

BP
10/2008

UNIVERSITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Katedra botaniky



Bakalářská práce

**Nedermatofytické keratinofilní mikromycety doprovázející
původce onychomykóz**

Nondermatophytic keratinophilic micromycetes associated with human onychomycosis

Vít Hubka

2008

školitel: **Karel Prášil**

PODĚKOVÁNÍ

Rád bych poděkoval svému školiteli Karlu Prášilovi za jeho ochotu si kdykoliv udělat čas, za rady a připomínky k práci v laboratoři, i k samotné bakalářské práci a za seznámení se spoustou zajímavé literatury.

Dále chci poděkovat dr. Aleně Kubátové za ochotu a čas, který se mnou strávila nad "kmeny", za cenné rady a nápady a za půjčenou literaturu.

Děkuji také MUDr. Magdaleně Skořepové, CSc. za poskytnuté primokultury a další podklady k práci.

Ještě chci poděkovat Ondrovi Koukolovi za několik užitečných připomínek a všem z "čísla 83" za příjemné soužití v laboratoři.

Také děkuji p. Lence Pokorné za pomoc při vaření půd.

Tuto práci jsem vypracoval samostatně, s použitím uvedené literatury.

Obsah

Obsah.....	2
Abstrakt.....	4
TEORETICKÁ ČÁST	5
1. Úvod.....	5
2. Onychomykóza	6
2.1. Rizikové faktory.....	6
2.2. Obranné mechanismy proti houbové infekci	7
2.4. Původci onychomykózy.....	9
2.5. Možné cesty invaze hub do nehtu a typy onychomykózy	9
3. Role nedermatofytických hub izolovaných z nehtu při onychomykóze	11
3.1. Nedermatofytické houby, opravdu problém na vzestupu?	11
3.2. Odběr materiálu a jeho zásadní význam pro posouzení role hub.....	13
3.3. Léčení onychomykózy vyvolané NVH	14
4. Keratin, keratofilní houby a keratinolýza	16
4.1. "Keratinolytický", nebo "keratofilní"?	16
4.2. Keratiny.....	16
4.2. Izolace keratofilních hub.....	17
4.3. Keratinolýza, nejen enzymatický proces	17
4.4. Další fyziologické vlastnosti keratofilních nedermatofytických hub	19
5. Nedermatofytické vláknité houby <i>in-vitro</i>	21
5.1. Experimentální prokazování keratinolýzy u hub	21
5.2. Invaze nehtové ploténky u nedermatofytických původců onychomykóz.....	21
Závěr	24
PRAKTICKÁ ČÁST.....	26
1. Zdroj materiálu.....	26
2. Odběr materiálu a kultivace na lékařském pracovišti	26
3. Zpracování přijatých kmenů	26
3.1 Kultivace	27
3.2 Dlouhodobé uchovávání kmenů.....	27
3.3 Mikroskopické technika, preparáty a fotodokumentace.....	27
3.4 Determinační literatura	28
4. Zhodnocení druhového zastoupení kmenů a vztah izolovaných hub k nehtům	28
5. Popis vybraných determinovaných taxonů	30
Seznam použité literatury:.....	33
Příloha I - Literární excerpce.....	39
Příloha II - Mikroskopické fotografie a morfologie kolonií kultivovaných hub	42

Abstrakt

Nedermatofytické vláknité houby jsou běžně izolovány z nehtů jako kontaminanty, nebo sekundární kolonizátoři při infekcích dermatofyty. Jejich možná role primárních patogenů je předmětem častých diskuzí. Tato práce shrnuje různé pohledy na význam nedermatofytických vláknitých hub při infekcích nehtů a snaží se shrnout důvody, kvůli kterým se názory autorů rozcházejí. Část práce se zabývá způsoby ověřování schopností nedermatofytických vláknitých hub napadat nehet a jiné keratinizované substráty *in-vitro*. Práce také zahrnuje přehled nedermatofytických vláknitých hub, které jsou v literatuře popisovány jako primární původci onychomykóz. Praktická část byla zaměřena na osvojení si práce s nedermatofytickými mikromycety izolovanými z nehtů, na jejich kultivaci, dokumentaci a určování.

Klíčová slova: keratin, keratofilní houby, keratinolýza, nedermatofytické vláknité houby, nehet, onychomykóza

Abstract

Nondermatophyte filamentous fungi are often isolated from nails as contaminants or secondary invaders in dermatophyte onychomycosis. Their possible role as primary pathogens is subject of frequent discussions. This work of mine summarises various points of view on significance of nondermatophytic filamentous fungi in nail infections. It also summarises reasons for which opinions of various authors differ. A part of my work deals with methods used for verification of nondermatophytic filamentous fungi's ability to invade nails and other keratinous substrates *in-vitro*. A list of nondermatophytic filamentous fungi which are in scientific studies referred to as primary causative agents of onychomycosis was also included in the discourse. Practical part of my work was focused on getting experience in working with nondermatophytic micromycetes isolated from nails, on their cultivation, documentation and determination.

Key words: keratin, keratinophilic fungi, keratinolysis, nail, nondermatophytic filamentous fungi, onychomycosis

TEORETICKÁ ČÁST

1. Úvod

Za posledních několik desetiletí bylo mezi saptotrofními a fytopatogenními houbami popsáno mnoho druhů, které jsou navíc schopné vyvolat onemocnění člověka. Tento trend pokračuje i dnes.

Nejinak je tomu i u houbami vyvolaného onemocnění nehtů, onychomykóze. Napadení nehtu mají na svědomí nejčastěji specializované parazitické houby (tzv. dermatofyta). Ostatní houby izolované z nehtu (tzv. nedermatofytické) se těší v poslední době zvýšené pozornosti a o jejich významu jako o možných patogenech toho bylo mnoho napsáno. Názory autorů na význam těchto hub se často liší a jsou předmětem diskuzí.

Cíle práce:

- Podat obraz o současných pohledech na skupinu nedermatofytických vláknitých hub, o důvodech rozporů nad úlohou těchto hub v napadeném nehtu a o snahách tyto rozpory v praxi řešit.
- Práce má nastínit jaké jsou experimentální snahy o ověření keratinolytických schopností nedermatofytických vláknitých hub, jakožto nejdůležitějšího faktoru virulence při napadání nehtu.
- Vypracovat přehled druhů nedermatofytických vláknitých hub zastoupených v odběrech z nehtů.
- Cílem praktické části bylo naučit se pracovat s houbami izolovanými při odběrech z nehtů, tedy je kultivovat, určovat, dokumentovat a uchovávat.

2. Onychomykóza

Onychomykóza (z řeckého onychos = nehet) je nejčastější onemocnění nehtů. Je celosvětovým problémem a její léčení stojí každoročně nemalé prostředky. Ve frekvenci onychomykózy jsou regionální rozdíly závisící především na klimatu a socioekonomických podmínkách. Před sto lety byla považována za vzácnou, ale její prevalence* dramaticky vzrostla během posledních několika desetiletí (Baran et al. 1999). Částečně to může být nárůst zdánlivý, protože houbové infekce nehtů nebyly nikdy příliš studovány z důvodu, že se na ně pohlíželo spíše jako na kosmetický než zdravotní problém (Torres-Rodríguez & López-Jodra 2000). Nepopíratelné jsou ale změny ve společnosti jako stárnutí populace, vznik nové skupiny imunokompromitovaných pacientů, nárůst počtu diabetiků a další změny vedoucí k rozšiřování spektra lidí ohrožených onychomykózou (Midgley & Moore 1998).

V populacích vyspělých zemí se prevalence onychomykózy pohybuje od 2-13 % a stoupá významně s věkem, podle některých studií na 25 % i více. U dětí je onychomykóza vzácná kvůli rychlému růstu nehtů a z důvodu absence rizikových faktorů - viz níže (Kulíková 2008).

Onychomykóza postihuje častěji nehty prstů u nohou než nehty na rukou, nejčastěji palec nebo malíček (pravděpodobnost většího poškození v těsné obuvi). Nehty na rukou se obvykle infikují sekundárně z ložisek infekce jinde na těle (Vosmík a Skořepová 1995). Některé neléčené formy působí značnou bolestivost a nezanedbatelná je i estetická stránka, která vede k psychickým a společenským obtížím postižených a ke snížení kvality jejich života (Midgley & Moore 1998).

2.1. Rizikové faktory

Na vzhledu a kvalitě nehtu se promítá celá řada faktorů, jedno z odvětví čínské medicíny se dokonce zabývá posuzováním zdravotního stavu podle vzhledu nehtu. Zdravý a neporušený nehet je stavěný tak, aby odolával vnějším vlivům, včetně houbových infekcí, proto bývá napaden jen zřídka.

S přibývajícím věkem se mění struktura nehtu. Můžeme pozorovat změny v barvě, tloušťce a ohebnosti. Zvyšuje se také lomivost nehtu. Tyto změny mají za následek větší náchylnosti nehtu k infekcím různými druhy hub (Torres-Rodríguez & López-Jodra 2000).

Pacienti s diabetes mellitus bývají považováni za rizikovou skupinu. Několik studií nezávisle na sobě zjistilo prevalenci onychomykózy mezi 25-35 %, to bylo asi 2,5× více než u kontrolního vzorku z nediabetické populace (Manzano-Gayosso et al. 2008, Dogra et al. 2003,

* prevalence - užíváno jako počet nemocných k určitému datu
incidence - počet nových případů infekce za časové období

Gupta et al. 1998). Hlavními komplikacemi majícími význam při vzniku onychomykózy u diabetiků jsou zhoršený krevní oběh a snížená citlivost končetin, která při nevhodném obutí mívá za následek poškození nehtu, které usnadňuje vznik infekce. Otlaky způsobené nehtem deformovaným onychomykózou někdy vedou i k nekróze a s ní spojenými dalšími komplikacemi (Gupta et al. 1998). U diabetiků byla pozorována zvýšená izolace nedermatofytických hub, především kvasinek (Dogra et al. 2003, Manzano-Gayosso et al. 2008).

Další skupinou, ve které se onychomykóza vyskytuje častěji jsou imunosuprimovaní pacienti[†]. Zde vyžaduje zvláštní pozornost především přítomnost rodu *Fusarium* při onychomykóze. Ten je znám jako jeden z nejčastějších původců nedermatofytické onychomykózy a u imunosuprimovaných i jako původce diseminovaného invazivního onemocnění (Tomšíková 2003). To by mělo být zohledněno před započatím imunosupresivní léčby, protože se napadený nehet může stát vstupní branou systémové houbové infekci. Je pravděpodobné, že tomu tak nemusí být jen u rodu *Fusarium* (Arrese et al. 1996).

Zvýšený výskyt onychomykózy je spojen s některými profesemi (horníci), sportovními aktivitami (fotbal, běh, plavání), ale také s prací na zahradě, kde dochází ke kontaktu s hlínou a rostlinami jako možnými rezervoáry některých skupin nedermatofytických hub. Těsná obuv, traumata nehtů a nohou, zapaření a nedostatečná hygiena, to vše přispívá ke vzniku infekce nohou a nehtů (Midgley & Moore 1998).

2.2. Obranné mechanismy proti houbové infekci

Obranné mechanismy můžeme v zásadě rozdělit na vnější a vnitřní.

K **vnějším** patří zejména nepoškozený povrch kůže a nehtu, nezměněný celou řadou nemocí. Důležité je i fyziologické osídlení mikroorganismy.

Z **vnitřních** faktorů mají klíčové postavení fagocytující elementy, granulocyty a monocyty, které zabrání růstu hyf. V obraně proti infekci se uplatňují Th1 a Th2 lymfocyty (Jedličková 2006).

Je znám vztah mezi četností výskytu onychomykózy u HIV-pozitivních pacientů v závislosti na fázi nemoci. Ve fázi, kdy je počet $CD4^+$ T-lymfocytů kolem $400/mm^3$ (zdravý člověk má kolem $1200/mm^3$) se incidence onychomykózy rapidně zvyšuje. Při poklesu na $200 CD4^+$ T-lymfocytů na mm^3 se u pacientů často objevují kožní a systémové infekce, onychomykóza je velmi častá, ale je jen jednou z mnoha komplikací a její léčení nebývá prioritou (Gregory 1996).

Mnohé houby parazitické pro člověka a savce dokáží využívat jen keratinizovanou tkáň, ale nedokáží růst při teplotě $37^\circ C$ a v přímém kontaktu s krevním sérem, kde probíhají intenzivně

[†] pacienti se sníženou imunitou v důsledku léčby nebo vlivem některých nemocí

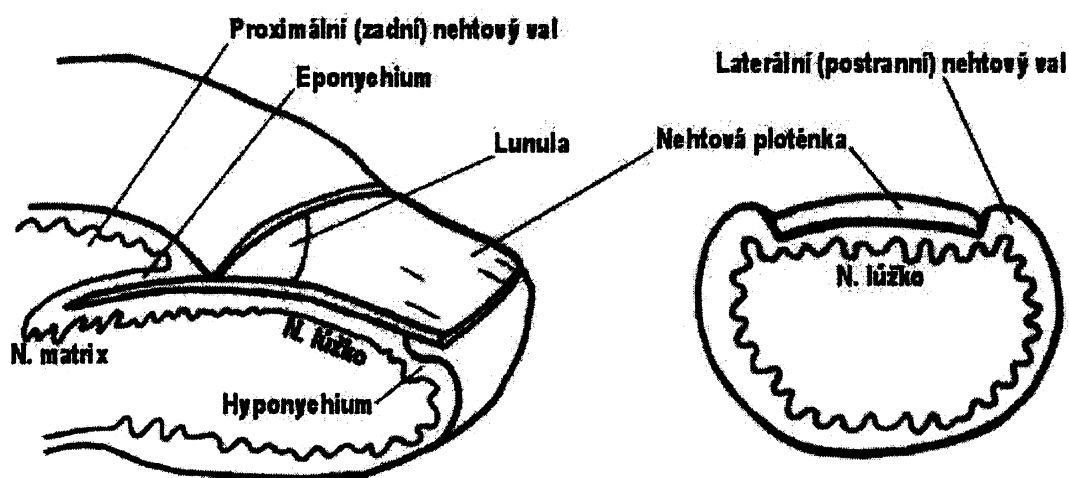
obraně reakce. Většina hub neprorůstá ani do škály, kde rychle vzniká zánětlivá reakce. Nehet je proto díky své izolaci ideálním útočištěm pro tyto houby (Torres-Rodríguez & López-Jodra 2000).

2.3. Nehet

K pochopení schopnosti hub napadat nehet je důležité uvědomit si rozdíly mezi jednotlivými anatomickými oblastmi nehtu. Hlavní funkcí nehtu je ochrana konečků prstů a zvýšení jejich citlivosti. Nehet sestává z nehtové ploténky a specializovaných epitelů: eponychium, nehtová matrix, nehtové lůžko, hyponychium.

Nehtová ploténka je plně keratinizovaná, mnohvrstevná, průsvitná destička z keratinizovaných buněk. Je pevně připojená k nehtovému lůžku, které přispívá materiálem pro stavbu spodní vstvy nehtové ploténky. Nejdistančnější část spojení mezi nehtovou plotenkou a lůžkem má velký význam jako bariéra proti průniku mikroorganismů. Proximálně a po stranách je nehtová ploténka lemována valy. Distální okraj je volný.

Na příčném řezu sestává nehtová ploténka ze 3 vrstev. Svrchní 2 vrstvy jsou produktem nehtové matrix a tvoří je tvrdý keratin. Spodní vrstva pochází z nehtového lůžka a je tvořena měkkým keratinem. Tloušťka této vrstvy se zvětšuje při poruchách nehtového lůžka (Baran et al. 1999).



Obr. 1: Podélný a příčný řez prstem (překresleno podle Baran et al. 1999).

Nehtová matrix je tvořena proliferujícími buňkami a má hlavní podíl na růstu nehtu. Nehet ruky roste rychlostí 2-5 mm za měsíc, na noze 1-2 mm za měsíc. Celý se obnoví za 3-4 měsíce na ruce a za 12-18 měsíců na noze. Rychlost růstu se snižuje s věkem a jako důsledek různých nemocí. Matrix je kryta **eponychiem** a část jí je viditelná skrz nehtovou ploténku jako tzv. **lunula**.

Nehtové lůžko je oblast mezi lunulou a hyponychiem.

Hyponychium je kryto volným okrajem nehtu, stává se viditelné jen při příliš krátkém zastřížení nehtu. V prostorech pod nehtem, především u nehtů na nohou, se často hromadí keratinizované buňky a keratinová drť.

Ve srovnání s vlasem je nehet více uniformní a je ontogeneticky, ale i svou tvrdostí srovnatelný s kůrou vlasu (Marchisio 2000b).

2.4. Původci onychomykózy

Rozeznáváme 3 hlavní skupiny původců onychomykózy.

1) Nejvýznamější je skupina tzv. **dermatofyt**. Je to skupina hub schopných vyvolat kožní onemocnění člověka a obratlovců. Patří k nim 3 blízké příbuzné anamorfní rody *Trichophyton*, *Epidermophyton* a *Microsporum* náležící do čeledi *Arthrodermataceae* z řádu *Onygenales*.

Dermatofyta jsou tradičně dělena na 3 ekologické podskupiny. **Geofilní** dermatofyta žijí přirozeně v půdě, kde rozkládají substráty s obsahem keratinu. Půda je i zdrojem nákazy lidí a zvířat, ale jedná se spíše o řídké případy. Geofilní dermatofyta jsou považována za předchůdce dalších 2 skupin, a to **zoofilních** a **antropofilních** dermatofyt, specializovaných patogenů zvířat a lidí. Infekce vyvolané zoofilními i antropofilními dermatofyty se šíří přímým kontaktem a kontaminovanými předměty (Padhye & Summerbell 2005).

Zástupci dermatofyt jsou v přibližně 90 % izolováni jako původci onychomykózy u člověka, v čele s *T. rubrum* (asi 70 %) a *T. mentagrophytes* (20 %), méně často, asi ve 3 % *E. floccosum* (Kulíková 2008).

2) Další skupinu možných původců onychomykózy tvoří **kvasinky**, převážně *Candida albicans*, méně často *C. parapsilosis* a další (Kulíková 2008).

3) Poslední skupinu původců tvoří **nedermatofytické vláknité houby** (dále jen NVH), kterými se podrobněji zabývá tato práce. Je to široká a nesourodá skupina hub s rozmanitou ekologií. Jejich význam jako primárních původců onychomykózy je častým předmětem sporů.

2.5. Možné cesty invaze hub do nehtu a typy onychomykózy

Preferovanou cestou bývá vždy ta, která stojí nejméně energie. Pokud není nehet mechanicky, nebo jinak poškozen, pak nejméně odolnými částmi nehtu z hlediska tvrdosti jsou keratinová drť pod volným okrajem nehtu, nehtové lůžko a spodní vrstva nehtové ploténky (Torres-Rodríguez & López-Jodra 2000). Napadení nehtu u dermatofyt často předchází napadení okolní kůže, ze které se houba na nehet rozšíří (Vosmík a Skořepová 1995).

Z lékařského hlediska je rozeznáváno několik typů onychomykózy podle lokalizace infekce a směru jejího postupu (viz např. Skořepová 2008, Baran et al. 1999, Suhonen et al. 1999). Různé houby preferují odlišné cesty, takže lokalizace nám může orientačně napovědět o jakou skupinu hub by se mohlo jednat. Jen při totální dystrofii nehtu, která může být konečným stádiem každého typu onychomykózy, už směr postupu infekce nezjistíme (Skořepová 2008).

Bez mikroskopické zkoušky většinou není zřejmý rozdíl mezi onychomykózou způsobenou dermatofyty a NVH, jako v případě rodů *Scytalidium*, *Fusarium*, *Acremonium* a *Scopulariopsis brevicaulis*. Ty vytváří na nehtu léze neodlišitelné od dermatofyt, ani případná produkce pigmentu u rodu *Scytalidium* nemůže sloužit jako vodítko, některé kmeny dermatofyt tmavý pigment také produkují. Pro NLK je někdy typická přítomnost zánětu v okolí nehtu, kterou u dermatofyt pozorujeme spíše vzácně (Suhonen et al. 1999, Tosti et al. 2000).

Některé NVH napadají nehet přímo a způsobují povrchovou (superficiální) onychomykózu. Je tomu tak u rodu *Alternaria* a u druhů *Aspergillus terreus*, *Acremonium potronii* a *Fusarium oxysporum* (Vander Straten et al. 2002). Nehet matní, stává se nerovným a nakonec bývá postižen celý nehet včetně hlubších vrstev (Suhonen et al. 1999). Tento typ onychomykózy tvoří jen asi 10 % ze všech typů onychomykóz a jejich nejčastějším původcem je dermatofyt *Trichophyton mentagrophytes*. Ten ale narozdíl od NVH napadá nehet po předchozí infekci kůže (Baran et al. 1999).

Nejčastější cesta invaze vede přes zrohovatělou hmotu hyponychia. Infekce pokračuje přes nehtové lůžko a spodní vrstvu nehtové ploténky směrem k zadnímu nehtovému valu (tzv. distálně-laterální subungvální onychomykóza). Je tomu tak u druhu *Aspergillus sydowii*, ale i u některých dalších zástupců rodu *Aspergillus*, dále u rodů *Acremonium* a druhů *Fusarium oxysporum* a *Scopulariopsis brevicaulis*. Distálně-laterální subungvální onychomykóza byla popsána i u druhů *Onychocola canadensis*, *Botryodiplodia theobromae* (dnes *Lasioidiplodia theobromae*) a *Pyrenochaeta unguis-hominis* (Vander Straten et al. 2002).

Méně často se infekce šíří naopak, z kůže zadního nehtového valu přes nehtovou matrix směrem k volnému okraji nehtu (tzv. proximální subungvální onychomykóza). Tato i předchozí cesta je typická pro nejčastěji izolovaný druh dermatofyt *Trichophyton rubrum*. Proximální subungvální onychomykóza je popisována u rodu *Scytalidium* a také u rodu *Fusarium*, který je znám ze všech typů onychomykózy (Suhonen et al. 1999).

3. Role nedermatofytických hub izolovaných z nehtu při onychomykóze

O významu zástupců dermatofyt jako o zdaleka nejčastějších původcích onychomykózy není pochyb, role kvasinek a především NVH je mnohem více kontroverzní.

3.1. Nedermatofytické houby, opravdu problém na vzestupu?

U kvasinek se obecně má za to, že nedokáží napadat zdravý nehet, ale jen nehet po traumatu, odloučený od lůžka nebo po předchozím zánětu okolní kůže. Předpokládá se zásadní význam faktorů jako časté máčení rukou ve vodě a dráždění chemickými přípravky. Zdravý nehet může být napaden jen u pacientů s chronickou mukokutánní kandidózou (Faergemann 1996).

NVH byly tradičně považovány za kontaminanty a sekundární patogeny napadající poškozené nehty, ačkoliv se připouštělo, že v méně než 2 % mohou hrát roli primárního patogena rody *Scopulariopsis* a *Scytalidium*. Dnes je oběma zmíněným rodům přisuzováno mezi 1,5-6 % infekcí nehtů, ačkoliv je většina případů spojena stále s nehty již dříve poškozenými a ještě častěji jsou oba rody izolovány spolu s dermatofyty (Vander Straten 2002).

Celosvětově, ale obzvláště v Evropě, je popisován trend rostoucí účasti NVH na vzniku onychomykózy jak u imunitně oslabených, tak imunokompetentních osob. Tím se k této dříve opomíjené skupině obrací větší pozornost a je popisováno stále více druhů izolovaných buď přímo jako původců, nebo jsou zjišťovány druhy potenciálně patogenní, schopné růst na lidském nehtu (Gianni et al. 2000).

V některých současných studiích je uváděn výskyt NVH jako primárních původců onychomykózy velmi vysoký, v jiných velmi nízký (srovnej s tab. 1). Obecně přijatelná jsou čísla mezi 2-12 % ze všech onychomykóz. Příliš malá, nebo vysoká čísla většinou značí chyby v metodice odběrů a kultivaci a také rozdílné chápání významu těchto hub různými autory (de Araújo et al. 2003). Těmto číslům se vymykají některé oblasti tropických zemí jako je Nigérie, Thajsko a Jamajka, kde rod *Scytalidium* působí 10-50 % případů onychomykóz (Elewski 1996).

Názory autorů se liší především v tom, jaké spektrum NVH jsou schopni akceptovat jako možné původce onychomykózy. Případy spojené s druhem *Scopulariopsis brevicaulis* a rodem *Scytalidium* jsou natolik zřejmé, že jsou při splnění všech kritérií všeobecně přijímány jako potenciální primární původci. Navíc jejich schopnosti rozkládat nehet byly ověřeny *in-vitro* (Marchisio 2000b).

Přítomnost druhů NVH se mění v závislosti na geografických oblastech. To je případ rodu *Scytalidium*, popisovaného z tropických oblastí, ale např. v Evropě se vyskytuje nanejvýše jako importovaná mykóza. Na druhé straně prevalence onychomykózy způsobené mnoha NVH se zdá být vyšší v mimotropických oblastech. To je příklad druhu *Aspergillus versicolor*, který je často

popisován jako původce onychomykózy v jižní Evropě. Druh *Scopulariopsis brevicaulis* je také více hlášen z mimotropických oblastí, hlavně z mírného pásu Evropy (Torres-Rodríguez & López-Jodra 2000).

Tab. 1: Procentuální podíl onychomykózy vyvolané NVH ze všech onychomykóz v 10 zemích (kvasinky a smíšené kultury "dermatofyt a NVH" nejsou započítány). Data z 10 vybraných studií publikovaných od r. 1999, které mapují spektrum původců a prevalenci onychomykózy v různých zemích. Tučně zvýrazněn nejčastěji izolovaný rod (při shodném zastoupení 2 rodů jsou tučně oba).

Země	n (%)	Izolované rody nedermatofytických vláknitých hub	autoři
Polsko	2,8	<i>Acremonium</i> , <i>Aspergillus</i> , <i>Scopulariopsis</i>	Mrotek et al. 2001
Dánsko	6,1	<i>Scopulariopsis</i>	Svejgaard & Nilsson 2004
Řecko	9,6	<i>Alternaria</i> , <i>Aspergillus</i> , <i>Cephalosporium</i> , <i>Cladosporium</i> , <i>Fusarium</i> , <i>Penicillium</i> , <i>Scopulariopsis</i>	Koussidou et al. 2002
Itálie	13	<i>Acremonium</i> , <i>Alternaria</i> , <i>Aspergillus</i> , <i>Curvularia</i> , <i>Fusarium</i> , <i>Scopulariopsis</i>	Romano et al. 2005
Kanada	7,8	<i>Acremonium</i> , <i>Arachnomyces</i> , <i>Aspergillus</i> , <i>Fusarium</i> , <i>Onychocola</i> , <i>Scopulariopsis</i> , <i>Scytalidium</i>	Gupta et al. 2000
Kolumbie	14	<i>Fusarium</i> , <i>Paecilomyces</i> , <i>Penicillium</i> , <i>Scytalidium</i>	Alvarez et al. 2004
USA	17,5	<i>Acremonium</i> , <i>Aspergillus</i> , <i>Fusarium</i> , <i>Scopulariopsis</i> , <i>Scytalidium</i>	Ghannoum et al. 2000
Libanon	3,5	<i>Aspergillus</i> , <i>Fusarium</i> , <i>Penicillium</i> , <i>Scopulariopsis</i>	Sayed et al. 2006
Írán	8,2	<i>Acremonium</i> , <i>Aspergillus</i> , <i>Fusarium</i> , <i>Scopulariopsis</i>	Khosravi & Mansouri 2000
Malajsie	35,5	<i>Aspergillus</i> , <i>Cladosporium</i> , <i>Curvularia</i> , <i>Fusarium</i> , <i>Hendersonula</i> , <i>Mucor</i> , <i>Paecilomyces</i> , <i>Penicillium</i> , <i>Scopulariopsis</i>	Ng et al. 1999

n (%) - procentuální podíl NVH na všech případech onychomykózy

Ze statistického nepoměru, kdy mají dermatofyta na svědomí 90 % infekcí nehtů na noze a nejméně 50 % infekcí nehtů rukou (90 % pokud nepočítáme kvasinkami způsobenou paronychii - zánět kůže v okolí nehtu, případně nehtového lůžka) je evidentní, že jejich schopnosti napadat nehet jsou oproti dermatofytům omezené a jejich přítomnost v kultuře ještě neznamená podíl na onemocnění (Ellis et al. 1997).

Některé práce domněnky o zvyšující se prevalenci onychomykózy způsobené NVH celkem přesvědčivě vyvracejí. Ellis et al. (1997) odebral během 1 roku 8-12 vzorků z každého ze 118 pacientů s onychomykózou za jejich současného léčení. Celkem u 43 (36 %) pacientů byl nalezen pouze dermatofyt, u zbylých 75 (64 %) byl také v některém z odběrů nalezen dermatofyt a navíc se alespoň v jednom z odběrů objevila NVH, nebo kvasinka. Zajímavé bylo zjištění, že jen u 2 pacientů se stejný druh NVH podařilo izolovat alespoň ve 2 odběrech po sobě. Jednalo se o druhy *Scedosporium apiospermum* (5 odběrů po sobě) a *Scopulariopsis brevicaulis* (3 odběry po sobě).

Tyto dvě NVH autoři označili jako sekundární kolonizátory, kteří pravděpodobně využívají jako živiny produkty rozkladu keratinu po dermatofytech. Zbylé NVH označili za kontaminanty

Tab. 2: Četnost izolace rodů NVH kontaminujících nehty u 118 pacientů s onychomykózou během 1 roku při 8-12 odběrech (Ellis et al. 1997)

Rod	n	Rod	n
<i>Cladosporium</i>	38	<i>Hendersonula</i>	3
<i>Alternaria</i>	18	<i>Paecilomyces</i>	3
<i>Epicoccum</i>	18	<i>Drechslera</i>	3
<i>Penicillium</i>	17	<i>Acremonium</i>	2
<i>Aspergillus</i>	12	<i>Geotrichum</i>	2
<i>Curvularia</i>	8	<i>Ulocladium</i>	2
<i>Scopulariopsis</i>	8	<i>Beauveria</i>	1
<i>Chrysosporium</i>	5	<i>Exophiala</i>	1
<i>Scedosporium</i>	5	<i>Graphium</i>	1
<i>Chaetomium</i>	4	<i>Stachybotrys</i>	1
<i>Stemphylium</i>	4		

(viz tab. 2). Rozdíl je především v tom, že sekundární kolonizátoři, narozdíl od kontaminujících druhů, v nehtu skutečně dlouhodobě rostou a mohou být snadno identifikováni na mikroskopických preparátech. To může vést k chybnému přesvědčení, že se jedná o primární patogeny. Navíc kontaminanty i sekundární kolonizátoři mohou často skrýt přítomnost dermatofyta, k jehož odhalení může být zapotřebí většího počtu odběrů.

3.2. Odběr materiálu a jeho zásadní význam pro posouzení role hub

Pro stanovení diagnózy onychomykózy je vždy nutné laboratorní potvrzení. Klinické vzezření onychomykózy způsobené různými druhy hub není většinou rozlišitelné a navíc některé kožní choroby, zejména psoriáza, ale i mnoho dalších, mohou vyvolávat podobnou představbu nehtu jakou můžeme pozorovat u onychomykózy (Baran et al. 1999).

Při odebrání materiálu je třeba rozpoznat odkud kam se infekce šíří a odebrat z místa na rozhraní mezi zdravou a změněnou částí nehtu, kde je mycelium nejvitálnější. V místě, kde infekce nehtu začala, mycelium postupně odumírá. Pokud se jedná o infekci způsobenou dermatofyty, pak v této již částečně rozložené části nehtu a v drti pod nehtem často rostou oportunní hyfomycety (Skořepová 2008). Odběr uskutečněný z těchto míst může proto vést ke kultivaci nerelevantní houby a mylnému určení původce onychomykózy. Je to i jeden z důvodů, proč při izolaci dermatofyta spolu s další nedermatofytickou houbou z téhož nehtu je jako původce brán dermatofyt, ostatní houby jako kontaminanty.

Posouzení role izolovaných hub je tedy možné jen ze správně odebraného materiálu, což je plně v rukou příslušného lékařského pracoviště. Obecně jsou pro potvrzení významu houby jako primárního patogena přijímána určitá kritéria. Těmi jsou pozitivní nález při přímé mikroskopii odebraného materiálu, růst houby pokud možno v čisté kultuře a izolace stejného druhu i při opakovaných odběrech. Poslední bod není často možné v praxi splnit (Skořepová 2008). Při pozitivním mikroskopickém nález je ihned zahájena léčba a při dalším odběru již houbu nemusíme zjistit, nebo pacient už nemusí vůbec přijít. O to větší důraz je kladen na 2 první kritéria. Ideální je,

když při přímé mikroskopii rozeznáme znaky později vykultivované houby (Skořepová 2008). Zhruba ve 20 % případů je mikroskopie falešně negativní a asi ve 30 % se nepodaří houbu izolovat do kultury. Proto je ke správnému stanovení diagnózy zapotřebí zkušeností, jak laboratorních, tak i v interpretaci výsledků (Baran et al. 1999).

Problémem při mikroskopii může být, že v nehtu, který nepředstavuje přirozené prostředí NVH, se jen málokdy najdou rozmnožovací struktury. Podaří se to nejčastěji jen u druhu *Scopulariopsis brevicaulis* a často také u rodu *Fusarium* a *Curvularia* u dalších možných původců vidíme většinou jen hyfy. Ty mohou být sice odlišitelné od dermatofyt, ale nedávají nám skutečnou zpětnou kontrolu. Je snad dokonce možné, že jsou některé nesporeující druhy přehlíženy a rody *Scopulariopsis* a *Fusarium*, u kterých konidie bývají přítomny a jsou zřejmě při přímé mikroskopii, jsou popisovány jako původci čštěji (de Araújo et al. 2003, Richardson & Warnock 2003).

Vysoká prevalence rodů jako *Aspergillus*, *Acremonium*, *Alternaria*, nebo *Chrysosporium* izolovaných z nehtu může být klamná. I když jsou z nehtu izolovány bez dermatofyt, nemusí být příčinou změn pozorovaných na nehtu. Nehet může trpět úplně z jiného důvodu než je houbová infekce a rody těchto všudypřítomných hub mohou být jen znečištěním, což v takových případech vede k chybné diagnóze a léčení. O to větší význam má skutečné potvrzení houby přímou mikroskopii napadeného nehtu a opakovanými odběry (Torres-Rodríguez & López-Jodra 2000).

Ke špatnému závěru může vést i špatná interpretace narostlé kultury. Některé kontaminanty, např. rod *Alternaria*, dokáží rychle přerůst pomalu rostoucí kolonii dermatofyta a ta může být přehlédnuta (Elewski 1996).

3.3. Léčení onychomykózy vyvolané NVH

Greer (1995) se domníval, že smíšené kultury dermatofyt a NVH, izolované z nehtu mohou mít význam při léčení. Přítomnost NVH může léčení komplikovat a i po odléčení dermatofyta mohou v některých případech NVH v nehtu přetrvávat a udržovat chorobné změny.

Ellis et al. (1997) nesledoval při léčbě žádný vliv přítomnosti kontaminujících hub, ani hub kolonizujících nehet sekundárně, všechny zmizely spolu s odléčením dermatofyta. Návrhy, že by případy s izolací smíšených kultur měly vyžadovat speciální léčbu, označili autoři za matoucí.

Ať je již skutečnost o vlivu smíšených kultur jakákoliv, větší problém představuje léčení případů, kdy je NVH skutečným a jediným původcem, jak ukazují 3 následující studie na imunitně neoslabených pacientech. Všechny studie užívaly stejná léčiva (itrakonazol a terbinafin).

Tosti et al. (2000) léčili během 4 let 59 případů onychomykózy vyvolané rody *Fusarium*, *Scopulariopsis*, *Acremonium* a *Aspergillus*. Velký nárůst v počtu případů sledovali především u rodu *Fusarium*, u něhož se setkali s velkou odolností proti léčivům a úplného vyléčení dosáhli jen u 40 % pacientů. Ani 70% úspěšnost u rodů *Scopulariopsis* a *Acremonium* není uspokojivá.

Gupta et al. (2001) dosáhli vyléčení všech pacientů s onychomykózou způsobenou druhem *Scopulariopsis brevicaulis*. Zhodnocením údajů v literatuře potvrzují problematické léčení onychomykózy způsobené rodem *Fusarium*. To je v souhrnu úspěšné jen asi v 60 %. Ranawaka et al. (2008) nacházeli rezervoár rodu *Fusarium* v léčeném nehtu i po 11 měsících, a i když se podařilo vyléčit všech 5 případů, jen 3 z 5 nehtů rostly po léčbě normálně.

Všechny 3 studie potvrdily schopnost NVH dlouho perzistovat v nehtu navzdory léčení. Nejsnadněji léčitelná se ukazuje onychomykóza způsobená rodem *Aspergillus*. Problémy jsou s léčením pacientů s onychomykózou způsobenou rodem *Fusarium*, jehož přítomnost v nehtu navíc představuje nebezpečí propuknutí diseminované infekce u imunitně oslabených. Léčba onychomykózy způsobené NVH může být zdlouhavá a kvůli nesourodosti této skupiny hub neexistují jednotné postupy v léčení.

4. Keratin, keratofilní houby a keratinolýza

4.1. "Keratinolytický", nebo "keratofilní"?

Spojením "keratofilní houby" jsou souhrnně označovány všechny druhy hub běžně izolované ze substrátů obsahujících keratin (Kunert 2000). Jde tedy o termín čistě ekologický a neříká nic o schopnosti keratin štěpit. Schopnost keratinolýzy u těchto hub můžeme vzhledem k jejich výskytu předpokládat a ukazuje se, že většina keratofilních hub skutečně má alespoň omezenou schopnost lýzy keratinu. Není to ale podmínkou, v substrátech s obsahem keratinu je i mnoho dalších snadněji rozkladatelných proteinů, které keratin přirozeně doprovází a mohou sloužit těmto houbám jako zdroj energie. Zejména na povrchu buněk je množství peptidů tvořících nerozpustnou síť (Monod 2008). Keratinizované tkáně mohou být i relativně bohaté na lipidy (Kunert 2000).

Další možností, kdy můžeme najít na keratinizovaných substrátech houby bez enzymatické schopnosti štěpení keratinu, je při získávání energie z produktů štěpení zprostředkovaného keratinolytickými houbami. V takových případech může být centrum rozšíření těchto keratofilních druhů značně odlišné od substrátu, ze kterého byly izolovány (Sharma & Rajac 2003).

Přívlastek "keratinolytický" je používán pro houby, u nichž byla schopnost keratinolýzy experimentálně prokázána (Kunert 2000). Vypovídá především o enzymatické výbavě houby.

Nemá tedy smysl se ptát, zda je daný druh keratofilní, nebo keratinolytický, jak můžeme někdy v odborné literatuře vidět. Oba termíny se totiž nevylučují. Měli bychom se spíše ptát na míru schopnosti keratinolýzy daného keratofilního druhu (Marchisio et al. 2000a).

S přibývajícimi znalosti o fyziologii keratofilních hub se podskupina keratinolytických hub stále rozrůstá. Keratofilní houby u nichž byla schopnost keratinolýzy prokázána, můžeme proto klidně označit jako keratofilní, keratinolytické druhy.

Naše znalosti z fyziologie keratofilních hub jsou ale stále kusé a u mnoha z nich, ač pravděpodobně keratin rozkládat aspoň omezeně dovedou, nebyly příslušné testy provedeny. Také se ukazuje, že keratinolýza nemusí být charakteristická pro druh, ale jen pro určité kmeny. Proto je třeba se slovem keratinolytický zacházet opatrně (Marchisio 2000b).

4.2. Keratiny

Keratinů (z řeckého keras = roh) existuje řada forem, v češtině jsou označovány jako rohovina, patří do skupiny skleroproteinů. Podílejí se na výstavbě intermediárních filament cytoskeletu epitelových tkání a jsou hlavními strukturálními proteiny povrchu těla ptáků, savců,

plazů a objživelníků (Singh 1999). Jsou nerozpustné ve vodě a značně odolné vůči fyzikálním i chemickým vlivům. Pro svou odolnost je keratin nedostupný většině organismů v půdě, přesto se tu nehromadí. Kromě keratinolytických hub dovede keratin štěpit jen několik druhů bakterií (např. *Bacillus licheniformis*, *Streptomyces fradiae*, *Fervidobacterium pennavorans*) a larvy specializovaného hmyzu, jako larvy kožojedů a housenky molů (Gradišar & Friedrich 2000).

In-vivo jsou molekuly keratinu uspořádány s mnoha dalšími proteiny a zpevňujícími substancemi do více či méně homogenní struktury. Na stavbě epidermis a jejích derivátů se podílí především skupina α -keratinů, jejichž sekundární strukturu tvoří 3 vzájemně propletené α -šroubovice. Pro aminokyselinové složení α -keratinů je typické vysoké zastoupení cystinu (10-14 % u vlasů a kůže, u nehtu více než 22 %). Molekula cystinu je složena ze 2 molekul aminokyseliny cysteinu spojených disulfidickým můstkem. Právě disulfidické můstky mají na svědomí vysokou odolnost α -keratinů (Marchisio 2000b).

4.2. Izolace keratinofilních hub

Když se keratinizovaný substrát ocitne v půdě, je osídlen mnoha mikroorganismy, které spolupracují podle svých možností na postupném rozkladu jednotlivých komponent až do úplné mineralizace.

Nejběžnější metodou izolace keratinofilních hub je zakopávání keratinových návnad ("keratin-baiting" technique), nejčastěji vlasů ("hair-baiting" technique). S drobnými vylepšeními jako je např. přidání antibiotik do okolní zvlhčené hlíny pro omezení kolonizace bakteriemi je používána již několik desetiletí (Sharma & Rajac 2003). Na návnadě můžeme pozorovat sukcesi. Prvními kolonizátory bývají nesespecializované rody jako *Fusarium*, *Penicilium* a *Mucor*, které zužitkovávají snadno rozkladatelnou mezibuněčnou hmotu. Ty jsou vystřídány rody jako např. *Chaetomium*, *Gliocladium* a *Humicola* schopnými štěpit odolnější substance. Finální skupinou bývají keratinofilní hyfomycety, včetně dermatofyt (Marchisio 2000b). Většina z nich náleží do řádu Onygenales a na keratinizovaném materiálu rostou v podobě anamorfy. Při vyčerpání substrátu vytváří plodnice uvolňující odolné askospory schopné setrvávat dlouho v dormantním stavu dokud není k dispozici čerstvý keratinový substrát, nebo jiný alternativní zdroj živin (Kushwaha & Gupta 2008).

4.3. Keratinolýza, nejen enzymatický proces

Obecně se i dříve předpokládalo, že prvním krokem v enzymatické degradaci keratinu je štěpení disulfidických můstků. Hledání enzymu zajišťující toto štěpení bylo mnoho let neúspěšné.

Byla izolována řada proteáz, které však při testování *in-vitro* samy o sobě nebyly schopné disulfidické můstky štěpit.

Ukázalo se, že dermatofyta jako specializovaní patogeni jsou schopni metabolizovat volný cystein, který je v keratinizovaných tkáních také přítomen a z nadbytku síry produkují siřičitan. Siřičitan je cytoplasmě toxický a je vylučován. V extracelulárním prostoru funguje jako redukční činidlo, napadá cystin v molekulách keratinu v okolí hyf a štěpí disulfidické můstky za vzniku cysteinu a S-sulfocysteinu (Kunert 1972). Reakce, známá biochemikům již dávno předtím jako sulfitolýza, byla sice u hub popsána, ale dlouhou dobu zůstala nedocněna co do důležitosti v procesu keratinolýzy.

Po zániku disulfidických můstků se keratin stává rozkladatelným běžnými proteolytickými enzymy. Ty byly v mnoha pracích nesprávně popsány jako keratinázy (např. Singh 1997, Anbu et al. 2006 a mnoho dalších), i když tuto schopnost nemají. U dermatofyt bylo nalezeno 16 genů kodujících endo- a exoproteázy, které jsou ve svém působení značně redundantní a jsou stejné jako u rodu *Aspergillus* (Monod et al. 2005) s určitými odlišnostmi v zastoupení endoproteáz (Léchenne et al. 2007). K závěru, že stejný profil enzymů jako dermatofyta produkuje i druh *Scopulariopsis brevicaulis* dospěli Brash a Zaldua (1994).

Hlavním důvodem proč jsou dermatofyta původci dermatomykóz mnohem častěji než ostatní keratinofilní houby, není tedy škála produkovaných enzymů, ale vysoká schopnost produkce siřičitanu narozdíl od většiny nedermatofytických hub.

Sulfitolýza je dosud jediným známým mechanismem, kterým jsou keratinolytické houby schopny redukce disulfidických můstků, překážku v procesu degradace kompaktní keratinizované tkáně jako je nehet a kůra vlasu (Monod 2005).

Léchenne et al. 2007 identifikovali u dermatofyt a u druhu *Aspergillus fumigatus*, oportunistického patogena, geny kódující pumpy pro odvádění siřičitanu z buňky. Tím potvrdily zásadní význam siřičitanu pro trávení keratinu dermatofyty a byla definitivně opuštěna hypotéza trávení keratinu enzymem keratinázou v součinnosti se specifickými proteázami. Tyto transportéry jsou nadějným terčem případných léčiv díky jejich vysoké specifčnosti pro keratinolytické houby, narozdíl od proteáz, které nacházíme i u člověka.

V degradaci keratinu tedy probíhají minimálně 3 doplňujících se procesy. Mechanická degradace prorůstajícími hyfami, redukce disulfidických můstků siřičitanem a štěpení peptidických vazeb proteázami (Kunert 2000).

Schopnost degradace keratinu není, jak se zdá, mezi běžnými houbami vzácností. Keratinolýza by mohla být využita k ničení skládek materiálu obsahujícího keratin, jako je odpad z kožedělného průmyslu, jatek, apod (Singh 1999). Mohly by být zajímavé i pro farmaceutický, a kosmetický průmysl, proto bylo prověřeno téměř 300 druhů běžných hub izolovaných ze vzduchu a

půdy (Friedrich et al. 1999). Více než 50 % všech kmenů vykazovalo známky degradace keratinové sraženiny (odolnost keratinové sraženiny k enzymatickému štěpení je značně snížena oproti kompaktnímu keratinu), především pak kmeny rodů *Acremonium*, *Fusarium*, *Geotrichum* a *Cladosporium*. Bylo vybráno 18 nejschopnějších kmenů a jejich keratinolytická aktivita byla prověřena na tvrdém keratinu. Zde rody jako *Acremonium* a *Geotrichum* nejevily žádné známky keratinolýzy. Nejvyšší pozorovaná keratinolytická aktivita byla zaznamenána u druhů *Aspergillus flavus*, *Alternaria radicina*, *Trichurus spiralis* a *Stachybotrys atra*.

Srovnatelná aktivita jako u *A. flavus* byla nalezena u *Doratomyces microsporus*, anamorfy druhu *Cephalotrichum microsporum* (Gradišar & Friedrich 2000). Narozdíl od *A. flavus* není *D. microsporus* producentem mykotoxinů, což jej činí lépe využitelným v praxi.

Vysoká schopnost rozkladu keratinu lidského nehtu, bůvolí kůže a peří byla otestována u druhu *Malbranchea gypsea* (Singh 1999).

Keratinolytickou aktivitu můžeme najít i u hub, které nebyly jako keratinofilní izolovány a není úplně jasné k čemu jim tato schopnost slouží. Moreira et al. (2007) popsali *in-vitro* schopnost rozkladu drůbežního peří, ovčí vlny, lidských nehtů a vlasů rostlinným patogenem *Myrothecium verrucaria*.

4.4. Další fyziologické vlastnosti keratinofilních nedermatofytických hub

Keratinofilní houby jsou adaptovány na využití proteinů jako hlavního, nebo jediného zdroje živin. Naproti tomu je jejich schopnost využití polysacharidů jako celulóza nebo pektiny a lipidů často redukována. Ve využití jednoduchých cukrů není rozdíl mezi keratinofilními a ostatními houbami. Dobrý růst na médiích obsahujících jednoduché sacharidy je využíván v laboratorních podmínkách k nahrazení proteinů při kultivaci (Kunert 2000).

Ve snaze objasnit proces keratinolýzy jako nejdůležitější řetězec reakcí z hlediska patogenity těchto hub, byla pozornost vědců zaměřena především na izolaci proteáz, které by tuto reakci objasnily. Je pochopitelné, že prvními objekty výzkumu byly dermatofyta, zvýšený zájem o fyziologii nedermatofytických hub spadá až do posledních 2 desetiletí.

Proteázy keratinofilních hub jsou málo specifické. Často popisovaná schopnost štěpit kolagen a elastin je spíše příčinou této široké specifity než specializovaných kolagenáz a elastáz. Proteázy mohou být děleny na endo- a exoproteázy a jsou syntetizovány většinou v neaktivní formě stejně jako řada jiných enzymů. Endoproteázy štěpí peptidové vazby uvnitř řetězce peptidu. Exoproteázy štěpí peptidické vazby jen na N- nebo C- konci polypeptidového řetězce (Monod 2008).

Růst keratinofilních hub na médiích s obsahem keratinu je spíše pomalý a je těžké získat dostatečné množství materiálu pro purifikaci nativních proteinů. Tento problém řeší dnes

molekulární genetiky. Ačkoliv sekvence těchto proteáz jsou napříč různými druhy silně konzervativní, jejich stupeň sekrece vykazuje velké mezidruhové rozdíly (Monod 2008).

Důležitý je metabolismus cystinu tvořícího nejvýznamnější složku keratinu. **Cystin** je použit jako zdroj síry, uhlíku a dusíku. Přebytečná síra je uvolňována do média ve formě síranu a v menší míře i siřičitanu. Síran je konečný, spíše inertní metabolit a jeho koncentrace v médiu je dobrým ukazatelem dosažené úrovně degradace (Kunert 2000).

Lipidy jsou také součástí keratinizovaných materiálů, někdy v nemalém množství. V produkci **lipáz** nacházíme obvykle velké mezi- i vnitrodruhové rozdíly (Kunert 2000). U druhu *Scopulariopsis brevicaulis* našli Brash a Zaldua (1994) chudší spektrum lipáz než u dermatofyt.

5. Nadermatofytické vláknité houby *in-vitro*

5.1. Experimentální prokazování keratinolýzy u hub

Povrch lidského těla představuje hlavní pasivní bariéru proti průniku houbových a jiných patogenů. Průnik touto bariérou za předpokladu neporušenosti je možný po štepení povrchových molekul včetně keratinů. Keratinolytická aktivita může být tedy brána jako důležitý faktor virulence a její intenzita vypovídá o potenciálu kmenu stát se původcem onemocnění (Rippon 1988).

Protože mechanismus rozkladu keratinu nebyl dlouho uspokojivě objasněn a při testování *in vitro* nebylo snadné určit, zda izolované peptidy pocházejí skutečně z rozkladu keratinu, nebo z celé řady dalších proteinů doprovázejících keratin, byla posuzována schopnost keratinolýzy především mikroskopicky, nebo hodnocena kvantitativně úbytkem hmotnosti keratinu v médiu po odstranění mycelia.

Míra pozorovaného rozkladu vždy závisí především na tvrdosti použitého materiálu a tedy i obsahu cystinu. Při úbytku váhy o méně než 20 % nemůže být houba brána jako skutečně keratinolytická a štěpí pouze nekeratinové proteiny, kterých je až 10 % i u tvrdého keratinu. U slabě keratinolytických hub úbytek většinou nepřesahuje 40 % po 8 a více týdnech kultivace (Kunert 2000).

5.2. Invaze nehtové ploténky u nadermatofytických původců onychomykóz

Rozklad různých typů keratinu dermatofyty byl intenzivně studován, obdobných studií u nadermatofytních vláknitých hub je znatelně méně. Zvláště málo je uspokojivých experimentálních modelů studujících napadání lidského nehtu houbami. I když je nehet více homogenní než vlas, je vlasová kůra svou odolností, ale i ontogeneticky s nehtem srovnatelná (Marchisio 2000b). Kůra vlasu bývá kvůli větší odolnosti až poslední rozkládanou částí vlasu a ve způsobu jejího rozkladu a také v úrovni dosažené destrukce byla sledována velká podobnost s nehtem.

Keratinolytické houby vykazují 2 typy mechanické invaze keratinizovaného substrátu, a to povrchovou erozi a kolmo na povrch prorážející hyfy. Opakovaně se ve studiích setkáváme s popisy užších, dlouhých, perforujících hyf u kmenů se slabou keratinolytickou aktivitou a tlustých, kolmo na povrch pronikajících hyf u hub schopných rychlého rozkladu substrátu. Při pronikání kompaktní vrstvou kůry vlasu, nebo povrchovou vrstvou nehtu byly opakovaně u různých druhů dermatofyt, ale také u druhu *Scopulariopsis brevicaulis* (Marchisio et al. 2000a) a rodu *Chrysosporium* sp. (Mitola et al. 2002) popsány útvary podobné apresoriím rostlinných patogenů, z nichž vyrůstá prorážející hyfa k méně odolným vrstvám vlasu a nehtu.

V experimentálních podmínkách je nehet napadán převážně ze spodní strany, což je díky její menší odolnosti méně energeticky náročné (Richardson & Edward 2000).

Richardson a Edward (2000) testovali bez přidání dalších živin schopnost invadovat nehtovou ploténku nejběžnějšími primárními původci onychomykóz mezi nedermatofytickými houbami, a to *S. brevicaulis*, *Acremonium* sp., *Fusarium* sp. a *Aspergillus versicolor*. Výsledky ale neodpovídaly skutečnosti, jak často jsou jednotlivé druhy jako původci izolovány v praxi a jak se při mikroskopických zkouškách napadeného nehtu jeví v preparátu. Druhy *S. brevicaulis*, *A. versicolor* a *Acremonium* sp. rostly jen na povrchu nehtu a rozklad byl omezen na nekeratinizovanou mezibuněčnou hmotu. Jen rod *Fusarium* prorůstal všechny 3 vrstvy nehtu, to ale není v praxi také typické. Přestože autoři nepřidávali žádné dodatečné živiny pro kultivaci, jako v případě většiny ostatních studií, nebyl tento model pro simulování kolonizace nehtu vhodný.

K nejčastějším nedermatofytním původcům onychomykózy patří druh *Scopulariopsis brevicaulis*, běžný půdní saprotrof často nacházený na širokém spektru substrátů zvířecího původu. Marchisio et al. (2000a) jako první experimentálně prokázali schopnost druhu *S. brevicaulis* keratin rozkládat. Testovali 9 kmenů, 4 izolované jako původce onychomykózy a 5 ze vzduchu v Turíně. Invaze vlasu a nehtu byla v časových intervalech sledována na substrátu ze sterilizované zahradní půdy, kousků nehtů a vlasů. K pozorování byl použit světelný, skenovací a transmisní elektronový mikroskop.

Schopnost keratinolýzy se nezdála být specifická pro druh jako celek, protože byla pozorována jen u 3 kmenů z 9 testovaných. Tyto kmény dokázaly rozložit kolem 30 % vlasu během 3 měsíců, rozklad nehtů byl podobný jako u kůry vlasu, ale nebyl číselně kvantifikován. V porovnání s dermatofyty schopnými rozložit až 80% vlasu za 3 týdny byla tedy keratinolytická schopnost druhu *S. brevicaulis* nízká. Oproti tomu na jiných keratinizovaných substrátech jako je peří byla ale u druhu *S. brevicaulis* během 7 týdnů popsána schopnost rozložit 79 % substrátu oproti 72 % pozorovaných u druhu *T. mentagrophytes* (Anbu et al. 2006).

Oyeka a Gugnani (1997) studovali schopnost rozkladu keratinu druhy *Fusarium solani*, *Scytalidium dimidiatum*, *S. hyalinum* a *S. japonicum*. Zahrnuli pro srovnání i druhy dermatofyt *Trichophyton rubrum* a *T. mentagrophytes*.

Druh *S. dimidiatum*, synanamorfa druhu *Nattrasia mangiferae*, je známým rostlinným patogenem a je často izolován jako původce kožních infekcí a onychomykóz. Druh *S. hyalinum* způsobuje stejné infekce, ale není znám z rostlinného materiálu, ani z půdy. Druh *S. japonicum* je uváděn jako původce bronchiolitidy skotu v Japonsku.

Úbytek keratinu byl sledován na základním médiu s přidanými nehtovými odstrážky a na stejném základním médiu s přidaným práškovým keratinem. Zkoumané nedermatofytické druhy vykázaly schopnost rozložit kolem 40 % nehtové ploténky. Autoři se domnívají, že *S. japonicum*, i

když dosud nebylo izolováno jako původce kožních mykóz, ani onychomykóz, má potenciál se jím stát.

Van Oorschot (1980) zjišťovala keratinolytické schopnosti u 21 isolátů rodu *Chrysosporium* na lidských vlasech, všechny izoláty označil jako keratinolytické. Průměrná hodnota pro celý rod *Chrysosporium* spočítaná z objemu vlasu rozloženého jednotlivými izoláty byla 38,1 %. Keratinolýza může být mnohem efektivnější při vhodných kombinacích 2, nebo více druhů rodu *Chrysosporium*, nebo při kombinaci s jinými keratinolytickými rody (Kushwaha 2000).

Mitola et al. (2002) sledovali u 8 izolátů rodu *Chrysosporium* rozklad nejodolnějších částí vlasu, kutikuly a kůry. Na stupnici 0-4 označili všechny izoláty stupněm 3 nebo 4, tedy 50-80 % rozložené vlasové kůry a kutikuly.

Tab. 3: Rozdílné schopnosti hub rozkládat materiál lidského nehtu, příp. vlasu (pod čarou pro srovnání hodnoty 2 druhů rodu *Trichophyton*). Souhrn z několika prací uvedených výše.

Druh	Schopnost rozkladu keratinizovaného materiálu	Původce onychomykózy	Autoři
<i>Scytalidium dimidiatum</i>	43 % nehtu	+	Oyeka & Gugnani (1997)
<i>S. hyalinum</i>	40 % nehtu	+	Oyeka & Gugnani (1997)
<i>S. japonicum</i>	38 % nehtu	-	Oyeka & Gugnani (1997)
<i>Fusarium solani</i>	43 % nehtu	+	Oyeka & Gugnani (1997)
<i>Scopulariopsis brevicaulis</i>	30 % vlasu	+	Marchisio et al. (2000)
<i>Malbranchea gypsea</i>	78 % nehtu*	-	Singh (1999)
<i>Chrysosporium spp.</i>	38,1 % vlasu*	+	Van Oorschot (1980)
<i>Chrysosporium spp.</i>	50-80 % vlasové kůry**	+	Mitola et al. (2002)
<i>Trichophyton rubrum</i>	73 % nehtu	+	Oyeka & Gugnani (1997)
<i>T. simii</i>	84 % nehtu	-	Singh (1997)

* průměrná hodnota pro 21 druhů rodu *Chrysosporium*

** hodnoty 8 izolátů různých druhů rodu *Chrysosporium*

pozn. Hodnoty v tabulce jsou spíše orientační, nezohledňují rozdílné metodiky. Procentuální hodnoty rozkladu jsou většinou odečítány v době, kdy houba už nejprojevuje další aktivitu rozkládat substrát (již rozložila vše, co jí dovolují její možnosti, nebo je inhibována vlastními metabolity vypouštěnými do média), toho je dosaženo za rozdílnou dobu.

Když je po určité době osídlená návnada vyjmuta, nemůžeme všechny izolované houby automaticky označit za keratofilní. Některé druhy se mohou živit produkty rozkladu jiných hub, je proto potřeba dalších testů pro potvrzení, zda se skutečně jedná o houbu keratofilní (Marchisio 2000b).

Závěr

Role NVH může být v podstatě trojí. Díky všudypřítomnosti těchto hub v prostředí jsou nejčastěji izolovány jako kontaminanty. S jejich úlohou sekundárních kolonizátorů živících se produkty rozkladu keratinu po dermatofytech panuje také všeobecný souhlas. Pokud jde ale o roli NVH jako primárních patogenů nehtu, tak je lékařská a vědecká veřejnost rozdělena na několik táborů reprezentujících různé názory. Jsou autoři, kteří NVH nepřikládají jako patogenům žádnou váhu, nebo jen v případech, kdy je nehet zásadně poškozen. Jiní připouštějí možnou úlohu patogena několika málo druhů NVH. A konečně jsou i autoři schopní při splnění určitých kritérií tolerovat jako původce celou škálu druhů schopných napadat i jinak zdravý nehet. Tyto rozdílné pohledy na úlohu NVH se pravděpodobně odrazejí i ve spektru NVH, které tito autoři popisují jako primární patogeny.

Jak ukazuje např. Ellis et al. (1997) ani přítomnost NVH v přímé mikroskopii a zároveň v čisté kultuře nemusí znamenat, že se jedná o primární patogeny. NVH dokáží často maskovat přítomnost dermatofyta a mohou ho přerůst i v kultuře. Kontaminanty, které Ellis et al. (1997) z nehtu izoloval, jsou izolovány běžně většinou autorů. Není divu, že některé z těchto houby, které jsou izolovány jako kontaminanty, jsou popisovány i jako původci onychomykózy. Je ale otázkou nakolik je jejich role primárních patogenů skutečná a v kolika případech došlo k její chybné diagnostice.

Není pochyb, že případy onychomykóz způsobených NVH existují. Je jen otázkou, jak moc jsou časté, jak často dochází k jejich chybné diagnostice a nakolik to ovlivňuje dnes popisovaný trend rapidního vzestupu role NVH. Vzrůst počtu imunitně oslabených pacientů a dalších rizikových skupin je nepopíratelný, ale velký vliv může mít prostě jenom fakt, že si této skupiny hub v posledních desetiletích více všímáme.

Léčení primárních infekcí nehtů vyvolaných některými NVH může být obtížné a zdlouhavé a houba dokáže v nehtu přetrvávat i dlouhou dobu v průběhu léčení. Je tedy prokazatelná v opakovaných odběrech, když jsou tyto odběry uskutečněny v ne moc dlouhém časovém intervalu. Pokud houba není zjištěna při tomto dalším odběru, je pravděpodobné, že se jednalo o kontaminant, nebo její role byla zanedbatelná. Mikroskopické potvrzení a izolace NVH v čisté kultuře při jednom odběru nemusí být, jak se zdá, jistotou prokázání role patogena. I když je to v praxi často obtížně splnitelné, mělo by na prokázání původce v opakovaném odběru být pohlíženo jako na jedno z hlavních, ne-li nejdůležitější kritérium.

Kde je pravda a jaké jsou skutečné schopnosti jednotlivých NVH způsobit onemocnění nehtu, to se snaží ukázat práce studující schopnost těchto hub napadat nehet *in-vitro*, a také studie

mapující prevalenci onychomykózy a spektrum jejích původců, které v současnosti probíhají v mnoha zemích.

Pokusů o experimentální ověření schopnosti nedermatofytních hub invadovat nehtovou ploténku nebylo zatím mnoho a jejich výsledky často nejsou jednoznačné. Kvůli rozdílné metodice jsou navíc mezi sebou jen obtížně porovnatelné. Výsledky pokusů různých autorů u stejného druhu se často navzájem významně liší. Důvodů může být celá řada, od špatné simulace podmínek vzniku infekce, až po velkou vnitrodruhová rozdílnost ve schopnosti invazivity jednotlivých kmenů.

Dosažené hodnoty rozkladu nehtů, vlasů, apod. v experimentálních podmínkách často nekorespondují s tím, zda daný druh je, nebo není v praxi nacházen jako původce onemocnění. Viz nejvyšší schopnosti rozkládat nehet u druhů *Trichophyton simii* a *Malbranchea gypsea* (tab.1), které nejsou uváděny jako původci onychomykózy. Příčin může být opět několik. Při vzniku onychomykózy hrají jistě roli faktory, které se jen těžko mohou podařit *in-vitro* podmínkami simulovat. Výskyt některých druhů hub potenciálně schopných onychomykózu vyvolat v oblastech, kde nedochází k intenzivnímu kontaktu se člověkem, může být také důvodem, proč dosud nejsou tyto druhy hlášeny jako původci.

PRAKTICKÁ ČÁST

1. Zdroj materiálu

Materiál k praktické části byl získán za spolupráce s MUDr. Magdalenou Skořepovou, CSc. z Centra pro dermatomykózy I.LF UK a VFN, jehož součástí je i mykologická laboratoř. Vyšetřovaný soubor tvoří ambulantní pacienti dermatologických ordinací z Prahy a Středočeského kraje, převážně okres Praha-západ a Praha-východ. Až na výjimky jde o pacienty v dobrém celkovém stavu, bez závažné poruchy imunity. Nejčastěji jsou vyšetřována onemocnění nehtů, méně často ostatní lokalizace jako plosky nohou, mezprstí a další. Kmeny hub zde použité pocházejí z období od února do dubna 2008.

2. Odběr materiálu a kultivace na lékařském pracovišti

Před odběrem pacient na několik týdnů vynechá veškerou antifungální léčbu (2 týdny u mykóz kůže, 6 týdnů u mykóz nehtů). Nehty si nestříhá, nelakuje a nečistí, normální hygienické mytí se neomezuje.

Místo určené k odběru se nejdříve dekontaminuje otřením 70% alkoholem. Patogeny rostou především na spodní straně nehtu a otření je neodstraní. Po oschnutí se oškrabují šupiny nebo podnehtová drť sterilním nástrojem do sterilní odběrové nádoby, nebo se odebírá přímo na kultivační půdu. Očkují se 3 zkumavky z každého vzorku – 2 zkumavky obsahují 2% Sabouraudův glukózový agar s chlomafenikolem a thiaminem, 1 zkumavka agar téhož složení navíc s aktidionem (selektivní půda pro dermatofyty).

Šikmé půdy se po 3 týdnech kultivace při 27°C roztrídí podle makroskopického vzhledu na dermatofyta, kvasinky a nedermatofytické vláknité houby. Dermatofyta se určují pomocí mikrokultur, k určování NVH se přistupuje pouze tehdy, když splňují předpoklady pro etiopatogenetickou souvislost s onemocněním, tedy pozitivní přímá mikroskopie, masivní růst NVH v čisté kultuře a nález NVH nejlépe ve 3 po sobě následujících odběrech s odstupem alespoň 1 týden. Ojedinelé kolonie nebo naopak masivní růst celé směsi různých druhů se považují za kontaminaci.

3. Zpracování přijatých kmenů

U přijatých primokultur byl hodnocen vzhled kolonií a sporulace. U kultur, kde z mikroskopického preparátu bylo možné kmen předběžně určit do rodu, bylo postupováno podle doporučení v příslušných determinačních monografiích k jednotlivým rodům.

3.1 Kultivace

Ke kultivaci rodu *Fusarium* byl použit bramborovo-dextrózový agar (PDA) a syntetické živné médium (SNA) s kouskem lístku karafiátu. Doba kultivace byla 7-14 dní při 25 °C při režimu 12h denní světlo a 12 h světlo o vlnových délkách 310-360 nm (tzv. near-UV light) pro maximalizaci produkce sporodochií nezbytných pro identifikaci některých druhů.

Pro kultivaci rodů *Aspergillus* a *Penicillium* byly při 25 °C bzl shodně použity agar se sladinovým extraktem (MEA), Czapek-Doxův agar (CzA) a Czapek-Doxův agar s kvasničným extraktem (CYA). Pro rod *Trichoderma* byl použit ovesný agar (OA) a kukuřičný agar se 2% dextrózy (CMA). Rod *Beauveria* byl kultivován na ovesném agaru (OA).

Pro kultivaci ostatních rodů (také při 25 °C) byly jako základní půdy použity sladinový agar (Sl 4°), bramborovo-mrkvový agar (PCA) a Czapek-Doxův agar (CzA). Dále byly podle konkrétních potřeb použity i další půdy. Kultury některých nesporelujících kmenů byly vystaveny 7 dní, nebo i déle, účinkům UV-záření, dokud nedošlo k iniciaci sporulace.

Použitá živná média: CMA (podle Atlas 1997)
CYA (podle Atlas 1997)
CzA (podle Atlas 1997)
MEA (podle Atlas 1997)
OA (podle Atlas 1997)
PCA (podle Atlas 1997)
PDA (podle Atlas 1997)
Sl 4° (podle Fassatiová 1979)
SNA (podle Atlas 1997)

3.2 Dlouhodobé uchování kmenů

K uchování kmenů byla použita vždy dvojice šikmých půd, jedna se sladinovým agarem (Sl 4°) a jedna s bramborovo-mrkvovým agarem (PCA).

3.3 Mikroskopická technika, preparáty a fotodokumentace

Determinace kmenů a jejich fotodokumentace byla prováděna na světelném mikroskopu Olympus BX51 vybaveném digitálním fotoaparátem.

V preparátech bylo jako pozorovací médium použito Melzerovo činidlo (Křisa & Prášil), nebo laktofenol (Křisa & Prášil).

V některých případech byly pro pozorování a fotodokumentaci užitečné "sklíčkové kultury". Především u rodů, kde konidie velmi snadno odpadávají od konidioforů a přenesením vzorků z Petriho misky na podložní sklíčko můžeme jen málokdy pozorovat původní rozložení struktur. Tyto kultury se osvědčily především u rodů *Aureobasidium*, *Cladosporium*, *Ulocladium* a *Alternaria*. Zhotovení sklíčkové kultury je následující. Malý kousek živného média (asi 1-2 mm³) položíme na sterilní podložní sklíčko, zaočkujeme inokulem příslušného kmenu, přiklopíme krycím sklíčkem, které lehce přimáčkeme. Kulturu přeneseme do vlhkého prostředí na několik dní (můžeme průběžně kontrolovat stav). Před vlastním pozorováním kápeme na okraj krycího sklíčka pozorovací médium.

3.4 Determinační literatura

K určování druhů byla použita jak kompendijní literatura, tak monografie a časopisy věnované jednotlivým rodům. Příslušná literatura je uvedena přímo u určených rodů.

4. Zhodnocení druhového zastoupení kmenů a vztah izolovaných hub k nehtům

Z celkového počtu 29 primokultur nedermatofytických vláknitých hub izolovaných z nehtů bylo získáno 32 kmenů (ve 3 primokulturách rostly 2 kmeny hub). Žádný z kmenů nebyl průkazně patogenní. Podle lékařského záznamu všechny kmeny rostly buď ve smíšené kultuře s dermatofyty, nebo nebyla pozitivní přímá mikroskopie odebraného materiálu. Proto se ve všech případech s největší pravděpodobností jednalo o pouhé kontaminanty, nebo byla jejich účast na infekci minimální. Z porovnávání s taxony, které již v literatuře byly popsány jako primární původci onychomykózy v Tab. 4 je zřejmé, že u většiny určených druhů nebyla schopnost napadnout nehet popsána. To jen potvrzuje jejich zanedbatelnou úlohu v napadených nehtech, ze kterých byly odebrány. Mezi určenými kmeny byly ale i některé potenciálně patogenní druhy, především druh *Fusarium oxysporum*, který patří k nejčastěji izolovaným původcům onychomykózy mezi NVH. V tomto případě se ale opět nejednalo o primárního původce.

Tab. 4: Přehled určených taxonů.

+/- Taxony popsané v literatuře jako původci onychomykózy značené "+", nepopsané "-" ; u neurčených kmenů byl údaj vynechán (srovnání s Přílohou I - Literární excerpte).

Taxon	počet	+/-
<i>Alternaria alternata</i> (Fr.) Keissl.	2	+
<i>Arthriniium phaeospermum</i> (Corda) M.B. Ellis	1	-
<i>Aspergillus niger</i> Tiegh.	1	+
<i>Aspergillus</i> sekce <i>Candidi</i>	1	
<i>Aspergillus sydowii</i> (Bainier & Sartory) Thom & Church	2	+
<i>Aureobasidium pullulans</i> var. <i>pullulans</i> (de Bary) G. Arnaud	2	-
<i>Auxarthron</i> sp.	1	-
<i>Beauveria bassiana</i> (Bals.-Criv.) Vuill.	2	-
<i>Cladosporium cladosporioides</i> (Fresen.) G.A. de Vries	2	-
<i>Cladosporium sphaerospermum</i> Penz.	1	+
<i>Eurotium amstelodami</i> L. Mangin	1	-
<i>Fusarium</i> cf. <i>avenaceum</i> (Fr.) Sacc.	1	-
<i>Fusarium oxysporum</i> Schldl.	2	+
<i>Chaetomium funicola</i> Cooke	1	-
<i>Chaetomium globosum</i> Kunze	1	+
<i>Penicillium expansum</i> Link	3	-
<i>Penicillium spinulosum</i> Thom	2	-
<i>Phoma</i> sp.	2	+
<i>Trichoderma viride</i> Pers.	1	-
<i>Ulocladium botrytis</i> Preuss	3	+
neznámý zástupce skupiny <i>Coelomycetes</i>	1	
Celkem kmenů	32	

5. Popis vybraných determinovaných taxonů

Aspergillus sydowii (Bainier & Sartory) Thom & Church

Konidiofor hladký, často s odstínem do hněda; měchýřek subsférický; konidiogenní buňky biseriátní; častý výskyt redukováných konidioforů bez měchýřků; povrch **konidií** hrubý, rozměry 3,5-4,5 μm .

Kolonie po 7 dnech: CYA - 31 mm, kolonie bílé, později zelené reverz červenohnědý;

CzA - 26 mm, šedohnědé kolonie s bílým okrajem, červenohnědý reverz;

MEA - 24mm, modrozelené;

Determinace: Klich 2002; de Hoog et al. 2000; Raper & Fennel 1965

Aureobasidium pullulans var. *pullulans* (de Bary) G. Arnaud

Konidie jsou hladké, protáhlé, značně proměnlivého tvaru i velikosti, jednobuněčné, méně často i dvoubuněčné, 6-14 \times 3-5 μm . Konidie se tvoří ve skupinách na krátkých postranních výrůstcích vegetativních hyf. Vegetativní mycelium je zpočátku bílé, hyfy jsou nepravidelně tlusté, po určitém čase se začínají místy tvořit tlustostěnné, tmavé **chlamydospory**, jednotlivé, nebo přímo z vegetativního mycelia (tvoří pak řetězky). Zřídka se dají pozorovat i **endokonidie**.

Kolonie po 7 dnech: MEA - kolonie okrové s nádechem do růžova, kvasinkovitého vzhledu, od středu černající, 45 mm

PCA - především substrátové mycelium, řetězky chlamydospor patrné i pod binokulární lupou; 40 mm

CzA - nepravidelně laločnaté okraje kolonií, chlamydospory se tvoří převážně na okraji kolonie

Determinace: Hermanides-Nijhof 1977; de Hoog et al. 2000

Pozn. U čertvých kultur byl na MEA a CzA cítit silný zápach po shnilém ovoci.

Auxarthron sp.

Askomata kulovitá, na povrchu krytá oranžovohnědou retikuloperidií. **Přívěšky** málo časté, dlouhé 300 μm i více, bazální částí kloubovitě připojené k retikuloperidii, zakončení jsou slabě zahnutá až svinutá. **Askospory** se síťovaným povrchem, který jim dodává ježatý vzhled, 2,5-3 μm velké.

Sporulace pomalá, po 14 dnech sterilní na všech použitých půdách. Po 3 týdnech se objevuje sporulace na PCA. Po 4 týdnech na CzA a SNA. Na OA a CYA déle než po 5 týdnech. Dlouhodobě sterilní zůstává na SI 4°, MEA a PDA

Kolonie po 14 dnech: CzA 13 mm; CYA 25 mm; MEA 23 mm; PCA 18 mm (růžové zbarvení média); PDA 23 mm; SI 4° 23 mm; SNA 8 mm; na CYA a PDA krvavě červený revers.

Determinace: Currah 1985

Beauveria bassiana (Bals.-Criv.) Vuill.

Lahvovité nebo kulovité konidiogenní buňky tvoří často husté shluky kolem hyf. Na konci vyběhají konidiogenní buňky v úzkou rachis, zprohýbanou na způsob "cik-cak". **Konidie** kulovité nebo subsférické, hladké, hyalinní, 3 µm.

Kolonie po 7 dnech: OA - kolonie bílé s nádechem do žluta, 19 mm.

Determinace: de Hoog 1972; de Hoog 2000

Eurotium amstelodami L. Mangin

Tvoří současně i anamorfní stádium *Aspergillus hollandicus* Samson & W. Gams.

Anamorfa: konidiofor hladký; měchýřek kulovitý; konidiogenní buňky uniseriální; **konidie** eliptické, tmavozelené s drsnou stěnou, 3,5-5(-7) × 3-4 µm.

Teleomorfa: **Kleistothecia** žlutá, kulovitá, stěna plná. **Askospory** čočkovité s hrubou stěnou a zřetelnou ekvatoriální brázdou, rozměry 5-6 × 4 µm.

Kolonie po 7 dnech: žluté s nádechem do zelena, zrnitý vzhled kvůli současné přítomnosti žlutých kleistothécií a zelených konidií; CYA 12 mm; CzA 15 mm; MEA 16 mm.

Determinace: Klich 2002; de Hoog et al. 2000

Fusarium oxysporum Schltdl.

Konidiofory téměř nevětvené, nesou jednotlivé monofialidy.

Makrokonidie větvenovité, slabě prohnuté, nejčastěji se 3 septy, ale někdy i více.

Mikrokonidie variabilní ve tvaru i velikosti, elipsoidní i protáhlé, většinou bez sept. Chlamydospory přítomné jednotlivě na vzdušném myceliu.

Kolonie po 4 dnech: PDA - okrové s nádechem do modra, 55 mm; SNA - bezbarvé.

Determinace: Leslie & Summerell 2006; Samson et al. 2004

Chaetomium funicola Cooke

Askomata kulovitá, na povrchu 2 typy sít. Prvním typem jsou výrazně hrubostěnné, dichotomicky větvené sítě, tvořící prostorovou síť. Druhým typem jsou přímé, nevětvené sítě zakončené hrotem.

Askospory hnědozelené, citrónkovité, 6 × 5 µm.

Kolonie po 7 dnech: sporuluje na PCA i SI 4°;

PCA - 55 mm, mycelium velmi řídké;

SI 4° - 60 mm; husté mycelium, bělošedé až šedočerné;

Determinace: von Arx et al. 1986; de Hoog et al. 2000

***Chaetomium globosum* Kunze**

Askomata ovoidní, na povrchu s četnými nevětvenými, stočenými sětami s jemně bradavičnatým povrchem. **Askospory** hnědé, citrónkovité, 9-10 × 8 μm.

Kolonie po 7 dnech: zelené; sporuluje na PCA i SI 4°; PCA 17 mm; SI 4° celá miska.

Determinace: von Arx et al. 1986; de Hoog et al. 2000

***Trichoderma viride* Pers.**

Konidiofory větvené na způsob pyramidy. Fialidy vyrůstají z terminálních větví většinou po dvou.

Konidie subglobózní, zelené, s drsným povrchem, 3,5-4 μm.

Kultury: Na OA i MEA byl růst velmi rychlý. Nejdříve bílé kolonie se s postupující sporulací zbarvily světle zeleně, později tmavě zeleně.

Determinace: Kubicek & Harman 1998; de Hoog 2000

Pozn. Mladé kultury byly cítit po kokosu.

neznámý zástupce skupiny *Coelomycetes*

Vegetativní mycelium sestává z nepravidelně tlustých, často nafouklých a jinak deformovaných hyf. Je intenzivně černě zbarvené, místy ale i hyalinní. Kultury zůstávají dlouho sterilní. K iniciaci sporulace byly proto umístěny pod zdroj UV-zářením. Po 2 týdnech se na kulturách vytvořily velmi tuhé, několik mm velké stromatické útvary sestávající s velkého počtu perithecioidních konidiomat. Povrch je pokryt krátkými chlupy. Některá stromata zůstávají i dlouho po svém vytvoření bez známek sporulace.

Konidiogenní buňky jsou bez sept, **konidie** vznikají jako jednobuněčné, hyalinní, hladké, někdy se jejich povrch stává zrnitým. Záhy se v konidiích objevuje 1 nebo 2 septa. Zralé konidie mají rozměry 18-23 × 8-9 μm, jsou hnědé nebo rezavě hnědé, 2-3buněčné.

Byl pozorován velmi rychlý růst na všech médiích, na PCA převládalo substrátové mycelium, na ostatních půdách naopak vzdušné mycelium. Sporulace se podařilo dosáhnout jen na PCA a SI 4°. Na ostatních médiích, CYA, CzA, OA, PDA, SNA, i navzdory tvorbě stromat nebyla sporulace pozorována.

Seznam použité literatury:

- Araújo, A. J. G. de, Bastos, O. M. P., Souza, M. A. J. & Oliveira, J. C. de (2003):** Onychomycosis caused by emergent fungi: clinical analysis, diagnosis and revision. – *Anais Brasileiros de Dermatologia* 78: 445-455.
- Alvarez, M. I., González, L. A. & Castro, L. A. (2004):** Onychomycosis in Cali, Colombia. – *Mycopathologia* 158: 181-186.
- Álvarez, P., Enríquez, A. M., Toro, C., Martínez, I., Buhigas, I., Miguel, S. de, Lago, M., Puente, S., Palacio, A. del & Baquero, M. (2000):** Dermatomicosis de importación por *Scytalidium dimidiatum*: a propósito de tres casos. – *Revista Iberoamericana de Micología* 17: 102-106.
- Anbu, P., Gopinath, S. C. B., Hilda, A., Mathivanan, N. & Annadurai, G. (2006):** Secretion of keratinolytic enzymes and keratinolysis by *Scopulariopsis brevicaulis* and *Trichophyton mentagrophytes*: regresion analysis. – *Canadian Journal of Microbiology* 50: 1060-1069.
- Arrese, J. E., Piérard-Franchimont, C. & Piérard, E. (1996):** Fatal hyalohyphomycosis following *Fusarium* onychomycosis in an immunocompromised patient. – *The American Journal of Dermatology* 18: 196-198.
- Arx, J. A. von, Guarro, J. & Figueras, M. J. (1986):** The ascomycete genus *Chaetomium*. *Beih. Nova Hedwigia* 84: 1-162.
- Atlas, R. M. (1997):** *Handbook of microbiological media, second edition.* – CRC Press, Boca Raton.
- Baran, R. & Piérard, G. E. (2004):** Onychomycoses. – Masson, Paris.
- Baran, R., Hay, R., Haneke, E., Tosti, A. & Piraccini, B. M. (1999):** Onychomycosis: the current approach to diagnosis and therapy. – Martin Dunitz Ltd., London.
- Barde, A. K. & Singh S. M. (1983):** A case of onychomycosis by *Curvularia lunata* (Wakker) Boedijn. – *Mykosen* 26: 311-316.
- Barde, A. K. & Singh S. M. (1984):** *Cladosporium carrionii* Trejod 1954 infection of human nail. – *Mykosen* 27: 366-369.
- Barua, P., Barua, S., Borkakoty, B., Mahanta, J. (2007):** Onychomycosis by *Scytalidium dimidiatum* in green tea leaf pluckers: report of two cases. – *Mycopathologia* 164: 193-195.
- Boisseau-Garsaud, A. M., Desbois, N., Guillermin, M. L., Ossondo, M., Gueho, E. & Cales-Quist, D. (2002):** Onychomycosis due to *Exophiala jeanselmei*. – *Dermatology* 204: 150-152.
- Brash, J. & Zaldua, M. (1994):** Enzyme patterns of dermatophytes. – *Mycoses* 37: 11-16.
- Calado, N. B., Sousa, F., Gomes, N. O., Cardoso, F. M., Zaror, L. C. & Milan, E. P. (2006):** *Fusarium* nail and skin infection: A report of eight cases from Natal, Brazil. – *Mycopathologia* 161: 27-31.
- Campbell, C. K. & Johnson, E. M. (2005):** Dermatofungal molds. – In: Merz, W. G., Hay, R. J. [eds.], *Topley & Wilson's Microbiology & Microbial Infections: Medical Mycology*, 10th ed., p. 220-243, Hodder Arnold, London.
- Costa, A. R., Porto, E., Lacaz, C. S. da, Melo, N. T. de, Calux, M. J. F. de & Valente, N. Y. S. (1988):** Cutaneous and unguinal phaeohyphomycosis caused by species of *Chaetomium* Kunze (1817) ex Fresenius, 1829. – *Journal of Medical and Veterinary Mycology* 26: 261-268.
- Currah, R. S. (1985):** Taxonomy of *Onygenales*: *Arthrodermataceae*, *Gymnoascaceae*, *Myxotrichaceae* and *Onygenaceae*. – *Mycotaxon* 24: 1-216.

- Dogra, S., Kumar, B., Bhansali, A. & Chakrabarty, A. (2002):** Epidemiology of onychomycosis in patients with diabetes mellitus in India. – *International Journal of Dermatology* 41: 647-651.
- Elewski, B. E. (1996):** Diagnostic technique for confirming onychomycosis. – *Journal of the American Academy of Dermatology* 35: 6-9.
- Ellis, D. H., Marley, J. E., Watson, A. B. & Williams, T. G. (1997):** Significance of non-dermatophyte moulds and yeasts in onychomycosis. – *Dermatology* 194: 40-42.
- Escobar, M. L. & Carmona-Fonseca, J. (2003):** Onicomycosis por hongos ambientales no dermatofíticos. – *Revista Iberoamericana de Micología* 20: 6-10.
- Evans, E. G. V. (2003):** Drug synergies and the potential for combination therapy in onychomycosis. – *British Journal of Dermatology* 149: 11-13.
- Fassatiová, O. (1979):** Plísňe a vláknité houby v technické mikrobiologii. – Státní nakladatelství technické literatury, Praha.
- Faergemann, J. (1996):** The role of yeasts in onychomycosis. – *Mycoses* 39: 223-224.
- Friedrich, J., Gradišar, H., Mandin, D., Chaumont, J. P. (1999):** Screening fungi for synthesis of keratinolytic enzymes. – *Letters in Applied Microbiology* 28: 127-130.
- García-Martos, P., Márquez, A. & Gené, J. (2002):** Infecciones humanas por levaduras negras género *Exophiala*. – *Revista Iberoamericana de Micología* 19: 72-79
- Ghannoum, M. A., Hajjeh, R. A., Scher, R., Konnikov, N., Gupta, A. K., Summerbell, R., Sullivan, S., Daniel, R., Krusinski, P., Fleckman, P., Rich, P., Odom, R., Aly, R., Pariser, D., Zaiac, M. Rebell, G., Leshner, J., Gerlach, B., Ponce-De-Leon, G. F., Ghannoum, A., Warner, J., Isham, N. & Elewski, B. (2000):** A large-scale North American study of fungal isolates from nails: the frequency of onychomycosis, fungal distribution, and antifungal susceptibility patterns. – *Journal of the American Academy of Dermatology* 43: 641-648.
- Gianni, C., Cerri, A. & Crosti, C. (1997):** Ungual phaeohyphomycosis caused by *Alternaria alternata*. – *Mycoses* 40: 219-221.
- Gianni, C., Cerri, A. & Crosti, C. (2000):** Non-dermatophytic onychomycosis. An underestimated entity? A study of 51 cases. – *Mycoses* 43: 29-33.
- Godoy, P., Nunes, F., Silva, V., Tomimori-Yamashita, J., Yaror, L. & Fischman, O. (2004):** Onychomycosis caused by *Fusarium solani* and *Fusarium oxysporum* in São Paulo, Brazil. – *Mycopathologia* 157: 287-290.
- Goon, A. T. J. & Seow, C. S. (2002):** Three cases of *Nattractia mangiferae* (*Scytalidium dimidiatum*) Infection in Singapore. – *International Journal of Dermatology* 41: 53-55.
- Gradišar, H., Kern, S. & Friedrich, J. (2000):** Keratinase of *Doratomyces microsporus*. – *Applied Microbiology and Biotechnology* 53: 196-200.
- Greer, D. L. (1995):** Evolving role of nondermatophytes in onychomycosis. – *International Journal of Dermatology* 34: 521-524.
- Gregory, N. (1996):** Special patient populations: onychomycosis in the HIV-positive patient. – *Journal of the American Academy of Dermatology* 35: 13-16.
- Grigoriu, D., Delacrétaz, J. & Borelli, D. (1987):** Medical mycology. – Hans Huber Publishers, Toronto.
- Gupta, A. K., Gregurek-Novak, T., Konnikov, N., Lynde, C. W., Hofstader, S. & Summerbell, R. C. (2001):** Itraconazole and terbinafine treatment of some nondermatophyte molds causing onychomycosis of the toes and a review of the literature. – *Journal of cutaneous medicine and surgery* 5: 206-210.

- Gupta A. K., Jain, H. C., Lynde, C. W., MacDonald, P., Cooper, E. A. & Summerbell, R. C. (2000):** Prevalence and epidemiology of onychomycosis in patients visiting physicians' offices : A multicenter canadian survey of 15,000 patients. – *Journal of the American Academy of Dermatology* 43: 244-248.
- Gupta, A. K., Konnikov, N., MacDonald, P., Rich, P., Rodger, N. W., Edmonds, M. W., McManus, R., & Summerbell, R. C. (1998):** Prevalence and epidemiology of toenail onychomycosis in diabetic subjects: a multicentre survey. – *British Journal of Dermatology* 139: 665-671.
- Hattori, N., Adachi, M., Kaneko, T., Shimosuma, M., Ichinohe, M. & Iozumi, K. (2000):** Case report. Onychomycosis due to *Chaetomium globosum* succesfully treated with itraconazole. – *Mycoses* 43: 89-92.
- Hermanides-Nijhof, E. J. (1977):** *Aureobasidium* and allied genera. – *Studies in Mycology* 15: 141-177
- Hoog, G. S. de (1972):** The genera *Beauveria*, *Isaria*, *Tritirachium* and *Acrodontium* gen. nov. – *Studies in Mycology* 1: 1-41
- Hoog, G. S. de, Guaro, J., Gené, J. & Figueras, M. J. (2000a):** Atlas of clinical fungi, 2nd ed. – Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht.
- Hoog, G. S. de, Mayser, P., Haase, G., Horré, R. & Horrevorts, A. M. (2000b):** A new species, *Phialophora europaea*, causing superficial infections in humans – *Mycoses* 43: 409-416
- Hilmioğlu-Polat, S., Metin, D. Y., İnci, R., Dereli, T., Kılınc, I. & Tümbay, E. (2005):** Non-dermatophytic molds as agents of onychomycosis in Izmir, Turkey – A prospective study. – *Mycopathologia* 160: 125-128
- Ioannidou, D. J., Maraki, S., Krasagakis, S. K., Tosca, A. & Tselentis, Y. (2006):** The epidemiology of onychomycoses in Crete, Greece, between 1992 and 2001. – *Journal of the European academy of dermatology and venereology* 20: 170-174
- Jedličková, A. (2006):** Systémové mykózy. – Maxdorf, Praha.
- Khosravi, A. R. & Mansouri, P. (2000):** Onychomycosis in Teheran, Iran: Prevailing fungi and treatment with itraconazole. – *Mycopathologia* 150: 9-13.
- Klich, M. A. (2002):** Identification of common *Aspergillus* species. – Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht.
- Kombila, M., Martz, M., Diaz, M. G. de, Bievre, C. de & Richard-Lenoble, D. (1990):** *Hendersonula toruloidea* as an mycotic foot infection in Gabon. – *Journal of Medical and Veterinary Mycology* 28: 215-223.
- Kossidou, T., Devliotou-Panagiotidou, D., Karakatsanis, G., Minas, A., Mourellou, O. & Samara, K. (2002):** Onychomycosis in Northern Greece during 1994-1998. – *Mycoses* 45: 29-37.
- Křísa, B. & Prášil, K. (1994):** Sběr, preparace a konzervace rostlinného materiálu. – Přírodovědecká fakulta UK, Praha.
- Kubicek, C. P. & Harman, G. E. (1998):** *Trichoderma* and *Gliocladium*. Volume 1: Basic biology, taxonomy and genetics. – Taylor & Francis Ltd., London.
- Kulíková, Z. (2008):** Onychomykózy. – *Dermatologie v praxi* 2: 19-21.
- Kunert J. (1972):** Keratin decomposition by dermatophytes: evidence of the sulphitolysis of the protein. – *Experientia* 28: 1025-1026.

- Kunert, J. (2000):** Physiology of keratinophilic fungi. – In: Kushwara, R. K. S. & Guaró, J. [eds.], *Biology of Dermatophytes and other Keratinophilic Fungi*, p. 77-85, Revista Iberoamericana de Micología, Bilbao.
- Kushwaha, R. K. S. (2000):** The genus *Chrysosporium*, its physiology and biotechnological potential. – In: Kushwara, R. K. S. & Guaró, J. [eds.], *Biology of Dermatophytes and other Keratinophilic Fungi*, p. 66-76, Revista Iberoamericana de Micología, Bilbao.
- Kushwaha, R. K. S. & Gupta, P. (2008):** Relevance of keratinophilic fungi. – *Current Science* 94: 706-707.
- Léchenne, B., Reichard, U., Zaugg, C., Fratti, M., Kunert, J., Boulat, O. & Monod, M. (2007):** Sulphite efflux pumps in *Aspergillus fumigatus* and dermatophytes. – *Microbiology* 153: 905-913.
- Leslie, J. F. & Summerell, B. A. (2006):** The *Fusarium* laboratory manual. – Blackwell Publishing, Ames.
- Manzano-Gayosso, P., Hernández-Hernández, F., Méndez-Tovar, L. J., Palacios-Morales Y., Córdova-Martínez, E., Bazán-Mora, E. & López-Martínez, R. (2008):** Onychomycosis incidence in type 2 diabetes mellitus patients. – *Mycopathologia* 166: 41-45.
- Marchisio, V. F. (2000b):** Keratinophilic fungi: Their role in nature and degradation of keratinic substrates. – In: Kushwara, R. K. S. & Guaró, J. [eds.], *Biology of dermatophytes and other keratinophilic fungi*, p. 86-96, Revista Iberoamericana de Micología, Bilbao.
- Marchisio, V. F., Fusconi, A. & Querio, F. L. (2000a):** *Scopulariopsis brevicaulis*: a keratinophilic or keratinolytic fungus?. – *Mycoses* 43: 281-292.
- Matsumoto, T., Matsuda, T., Padhye, A. A., Standard, P. G. & Ajello, L. (1992):** Fungal melanonychia: ungual phaeohyphomycosis caused by *Wangiella dermatitidis*. – *Clinical and experimental dermatology* 17: 83-86.
- Midgley, G. & Moore, M. K. (1998):** Onychomycosis. – *Revista Iberoamericana de Micología* 15: 113-117.
- Mitola, G., Escalona, F., Salas, R., García, E. & Ledesma, A. (2002):** Morphological characterization of *in-vitro* human hair keratinolysis, produced by identified wild strains of *Chrysosporium* species. – *Mycopathologia* 156: 163-169.
- Monod, M. (2008):** Secreted proteases from dermatophytes. – *Mycopathologia* DOI:10.1007/s11046-008-9105-4 (published 30 January 2008).
- Monod, M., Léchenne, B., Jousson, O., Grand, D., Zaugg, C., Stöcklin, R. & Grouzmann, E. (2005):** Aminopeptidases and dipeptidyl-peptidases secreted by *Trichophyton rubrum*. – *Microbiology* 151: 145-155.
- Moreira, F. G., de Souza, C. G. M., Costa, M. A. F., Reis, S. & Peralta, R. M. (2007):** Degradation of keratinous materials by the plant pathogenic fungus *Myrothecium verrucaria*. – *Mycopathologia* 163: 153-160.
- Mrotek, M., Zegarska, B., Zimma, M. & Bubna, W. (2001):** Pathogenic fungi in the material of the Mycological Laboratory of the Dermatology Clinic in Bydgoszcz in the period January 1996 - August 2000. – *Mikologia Lekarska* 8 : 153-157.
- Ng, K. P., Saw, T. L., Madasamy, M. & Moo, T. S. S. (1999):** Onychomycosis in Malaysia. – *Mycopathologia* 147: 29-32.
- Oyeka, C. A. & Gugnani, H. C. (1997):** Keratin degradation by *Scytalidium* species and *Fusarium solani*. – *Mycoses* 41: 73-76.

- Padhye, A. A. & Summerbell, R. C. (2005):** The dermatophytes. – In: Merz, W. G., Hay, R. J. [eds.], Topley & Wilson's Microbiology & Microbial Infections: Medical Mycology, 10th ed., p. 220-243, Hodder Arnold, London.
- Richardson, M. & Edward, M. (2000):** Model systems for the study of dermatophyte and non-dermatophyte invasion of human keratin. – In: Kushwara, R. K. S. & Guarro, J. [eds.], Biology of dermatophytes and other keratinophilic fungi, p. 115-121, Revista Iberoamericana de Micología, Bilbao.
- Ranawaka, R. R., Silva, N. de & Ragunathan, R. W. (2008):** Onychomycosis caused by *Fusarium* sp. in Sri Lanka: Prevalence, clinical features and response to itraconazole pulse therapy in six cases. – Journal of Dermatological Treatment DOI: 10.1080/09546630801974912 (published 29 April 2008).
- Raper, K. B. & Fennel, D. I. (1965):** The genus *Aspergillus*. – The Williams & Wilkins Company, Baltimore.
- Ribes, J. A., Vanover-Sams, C. L. & Baker, D. J. (2000):** Zygomycetes in human disease. – Clinical Microbiology Reviews 13: 236-301.
- Richardson, M. & Edward, M. (2000):** Model systems for the study of dermatophyte and non-dermatophyte invasion of human keratin. – In: Kushwara, R. K. S. & Guarro, J. [eds.], Biology of dermatophytes and other keratinophilic fungi, p. 115-121, Revista Iberoamericana de Micología, Bilbao.
- Richardson, M. D. & Warnock, D. W. (2003):** Fungal infection: Diagnosis and management, 3rd ed. – Blackwell Publishing, Oxford.
- Rippon, J. W. (1988):** Medical mycology: The pathogenic fungi and the pathogenic actinomycetes. 3rd ed. – W. B. Sanders Company, Philadelphia.
- Romano, C., Gianni, C. & Difonzo, E. M. (2005):** Retrospective study of onychomycosis in Italy: 1995-2000. – Mycoses 48: 42-44.
- Romano, C., Maritati, E., Paccagnini, E. & Massai, L. (2004):** Onychomycosis due to *Ulocladium botrytis*. – Mycoses 47: 346-348.
- Samson, R. A., Hoekstra, E. S. & Frisvald, J. C. (2004):** Introduction to food- and airborne fungi, 7th ed. – Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht.
- Sayed, F. E., Ammoury, A., Haybe, R. F. & Dhaybi, R. (2006):** Onychomycosis in Lebanon: a mycological survey of 772 patients. – Mycoses 49: 216-219.
- Sharma, R. & Rajac, R. C. (2003):** Keratinophilic fungi: nature's keratin degrading machines! Their isolation, identification, and ecological role. – Resonance 8: 28-40.
- Scher, R. K. & Barnett, J. M. (1990):** Successful treatment of *Aspergillus flavus* onychomycosis with oral itraconazole. – Journal of the American Academy of Dermatology 23: 749-750
- Singh, C. J. (1997):** Characterization of an extracellular keratinase of *Trichophyton simii* and its role in keratin degradation. – Mycopathologia 137: 13-16.
- Singh, C. J. (1999):** Exocellular proteases of *Malbranchea gypsea* and their role in keratin deterioration. – Mycopathologia 143: 147-150.
- Skořepová, M. (2008):** Dermatomykologie v obrazech. – Galén, Praha.
- Stiller, M. J., Rosenthal, M. D., Summerbell, R. C., Polack, J. & Chan, A. (1992):** Onychomycosis of toenails caused by *Chaetomium globosum*. – Journal of the American Academy of Dermatology 26: 775-776.

- Suhonen, R. E., Dawber, R. P. R. & Ellis, D. H. (1999):** Fungal infection of the skin, hair and nails. – Martin Dunitz Ltd, London.
- Svejgaard, E. L. & Nilsson, J. (2004):** Onychomycosis in Denmark: prevalence of fungal nail infection in general practice. – *Mycoses* 47: 131-135.
- Tomšíková, A. (2003):** Nozokomiální mykózy. – Karolinum, Praha.
- Torres-Rodríguez, J. M. & López-Jodra, O. (2000):** Epidemiology of nail infection due to keratinophilic fungi. – In: Kushwara, R. K. S. & Guarro, J. [eds.], *Biology of dermatophytes and other keratinophilic fungi*, p. 122-135, Revista Iberoamericana de Micología, Bilbao.
- Torres-Rodríguez, J. M., Madrenys-Brunet, N., Siddat, M., López-Jodra & Jimenez, T. (1998):** *Aspergillus versicolor* as cause of onychomycosis: report of 12 cases and susceptibility testing to antifungal drugs. – *Journal of the European academy of dermatology and venereology* 11: 25-31.
- Tosti, A. & Piraccini, B. M. (1998):** Proximal subungual onychomycosis due to *Aspergillus niger*: report of two cases. – *British Journal of Dermatology* 139: 152-169
- Tosti, A., Piraccini, B. M. & Lorenzi, S. (2000):** Onychomycosis caused by nondermatophytic molds: Clinical features and response to treatment of 59 cases. – *Journal of the American Academy of Dermatology* 42: 217-224.
- Van Oorschot, C. A. N. (1980):** A revision of *Chrysosporium* and allied genera. – *Studies in Mycology* 20: 1-89.
- Vander Straten, M. R., Balkis, M. M. & Ghannoum, M. A. (2002):** The role of nondermatophyte molds in onychomycosis: diagnosis and treatment. – *Dermatologic Therapy* 15: 89-98.
- Vosmík, F. & Skořepová, M. (1995):** Dermatomykózy: diagnostika a terapie dermatologických mykotických infekcí. – Galén, Praha.
- Volleková, A., Lisalová, M. & Poczová, M. (2008):** *Arthrographis kalrae* – an uncommon causative agent of onychomycosis – *Epidemiologie, Mikrobiologie, Imunologie* 57: 53-56
- Vroey, C. de, Lasagni, A., Tosi, E., Schroeder, F. & Song, M. (1992):** Onychomycosis due to *Microascus cirrosus*. – *Mycoses* 35: 193-196.

Příloha I - Literární excerptce

Přehled nedermatofytických vláknitých hub uváděných v literatuře jako původci onychomykózy		
St- stádium životního cyklu; A- anamorfa; T- teleomorfa; Z - zástupce třídy <i>Zygomycetes</i> ; B - zástupce oddělení <i>Bazidiomycota</i>		
St	Taxon	Zdroj
A	<i>Acremonium potronii</i> Vuill.	Vander Straten et al. 2002; de Hoog et al. 2000a
A	<i>Acremonium roseogriseum</i> (S.B. Saksena) W. Gams	Vander Straten et al. 2002
A	<i>Acremonium spinosum</i> (Negroni) W. Gams	de Hoog et al. 2000a
A	<i>Acremonium strictum</i> W. Gams	Campbell & Johnson 2005;
A	<i>Acremonium</i> spp.	Manzano-Gayosso et al. 2008; Ioannidou et al. 2006; Romano et al. 2005; Hilmioglu-Polat et al. 2005; Romano et al. 2005; Gianni et al. 2000; Khosravi & Mansouri 2000; Gupta et al. 2000 ;Rippon 1988
A	<i>Alternaria alternata</i> (Fr.) Keissl.	Campbell & Johnson 2005; Gianni et al. 2000; de Hoog et al. 2000a; Gianni et al. 1997
A	<i>Alternaria chlamydospora</i> Mouch.	de Hoog et al. 2000a
A	<i>Alternaria</i> spp.	Ioannidou et al. 2006; Hilmioglu-Polat et al. 2005; Romano et al. 2005; Vander Straten et al. 2002; Rippon 1988; Grigoriu et al. 1987
T	<i>Aphanoascus fulvescens</i> (Cooke) Apinis	Campbell & Johnson 2005;
T	<i>Arachnomyces</i> sp.	Gupta et al. 2000;
T	<i>Arthroderma tuberculatum</i> Kuehn	Rippon 1988;
A	<i>Arthrographis kalrae</i> (R.P. Tewari & Macph.) Sigler & J.W. Carmich.	Volleková et al. 2008; de Hoog et al. 2000a
A	<i>Aspergillus candidus</i> Link	Campbell & Johnson 2005; Escobar & Carmona-Fonseca 2003; Vander Straten et al. 2002; Rippon 1988;
A	<i>Aspergillus clavatonanicus</i> Bat., H. Maia & Alecrim	de Hoog et al. 2000a
A	<i>Aspergillus flavus</i> Link	Hilmioglu-Polat et al. 2005; Escobar & Carmona-Fonseca 2003; Vander Straten et al. 2002; Scher et al. 1990; Rippon 1988;
A	<i>Aspergillus fumigatus</i> Fresen.	Manzano-Gayosso et al. 2008; Hilmioglu-Polat et al. 2005; Vander Straten et al. 2002; Ng et al. 1999; Rippon 1988
A	<i>Aspergillus glaucus</i> (L.) Link	Campbell & Johnson 2005; de Hoog et al. 2000a
A	<i>Aspergillus hollandicus</i> Samson & W. Gams	Campbell & Johnson 2005; de Hoog et al. 2000a
A	<i>Aspergillus nidulans</i> (Eidam) G. Winter	Gupta et al. 2000; Ng et al. 1999
A	<i>Aspergillus niger</i> Tiegh.	Hilmioglu-Polat et al. 2005; de Hoog et al. 2000a; Ng et al. 1999; Tosti & Piraccini 1998
A	<i>Aspergillus ochraceus</i> G. Wilh.	Baran & Piérard 2004
A	<i>Aspergillus oryzae</i> (Ahlb.) E. Cohn	de Hoog et al. 2000a
A	<i>Aspergillus restrictus</i> G. Sm.	Campbell & Johnson 2005; de Hoog et al. 2000a,
A	<i>Aspergillus sclerotiorum</i> G.A. Huber	Campbell & Johnson 2005; de Hoog et al. 2000a
A	<i>Aspergillus sydowii</i> (Bainier & Sartory) Thom & Church	Campbell & Johnson 2005; Vander Straten et al. 2002; Gupta et al. 2000; de Hoog et al. 2000a; Rippon 1988;
A	<i>Aspergillus terreus</i> Thom	Hilmioglu-Polat et al. 2005; Vander Straten et al. 2002; Gupta et al. 2000; Rippon 1988;
A	<i>Aspergillus unguis</i> (Weill & L. Gaudin) Thom & Raper	Campbell & Johnson 2005; de Hoog et al. 2000a

A	<i>Aspergillus ustus</i> (Bainier) Thom & Church	Campbell & Johnson 2005; Rippon 1988
A	<i>Aspergillus varians</i> Wehmer	Baran & Piérard 2004
A	<i>Aspergillus versicolor</i> (Vuill.) Tirab.	Campbell & Johnson 2005; Escobar & Carmona-Fonseca 2003; Vander Straten et al. 2002; Gupta et al. 2000; Rippon 1988; Torres-Rodríguez et al. 1998
A	<i>Aspergillus</i> spp.	Ioannidou et al. 2006; Romano et al. 2005; Gianni et al. 2000; Khosravi & Mansouri 2000; Grigoriu et al. 1987
A	<i>Cephalosporium</i> sp.	Grigoriu et al. 1987
A	<i>Cladophialophora carrionii</i> (Trejos) de Hoog, Kwon-Chung & McGinnis	Barde & Singh 1984
A	<i>Cladosporium</i> sp.	Hilmioğlu-Polat et al. 2005; Ng et al. 1999;
A	<i>Cladosporium sphaerospermum</i> Penz.	de Hoog et al. 2000a
A	<i>Curvularia lunata</i> (Wakker) Boedijn	de Hoog et al. 2000a, Ng et al. 1999; Barde & Singh 1983
A	<i>Curvularia</i> spp.	Romano et al. 2005; Gianni et al. 2000
A	<i>Dendrophoma</i> sp.	Escobar & Carmona-Fonseca 2003;
A	<i>Exophiala dermatitidis</i> (Kano) de Hoog	García-Martos et al. 2002; Matsumoto et al. 1992
A	<i>Exophiala jeanselmei</i> var. <i>jeanselmei</i> (Langeron) McGinnis & A.A. Padhye	Campbell & Johnson 2005; Boisseau-Garsaud 2002
A	<i>Fusarium oxysporum</i> Schldl.	Calado et al. 2006; Campbell & Johnson 2005; Romano et al. 2005; Godoy et al. 2004; Escobar & Carmona-Fonseca 2003; Vander Straten et al. 2002; Gianni et al. 2000; Gupta et al. 2000; de Hoog et al. 2000a; Rippon 1988
A	<i>Fusarium solani</i> (Mart.) Sacc.	Calado et al. 2006; Campbell & Johnson 2005; Godoy et al. 2004; Escobar & Carmona-Fonseca 2003; Vander Straten et al. 2002; Gupta et al. 2000; Khosravi & Mansouri 2000; Ng et al. 1999
A	<i>Fusarium verticilloides</i> (Sacc.) Nirenberg	Escobar & Carmona-Fonseca 2003;
A	<i>Fusarium</i> spp.	Hilmioğlu-Polat et al. 2005; Romano et al. 2005; Grigoriu et al. 1987 ...
A	<i>Geomyces pannorum</i> (Link) Sigler & J.W. Carmich.	Campbell & Johnson 2005; de Hoog et al. 2000a
T	<i>Gymnascella dankaliensis</i> (Castell.) Currah	Campbell & Johnson 2005; de Hoog et al. 2000a
T	<i>Chaetomium globosum</i> Kunze	Campbell & Johnson 2005; Hattori et al. 2000; de Hoog et al. 2000a; Stiller et al. 1992; Rippon 1988;
T	<i>Chaetomium brasiliense</i> Bat. & Pontual	Costa et al. 1988
A	<i>Chryso sporium carmichaelii</i> Oorschot	Baran & Piérard 2004
A	<i>Chryso sporium keratinophilum</i> D. Frey ex J.W. Carmich	Manzano-Gayosso et al. 2008; de Hoog et al. 2000a
A	<i>Chryso sporium lobatum</i> Scharapov	Baran & Piérard 2004
A	<i>Chryso sporium queenslandicum</i> Apinis & R.G. Rees	de Hoog et al. 2000a
A	<i>Chryso sporium tropicum</i> J.W. Carmich.	de Hoog et al. 2000a
A	<i>Cyphellophora pluriseptata</i> G.A. de Vries, Elders & Luykx	de Hoog et al. 2000a
A	<i>Lasiodiplodia theobromae</i> (Pat.) Griffon & Maubl.	Campbell & Johnson 2005; Vander Straten et al. 2002; de Hoog et al. 2000a; Grigoriu et al. 1987;
A	<i>Malbranchea gypsea</i> Sigler & J.W. Carmich	Baran & Piérard 2004
A	<i>Malbranchea</i> spp.	Ng et al. 1999

T	<i>Microascus cinereus</i> Curzi	de et al. Hoog 2000a
T	<i>Microascus cirrosus</i> Curzi	de Vroey et al. 1992
T	<i>Microascus manginii</i> (Loubière) Curzi	de Hoog et al. 2000a
A	<i>Myriodontium keratinophilum</i> Samson & Polon.	Baran & Piérard 2004
T	<i>Myxotrichum deflexum</i> Berk.	Campbell & Johnson 2005; de Hoog et al. 2000a
A	<i>Myceliophthora lutea</i> Costantin	Baran & Piérard 2004
Z	<i>Mucor</i> sp.	Ribes et al. 2000; Ng et al. 1999
A	<i>Natrassia mangiferae</i> (Syd. & P. Syd.) B. Sutton & Dyko	de Hoog et al. 2000a; Goon & Seow 2002; Ng et al. 1999; Rippon 1988; Grigoriu et al. 1987
A	<i>Natrassia</i> spp.	Escobar & Carmona-Fonseca 2003
A	<i>Onychocola canadensis</i> Sigler	Campbell & Johnson 2005; Vander Straten et al. 2002; Gupta et al. 2000; de Hoog et al. 2000a;
T	<i>Ceratocystis stenoceras</i> (Robak) C. Moreau	Campbell & Johnson 2005; de Hoog et al. 2000a
A	<i>Paecilomyces lilacinus</i> (Thom) Samson	Campbell & Johnson 2005; de Hoog et al. 2000a
A	<i>Paecilomyces variotii</i> Bainier	Campbell & Johnson 2005; de Hoog et al. 2000a
A	<i>Paecilomyces</i> spp.	Hilmioğlu-Polat et al. 2005; Ng et al. 1999
A	<i>Penicillium citrinum</i> Thom	Baran & Piérard 2004
A	<i>Penicillium</i> spp.	Campbell & Johnson 2005; Escobar & Carmona-Fonseca 2003; Ng et al. 1999;
	<i>Phialophora europaea</i> de Hoog, Mayser & Haase	de Hoog et al. 2000b
A	<i>Phoma sorghina</i> (Sacc.) Boerema, Dorenb. & Kesteren	de Hoog 2000a
A	<i>Phyllosticta sydowii</i> Bres.	Rippon 1988; Grigoriu et al. 1987
A	<i>Polypaecilum insolitum</i> G. Sm.	Campbell & Johnson 2005; de Hoog et al. 2000a
T	<i>Pseudeurotium ovale</i> var. <i>ovale</i> Stolk	de Hoog et al. 2000a
A	<i>Pyrenochaeta unguis-hominis</i> Punith. & M.P. English	Campbell & Johnson 2005; Vander Straten et al. 2002; de Hoog 2000a;
T	<i>Renispora flavissima</i> Sigler, P.K. Gaur, Lichtw. & J.W. Carmich.	Baran & Piérard 2004
A	<i>Scedosporium</i> spp.	Ioannidou et al. 2006
B	<i>Schizophyllum commune</i> Fr.	de Hoog et al. 2000a
A	<i>Scopulariopsis acremonium</i> (Delacr.) Vuill.	Campbell & Johnson 2005; Vander Straten et al. 2002; de Hoog et al. 2000a
A	<i>Scopulariopsis asperula</i> (Sacc.) S. Hughes	Campbell & Johnson 2005; de Hoog et al. 2000a
A	<i>Scopulariopsis brevicaulis</i> (Sacc.) Bainier	Campbell & Johnson 2005, téměř všechny zdroje
A	<i>Scopulariopsis brumptii</i> Salv.-Duval	Vander Straten et al. 2002
A	<i>Scopulariopsis flava</i> (Sopp) F.J. Morton & G. Sm	Campbell & Johnson 2005; de Hoog et al. 2000a
A	<i>Scopulariopsis fusca</i> Zach	Campbell & Johnson 2005; Vander Straten et al. 2002; de Hoog et al. 2000a
A	<i>Scopulariopsis koningii</i> (Oudem.) Vuill.	Campbell & Johnson 2005; Vander Straten et al. 2002; de Hoog et al. 2000a;
A	<i>Scytalidium dimidiatum</i> (Penz.) B. Sutton & Dyko	Barua et al. 2007; Campbell & Johnson 2005; Goon & Seow 2002; Vander Straten et al. 2002; Álvarez et al. 2000; Gupta et al. 2000;
A	<i>Scytalidium hyalinum</i> C.K. Campb. & J.L. Mulder	Campbell & Johnson 2005; Vander Straten et al. 2002; Gupta et al. 2000; Rippon 1988
A	<i>Trichoderma</i> sp.	Hilmioğlu-Polat et al. 2005
A	<i>Ulocladium botrytis</i> Preuss	Romano et al. 2004
A	<i>Ulocladium</i> spp.	Hilmioğlu-Polat et al. 2005

Příloha II - Mikroskopické fotografie a morfologie kolonií kultivovaných hub



Obr. 1.1

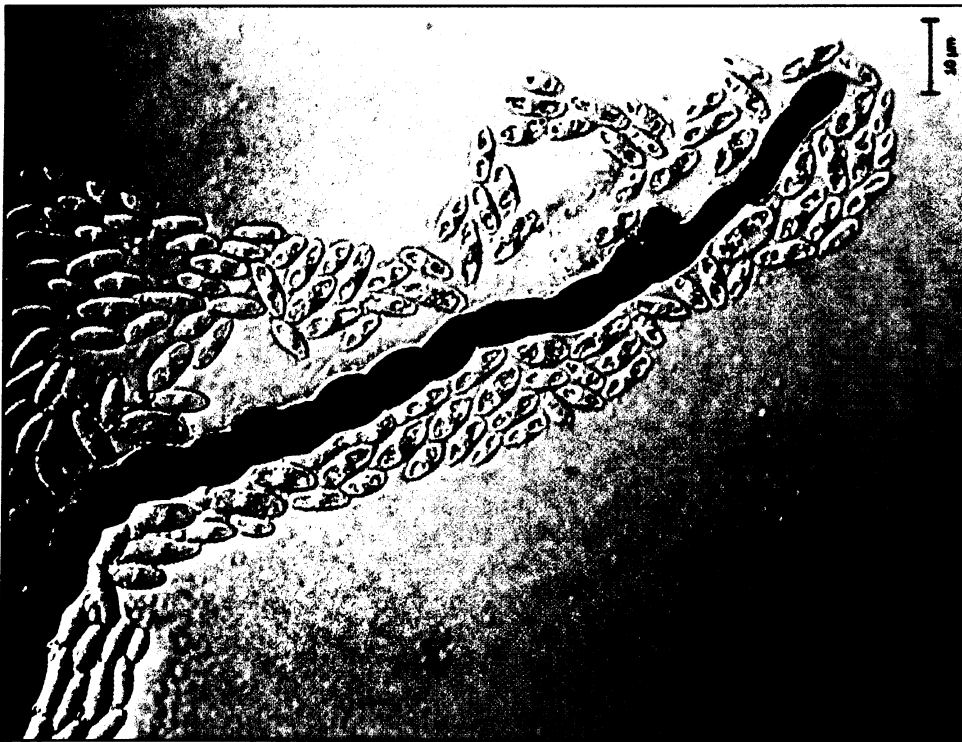


Obr. 1.2.

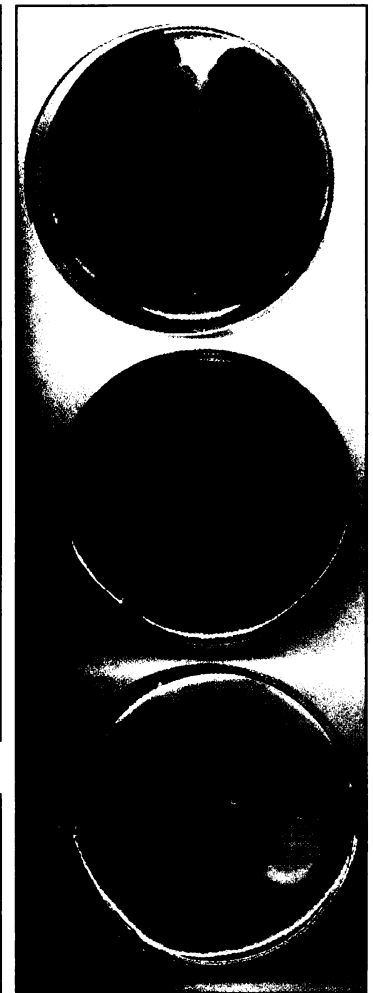
Aspergillus sydowii

Obr. 1.1. - zřetelně biseriální konidiogenní buňky; do hněda zbarvený konidiofor

Obr. 1.2. - redukovaný typ konidioforu; konidie s výrazně hrubým povrchem

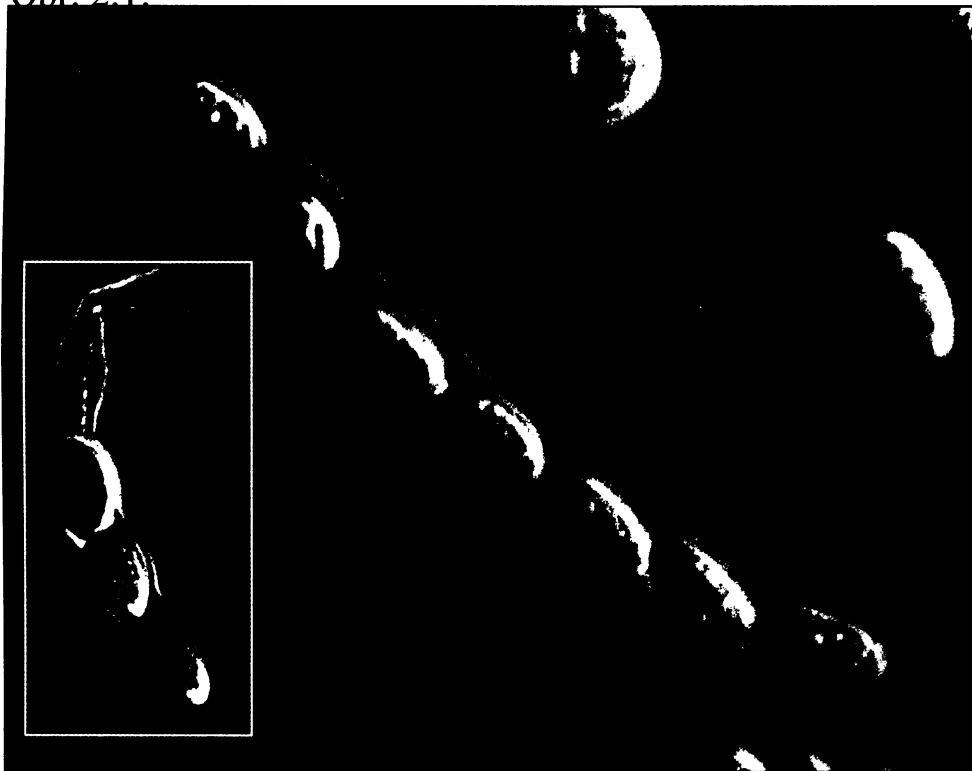


Obr. 2.1.



Obr. 2.3.

*Aureobasidium
pullulans*

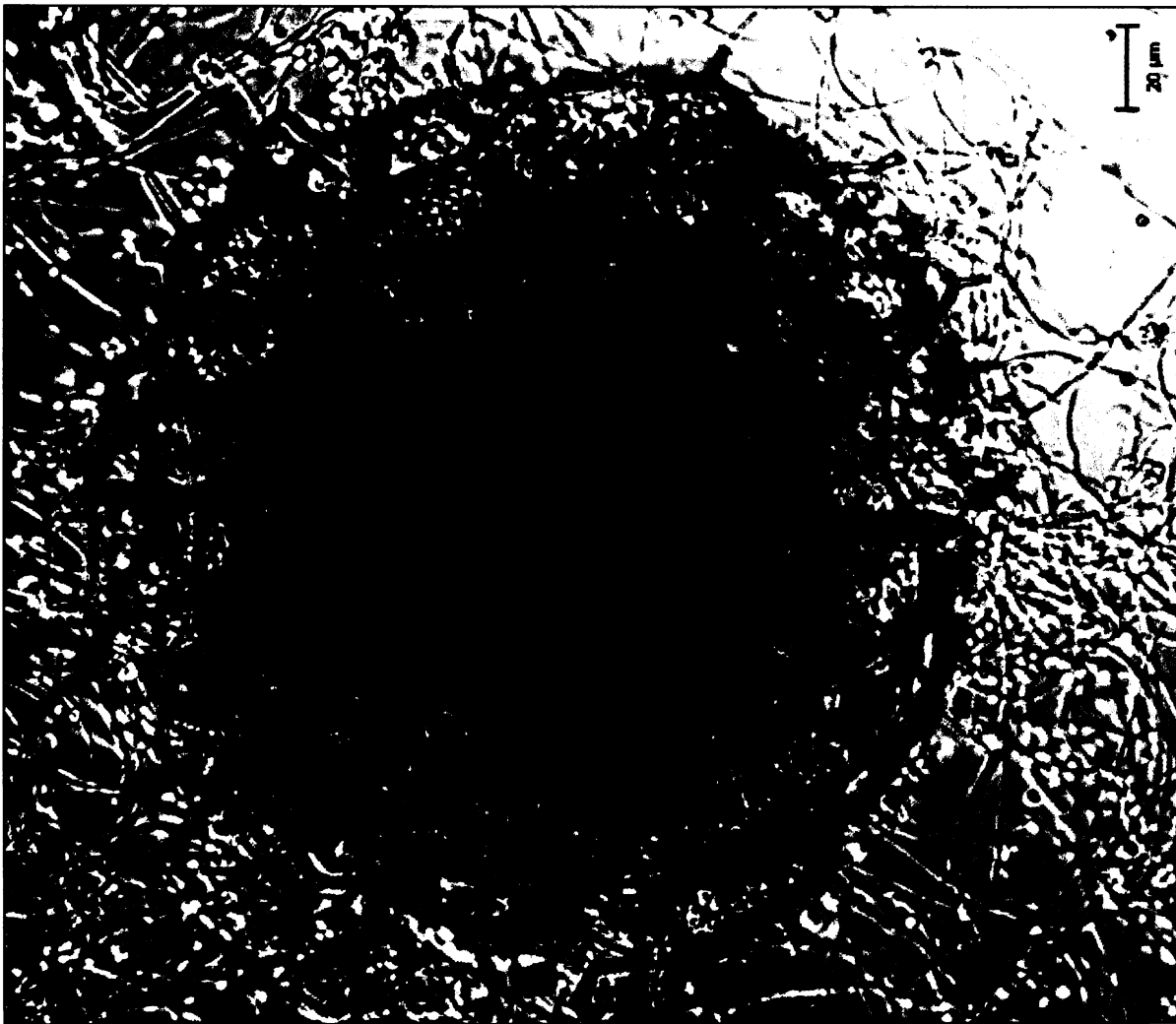


Obr. 2.2.

Obr. 2.1. Řetízek chlamydospor, kolem hyalinní konidie

Obr. 2.2. Endokonidie

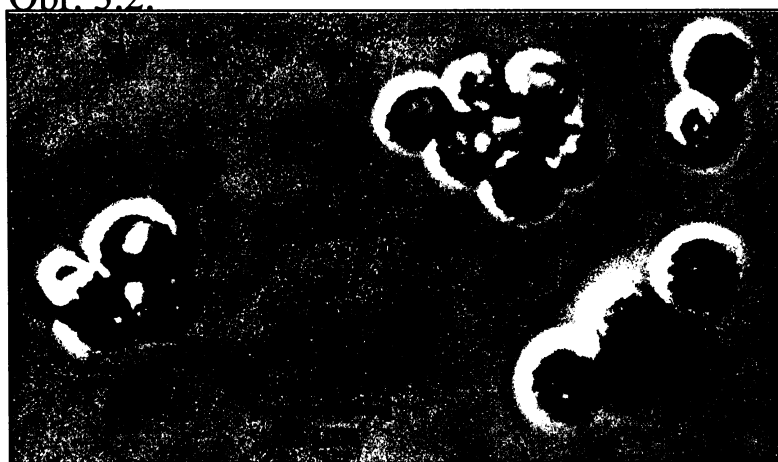
Obr. 2.3. Kultury po 14 dnech, shora: SI °4, PCA, CZA



Obr. 3.1.



Obr. 3.2.



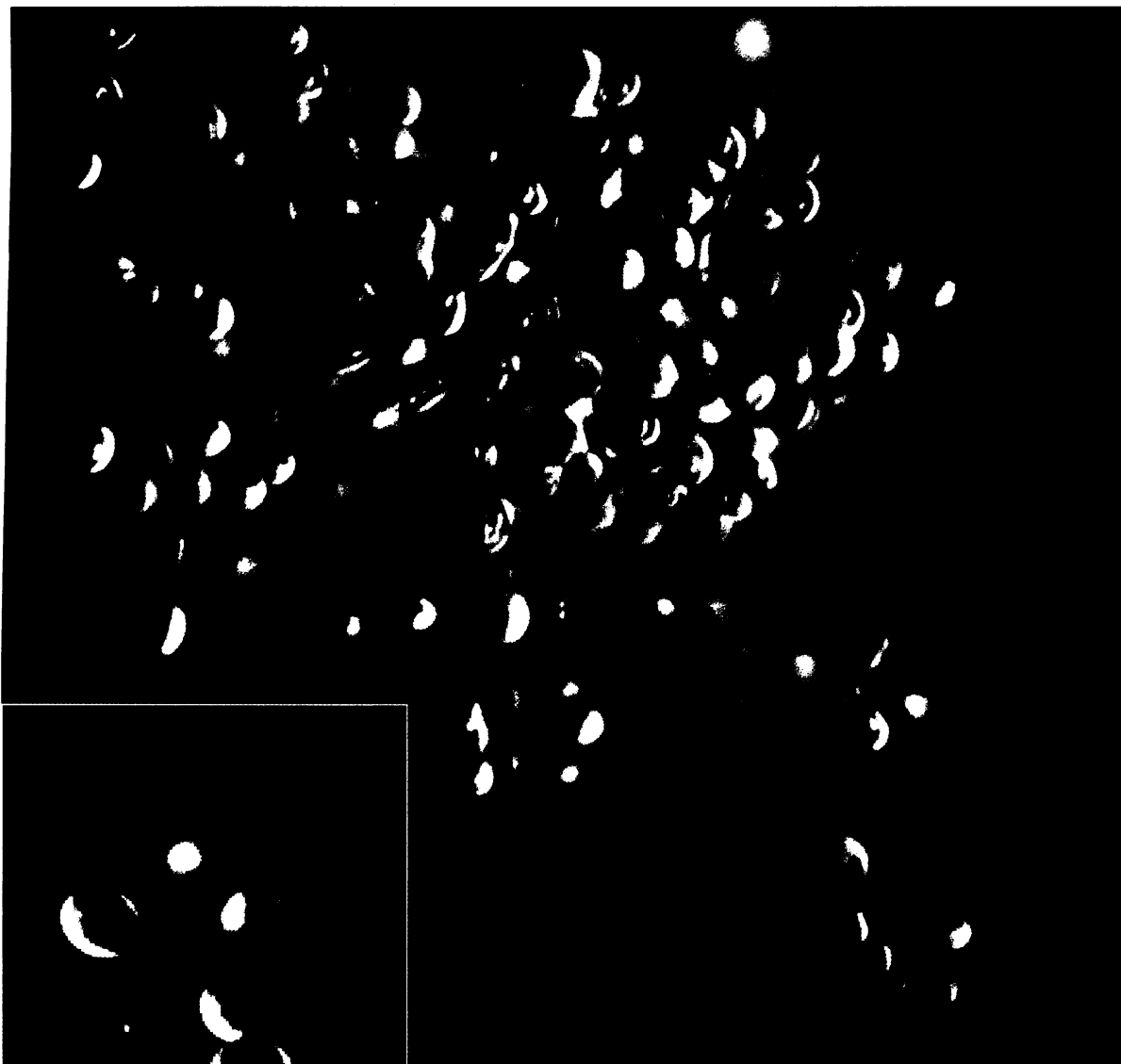
Obr. 3.3.

Auxarthron sp.

Obr. 3.1. Askoma, rezavě
hnědá retikuloperidie

Obr. 3.2. Přívěsek

Obr. 3.3. Askospory



Obr. 4.1.

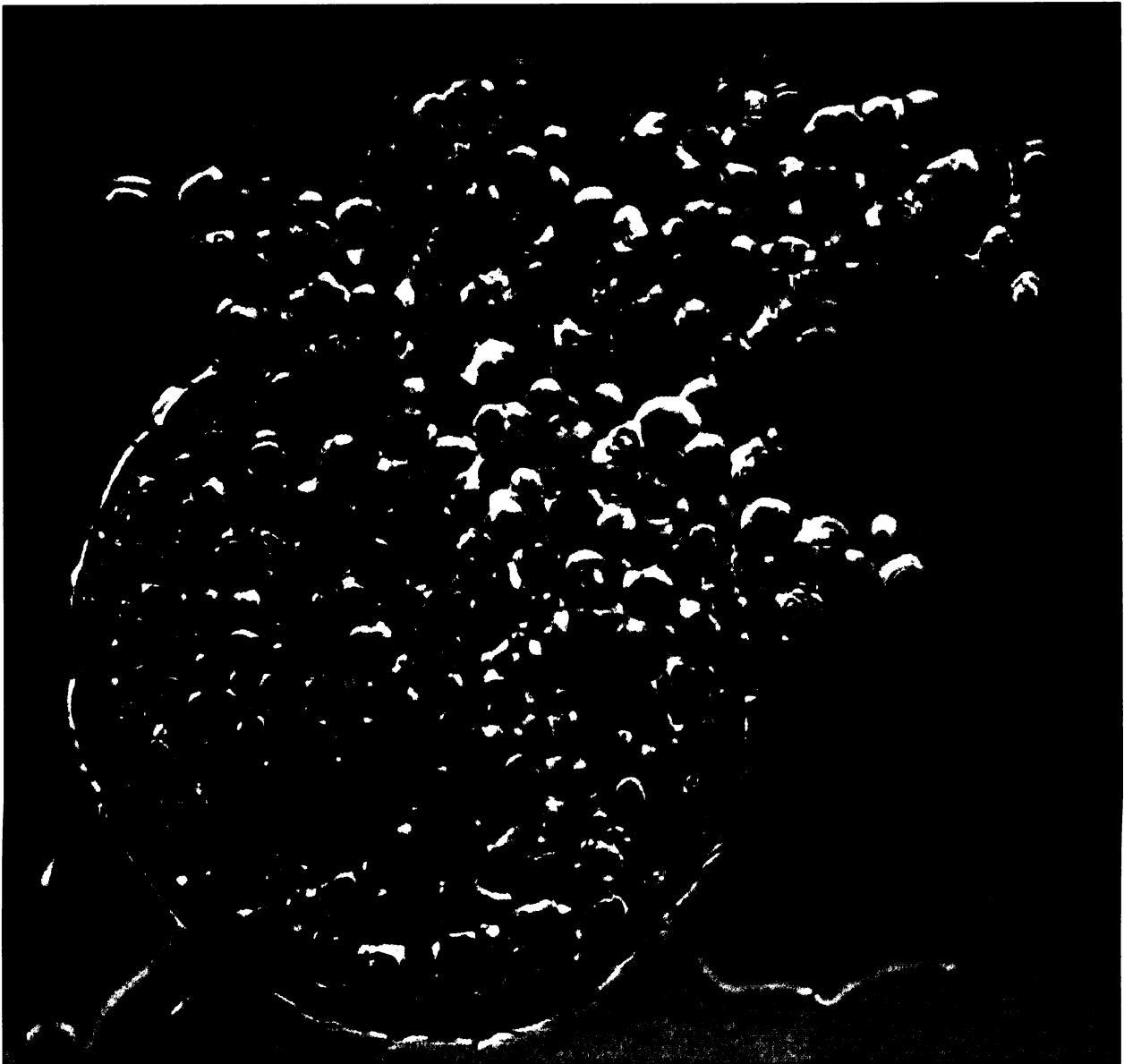


Obr. 4.2.

Beauveria bassiana

Obr. 4.1. Shluk konidiogenních buněk

Obr. 4.2. Konidiogenní buňka s raphe zprohýbanou na způsob "cik-cak"



Obr. 5.1.



Obr. 5.2.



Obr. 5.3.

Eurotium amstelodami

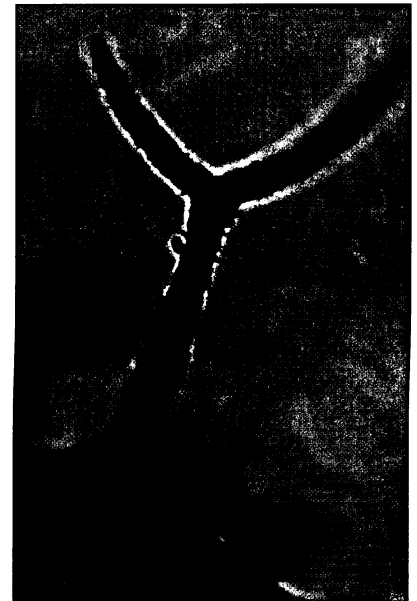
Obr. 5.1. Vřecka uvolněná z klestothecia

Obr. 5.2. Vřecko a askospory

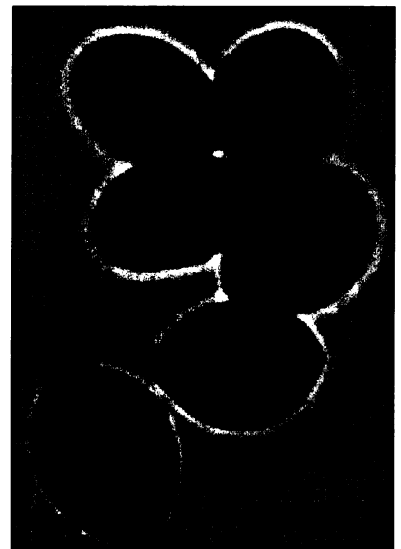
Obr. 5.3. Kultura na CYA



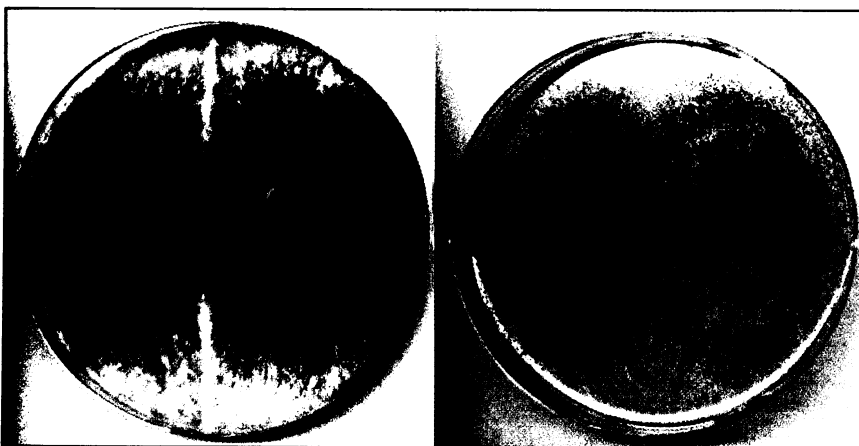
Obr. 6.1.



Obr. 6.2.



Obr. 6.3.



Obr. 6.4.

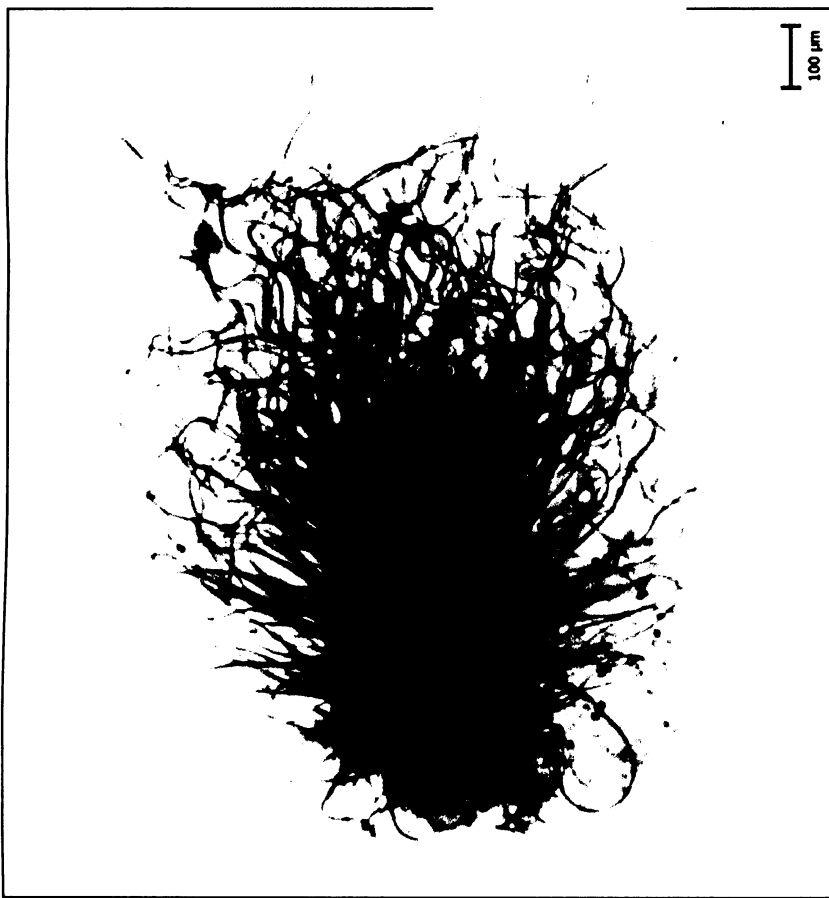
Chaetomium funicola

Obr. 6.1. Askoma

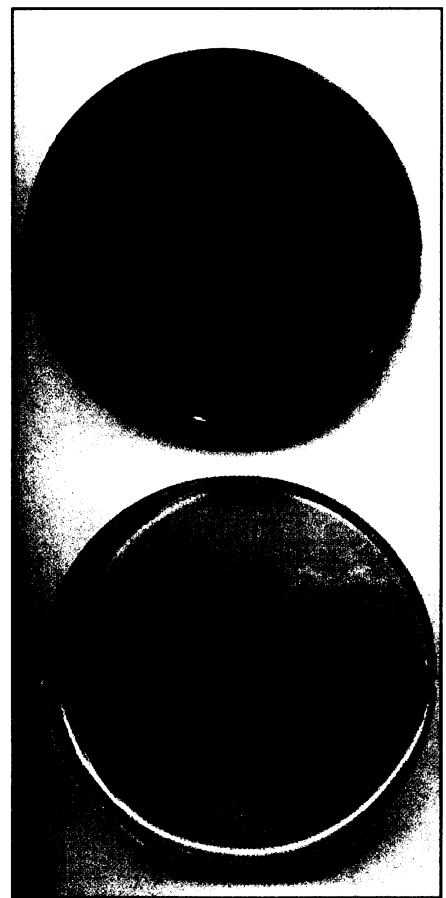
Obr. 6.2. Dichotomicky
větvená sěta s drsným
povrchem

Obr. 6.3. Askospory

Obr. 6.4. Kultury po 7
dnech; vlevo SI °4,
vpravo PCA



Obr. 7.1.



Obr. 7.2.



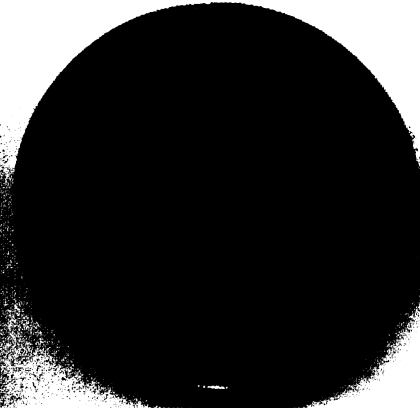
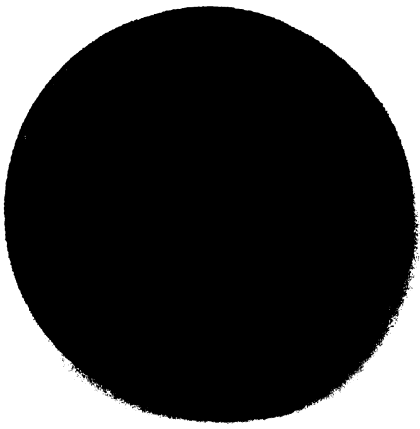
Obr. 7.3.

Chetomium globosum

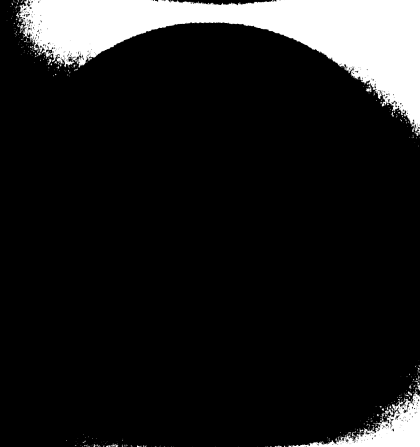
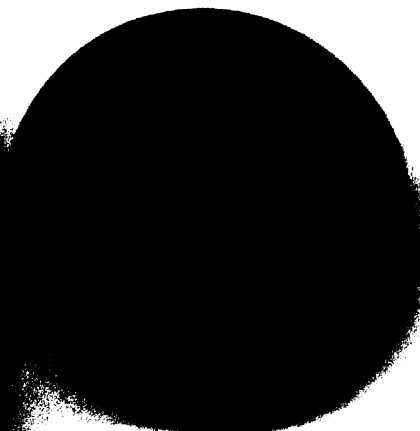
Obr. 7.1. Askoma

Obr. 7.2. Kultury po 7 dnech, nahore
SI °4, dole PCA

Obr. 7.3. Stočené séty a askospory



Obr. 8.3.



Obr. 8.4.



Obr. 8.1.



Obr. 8.2.

neurčený "coelomycet"

Obr. 8.1. Konidie 2-3buněčné

Obr. 8.2. Konidiogenní buňky

Obr. 8.3. Kolonie na SI^o4 a PCA po týdnu

Obr. 8.4. Tytéž kolonie po dalších 2 týdnech pod UV-zářením; tvorba stromat