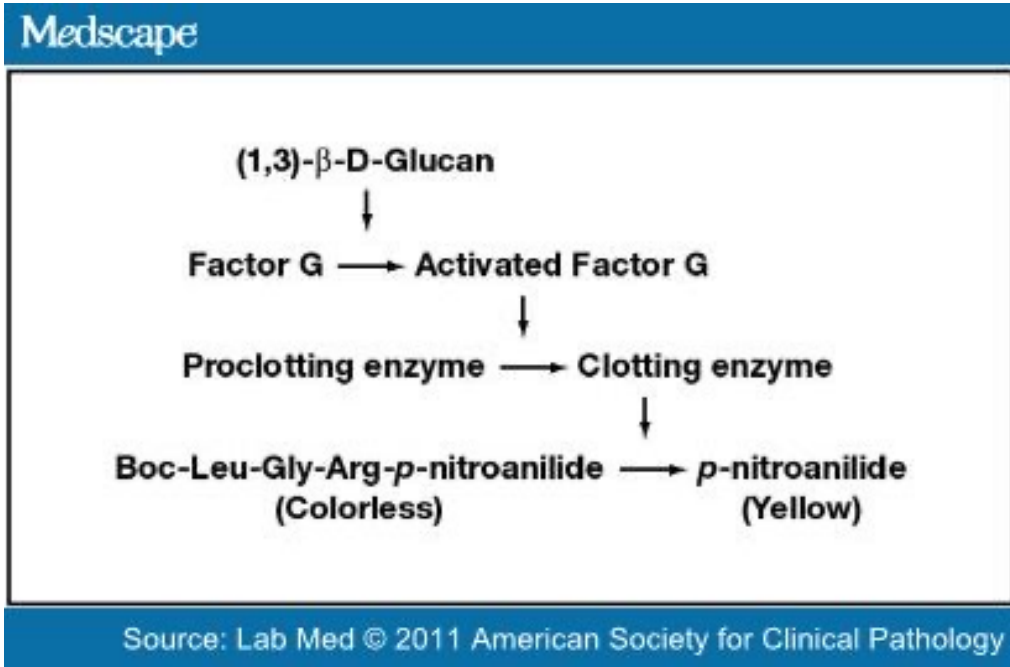
G-test / limulus test - princip

- **testování bezpečnosti potravin, léčiv, lék. nástrojů, vakcín**
- enzymová kaskáda srážení a tvorba gelové substance v přítomnosti některých antigenů potenciálních parazitů (**endotoxin G- bakterií, glukany hub**)
- krev je upravena pro výrobu testovacích kitů
- velmi senzitivní, k detekci **stačí 1 pg/ml antigenu**
- poměrně drahý test



PŘÍMÝ PRŮKAZ - SÉROLOGIE

G-test - limulus test - princip



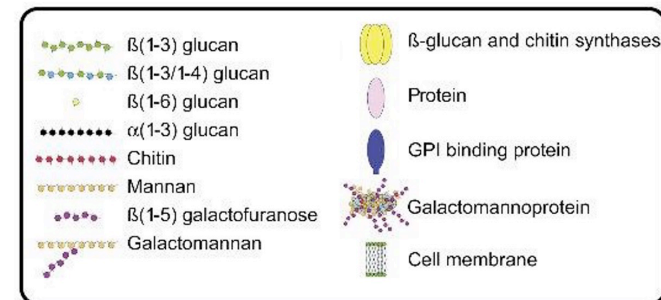
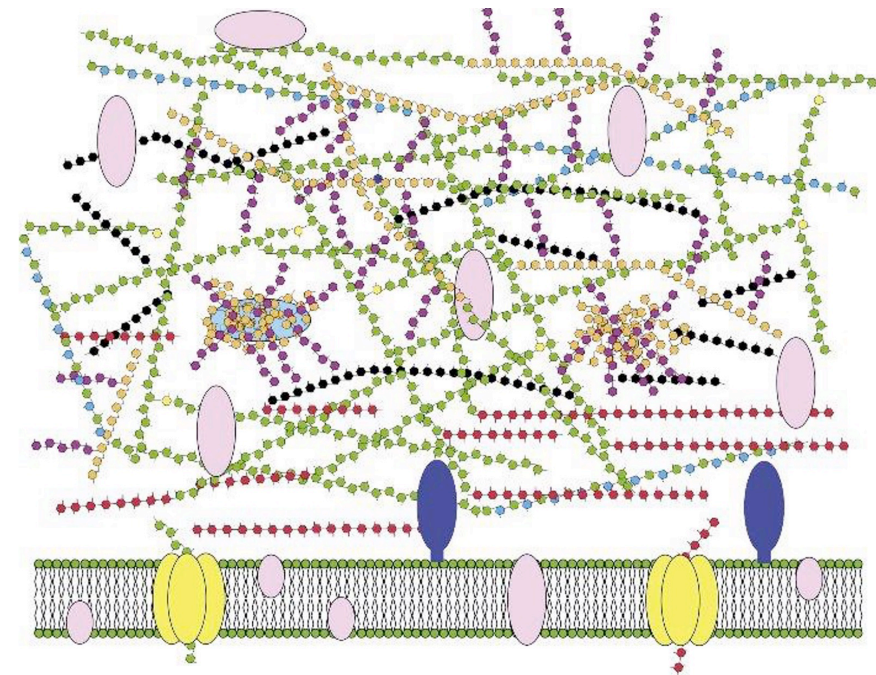
Schematic structure of fungus cell wall
(Supervised by Prof. Dr. H. Yamaguchi, School of Med., Teikyo Univ.)

- aktivace sérinové proteázy glukánem
(amébocyty ostrorepů = obdoba bílých krvinek)

PŘÍMÝ PRŮKAZ - SÉROLOGIE

Průkaz antigenu - β -D-glukan (G-test, limulus test)

- polysacharid stěny **většiny hub** (bakterií, řas, vyšších rostlin)
- **nedetekován u mukormycet**, jen velmi málo u **kryptokoků** a *Blastomyces dermatitidis*
- sérum
- cut-off ≥ 80 pg/ml (nebo ≥ 60 pg/ml u dvou po sobě jdoucích vzorků)
- **falešné positivity**
 - některá ATB (amoxicilin/klavulanát)
 - imunoglobuliny, albumin
 - někt. typy dialýzy
 - terapie krevními deriváty – albumin, imunoglobuliny
 - infekce některými bakteriemi
 - ošetření gázou, bavlnou, houbou s obsahem glukanu
 - bakteriální infekce
 - (odběrové zkumavky, laboratorní plasty atd.)



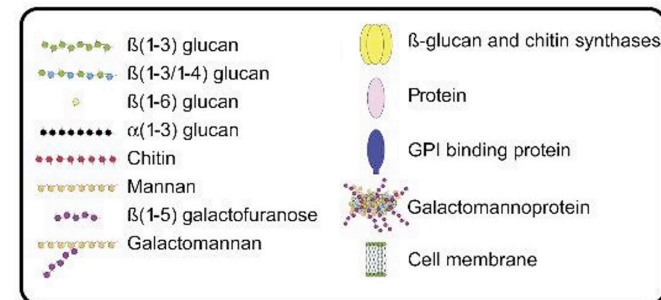
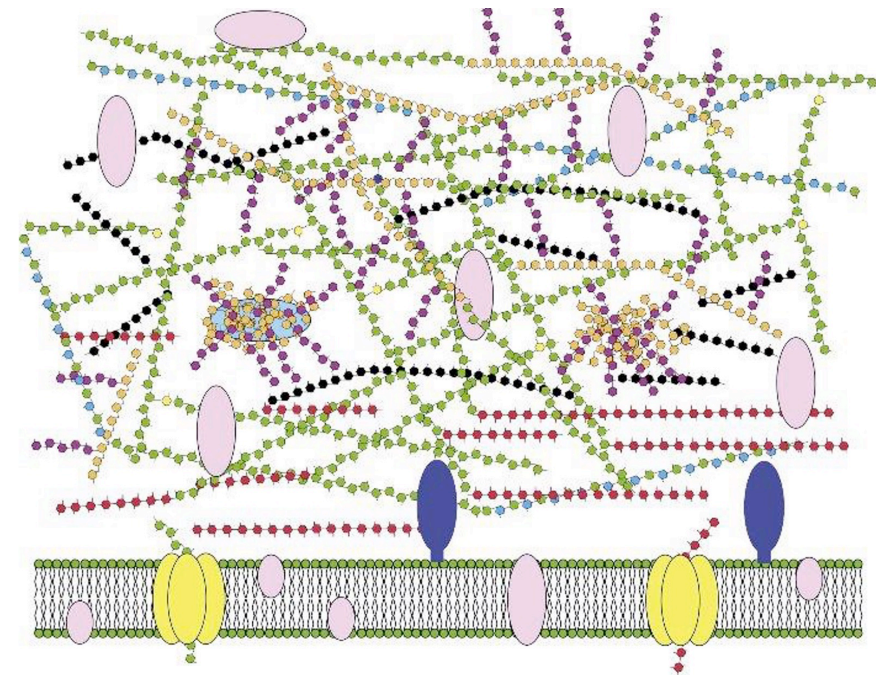
Abad et al. (2010)

PŘÍMÝ PRŮKAZ - SÉROLOGIE

GALAKTOMANNAN

(*Aspergillus*)

- polysacharidová složka BS **uvolňovaná do krevního oběhu rostoucími hyfami**
- **u opouzdřených forem infekce** (aspergillom) jsou ale nízké hodnoty GM
- **vysoká citlivost** zejména u pacientů **hematoonkologických** (neutropenie)

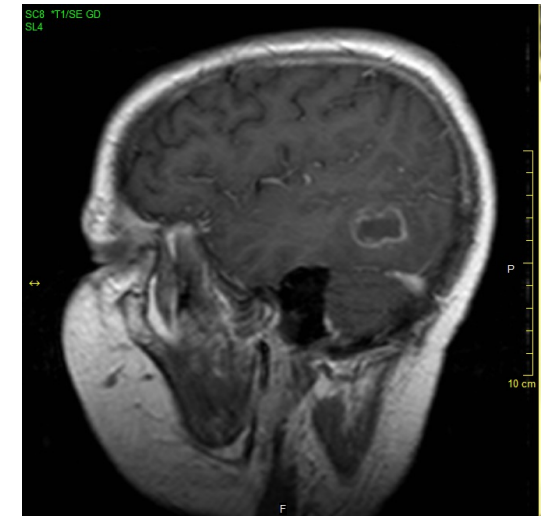
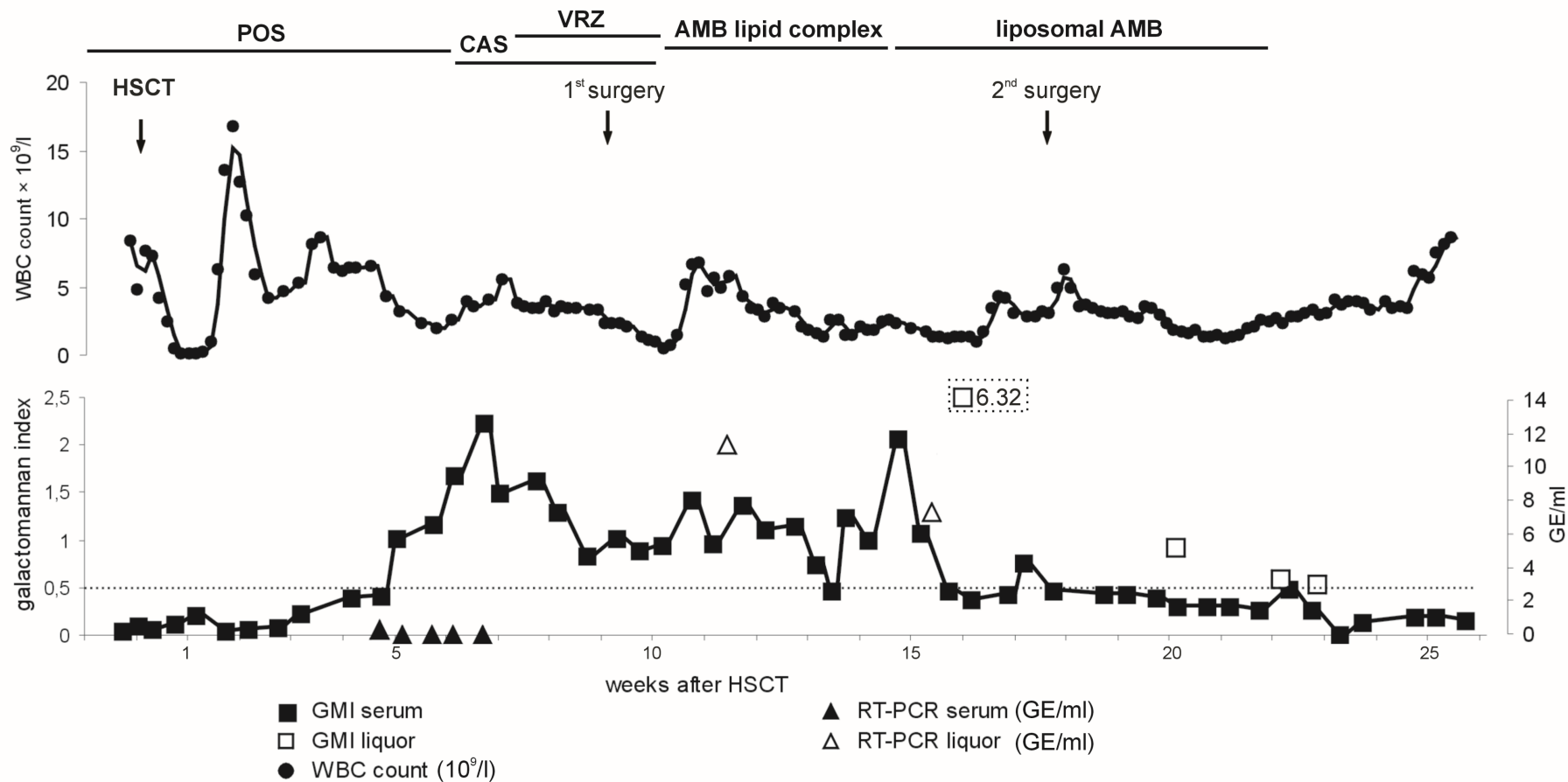


Abad *et al.* (2010)

PŘÍMÝ PRŮKAZ - SÉROLOGIE

Průkaz antigenu - galaktomannan (*Aspergillus*)

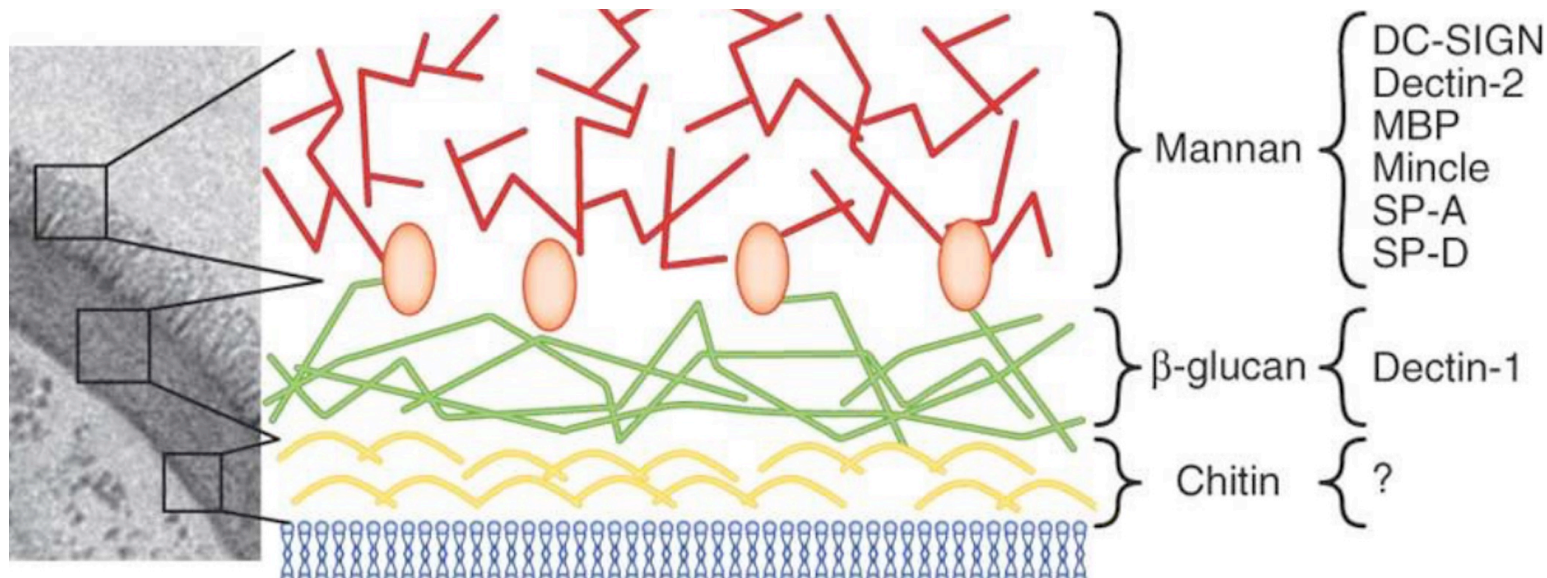
- monitoring v průběhu léčby IA u pacienta po transplantaci kostní dřeně



PŘÍMÝ PRŮKAZ - SÉROLOGIE

Průkaz antigenu - mannan (*Candida*)

- sérum, ELISA
- omezený význam stanovení samotného antigenu
- pro **průkaz invazivní kandidózy** doporučená kombinace průkazu **mannanu a antimannanu**
- **senzitivita ovlivněna druhem kvasinky**
- **pozitivita i při kolonizaci** bez přítomnosti invazivní infekce



	senzitivita	Specificita
Mannan	58 %	93%
antimannan	59 %	83 %
Mn+aMn	83 %	86 %

metaanalýza Mikulska *et al.* (2010)

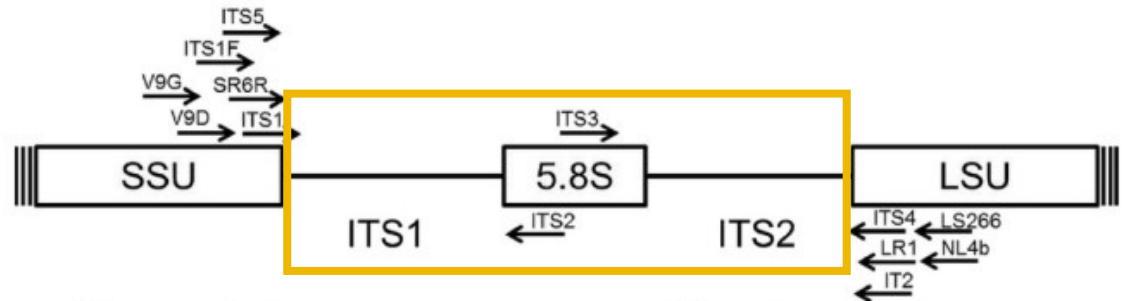
PŘÍMÝ PRŮKAZ - PRŮKAZ DNA

vlastní PCR reakce

- panfungální přístup
- specifické eseje pro určitý okruh patogenů, nebo jediný/skupinu druhů (výhodou u vzorků s potenciální kontaminanty z prostředí)

PCR přístup

- kvalitativní (ano/ne)
- kvantitativní (RT-PCR) – možnost odlišení kontaminace / kolonizace / infekce



Primer name	Sequences	References
ITS1:	(5' TCCGTAGGTGAACCTGCGG 3')	(White et al., 1990)
ITS2:	(5' GCTGCGTTCCTTCATCGATGC 3')	(White et al., 1990)
ITS3:	(5' GCATCGATGAAGAACGCAGC 3')	(White et al., 1990)
ITS4:	(5' TCCTCCGCTTATTGATATGC 3')	(White et al., 1990)
ITS5:	(5' GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG 3')	(White et al., 1990)
ITS1F:	(5' CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA 3')	(Gardes and Bruns, 1993)
IT2:	(5' CCTCCGCTTATTGATATGCTTAGG 3')	(Beguin et al., 2012)
SR6R:	(5' AAGTATAAGTCGTAACAAGG 3')	(Vilgalys and Hester, 1990)
LR1:	(5' GGTTGGTTTCTTTTCT 3')	(Vilgalys and Hester, 1990)
V9D:	(5' TTAAGTCCCTGCCCTTTGTA 3')	(Gerrits van den Ende and de Hoog, 1999)
V9G:	(5' TACGTCCCTGCCCTTTGTA 3')	(Gerrits van den Ende and de Hoog, 1999)
LS266:	(5' GCATTCCCAACAACACTCGACTC 3')	(Gerrits van den Ende and de Hoog, 1999)
NL4b:	(5' GGATTCTCACCTCTATGAC 3')	(O'Donnell, 1993)

PŘÍMÝ PRŮKAZ - POROVNÁNÍ

	Výhody	Nevýhody
Kultivace (dny až týdny)	<ul style="list-style-type: none">- určení patogena (rod, druh)- stanovení citlivosti	<ul style="list-style-type: none">- málo senzitivní- mnohdy nelze odebrat vhodný materiál
PCR (24 - 72 hodin)	<ul style="list-style-type: none">- velmi senzitivní- panfungální- určení patogena	<ul style="list-style-type: none">- nestandardní- falešné positivity- falešné negativy
Sérologie (hodiny)	<ul style="list-style-type: none">- senzitivní-časná diagnóza-standardní- monitorace úspěchu/selhání léčby	<ul style="list-style-type: none">- falešné positivity- nelze detekovat zygomycety
Mikroskopie (v minutách)	<ul style="list-style-type: none">- jednoduché- rychlé- specifické	<ul style="list-style-type: none">- málo senzitivní-mnohdy nelze odebrat vhodný materiál-neurčí patogena septované/neseptované

Časová náročnost

POVRCHOVÉ MYKÓZY:

ODBĚR MATERIÁLU A VYŠETŘENÍ VZORKŮ

Z jakého místa nejlépe odebrat pro vyšší výtěžnost? A proč?

OKRAJ?

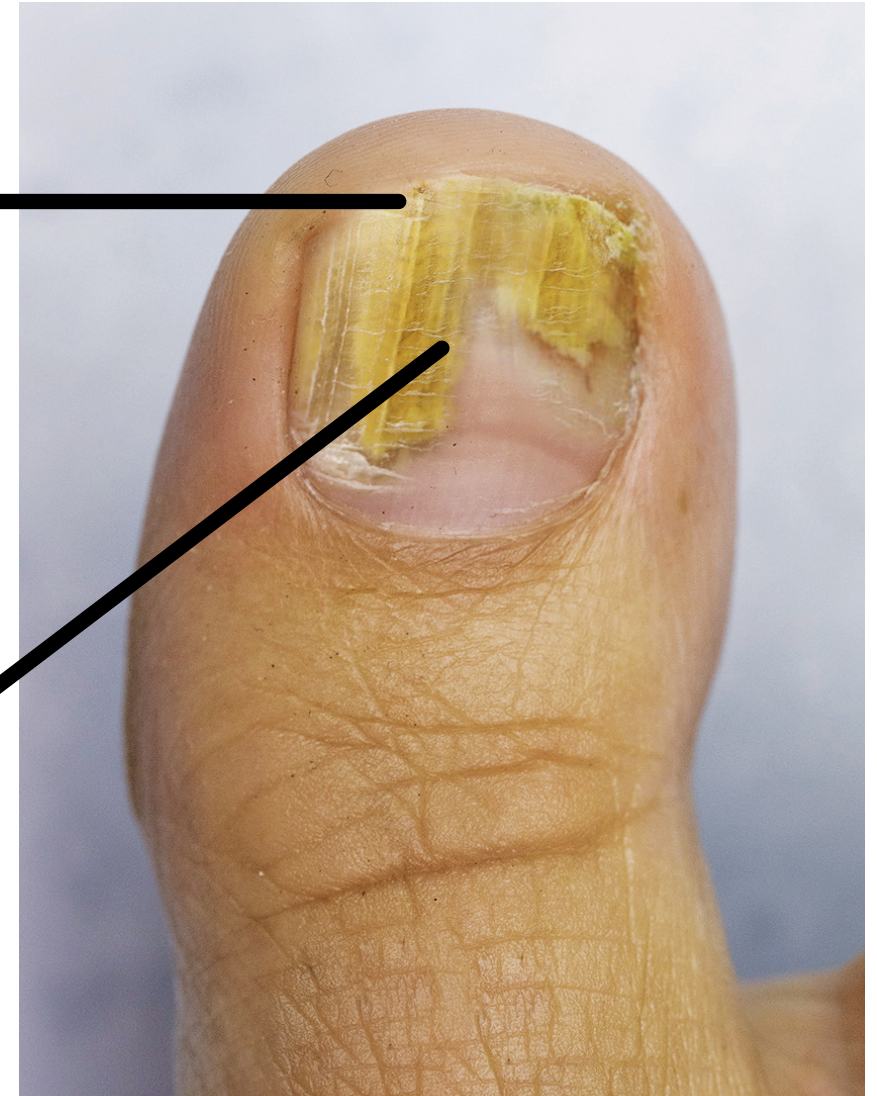


STŘED?

A co u nehtu?

OKRAJ?

**NEBO BLÍŽE
KE ZDRAVÉ
ČÁSTI?**



DIAGNOSTIKA DERMATOMYKÓZ

Odběr a zpracování materiálu

Kožní šupiny

- z okrajové části ložiska, místo odběru dekontaminovat (70% alkohol), seškrabání drobných šupin sterilním skalpelem po odstranění hrubých krust nebo šupin
- stěr zvlhčeným tamponem (méně vhodné)

Vlasy a chlupy

- vytáhnout i s folikulem sterilní pinzetou

Nehty

- odstranění povrchových částí a dekont. alkoholem
- šupiny, podnehtovou drť, opilované části do sterilní
- nádobky bez média



foto M. Skořepová

PŘÍMÝ PRŮKAZ: MIKROSKOPICKÉ VYŠETŘENÍ

- ničím nezastupitelné vyšetření, levné, časově nenáročné
- vysoká specificita, senzitivita závisí na kvalitě odebrané materiálu a zkušenostech
- obvykle vyšší záchytnost než kultivace, nemožnost druhového určení

Louhové preparáty

vzorek zakápnout **20%** KOH, nechá se působit 30-60 minut (často kombinace s barvením inkoustem Parker)

Fluorescenční metody

vazba barviva (Calcofluor, Blankophor) na chitin - fluorescenční mikroskop

pozitivní výsledek:

- pravidelná, intenzivně septovaná vlákna (**dermatofyty**)
- kvasinkové bb. nebo pseudomycelium (**kvasinky**)
- nepravidelná, často pigmentovaná vlákna (**NDFF**)
- až 30% mikroskop. pozit. vzorků kultivačně negativních



PŘÍMÝ PRŮKAZ: KULTIVACE

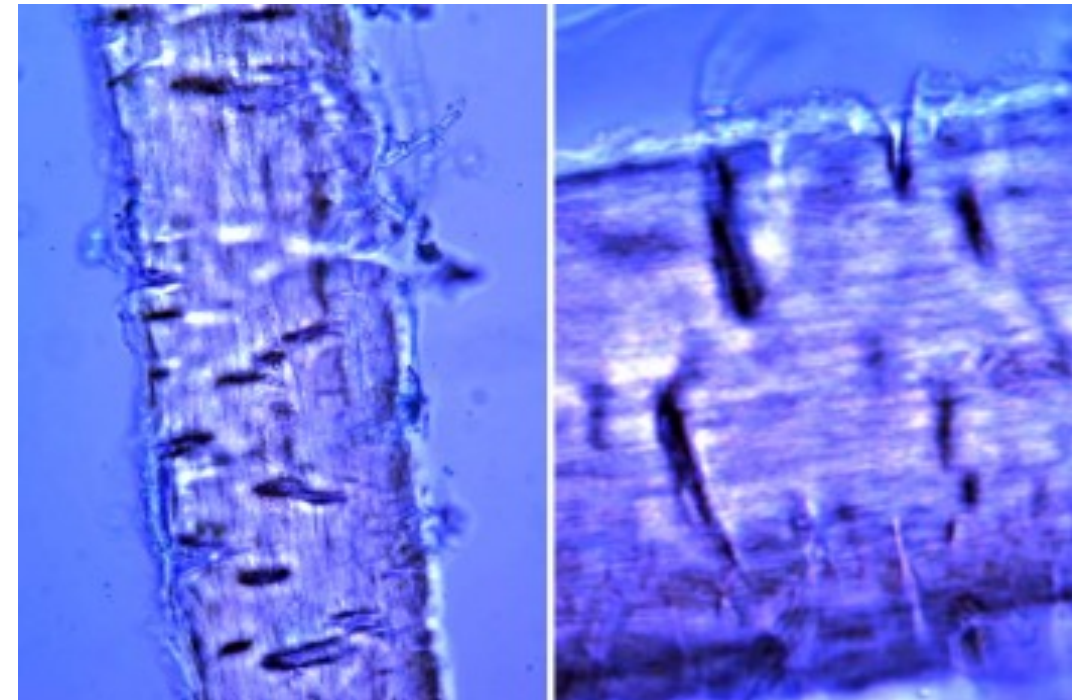
- **Sabouraudův glukózový agar** (SGA) s antibiotiky (chloramfenikol)
- část materiálu na SGA a přidavkem ATB a **cykloheximidu** (selektivní růst dermatofytů aj. zástupců řádu Onygenales)
- kultivace při cca **25 °C** (24-30 °C), ne 37 °C!; **3-4 týdny** pro dermatofyty, 3-7 dní pro kvasinky

Morfologická identifikace

mikro- a makromorfologie (vhodné přidat další médium, např. MEA, PDA nebo PCA)

dodatečné testy

- schopnost růstu při 37 °C
- růst na T1-T7 médiích
- perforace vlasu
- ureázový test



pozitivní test perforace vlasu

ANTIMYKOTIKA

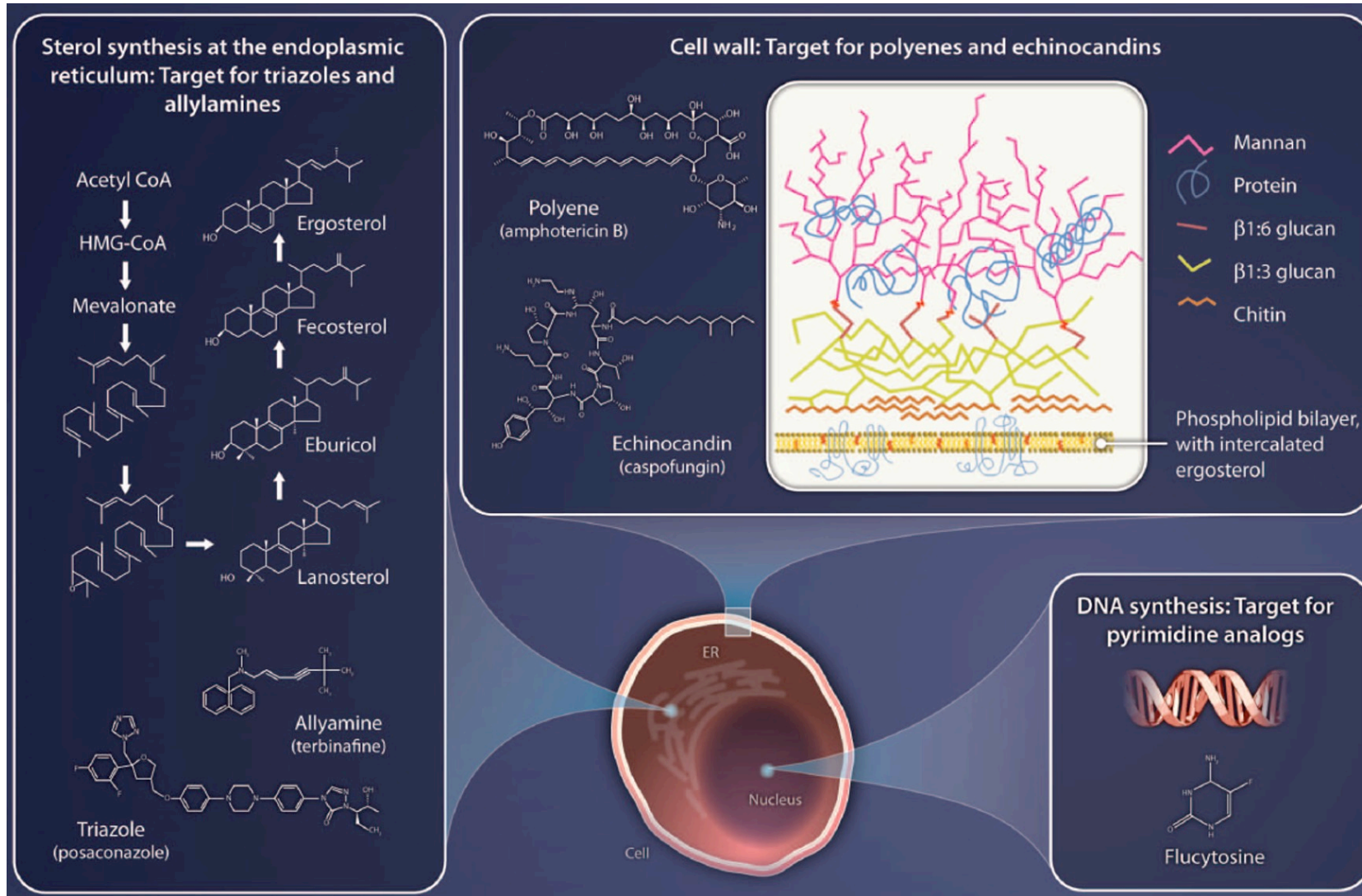
LÉKAŘSKÁ MYKOLOGIE



Vit Hubka, M.D., MSc., Ph.D.
Charles University

ANTIMYKOTIKA

antifungální látky

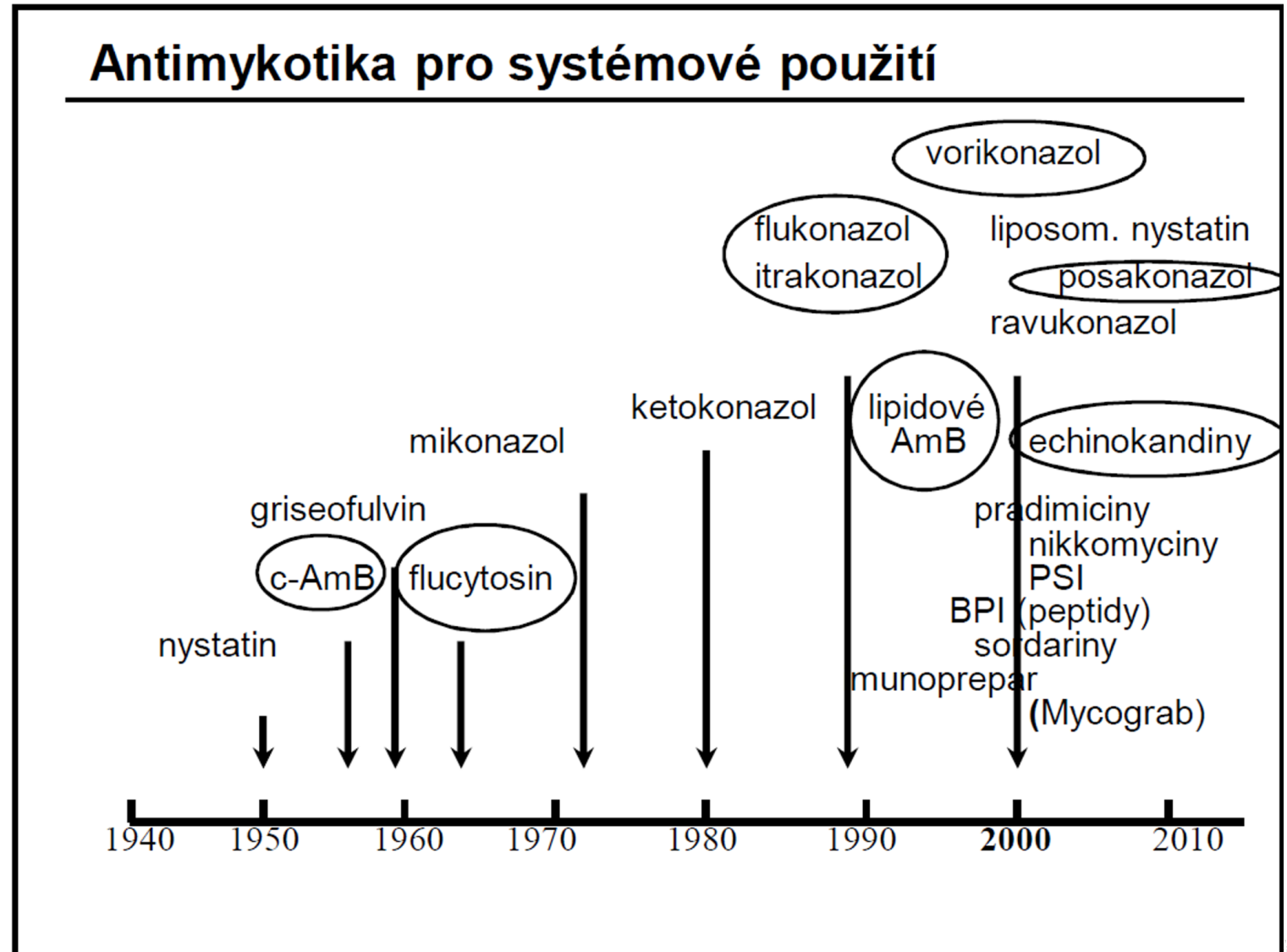


ANTIMYKOTIKA

antifungální látky

působí na syntézu:

- ergosterolu
- buněčné stěny
- DNA



REZISTENCE K **AZOLŮM**

REZISTENCE K **TERBINAFINU**

Aspergillus fumigatus

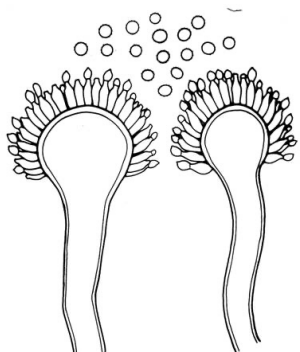
T. rubrum, T. mentagrophytes

- **používání azolových fungicidů v zemědělství**
(tebucon-, propicon-, difenocon-, epoxicon-, bromucazol) →
selekcce rezistentních kmenů
- pacienti dlouhodobě léčení azolovými léčivy

→ selhání léčby aspergilózy

- **prevalence:** na všech kontinentech, >10% v Nizozemí, UK, Japonsku, Turecku, ..

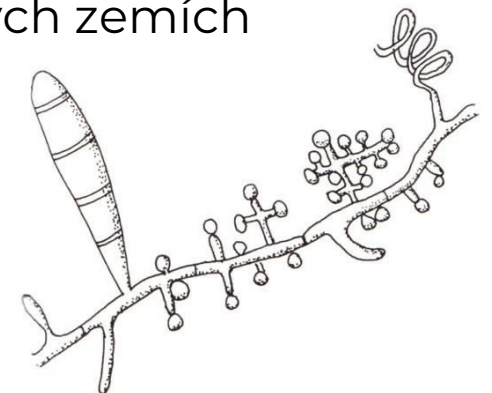
rezistence >10%: doporučeno změnit léčebné postupy pro empirickou / profylaktickou léčbu aspergilózy



- **nekontrolovaný prodej krémů obsahujících koktejl kortikosteroidů a 3-4 antimykotik / antibiotik** (JV Asie, Indie)

→ selhání léčby dermatofytózy

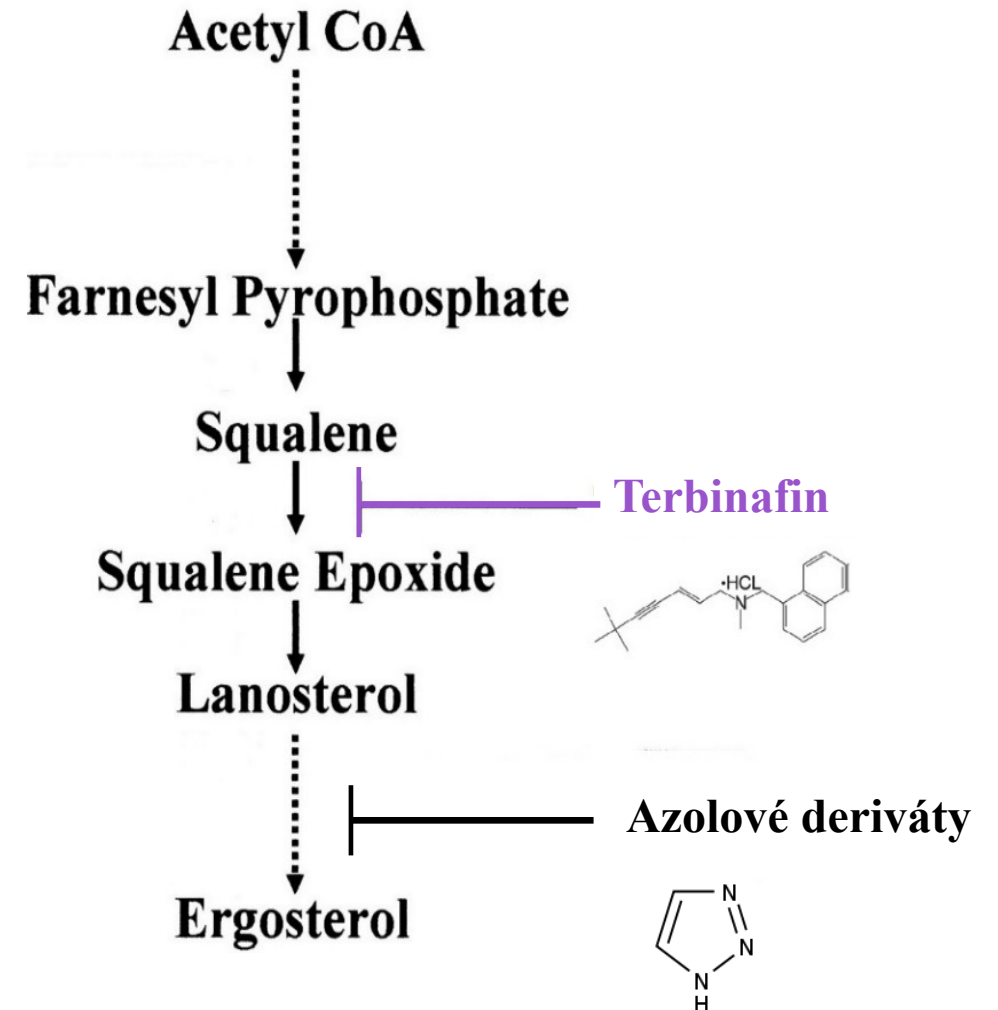
- **prevalence:** až desítky % v JV Asii a některých evropských zemích



MECHANISMUS ÚČINKU A REZISTENCE

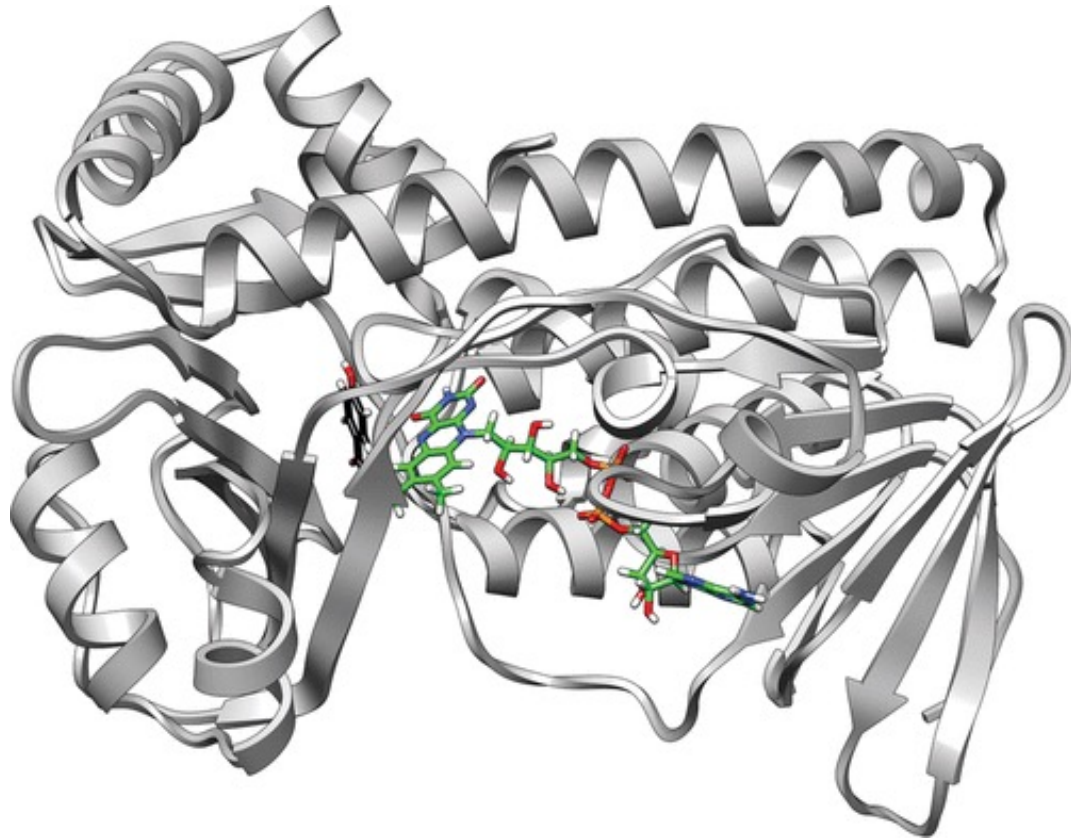
terbinafin a azolové deriváty

- inhibují enzymy zapojené v syntéze ergosterolu → ergosterol se nevytváří v dostatečné míře
- akumulace prekurzorů → změny propustnosti buněčné membrány → buněčná smrt
- rezistence: nesynonymní mutace v genech *Erg1* a *cyp51A* působí konformační změny v enzymech a zamezují nasednutí léčiva

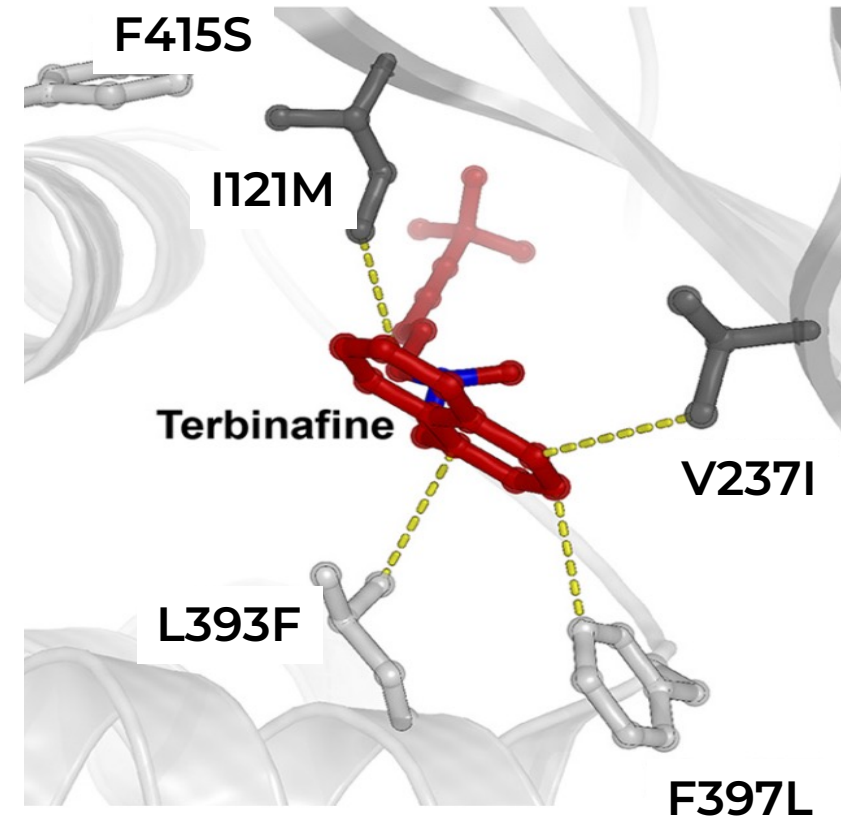


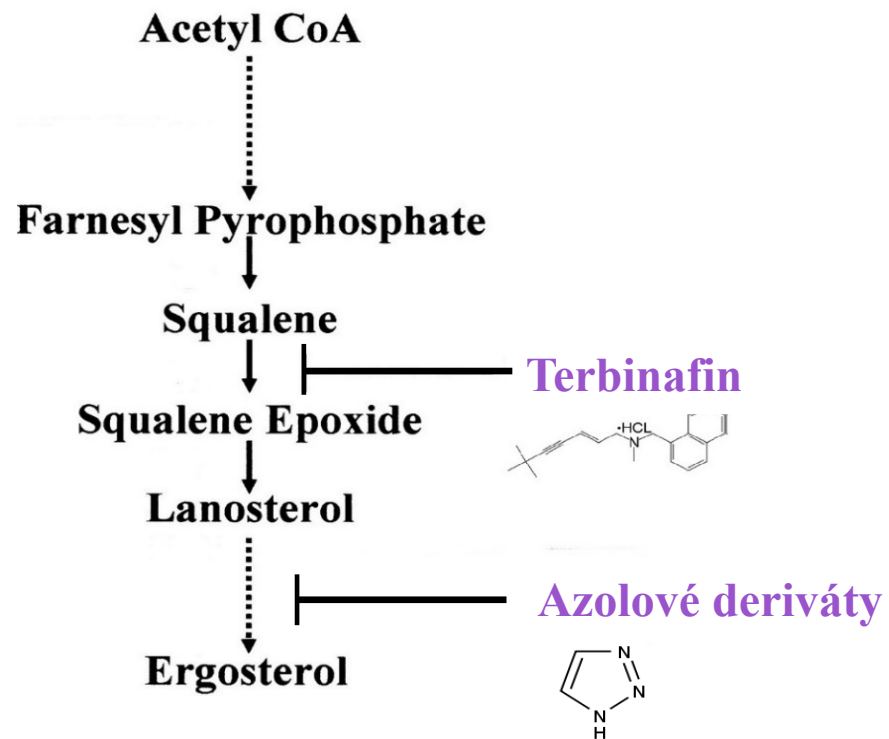
Různé mutace ve SQLE různá míra rezistence k terbinafinu

vazba terbinafinu na SQLE

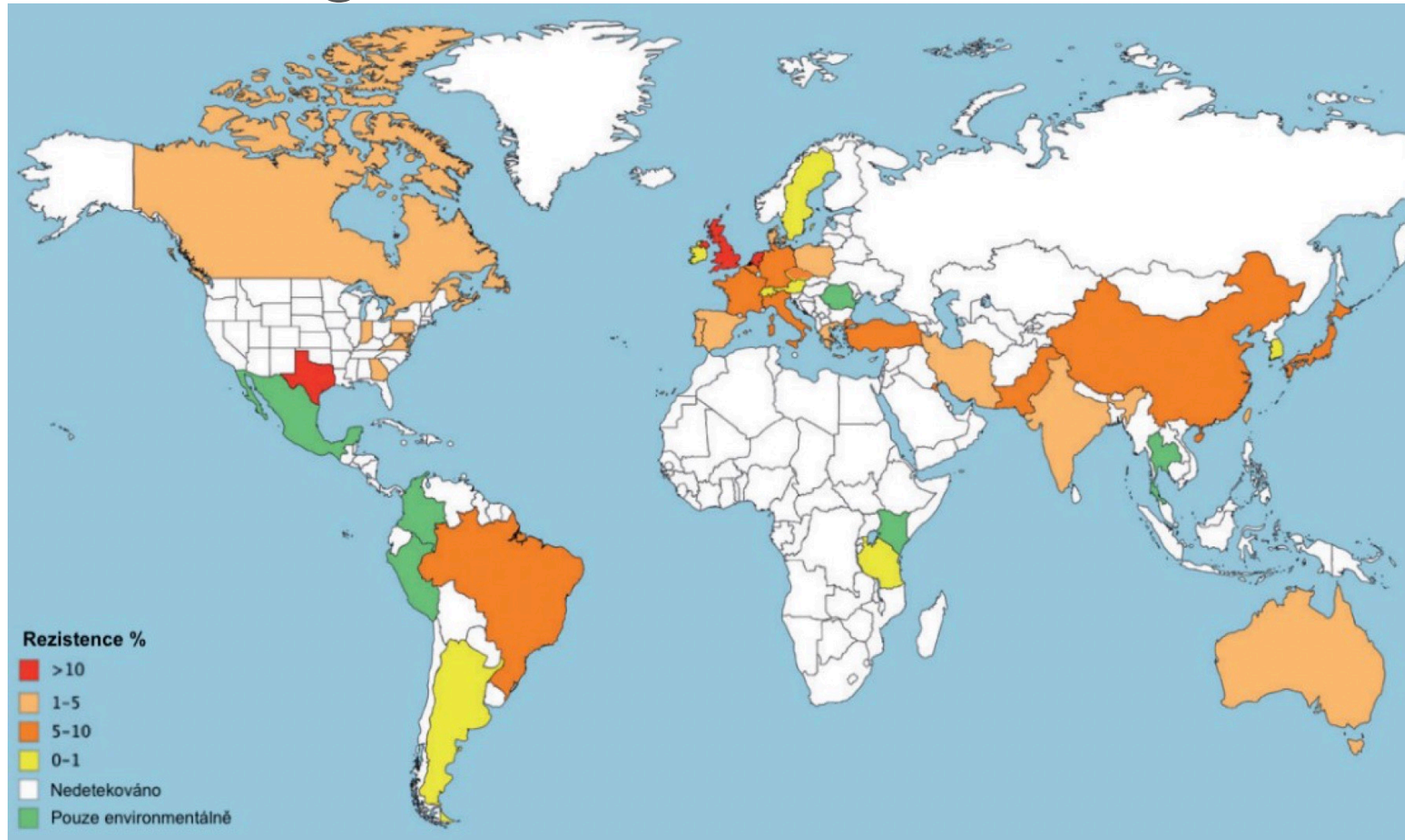


mutace v *Erg1* ovlivňující afinitu terbinafinu k vazebnému místu





Prevalence azol-rezistentních *A. fumigatus* v klinických vzorcích



Velká Británie 20 %
Nizozemí 11-30 %
Turecko 10,2 %
Japonsko 12,7 %

Česko 6,6 %
Itálie 6,3 %
Čína 5,8 %
Belgie 5,5 %
Dánsko 5 %
Španělsko 4,7 %
Německo 3,2 %
Írán 3,2 %
Austrálie 3,1 %
Řecko 2,7 %
Francie 2,1 %
Indie 1,7 %

Převzato a upraveno podle Lestrade *et al.* 2019. *Clin Microbiol Infect* 25: 799-806.

Nejčastější mutace v *cyp51A*:

TR₃₄/L98H

TR₄₆/Y121F/T289A

PREVALENCE REZISTENCE K TERBINAFINU

nutnost číst údaje v literatuře s obezřetností

TRICHOPHYTON RUBRUM

Řecko, Česko	0 %
Francie	0,23 %
Švýcarsko	~1 %
USA (onych.)	3,6 %

Japonsko	4 %
Írán	10 %
USA	18 %
Indie	10-54 %
Dánsko	56 %
Malajsie	100 %

- ↓ počet kmenů
- prevalence mezi kmeny se
suspektní rezistencí, zaslaných
do sběrné laboratoře

Nejčastější mutace v SQLE (*Erg1*):

L393F
F397L

T. MENTAGROPHYTES

Švýcarsko	0,2-0,6 %
Francie	0,69 %
Česko	2,5 %
USA (onych.)	4,3 %

Polsko	14 %
Írán	11 %
Belgie	20 %
Řecko	25 %
USA	56 %
Dánsko	63 %
Indie	8-74 %

Nejčastější mutace v SQLE (*Erg1*):

F397L
L393F

ZÁVĚRY AZOLOVÉ DERIVÁTY.

ANTIFUNGÁLNÍ REZISTENCE V ČR

- **prevalence** azolové rezistence u klin. izolátů *A. fumigatus* v ČR je **6.6 %**
- není **nutné měnit léčebná schémata pro empirickou / profylaktickou léčbu aspergilózy**, ale úroveň rezistence je třeba kontinuálně monitorovat i vzhledem ke stoupajícímu trendu
- „**environmentální mutace**“ **TR₃₄/L98H** a **TR₄₆/Y121F/T289A** patří k **nejčastěji detekovaným** u českých pacientů; omezení užívání azol. fungicidů by mohlo mít přínos pro snížení úrovně rezistence
- **skrínigové testování** (např. protokolem E.Def 10.1) je vhodné pro **časný záchyt ARAf kmenů**



ZÁVĚRY TERBINAFIN.

ANTIFUNGÁLNÍ REZISTENCE V ČR

- **prevalence rezistence k terbinafinu** u klinických izolátů ***T. mentagrophytes*** je **2.5 %**
- **rezistence nebyla detekována u *T. rubrum***
- **není nutné měnit postupy pro léčbu dermatofytózy**, ale úroveň rezistence u *T. mentagrophytes* by měla být nadále sledována, např. skrínigovým médiem obsahujícím 0,125 / 0,25 mg/L TRB
- všechny rezistentní kmeny měly genotyp „*T. indotineae*“, kde se předpokládá zavlečení imigrací



příští téma

POVRCHOVÉ MYKÓZY

LÉKAŘSKÁ MYKOLOGIE



Vit Hubka, M.D., MSc., Ph.D.
Charles University