

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Botanika



Bc. Kristýna Holíková

**Azolová rezistence u *Aspergillus fumigatus*: genetický podklad
a mechanismy šíření v České republice**

Azole resistance in *Aspergillus fumigatus*: genetic background
and mechanisms of spread in the Czech Republic

Diplomová práce

Vedoucí závěrečné práce: MUDr. Mgr. Vít Hubka, Ph.D.

Praha 2023

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem magisterskou práci vypracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani žádná její podstatná část nebyla použita k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 5. 1. 2023.

Podpis:

Bc. Kristýna Holíková

Poděkování

Především velice děkuji mému školiteli MUDr. Mgr. Vítovi Hubkovi, Ph.D. za konzultace, odborné vedení, pomoc a cenné rady. Zároveň velmi oceňuji trpělivý a přátelský přístup při průběhu výzkumu, včetně věnovaného času a ochoty, kterou mi v průběhu zpracování diplomové práce věnoval. Ráda bych poděkovala také za podporu při práci na grantovém projektu. Vážím si možnosti, že jsem mohla spolupracovat a zabývat se touto zajímavou problematikou.

Velké díky patří také RNDr. Pavlíně Lyskové, Ph.D. za výpomoc a odborný dohled při testování citlivosti antimykotik. Velmi oceňuji tuto přínosnou spolupráci, získané znalosti a také za možnost konzultací v průběhu celé doby výzkumu. V rámci toho děkuji také za poskytnuté klinické izoláty a za možnost praxe v Laboratoři lékařské mykologie (Zdravotní ústav se sídlem v Ústí nad Labem, Praha).

V návaznosti na klinickou část práce chci také poděkovat za izolované kmeny z pacientů paní doktorce MUDr. Daniele Lžičarové (Ústav lékařské mikrobiologie, 2. lékařská fakulta a Fakultní nemocnice Motol, Praha) a panu Mgr. Radimovi Dobiáši, Ph.D. (Zdravotní ústav se sídlem v Ostravě, Ostrava). Celkově si cením možnosti spolupráce se všemi třemi klinickými pracovišti při získávání údajů pro klinickou výzkumnou část práce. Děkuji i Ministerstvu zemědělství, Ústřednímu kontrolnímu a zkušebnímu ústavu zemědělskému (ÚKZÚS), kteří poskytli nejen data užívání azolů na polích a současně taktéž vlastníkům jednotlivých polností, kteří umožnili sběr půdních vzorků.

Dále děkuji Grantové agentuře Univerzity Karlovy za poskytnutí finanční podpory pro mou diplomovou práci (projekt GAUK 140420).

Zároveň bych chtěla poděkovat všem pedagogům a kolegům z oddělení katedry botaniky PŘF UK za přátelskou atmosféru, konzultace při průběhu práce a za mnoho cenných znalostí předaných při odborných přednáškách během studia. Včetně díky doc. Mgr. Ondřeji Koukolovi, Ph.D. za pomoc se studijními záležitostmi. Také si vážím vstřícnosti konzultací týkajících se nejen práce na diplomovém projektu.

Chtěla bych také poděkovat kolegyni Mgr. Kateřině Glässnerové za všechnu pomoc, kterou mi při celé době studia věnovala. Oceňuji laskavý přístup, podporu při práci na projektech, a především pozitivní motivaci při studiu.

A v neposlední řadě bych ráda poděkovala mé rodině, příteli, kamarádům a dalším blízkým za podporu nejen při psaní této práce, ale i během celého studia.

Abstrakt

Aspergillus fumigatus je široce rozšířená saprofytická houba, která se často uplatňuje jako oportunní patogen. Způsobuje onemocnění aspergilózu, která se může projevovat i jako život ohrožující infekce u imunokompromitovaných pacientů. Azolové deriváty patří mezi léky první volby v terapii aspergilózy, ale celosvětově se zvyšující výskyt azol-rezistentních kmenů *A. fumigatus* představuje závažný klinický problém. Studie posledního desetiletí ukázaly, že především důsledkem používání azolových fungicidů v zemědělství dochází k selekci rezistentních kmenů, které většinou nesou mutace v genu *cyp51A*. Právě to následně komplikuje i léčbu pacientů s aspergilózou. Přestože incidence infekcí nereagujících na léčbu azolovými antimykotiky narůstá, nebyla prevalence azolové rezistence v České republice dosud studována. Prvním cílem této diplomové práce proto bylo zjistit prevalenci azolové rezistence u klinických kmenů *A. fumigatus* v ČR a studovat molekulárně-genetický podklad této rezistence. Druhým cílem bylo zjistit prevalenci rezistence a její genetické mechanismy v půdním prostředí a zkoumat vztahy mezi půdními a klinickými rezistentními izoláty.

Pro tyto účely bylo ze tří zdravotnických zařízení shromážděno v letech 2019-2021 celkem 301 klinických izolátů *A. fumigatus*. Dále bylo získáno 300 půdních izolátů z polí ošetřovaných a neošetřovaných azolovými fungicidy. U izolátů byla screeningovou metodou testována citlivost k azolovým derivátům metodou EUCAST AFST E.Def 10.1 a u rezistentních kmenů byly určeny hodnoty minimální inhibiční koncentrace ke čtyřem azolovým derivátům (ITR, VOR, POS a ISA) protokolem E.Def 9.3. Mezi 301 klinickými kmeny bylo nalezeno celkem 19 azol-rezistentních izolátů *A. fumigatus*, odpovídající prevalenci azolové rezistence 6,3 %. Sekvenací genu *cyp51A* byly nalezeny nesynonymní mutace u 8 klinických izolátů. Z nichž nejčastější byla mutace TR₄₆/L98H, u čtyř izolátů, a u dvou mutace TR₄₆/Y121F/T289A. Původ rezistence zmíněných mutací pramení ve vnějším prostředí. Další dva izoláty nesly mutace F46Y/M172V/E427K a F46Y/M172V/N248T/D255E/E427K, které zpravidla vznikají v průběhu dlouhodobé léčby. Mechanizmy rezistence u zbývajících 11 kmenů byly nezávislé na genu *cyp51A*, a jejich molekulární povaha nebyla v této práci dále zkoumána. Mezi půdními kmeny nebyla rezistence prokázána u žádného z testovaných izolátů. Z toho důvodu nebylo možné zkoumat souvislost mezi genotypy a mechanismy rezistence u kmenů z půdního a klinického prostředí. I přesto přinesla tato práce první cenné poznatky o výskytu azolové rezistence v ČR v klinickém materiálu a o genetických mechanismech, kterými je tato rezistence podmíněna. Byl tak vytvořen základ pro budoucí studie a kontinuální monitoring epidemiologické situace na poli azolové rezistence.

Klíčová slova: antifungální rezistence, azolové deriváty, aspergilóza, *Aspergillus fumigatus*, *cyp51A*

Abstract

Aspergillus fumigatus is a widespread saprophytic fungus. As an opportunistic pathogen it can also cause aspergillosis, which can manifest itself as a life-threatening infection in immunocompromised patients. Azole derivatives constitute first-line therapy of aspergillosis, but the increase worldwide of azole-resistant *A. fumigatus* strains represents a serious clinical problem. Most of the molecular mechanisms causing azole resistance are dependent on mutations in the *cyp51A* gene. Studies of the last decade have shown that primarily because of the use of azole fungicides in agriculture, azole-resistant strains of *A. fumigatus* are selected in the environment. This subsequently complicates the treatment of patients with aspergillosis, and the incidence of infections unresponsive to treatment with azole antifungals increases. Increasing incidence of azole antifungals-resistant infections has become a growing concern: yet the prevalence of azole resistance has not yet been assessed in Czech Republic. Therefore, the first objective of this thesis was to determine Czech Republic's prevalence of azole resistance in clinical strains of *A. fumigatus*. Those findings permitted the observation of the molecular-genetic mechanisms of this resistance. Second aim was to study environmental prevalence of azole resistance and the genetic mechanism in soil isolates of *A. fumigatus*. Finally, this allowed the investigation of the relationships between soil and clinical resistant isolates.

For these purposes, a total of 301 clinical isolates of *A. fumigatus* were collected from three healthcare facilities from 2019 to 2021. Concomitantly the sampling of 300 soil isolates from fields treated and untreated with azole fungicides was conducted. All the isolates were screened for sensitivity to azole derivatives using the EUCAST AFST E.Def 10.1 method and for resistant strains, the minimum inhibitory concentration values for four azole derivatives (ITR, VOR, POS and ISA) were determined by protocol E.Def 9.3. A total of 19 azole-resistant *A. fumigatus* isolates were found among 301 clinical strains, which corresponds to a prevalence of azole resistance of 6.3%. By sequencing the *cyp51A* gene, non-synonymous mutations were found in 8 clinical isolates. The most common, TR₄₆/L98H mutation was present in four isolates. Two more in TR₄₆/Y121F/T289A mutation. The origin of the resistance of the aforementioned mutations originates in the environment. The last two isolates carried mutations F46Y/M172V/E427K and F46Y/M172V/N248T/D255E/E427K, which usually arise during long-term treatment. The resistance mechanisms in the remaining 11 strains were not dependent on the *cyp51A* gene, but their molecular nature was not further investigated. Among the soil strains, resistance was not demonstrated in any of the tested isolates. Hence, it was impossible to investigate the connection between genotypes and resistance mechanisms in strains from soil and clinical environments.

Nonetheless, this thesis brought the first valuable knowledge of the occurrence of azole resistance in clinical material in Czech Republic. Moreover, the study brought to light the genetic mechanisms by which is this resistance conditioned. The foundation for future studies and continuous monitoring of the epidemiological situation in the field of azole resistance was laid.

Key words: antifungal resistance, azole derivatives, aspergillosis, *Aspergillus fumigatus*, *cyp51A*

Obsah

1. Úvod	1
1.1 Aspergilóza	2
1.2 Azolové deriváty	3
1.2.1 Mechanismus účinku.....	4
1.3 Fungální rezistence k azolovým derivátům	5
1.4 Vznik a šíření rezistence.....	7
1.4.1 Vznik rezistence	8
1.4.2 Epidemiologie azolové rezistence	9
1.5 Molekulární mechanismy rezistence.....	12
1.5.1 Mechanismy rezistence závislé na genu <i>cyp51A</i>	14
1.5.2 Mechanismy rezistence nezávislé na genu <i>cyp51A</i>	15
2. Metodologie	17
2.1 Zdroje izolátů	17
2.1.1 Klinické izoláty.....	17
2.1.2 Půdní izoláty.....	17
2.2 Kultivace a uchování kmenů	19
2.3 Molekulární analýza.....	20
2.3.1 Izolace DNA	20
2.3.2 PCR amplifikace.....	20
2.3.3 Ověření identifikace na úroveň druhu amplifikací genu <i>benA</i>	20
2.3.4 Amplifikace genu <i>cyp51A</i>	21
2.3.5 Purifikace PCR produktů	21
2.3.6 Sekvenace DNA.....	22
2.3.7 Druhovná identifikace <i>Aspergillus fumigatus</i>	22
2.3.8 Identifikace molekulárních mechanismů rezistence	22
2.4 Screening antifungální rezistence	22
2.5 Identifikace hodnoty minimální inhibiční koncentrace (MIC)	26
2.6 Statistické zpracování dat.....	29
3. Výsledky	30
3.1 Screening antifungální rezistence k azolovým derivátům	30
3.1.1 Identifikace klinických izolátů a rozdělení dle substrátů	30
3.1.2 Screening azolové rezistence klinických izolátů.....	30

3.1.3	Stanovení přesné hodnoty MIC azolových ATM metodikou EUCAST klinických izolátů	31
3.1.4	Statistické vyhodnocení dat klinických izolátů	36
3.1.5	Půdní izoláty	38
3.2	Molekulární analýza	41
3.2.1	Sekvenace genu <i>cyp51A</i> a analýza nesynonymních mutací	41
4.	Diskuze	45
4.1	Prevalence azolové rezistence v klinickém prostředí v České republice	45
4.2	Vznik rezistence v půdním prostředí a její šíření	47
4.3	Molekulární mechanismy rezistence	49
5.	Závěr	52
6.	Seznam použité literatury	55

Seznam zkratek

AMK	Aminokyselina
AOE	Acute otitis externa
ARAF	Azol-rezistentní <i>Aspergillus fumigatus</i>
ATM	Antimykotikum
ATP	Adenosintrifosfát
ATU	Area of Technical Uncertainty
BAL	Bronchoalveolární laváž
BAT	Bronchoalveolární tekutina
BP	Breakpoint hodnota
CAPA	COVID-19 associated pulmonary aspergillosis
CCF	Culture Collection of Fungi, Sběrka kultur hub
CF	Cystická fibróza
CLSI	The Clinical & Laboratory Standards Institute
CPA	Chronic pulmonary aspergillosis
<i>cyp51A</i>	Cytochrom P-450 gen kódující enzym CYP51A
DCD / HCD	Dolní cesty dýchací / Horní cesty dýchací
DMSO	Dimethylsulfoxid
ETA	Endotracheální aspirát
EUCAST - AFST	The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing - Antifungal susceptibility testing
GM	Geometrical mean, geometrický průměr
HS	Hot spots mutace
CHL	Chloramfenikol
CHOPN	Chronická obstrukční plicní nemoc
IA	Invazivní aspergilóza
IPA	Invazivní plicní aspergilóza
ISA	Isavukonazol
ITR	Itrakonazol
MEA	Malt extrakt agar
MIC	Minimální inhibiční koncentrace
OE / OMA	Otitis externa / Otitis media acuta
POS	Posakonazol
RPMI	Roswell Park Memorial Institute medium
SCOM	Chronická hnisavá otitis media
SDA	Sabouraudův dextrózový agar
STR	Streptomycin
TR	Tandemová repetice
VOR	Vorikonazol
ZN	Zhoubný nádor

1. Úvod

Mykotické infekce postihují více než miliardu lidí ve světě, a to se stejnou mortalitou, jako má například malárie, či tuberkulóza (Brown *et al.* 2012). *Aspergillus* je rod vláknitých hub, který způsobuje nemoc zvanou aspergilóza. (Patterson *et al.* 2016). Kromě toho také hraje důležitou roli v rozkládání uhlíku a dusíku. Jeho asexuální spory mohou být vzdušnými proudy rozptýleny do velké geografické vzdálenosti (Latgé 1999). Konidie *Aspergillus fumigatus* iniciují ročně více než 3 000 000 chronických a 300 000 invazivních onemocnění po celém světě (Brown *et al.* 2012, Bongomin *et al.* 2017). V závislosti na imunitním stavu hostitele může jejich inhalace vést k širokému spektru onemocnění, včetně invazivní aspergilózy, jejíž mortalita se pohybuje okolo 50 %. Úmrtnost se však podstatně zvyšuje, pokud je infekce způsobena kmeny rezistentními vůči azolovým antimykotikům (ATM), nebo pokud je diagnóza opožděna (Denning *et al.* 2016, Verweij *et al.* 2020, Ortiz *et al.* 2022). Například v případech invazivní aspergilózy rezistentní vůči VOR je mortalita zvýšena o 21 % proti tomu, když patogen azol-rezistentní není (Lestrade *et al.* 2019a). Plasticita genů je u rodu *Aspergillus* velmi výrazná a rychlá, a tak při dlouhodobém vystavení hub azolovým derivátům vzniká velký počet rezistentních kmenů. Právě z těchto důvodů často dochází ke komplikacím při léčbě aspergilózy (Hokken *et al.* 2019).

Reakce patogenu na léčbu ATM závisí na řadě faktorů. Je zásadní, jakým typem aspergilózy pacient trpí a zda má nějaké komorbidity. Aktuálně přibývá komorbidit plicní aspergilózy s COVID-19 (CAPA), při níž je mortalita až trojnásobně vyšší, než když pacient touto virózou netrpí (Alanio *et al.* 2020, Bartoletti *et al.* 2021, Prattes *et al.* 2021, Krzych *et al.* 2022, Ogawa *et al.* 2022). To je důvodem, proč v posledních letech přibylo velké množství především evropských studií, které zkoumají prevalenci azolové rezistence. Jelikož jsou azolové deriváty využívány celosvětově nejen v klinické, ale převážně také v zemědělské praxi, byly rezistentní kmeny *A. fumigatus* izolovány již na všech kontinentech. Proto je důležité sledovat epidemiologickou situaci. V České republice byly již dříve izolovány dva azol-rezistentními kmeny *A. fumigatus* (ARAF). Z těchto důvodů bylo záměrem této diplomové práce zjistit prevalenci azolové rezistence jak v klinickém, tak ve vnějším prostředí. A zároveň s tím studovat molekulárně genetické pozadí získaných ARAF kmenů z obou prostředí.

1.1 Aspergilóza

Aspergilóza je nejčastěji se vyskytující oportunní mykózou, která je způsobena vláknitými houbami. Zástupci rodu *Aspergillus* jsou mikroskopické houby s kosmopolitním rozšířením. Vyskytují se především jako saprotrofé v půdě, nebo na organickém či klinickém materiálu. Napadají hlavně imunosuprimované pacienty (Latgé 2001, Walsh *et al.* 2008, Patterson *et al.* 2016). Jejich konidiospory se snadno šíří vzduchem a díky své malé velikosti jsou snadno vdechnutelné. Je odhadováno, že každý člověk vdechne alespoň 100 konidií denně a zlomek z nich se dostane až do plicních alveol (Latgé 1999). V plicních sklípcích pacientů mohou konidie klíčit, růst, napadat plicní tkáň a způsobovat invazivní formu aspergilózy, která je nejčastější oportunní mykotickou infekcí u příjemců transplantátů krvetvorných kmenových buněk a druhá nejčastější u příjemců transplantovaných orgánů (Husain & Camargo 2019).

Nejčastějším původcem plicních mykotických infekcí, a tedy i aspergilózy, je druh *Aspergillus fumigatus* (Latgé 1999). Avšak počet méně běžných a kryptických druhů, které toto onemocnění způsobují, stoupá. Fylogeneticky příbuzné, kryptické druhy jsou si často morfologicky velmi podobné. Právě proto bývají rozlišované na základě molekulárních dat. Frekvence výskytu kryptických druhů v klinickém materiálu se pohybuje podle různých studií od 11 % do 19 % (Balajee *et al.* 2009, Alastruey-Izquierdo *et al.* 2014, Negri *et al.* 2014, Sabino *et al.* 2014, Hubka *et al.* 2018). Včasná identifikace na úroveň druhu přitom může být určující pro správné zvolení antifungální léčby (Nedel & Pasqualotto 2014, Lestrade *et al.* 2019b). Kryptické druhy *A. fumigatus* ze sekce *Fumigati*, kterými jsou například: *Aspergillus lentulus*, či zástupci komplexu *Aspergillus viridinutans*, jako jsou *Aspergillus felis*, *Aspergillus udagawae*, *Aspergillus pseudoviridinutans*, způsobují spíše infekce chronického charakteru. *Aspergillus fumigatus* je narozdíl od nich více termotolerantní, virulentní a mimo chronickou aspergilózu častěji způsobuje invazivní aspergilózu (IA) či aspergilom (Perfect *et al.* 2001, Lamoth 2016, Chowdhary *et al.* 2017).

Mortalita pacientů diagnostikovaných s invazivní aspergilózou, kteří byli infikováni kmeny aspergilů citlivých k běžným antimykotikům (ATM), se pohybuje mezi 30 až 50 % (Astvad *et al.* 2014). Ovšem v případě rezistentních kmenů mortalita výrazně stoupá a může dosahovat až 88 % (van der Linden *et al.* 2011).

1.2 Azolové deriváty

Azolové deriváty jsou léky první linie při léčbě aspergilózy. Spolu s polyeny (např. amfotericin B) a echinokandiny (např. kaspofungin) tvoří jednu ze tří skupin léků invazivní aspergilózy (Kurtz *et al.* 1994, Letscher-Bru & Herbrecht 2003, Gray *et al.* 2012, Lamoth & Calandra 2022).

V praxi jsou nejčastěji používána tři triazolová léčiva, tj. itrakonazol (ITR), vorikonazol (VOR) a posakonazol (POS) (Brahm H. Segal 2009, Patterson *et al.* 2016, Lestrade *et al.* 2019a). Volba druhu triazolu se odlišuje dle toho, jaký její typ byl pacientům diagnostikován. V základě je aspergilóza rozdělena na invazivní plicní aspergilózu (IPA) a chronickou plicní aspergilózu (CPA).

První volbou terapie invazivní aspergilózy je VOR a ISA (ISA). V reakci na situaci COVID-19 zvolil roku 2020 konsenzus několika mezinárodních společností lékařské mykologie jako lék první linie IPA, kromě původního VOR, také isavukonazol. A to z toho důvodu, že méně často vykazuje interakci s jinými léčivy, a tudíž má nižší hepatotoxicitu. Zároveň může mít méně z některých vedlejších účinků, způsobených triazolou. Neposledně má i zkrácený interval QT (Ullmann *et al.* 2018, Koehler *et al.* 2021, Lai & Yu 2021, Salmanton-García *et al.* 2021, Lamoth & Calandra 2022). Pro léčbu chronické aspergilózy se běžně využívá VOR a ITR (Denning *et al.* 2016). Lékem alergické bronchopulmonální aspergilózy je kromě prednisonu též ITR. Itrakonazol je také často zvolen v případě léčby aspergilomu. Ten může být v určitých případech řešený i chirurgickým zákrokem. Posakonazol je užíván hlavně při profylaxi aspergilózy. Zároveň je POS zvažován pro léčbu způsobenou kryptickými druhy z komplexu *Fumigati* (Page & Liles 2008, Lamoth & Calandra 2022).

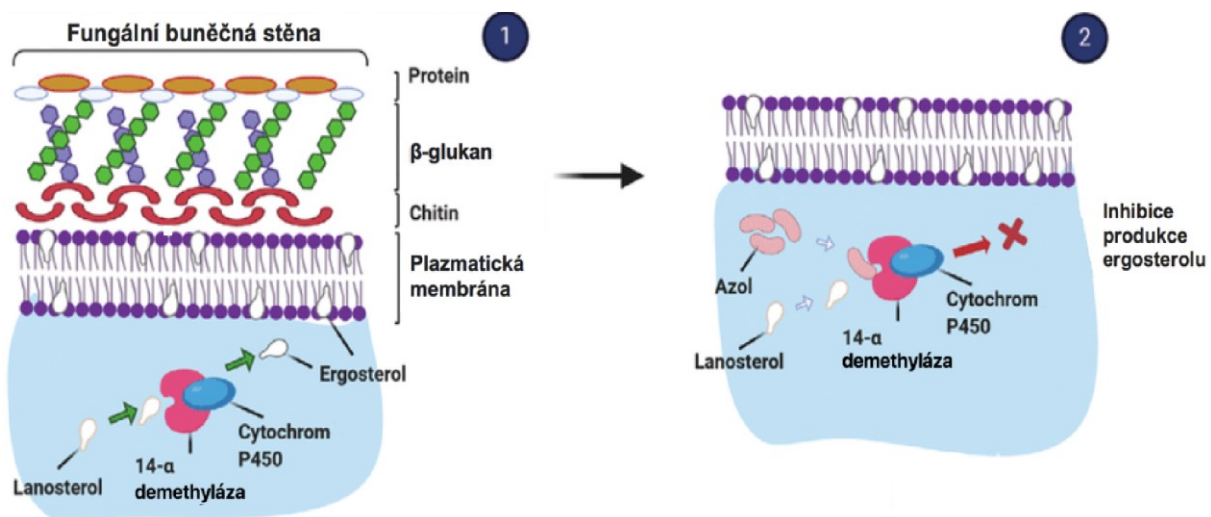
Limitujícím faktorem léčby invazivních mykotických infekcí je fakt, že bylo doposud uvedeno do klinické praxe ne příliš velké množství léčiv (Peyton *et al.* 2015). Pokud míra prevalence rezistence vůči azolovým derivátům přesáhne na daném území hodnotu 10 %, počáteční léčbou invazivní aspergilózy by měl být namísto azolových léčiv zvolen amfotericin B, nebo VOR kombinovaný s echinokandinem (Verweij *et al.* 2015). Ve všech případech má tedy při volbě terapie, kromě samotné identifikace, nezastupitelnou roli testování citlivosti k ATM relevantní metodikou a znalost lokální epidemiologické situace (Alastruey-Izquierdo *et al.* 2014).

1.2.1 Mechanismus účinku

Azoly působí intracelulárně a cíleně inhibují biosyntetickou dráhu ergosterolu cestou inhibice enzymu cytochrom P450-dependentní C-14- α -demethylázy (CYP51). Ergosterol, který je afektovaný azolovými deriváty, je v membránách vláknitých hub nepostradatelnou součástí. Jeho nedostatek negativně ovlivňuje především propustnost a fluiditu membrány směrem z vnějšího prostředí, odkud právě azoly vnikají do vnitřku buněk hub. V buňkách vláknitých hub má také hormonální účinek, stimuluje jejich růst a proliferaci (Lepesheva & Waterman 2007, Becher & Wirsal 2012, Price *et al.* 2015)

Schéma mechanismu působení azolů je shrnuto na **Obrázku 1**. Azoly nejdříve blokují demethylaci lanosterolu prostřednictvím inhibice 14- α -demethylázy (CYP51). Jeho supresí dojde ke snížení produkce ergosterolu a tím ke zvýšení hladiny methylsterolů, které jsou toxické a způsobují dezintegraci plazmatické membrány a plazmolýzu. Ve výsledku vede akumulace toxických methylsterolů a chybějící ergosterol v plazmatických membránách k buněčné smrti nebo k inhibici růstu buněk hub (Snelders *et al.* 2010, Astvad *et al.* 2014, Jensen 2016).

Obrázek 1. Mechanismus působení azolových derivátů na fungální buňku



Převzato a upraveno z (Makvandi *et al.* 2021)

1.3 Fungální rezistence k azolovým derivátům

Od roku 2000 došlo k výraznému nárůstu prevalence infekcí způsobených azol-rezistentními kmeny *A. fumigatus* (ARAf), které nereagují na léčbu léčivy této třídy (Astvad *et al.* 2014). Rod *Aspergillus* je v zemědělském (pole ošetřovaná azolovými fungicidy) a potravinářském prostředí (ošetřování skladovaných plodin azolovými fungicidy) azolům pravidelně vystavován, a to často ve vysokých koncentracích. To způsobuje selekci kmenů, které vůči těmto derivátům mají sníženou citlivost. Společně s dlouhodobým nebo nesprávným užíváním azolových léčiv (non lege artis) jsou selektovány kmeny, které se podmínkám přizpůsobily. Jejich počet tedy v daných prostředí stoupá, což má za následek zhoršení prognózy pacientů (Repentigny 2001, Balkis *et al.* 2002, Astvad *et al.* 2014, Berger *et al.* 2017).

Existují tři typy rezistence k azolům. Kmeny *A. fumigatus* mohou vykazovat rezistenci buď vůči všem azolovým léčivům (pan-azol rezistentní), nebo k více než k jednomu azolovému léčivu (multi-azol rezistentní), nebo mohou být rezistentní pouze k jedinému azolovému léčivu (Verweij *et al.* 2009).

Minimální inhibiční koncentrace (MIC) je hodnota nejnižší koncentrace léčiva (nejčastěji udávaná v mg/l média), při které je po 48 hodinách inkubace inhibován růst testovaných kmenů plísní. Na základě *in vitro* testování *A. fumigatus* jsou komisí EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing), podvýborem AFST (Antifungal Susceptibility Testing Subcommittee) stanoveny průběžně aktualizované hraniční hodnoty MIC azolových léčiv neboli breakpointy. Pomocí stanovených hodnot breakpointů se v praxi určuje, zda je kmen kultivovaného patogenu citlivý nebo rezistentní.

Dále jsou využívány hodnoty ATU (Area of Technical Uncertainty), které upozorňují na to, že je naměřená hodnota v oblasti s obtížnou interpretací. Příčinou je breakpoint v místě, pro které nelze dosáhnout reprodukovatelnou interpretaci. Proto jsou izoláty, které spadají do této kategorie podrobeny buď dalšímu testování, nebo jiným pravidlům, jejichž pomocí lze izoláty definitivně prohlásit za citlivé, nebo azol-rezistentní. Tato pravidla jsou také stanovena komisí EUCAST, a jsou sepsána v **Metodologii v kapitole 2.5** Hodnoty MIC jsou využívány při testování citlivostí nejen ATM, ale také např. antibiotik u odlišných typů metod (Verweij *et al.* 2009, Arendrup *et al.* 2016, Guinea *et al.* 2019b, Jorgensen *et al.* 2020, Arendrup *et al.* 2021, Serrano-Lobo *et al.* 2022). Aktuální hodnoty breakpointů čtyř nejčastěji užívaných ATM (ITR, VOR, POS a ISA), která byla testována v této práci, jsou vypsány v **Tabulce 1** (<https://www.eucast.org/astoffungi/clinicalbreakpointsforantifungals>).

Tabulka 1. Hodnoty breakpointů (mg/l) určující rezistenci u *Aspergillus fumigatus*

Azolový derivát (mg/l)	Citlivost ≤	Rezistence >	ATU*
Itrakonazol	1 mg/l	1 mg/l	2 mg/l
Vorikonazol	1 mg/l	1 mg/l	2 mg/l
Posakonazol	0,125 mg/l	0,25 mg/l	0,25 mg/l
Isavukonazol	1 mg/l	2 mg/l	2 mg/l

* ATU (Area of Technical Uncertainty)

Na selhání léčby aspergilózy triazolovými léčivy mohou působit různé faktory. Některé z nich jsou shrnuty ve schématu na **Obrázku 2**, kde jsou faktory rozděleny do tří skupin. Prvním faktorem je samotný patogen, jeho případná rezistence, virulence a míra zatížení organismu člověka mykotickou infekcí (Ortiz *et al.* 2022). Z faktorů na straně hostitelského organismu hraje roli především stav imunitního systému a místo v těle, které je zasaženo infekcí. Léčbu může výrazně zkomplikovat případná infekce transplantované tkáně/orgánu (Husain & Camargo 2019, Simon *et al.* 2021).

Poslední skupina faktorů ovlivňujících průběh léčby jsou vlastnosti samotných azolů. Například jejich absorpce, distribuce a metabolismus v organismu člověka (Patterson *et al.* 2016). Faktorů, které ovlivňují volbu léčby se vyskytuje mnoho, a tak je špatná indikace léčiv poměrně častá (Astvad *et al.* 2014, Risum *et al.* 2022). Právě i proto je třeba klást důraz na doporučení, kterými by se léčba měla striktně řídit. Je také nutné včas reagovat na zvýšenou prevalenci rezistence v populaci a léčebné postupy případně aktualizovat dle dané situace.

Obrázek 2. Schéma vlivů patogenu, hostitele a léčiv na selhání léčby aspergilózy



Převzato a upraveno z (Astvad *et al.* 2014)

1.4 Vznik a šíření rezistence

Jedna z prvních studií týkající se azolové rezistence u *A. fumigatus* popisuje její vznik u dvou pacientů dlouhodobě léčených ATM v Kalifornii (W. *et al.* 1997). Ve stejném období proběhla i jedna z prvních rozsáhlejších epidemiologických studií týkající se téže problematiky v Nizozemí. Ta odhalila nárůst počtu rezistentních kmenů izolovaných v období 1994-2007 z klinického prostředí vůči ITR z 1,7 % na 6 % (Meis *et al.* 2016). Četnost studií týkajících se rezistence od té doby začala globálně narůstat.

Evropa je kontinentem, kde je incidence rezistence studována nejčastěji. V Nizozemí byla dokonce zaznamenána alarmující situace, kdy počet rezistentních kmenů rizikových pacientů dosahoval až 30 % (Verweij *et al.* 2016). Avšak výskyt rezistence je potvrzen již na všech sedmi kontinentech. Konkrétně se jedná o dvě nejčastěji se nacházející mutace TR₃₄/L98H a TR₄₆/Y121F/T289A, které vznikají ve vnějším prostředí (Snelders *et al.* 2008, Lestrade *et al.* 2019b, Burks *et al.* 2021). I přes výrazný nárůst počtu studií, které se

problematikou zabývají, není stále azolová rezistence ve většině států monitorována. Přitom je to nutný předpoklad k porozumění jejího vzniku a šíření, díky kterému je možné zavést preventivní opatření, která nárůst rezistence mohou odvrátit nebo upravit léčebné postupy.

1.4.1 Vznik rezistence

Existují dva způsoby vzniku ARAf kmenů. Častěji dochází ke vzniku rezistence ve vnějším prostředí kvůli nadměrnému užívání azolových fungicidů, např. v zemědělství nebo při skladování suroviny. Méně často vzniká rezistence v klinické sféře, při léčbě pacientů azolovými ATM.

Hypotéza o souvislosti azolové rezistence s užíváním triazolových fungicidů byla poprvé formulována teprve před 7 lety (Price *et al.* 2015). Jejím předpokladem bylo, že dlouhodobé vystavení *A. fumigatus* vysokým koncentracím azolových fungicidů na polnostech, které se v zemědělství užívají při boji proti fytopatogenům, pohání přirozenou selekci kmenů *A. fumigatus* odolných vůči azolům (Abdolrasouli *et al.* 2015).

Zjištěna byla také souvislost mezi zvyšující se incidencí infekcí způsobených ARAf a stále širším spektrem rezistentních genotypů hlášených z prostředí (Cao *et al.* 2021). Pro to, aby hypotéza byla potvrzena, bylo nutné získat data nejen o prevalenci a mechanismech rezistence, ale i o genetických vztazích izolátů z půdy a klinického materiálu na populačně-genetické úrovni pomocí typizace. Zaznamenán byl nález totožných mutací jak u kmenů v zemědělském prostředí, tak u ARAf kmenů z pacientů (Hollomon 2017). Dalším důkazem spojitosti výskytu stejné nejčastěji nacházené mutace TR₃₄/L98H u kmenů *A. fumigatus* izolovaných z půdních vzorků, a taktéž z pacientů, kteří nebyli azolovým léčivům nikdy vystaveni (Alvarez-Moreno *et al.* 2017), přispěly k prokázání hypotézy o přenosu rezistence z vnějšího prostředí do klinického prostředí.

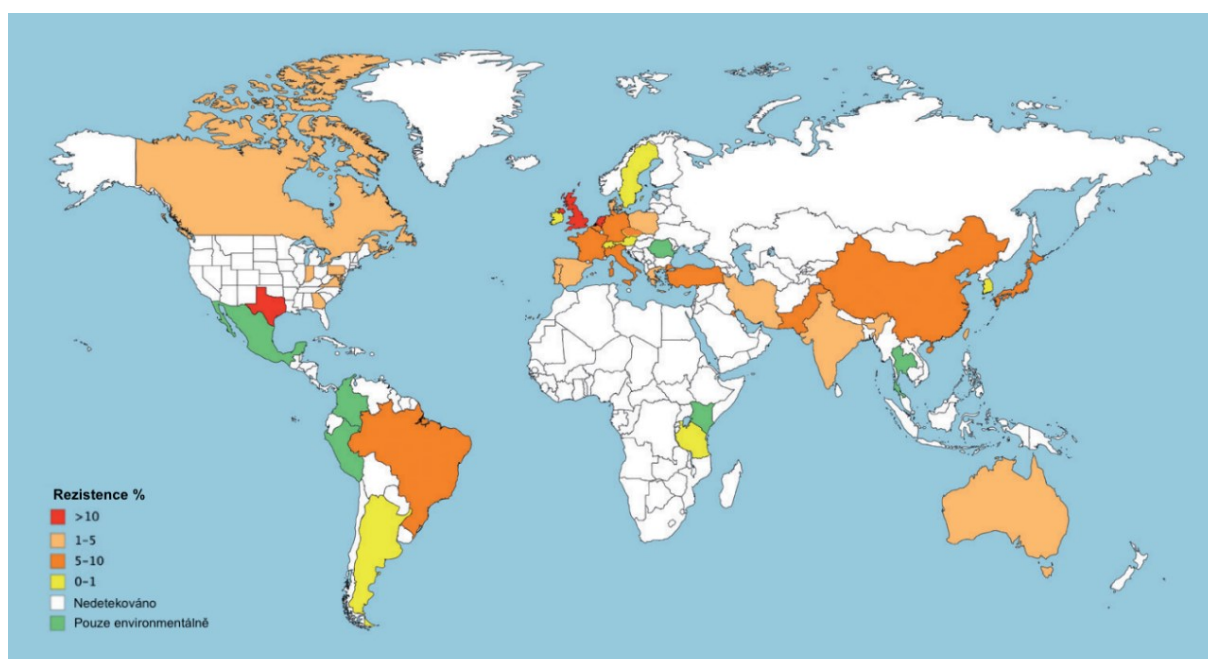
Izoláty z prostředí nesou charakteristické genotypy, které jsou nerozeznatelné od těch, které se vyskytují u pacientů. Kmeny *A. fumigatus* se adaptují v prostředí, kde se vyskytují azolové fungicidy, dochází k přenosu genotypů, aniž by to mělo vliv na jejich přežití (Zhang *et al.* 2017, Zhang *et al.* 2021). Izolace stejných klonů ARAf z vnějšího prostředí, tak z klinického materiálu naznačuje, že kmeny s tímto fenotypem mají málo komplikací, které by zabránili jejich šíření. Environmentální rezervoáry patogenních hub, které si především díky používání fungicidů vyvinuly rezistenci vůči klinickým azolům, představují riziko při léčbě aspergilózy. Rezistentní patogeny nereagující, nebo nedostatečně reagující na indikovaná léčiva, totiž mohou mít vliv na selhání léčby (Rhodes *et al.* 2022b).

1.4.2 Epidemiologie azolové rezistence

Znalost epidemiologie a lokální úrovně rezistence je velmi důležitá, protože má vliv na místní terapeutická doporučení u rizikových pacientů. V regionech s mírou rezistence vyšší než 10 % je doporučeno změnit léčebné schéma. A to konkrétně přejít od úvodní terapie aspergilózy triazoly k léčbě liposomálním amfotericinem B, nebo podávat triazoly současně s echinokandinem, aby se předešlo selhání terapie. Přičemž například u invazivní aspergilózy je nutné reagovat neprodleně. Kritický je také fakt, že mimo azolů jsou dvě zmíněná léčiva jediná, která se pro léčbu invazivní aspergilózy dají použít. Pro závěry vedoucí ke změně těchto doporučení musí být na určitém území testováno alespoň 100 izolátů *A. fumigatus* (van der Linden *et al.* 2015, Meis *et al.* 2016, Ullmann *et al.* 2018).

Na **Obrázku 3** je vidět globální prevalence rezistence v klinickém materiálu u jednotlivých států (Lestrade *et al.* 2019b). Kritická míra prevalence přesahující 10 % je vyznačena červenou barvou a z evropských zemí se nachází v Nizozemí a ve Velké Británii. Z mimoevropských zemí byla tato míra rezistence zjištěna jen v USA v Texasu (Lestrade *et al.* 2019b). V roce 2019 také přibyla studie z Japonska, kde byla zjištěna prevalence 12,7 % (**Tabulka 3**). Tmavě oranžovou barvou jsou označeny státy, kde je výskyt rezistence zvýšený. Tyto státy často hlásily výskyt rezistence i ve vnějším prostředí a je nanejvýš vhodné v nich rezistenci i nadále aktivně monitorovat.

Obrázek 3. Globální prevalence azolové rezistence izolátů *Aspergillus fumigatus* z klinického a vnějšího prostředí



Převzato a upraveno z (Lestrade *et al.* 2019b)

Nejvíce studovanou částí světa je Evropa (**Tabulka 2**), avšak studie týkající se azolové rezistence přibývají z celého světa. Konkrétní hodnoty prevalence v Evropě u vybraných států jsou vypsány v **Tabulce 2**. Byly vybrány pouze studie zahrnující více než 100 zkoumaných izolátů. Alarmující hodnoty má především Velká Británie s hodnotou prevalence 20 % (Bueid *et al.* 2010). Dále Nizozemí, kde byla roku 2011 stanovena prevalence 5,3 % (van der Linden *et al.* 2011), která se do roku 2020 více, než dvojnásobně zvýšila, na hodnou 11,3 % (Lestrade *et al.* 2020). Dále Turecko s hodnotou 10,2 % (Ozmerdiven *et al.* 2015). V posledním desetiletí se také výrazně zvýšila prevalence rezistence ve Španělsku z 1,95 % (Escribano *et al.* 2013) na 4,7 % (Escribano *et al.* 2021).

Jedna z prvních mimoevropských studií prokazující azolovou rezistenci byla studie z Číny, která stanovila prevalenci 5,8 % (Lockhart *et al.*, 2011). Následovaly další země prokazující azolovou rezistenci, které jsou shrnuté v **Tabulce 3**. Nejvíce alarmující situace v klinickém prostředí byla stanovena v Japonsku, kde se prevalence během pár let zvýšila z 6,1 % (Tashiro *et al.* 2012) na 12,7 % (Tsuchido *et al.* 2019).

Tabulka 2. Prevalence azolové rezistence u *Aspergillus fumigatus* v klinických vzorcích v různých evropských zemích

Stát	Prevalence rezistence	Citace
Velká Británie	20.0 %	(Jensen 2016)
Nizozemí	11.3 %	(Bueid <i>et al.</i> 2010)
Turecko	10.2 %	(Ozmerdiven <i>et al.</i> 2015)
Itálie	6.25 %	(Lestrade <i>et al.</i> 2020)
Belgie	5.5 %	(Simon <i>et al.</i> 2021)
Dánsko	5.0 %	(Arabatzis <i>et al.</i> 2011)
Španělsko	4.7 %	(Bader <i>et al.</i> 2015)
Polsko	4.13 %	(Nawrot <i>et al.</i> 2018)
Německo	3.2 %	(Escribano <i>et al.</i> 2021)
Řecko	2.7 %	(Vermeulen <i>et al.</i> 2015)
France	2.1 %	(Lazzarini <i>et al.</i> 2016)

Tabulka 3. Prevalence azolové rezistence u *Aspergillus fumigatus* v klinickém i vnějším prostředí v mimoevropských zemích

Stát	Prevalence rezistence	Citace
Tanzanie	13.9 %	(Chowdhary <i>et al.</i> 2015)*
Japonsko	12.7 %	(Tsuchido <i>et al.</i> 2019b)
Kolumbie	9.3 %	(Alvarez-Moreno <i>et al.</i> 2017)*
Čína	5.8 %	(Lockhart <i>et al.</i> 2011)
USA	5.6 %	(Wiederhold <i>et al.</i> 2016)
Írán	3.2 %	(Seyedmousavi <i>et al.</i> 2013)
Thajsko	3.2 %	(Tangwattanachuleeporn <i>et al.</i> 2017)*
Austrálie	3.1 %	(van der Linden <i>et al.</i> 2015)
Indie	1.7 %	(Chowdhary <i>et al.</i> 2015)

* studie zkoumající izoláty z vnějšího prostředí

Donedávna nebylo jasné, jestli se jednotlivé mutace vyvinuly ve světě jen jednou, nebo zdali se daná mutace vyvinula vícekrát na odlišných lokalitách nezávisle na sobě. Ale díky získání dat týkajících se azolové rezistence *A. fumigatus* z různých částí světa, bylo přispěno k celkovému porozumění vzniku a šíření rezistence. Příkladem je studie (Etienne *et al.* 2021), která vznik rezistence demonstrovala pomocí porovnání různých parametrů (např. druh mechanismu rezistence) ARAf izolátů z USA s izoláty z Nizozemí, Indie a Velké Británie. Ve výsledku studie podpořila hypotézu jednorázové introdukce a následného šíření řízených mutací ARAf izolátů. Což bylo pravděpodobně zprostředkované prostřednictvím rekombinací mutací rezistence, které vznikly ve vnějším prostředí.

1.5 Molekulární mechanismy rezistence

Rozsáhlý výzkum patogenních vláknitých hub, pocházejících především z klinického prostředí, vedl k identifikaci mnohých mechanismů triazolové rezistence (Snelders *et al.* 2010). Mechanismy azolové rezistence u rodu *Aspergillus* lze rozdělit do dvou typů. Jsou jimi mechanismy závislé na genu *cyp51*, a dále mechanismy, které naopak na genu *cyp51* závislé nejsou. Níže jsou v podkapitolách **1.4.1. a 1.4.2** oba typy podrobněji vysvětleny.

Mezi tři nejčastěji identifikované mechanismy rezistence u rodu *Aspergillus* se řadí:

- A. Bodové mutace v genu *cyp51*
- B. Zvýšená exprese genu *cyp51*
- C. Zvýšená exprese genů kódujících efluxní pumpy

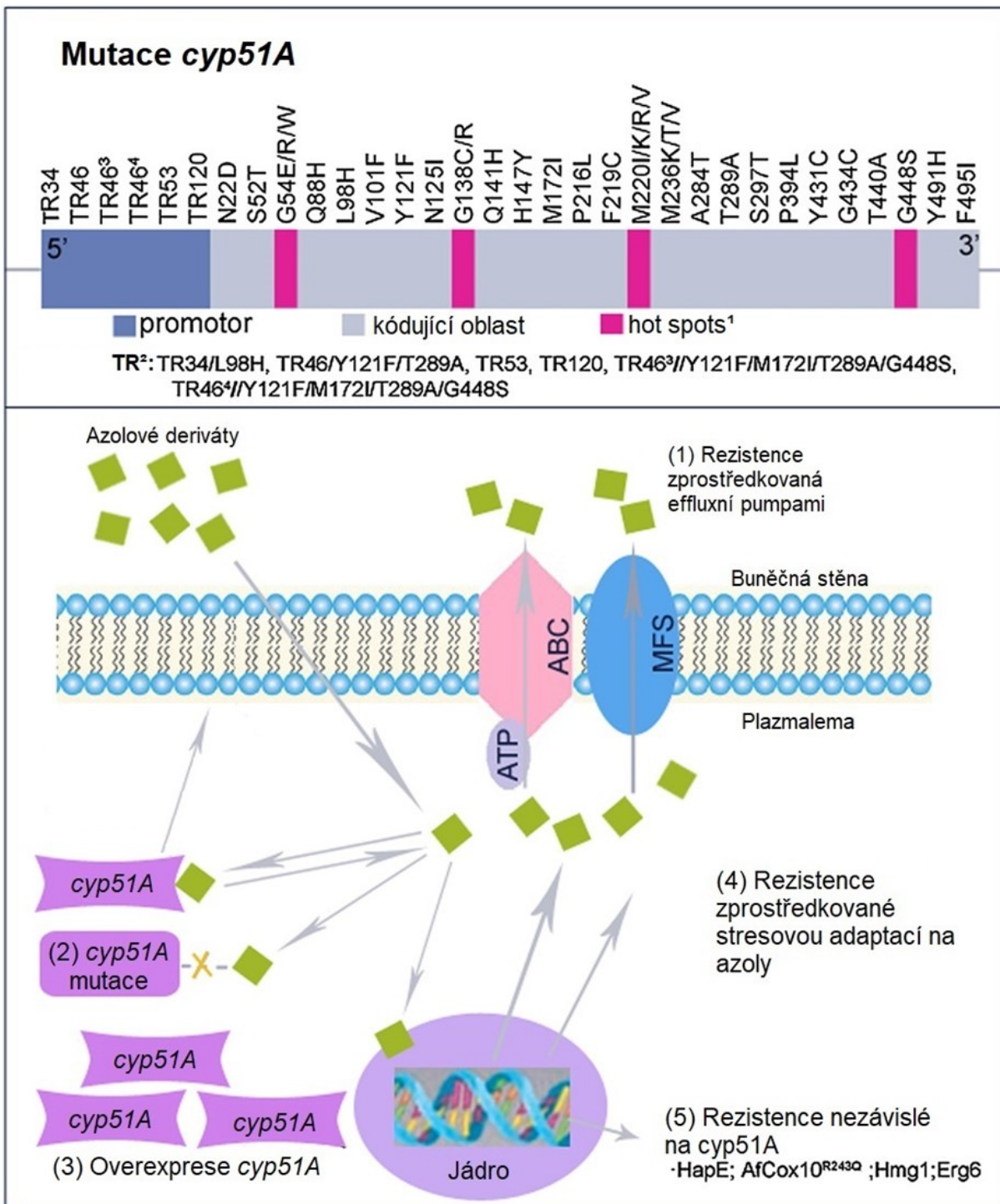
Převažujícími mechanismy rezistence u *A. fumigatus* jsou různé typy nesynonymních mutací v genu *cyp51A*, které způsobí změnu aminokyselin (AMK). Počet známých mechanismů způsobujících rezistenci, která není zprostředkována mutacemi ve zmíněném genu roste (Chen *et al.* 2020, Nywening *et al.* 2020).

Způsobů změny sekvence, které vedou k rezistenci je několik. Příkladem je změna konformace proteinu nebo odstranění AMK v místě, které interaguje s azolovým derivátem. Dále mohou nastat strukturální změny zahrnující změnu polohy hemové skupiny, což naruší interakci s azoly. Všechny tyto změny mohou modifikovat enzymatickou aktivitu, a tudíž narušit produkci nepostradatelného ergosterolu. Díky velké flexibilitě struktury proteinu se může objevit substituce v aminokyselinové sekvenci *cyp51*, která právě může způsobit odolnost vůči azolům (Becher & Wirsal, 2012).

Aspergillus fumigatus má velkou plasticitu exprese genů. Dokazuje to například studie (Hokken *et al.*, 2019), ve které bylo potvrzeno, že za pouhých 60 minut od vystavení ITR má kmen patogenu schopnost změnit transkripci řady genů tak, že dojde ke zlepšení homeostázy organismu a překonání nepříznivých podmínek.

První polovina **Obrázku 4** obsahuje mimo jiné, mutace v *cyp51A*, které způsobují azolovou rezistenci. Tyto mutace se nachází v takzvaných hot spots, což jsou místa, kde dochází nejčastěji ke vzniku mutací. V druhé části **Obrázku 4** je znázorněn proces působení azolů na buňky *A. fumigatus*, včetně popsané buněčné membrány. Zároveň je zde vypsáno pět hlavních skupin mechanismů rezistence, které jsou podrobněji vysvětleny níže v podkapitolách **1.4.1. a 1.4.2**.

Obrázek 4. Pět základních molekulárních mechanismů azolové rezistence *Aspergillus fumigatus*, včetně mutací v genu *cyp51A* a jeho promotoru



¹ Hot spots, oblasti genomu, kde dochází častěji k mutacím; ² Tandemové repetice
Převzato a upraveno z (Chen *et al.* 2020)

1.5.1 Mechanismy rezistence závislé na genu *cyp51A*

Genom *A. fumigatus* obsahuje dvě isoformy genu *cyp51* a to *cyp51A* a *cyp51B* (Mellado *et al.*, 2001). Obě isoformy proteinů mají různé kinetické vlastnosti a odlišnou citlivost k azolům (Warrilow *et al.*, 2010). Zmíněný gen *cyp51* kóduje 14 α -sterol-demethylázu, která je nezbytná pro biosyntézu ergosterolu. Klíčovým je především enzym CYP51A (Mellado *et al.* 2005), který biosyntézu ergosterolu inhibuje. Podobnou funkci zastupuje i enzym CYP51B, který má lepší vazebnou afinitu k triazolovým sloučeninám. Role mutací v genu *cyp51B*, způsobených azoly je ale stále diskutována. A klinicky relevantní rezistenci patogenu je tudíž doposud spojován pouze gen *cyp51A* (Ferreira *et al.* 2005, Rybak *et al.* 2019, Gonzalez-Jimenez *et al.* 2020, Nywening *et al.* 2020).

Při nedostatku ergosterolu je negativně ovlivněna propustnost a fluidita plazmatické membrány patogenu. V buňkách vláknitých hub má ergosterol také hormonální účinek, stimuluje růst a proliferaci (Lepesheva & Waterman, 2007, Becher & Wirsal, 2012, Price *et al.*, 2015). V praxi bývají nejčastěji detekovány kmeny obsahující mutace v *cyp51A*. Ty mohou být tím pádem schopné účinkům azolů zabránit, takže nedojde k narušení funkce ergosterolu v membránách patogenu (Rivero-Menendez *et al.* 2016).

Rezistence k azolům je většinou způsobená substitucemi AMK v genu *cyp51A*. Na **Obrázku 4** je v první části zmíněna většina doposud zjištěných mutací v *cyp51A*, které způsobují azolovou rezistenci. A to včetně tandemových repetitiv (TR) v promotoru genu. V druhé polovině téže Obrázku 4 je vedle ostatních mechanismů rezistence pod bodem (2) zmíněný právě tento mechanismus rezistence, který závisí na mutacích v genu *cyp51A*. Vývoj rezistence byl doposud primárně spojen se zmíněnými bodovými nesynonymními mutacemi. A to včetně nejčastějších substitucí AMK v místech G54, G138, M220 a G448. Mimo ně bylo v proteinu CYP51A nalezeno více, než 20 dalších odlišných substitucí AMK (Bowyer *et al.* 2011, Arendrup 2014, Sharma *et al.* 2015). Dále s rezistencí souvisí mutace G54A, G54W, P216L, M220V/K/T a G448S, které mohou modifikovat vazebné místo pro léčivo. Tím se snižuje afinita v interakci léku a enzymu (Mann *et al.* 2003, Camps *et al.* 2012b, Krishnan Natesan & Chandrasekar 2016).

Postupem času však bylo prokázáno, že se mnohem častěji vyskytují bodové mutace v kombinaci s TR v promotoru genu. Právě mutace v promotoru genu *cyp51* způsobují jeho zvýšenou expresi neboli overexpresi, což vede k rezistenci (**Obrázek 4 – bod (3)**). Většina mechanismů azolové rezistence izolátů, které nejsou z klinického prostředí, ale jsou z vnějšího, je vyvolána mutacemi, které jsou zprostředkovány TR. Právě s těmito mechanismy je spojováno nadměrně užívání azolových fungicidů (Ren *et al.* 2017, Resendiz Sharpe *et al.* 2018, Chen *et al.* 2020).

Vůbec nejběžnější mechanismus rezistence v klinickém i vnějším prostředí je mutace TR₃₄/L98H (Chowdhary *et al.*, 2013). Kmeny s touto mutací mohou být rezistentní vůči všem triazolovým léčivům, a vyskytují se celosvětově. Změny vedoucí k rezistenci zahrnují kromě bodové mutace – substituce leucinu v pozici 98 za histidin, také 34 párů bází dlouhou TR v promotoru *cyp51*, která umožní funkci mutace (Mellado *et al.*, 2007; Verweij *et al.*, 2007).

Další příklad je druhý nejčastěji identifikovaný mechanismus rezistence taktéž v obou prostředích TR₄₆/Y121F/T289A zahrnující 46 párů bází dlouhou TR v promotoru genu, substituci tyrosinu 121 za fenylalanin a threonin 289 za alanin. Rezistence se projevuje především vůči VOR (Linden *et al.*, 2013).

Existuje několik dalších TR, které se nachází výhradně v promotoru genu *cyp51A*, ovlivňují rezistenci působením na mutace v témže genu, a nově objevených TR stále přibývá. Jednou z nich je TR₁₂₀ (Hare *et al.* 2019). Identifikace takových mechanismů vyzívá k novým poznatkům přispívajícím k porozumění celkové problematice azolové rezistence. Proto je toto odvětví také momentálně intenzivně studováno.

1.5.2 Mechanismy rezistence nezávislé na genu *cyp51A*

Druhý typ mechanismů rezistence s mutacemi v genu *cyp51A* nesouvisí (Arendrup *et al.* 2010, Camps *et al.* 2012a). Ve studiích (Bueid *et al.* 2010, Bueid *et al.* 2012) bylo zjištěno, že okolo 43 % studovaných ARAf izolátů nenesou mutaci v genu *cyp51A*. Tyto mechanismy jsou identifikované a studované méně často. Azolovou rezistenci, která není zprostředkovaná *cyp51* lze rozdělit do tří skupin. Proto byly na **Obrázku 3** tyto mechanismy rezistence zmíněny ve třech následujících bodech: rezistence zprostředkovaná efluxními pumpami – bod (1), mutace v genech jiných, než je *cyp51A* – bod (4), a také rezistence zprostředkovaná adaptací na stres – bod (5). Protože tyto mechanismy většinou vykazují pouze slabou rezistenci k azolům, mohou být i reverzibilní nebo zcela nejsou zapříčiněné mutacemi.

Častým mechanismem rezistence je nadměrná exprese určitých genů, která nastane při dlouhodobém vystavení azolových derivátů. Ze všeho nejčastějším mechanismem, který není vázán na *cyp51A*, je konkrétně exprese efluxními pumpami zmíněná na **Obrázku 4** pod bodem (1). Efluxní pumpy hrají důležitou roli při překonávání hromadění vnitrobuněčných toxinů. To houbovým patogenům pomáhá u infekce nebo kolonizace jejich hostitelů. Nadměrná exprese efluxních pump může tedy pumpovat azoly z jejich buněk, a právě to způsobí rezistenci (da Silva Ferreira *et al.* 2006, Camps *et al.* 2012a, Paul *et al.* 2017).

Mechanismy další skupiny se genu *cyp51A* netýkají. Některé z nich jsou zmíněné na **Obrázku 4** pod bodem (5). Jedním z nich je mutace P88L u protein vázajícího zesilovače transkripčního faktoru CCAAT, která hraje roli ve vzniku azolové rezistence. Kmeny ARAf nesoucí mutaci P88L mohou být pan azole rezistentní a dochází u nich ke snížené expresi genu *cyp51*. Zato je ale zhoršeno fitness patogenu, který tuto mutaci má. Bylo zpozorováno, že takový kmen má pomalejší růst, než kmen nemutovaný (Hortschansky *et al.* 2007, Camps *et al.* 2012c, Hortschansky *et al.* 2020).

Zajímavým molekulárním mechanismem rezistence je včlenění exogenního cholesterolu, pocházejícího z hostitele, do plazmatické membrány patogenu. *Aspergillus fumigatus* tak získává větší toleranci vůči azolům. To bylo potvrzeno i studií, ve které byl do kultivačního média s ITR navíc přidán cholesterol. A v reakci na to testovaný izolát vykazoval zvýšenou toleranci oproti izolátu, který byl kultivován na médiu s ITR bez přidaného cholesterolu (Xiong *et al.* 2005).

Existují i jiné mechanismy, které jsou zprostředkované stresovou adaptací. Na **Obrázku 4** je skupina těchto mechanismů zmíněna v bodu (4). V 10 % se kmeny ARAf nachází v přirozené, nemutované formě neboli ve wild-type (WT), která se tedy *cyp51A* zcela netýká. Nehledě na to však vykazují rezistenci k azolům (Jensen, 2016).

2. Metodologie

2.1 Zdroje izolátů

2.1.1 Klinické izoláty

Sběr klinických dat byl započat v červenci 2019 a ukončen v prosinci 2021. Celkově bylo shromážděno 303 klinických izolátů. Do studie byly zapojeny tři instituce, které zaslaly izoláty rodu *A. fumigatus* určené na základě makro-morfologických a mikro-morfologických znaků. Společně s izoláty byly shromážděny i základní anonymizované anamnestické údaje pacientů z laboratorních informačních systémů (LIMS). Instituce, které materiály poskytly, byly následující: Ústav lékařské mikrobiologie, 2. lékařská fakulta a Fakultní nemocnice Motol, Praha (MUDr. Daniela Lžičařová) poskytl 65; Laboratoř lékařské mykologie, Zdravotní ústav se sídlem v Ústí nad Labem, Praha (RNDr. Pavlína Lysková, Ph.D.) poskytl 146 izolátů; Zdravotní ústav se sídlem v Ostravě, Ostrava (Mgr. Radim Dobiáš, Ph.D.) poskytl izolátů 92.

Spektrum pacientů zahrnovalo jak hospitalizované, tak ambulantní pacienty. Jednalo se o vzorky z pacientů s podezřením na mykotické onemocnění, či různými typy prokázané aspergilózy od chronické, přes alergickou broncho-pulmonální aspergilózu, až po invazivní aspergilózu. Zastoupeny byly izoláty z neinvazivních forem aspergilózy (např. otitis externa). U velké části izolátů nebyla jasně prokázána příčinná souvislost s onemocněním, nebo nebyla zpětně dohledávána, protože to nebylo cílem práce. Většina izolátů pocházela z různých pacientů, ale v několika případech, konkrétně u 27, byl odebrán vzorek ze stejného pacienta, a to ve dvou, či více časově oddělených odběrech nebo z místa infekce lokalizovaného v jiné části těla. Z toho ve 22 případech byly u každého z pacientů odebrány izoláty dva. Ze čtyř pacientů byly izolovány tři různé vzorky. A z jednoho pacienta byly izolovány čtyři vzorky. Seznam veškerých studovaných izolátů se nachází v **Příloze 2**.

2.1.2 Půdní izoláty

Izoláty z půdního prostředí byly odebrány v květnu 2020 z 10 polí nacházejících se na 5 rozdílných lokalitách v České republice. Celkem bylo shromážděno 300 půdních izolátů *A. fumigatus*. Jejich seznam společně se získanými daty se nachází v **Příloze 3.1 a 3.2**. Izolace proběhla na 2 typech polí. 150 vzorků bylo izolováno z ekologického hospodaření a dalších 150 z konvenčního, kde jsou využívány azolové fungicidy. Mapa lokalit s označením typu hospodaření na daném poli je vyobrazena na **Obrázku 5**.

Polovina ze vzorků získaná ze zemědělského prostředí, byla izolována z půdy polí, která byla ošetřována azolovými fungicidy. Ke každému poli dané lokality byly zjištěny informace o typu hospodaření a používání azolových fungicidů. Informace byly získány na základě žádosti zaslané Ministerstvu zemědělství, Ústřednímu kontrolnímu a zkušebnímu ústavu zemědělskému (ÚKZÚS) a vlastníků jednotlivých polností. Na **Obrázku 5** jsou tato pole značena zelenou barvou.

Obrázek 5. Mapa lokalit, ze kterých byly odebírány vzorky, včetně typu hospodaření



Ministerstvo zemědělství na daných územích provádí pravidelně servisní analýzu zbytků azolových fungicidů. Takže k 5 polím, která jimi byla ošetřovaná, ÚKZÚS poskytl informace o obsahu zbytků fungicidů v půdě získaných v rámci jejich bazálního monitoringu. Spotřeba azolových fungicidů za dobu 5 uplynulých let na jednotlivých polnostech, které byly do výzkumu zahrnuty, shrnuje **Příloha 3.1 a 3.2**.

Stejný princip získání informací byl proveden na polích, které jsou spadají pod ekologického zemědělství. Na nich tedy nebyly dlouhodobě, minimálně po dobu 5 let, chemické fungicidy využívány. U všech polí byl poskytnut přístup jejich soukromými vlastníky a byly provedeny sběry vzorků půdy, ze kterých byl posléze izolován *A. fumigatus*. Lokality byly zaznamenány na též **Obrázku 5**, a to zelenou barvou.

2.2 Kultivace a uchování kmenů

Kultivace klinických kmenů probíhala ve tmě v rozmezí teplot 37 až 45 °C na Sabouraudův agaru (SDA, Sabouraud Dextrose Agar; Trios, Prague, Czech Republic). Avšak dlouhodobě byly kmeny uchovány v lednici (4 °C) na šikmých půdách na agaru s maltózovým extraktem (MEA, Malt Extract Agar; HiMedia; Mumbai; Indie), dle doporučení Samson *et al.* (2014). Izoláty ARAf byly uloženy do Sbírký kultur hub (CCF - Culture Collection of Fungi) na katedře botaniky PŘF UK v Praze. Složení SDA i MEA je zaznamenáno v **Tabulce 4**.

Na každém z 10 polí bylo odebráno 5 různých vzorků, a to ve vzdálenosti alespoň 10 metrů od sebe. Celkově tedy bylo odebráno 50 půdních vzorků. Kmeny z půdního prostředí byly izolovány následovně: 2 g půdy bylo suspendováno v připraveném roztoku. Roztok obsahoval 0,85% NaCl a 0,01% detergentu Tween20 (SIGMA-ALDRICH, Saint Louis, MO, USA). Ředěním bylo dosaženo 0,5 McFarlandova zákalu za užití spektrofotometru Nanodrop ND-1000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Výsledná suspenze byla vortexována a ponechána k usazení. (Snelders *et al.* 2009, Alvarez-Moreno *et al.* 2017). Ze supernatantu bylo 50 µl nanášeno a poté rozetřeno sterilní hokejkou (Carl Roth, Karlsruhe, Německo) na kultivační plotnu o průměru 90 mm s SDA přídávkem chloramfenikolu (CHL) v koncentraci 50 mg/ml média. Vzorek byl inkubován při 48 °C po dobu 48 hodin na SDA nebo SDA s přídávkem itrakonazolu (ITR) (SIGMA-ALDRICH, Saint Louis, MO, USA), aby se selektoval termorezistentní druh *A. fumigatus* (Alvarez-Moreno *et al.* 2019). Z každého z 50 odebraných vzorků bylo získáno 6 izolátů. Z čehož vždy byly izolovány 3 izoláty citlivé vůči ATM, kultivované na plotnách s SDA médiem. Další 3 izoláty byly rezistentní vůči ITR, který byl obsažen v SDA o koncentraci 4mg/l média (Arendrup *et al.* 2021). Všechny půdní kmeny byly posléze uchovány stejným způsobem jako kmeny klinické (viz výše).

Tabulka 4. Složení použitých médií

Médium + pH	Složení na 1000 ml destilované vody
MEA (Malt Extract Agar) - pH 5,4	20 g malt extraktu (Oxoid, Basingstoke, United Kingdom) 1 g peptonu (HiMedia, Mumbai, Indie) 20 g glukózy 15 g agaru
SDA (Sabouraud Dextrose Agar) - pH 5,6	40 g glukózy 10 g peptonu 20 g agaru

2.3 Molekulární analýza

2.3.1 Izolace DNA

Z kultur rostoucích 3 až 5 dní na MEA při teplotě 37°C byla izolována DNA za použití komerčního kitu ZYMO RESEARCH Quick-DNA™ Fungal/Bacterial Miniprep Kit (Irvine, CA, USA). Postup byl dodržen dle pokynů výrobce. Kvalita výsledné izolované DNA byla kontrolována za pomoci spektrofotometru Nanodrop ND-1000.

2.3.2 PCR amplifikace

PCR amplifikace probíhala za využití termocykleru Mastercycler Gradient (Eppendorf, Hamburk, Německo). U všech DNA byl využit mastermix složený z pufru MyTaq Bioline 5×, který obsahoval nukleotidy a MgCl₂, včetně polymerázy (GeneOn, Německo). PCR produkty byly zobrazeny na 1% agarózovém gelu s elektroforetickým pufrem TAE (Tris-acetát-EDTA) a přídatkem kapky ethidium bromidu (HiMedia, Bombaj, Indie). Kontrola možné kontaminace PCR reakční směsi byla provedena zařazením kontrolního vzorku, který odpovídal danému složení PCR směsi bez přidání vlastní DNA. Vzorky byly zaslány k sekvenaci DNA (viz kapitola 1.3.4 Sekvence DNA) jen pokud kontrolní vzorek nebyl na elektroforetogramu pozitivní.

2.3.3 Ověření identifikace na úroveň druhu amplifikací genu *benA*

Pro určení do druhu jak u izolátů z klinického, tak i půdního prostředí, byl zvolen gen pro β -tubulin (*benA*), který byl amplifikován pomocí forward primeru Bt2a (GGTAACCAAATCGGTGCTGCTTTC) a reverz primeru Bt2b (ACCCTCAGTGTAGTGACCCTTGGC) (Glass 1995). Tím byly z práce vyloučeny všechny druhy kromě *A. fumigatus*, včetně jeho morfologicky podobných „kryptických“ druhů. V **Tabulce 5** se nachází složení směsi, která byla použita pro PCR. Použitý amplifikační cyklus je zaznamenaný v **Tabulce 6**.

Tabulka 5. Složení PCR reakční směsi o objemu 20 μ l

Gen	Množství	Složka
<i>benA</i>	14,2 μ l	Deionizovaná H ₂ O
	4 μ l	Pufre (MyTaq Bioline 5× obsahující nukleotidy a MgCl ₂)
	0,3 μ l	Primery (forward i reverse, 25 pmol/ μ l)
	0,2 μ l	DNA polymeráza MyTaq HS Red (Bioline, Londýn, UK)
	1 μ l	Izolovaná genomická DNA

Tabulka 6. Amplifikační cyklus použitý pro PCR reakce

Postup	Fáze	Doba trvání
1.	Iniciální denaturace	1 min při 95°C
2.	Elongace 1 (35 cyklů)	20 s při 92 °C, 30 s při 55 °C a 60 s při 72°C
3.	Finální elongace	10 minut při 72°C

2.3.4 Amplifikace genu *cyp51A*

Gen *cyp51A*, který kóduje protein CYP51A (cytochrom P450-dependentní C-14-a-demetyláza) byl u izolátů amplifikován *ARAF* v celé jeho délce pomocí tří nezávislých PCR reakcí za využití tří dvojic primerů (**Tabulka 7**) dříve navržených (Mortensen *et al.* 2011). Amplifikována byla celá jeho kódující oblast. Promotorová oblast zmíněného genu amplifikována nebyla.

Tabulka 7. Primery použité k amplifikaci genu *cyp51A*

Gen	Forward primer	Reverse primer
<i>cyp51A</i>	Cyp1-L (CACCCTCCCTGTGTCTCCT)	Cyp1-R (AGCCTTGAAAGTTCGGTGAA)
	Cyp2-L (CATGTGCCACTTATTGAGAAGG)	Cyp2-R (CCTTGCGCATGATAGAGTGA)
	Cyp3-L (TTCCTCCGCTCCAGTACAAG)	Cyp3-R (CCTTTGAAGTCCTCGATGGT)

Složení PCR reakční směsi bylo zcela totožné jako v **Tabulce 5**. Amplifikační cyklus byl téměř stejný, jako je program uvedeným v **Tabulce 6**, avšak elongace proběhla namísto 35 cyklů ve 30 cyklech.

2.3.5 Purifikace PCR produktů

Všechny PCR produkty byly čištěny (purifikace) pomocí čistícího reagens ExoSAP-IT™ (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Dle pokynů výrobce byl ExoSAP-IT™, zředěný v poměru 1:9 deionisovanou H₂O přidán k PCR produktu, a to v množství 8 µl na 20 µl vzorku. Poté byla výsledná směs vložena do cycleru, program byl nastaven podle doporučení výrobce (37°C / 8 min; 80°C / 1 min).

2.3.6 Sekvence DNA

PCR produkty jednotlivých kmenů byly připraveny pro sekvenaci dle pokynů Laboratoře sekvenace DNA PŘF UK (Biocev, Vestec, ČR): k PCR produktu byly přidány oba koncové primery použité při PCR včetně H₂O v poměru 1:5. Využit byl sekvenátor ABI 3100 Avant (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA).

2.3.7 Druhová identifikace *Aspergillus fumigatus*

K úpravě všech získaných sekvencí byl nejprve využit program Bioedit 7.2.5 (www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html) (Nierman *et al.* 2005). Pro určení do druhu byla využita databáze NCBI (National Center for Biotechnology Information), pomocí vyhledávacího nástroje BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Bylo identifikováno 291 izolátů na základě shody získané sekvence *benA* přesahující 98% při porovnání s ex-typovým kmenem *A. fumigatus*, jehož přístupové číslo se nachází v databázi GenBank: EF669791 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/EF669791>), dle Houbraken *et al.* (2020). A 11 izolátů bylo identifikováno na základě shody získané sekvence *CaM*, s přístupovým č. EF669860 v téže databázi (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/EF669860>) (Samson *et al.* 2014, Houbraken *et al.* 2020).

2.3.8 Identifikace molekulárních mechanismů rezistence

Identifikace molekulárních mechanismů rezistence byla provedena u všech kmenů ARAf. Získané sekvence tří úseků genu *cyp51A* byly složeny na základě alignmentu, kdy k těmto třem fragmentům byla přidána referenční sekvence celého genu *cyp51A* od referenčního wild-type izolátu ARAf (GenBank: AF338659, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/AF338659>). Alignment byl vytvořen v programu MAFFT v7 (Multiple amino acid or nucleotide sequences Alignment by using Fast Fourier Transform) (<http://mafft.cbrc.jp/alignment/server/>) (Kato & Standley 2013). Složená kompletní sekvence byla porovnána se známými mutacemi uloženými v databázi FunResDB (<https://sbi.hki-jena.de/FunResDb>) a byly zjištěny konkrétní mutace testovaných ARAf kmenů.

2.4 Screening antifungální rezistence

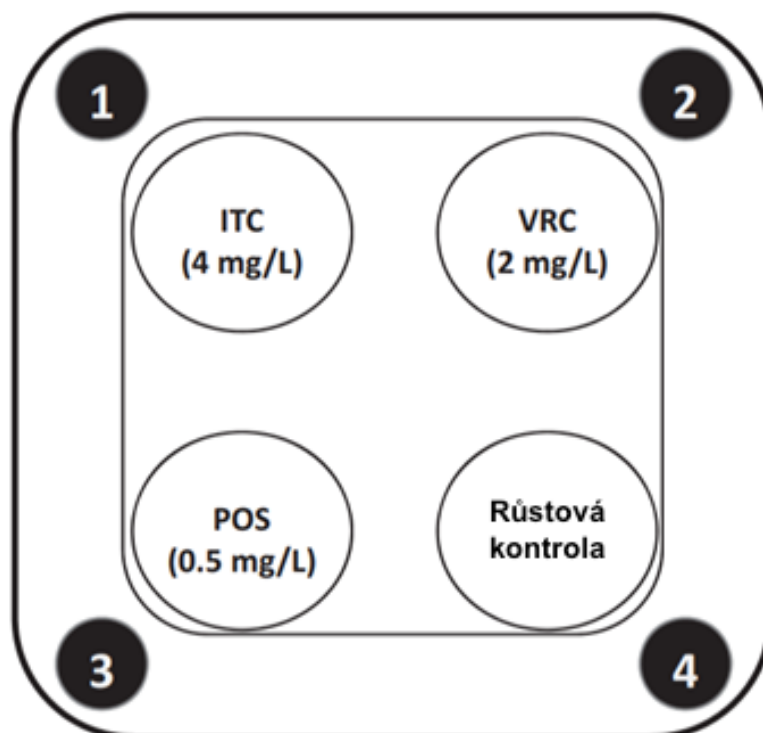
Screening izolátů ARAf z obou prostředí byl proveden na katedře botaniky PŘF pomocí screeningové destičky, která byla navržena podle protokolu E.Def 10.1 (Guinea *et al.* 2019a), doporučeného komisí EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing),

podvýborem AFST (Antifungal Susceptibility Testing Subcommittee) (https://www.eucast.org/astoffungi/publications_in_journals/). Jediným rozdílem bylo využití destičky se 24 jamkami (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) oproti destičkám čtyř – jamkovým z původního protokolu. Díky této obměně bylo možné testovat 6 kmenů zároveň na jedné destičce, což urychlilo průběh výroby destiček i následné testování izolátů. V každé ze 6 řad byl testován odlišný kmen, ve třech sloupcích byla azolová ATM (ITR, VOR a POS) a v posledním sloupci růstová kontrola.

Nejprve byly připraveny pracovní roztoky ATM, které obsahovaly dimethylsulfoxid (DMSO; SIGMA-ALDRICH, Saint Louis, MO, USA), ve kterém byla ATM rozpuštěna. Koncentrace ATM byla v pracovním roztoku 100× vyšší, než byla jejich finální koncentrace. Roztoky byly poté rozděleny na dávky dle potřeby do mikrozkušavek, které byly poté zmrazeny při -70°C.

Schéma (**Obrázek 6**) zobrazuje hodnoty koncentrace azolových ATM v mg na 1 litr média, tedy itraconazol (ITR, jamka č. 1) v koncentraci 4 mg/l, vorikonazol (VOR, jamka č. 2) v koncentraci 2 mg/l a posaconazol (POS, jamka č. 3) v koncentraci 0,5 mg/l (SIGMA-ALDRICH, Saint Louis, MO, USA).

Obrázek 6. Schéma 4-jamkové destičky pro screening citlivosti vůči azolovým antimykotikům (itraconazol, vorikonazol, posaconazol)



převzato z Guinea *et al.* (2019a)

Jamky č. 1 až 3 tedy obsahovaly RPMI médium (Roswell Park Memorial Institute 1640-série) s přidavkem jednoho ze tří azolových ATM. A poslední z jamek vždy obsahovala pouze médium SDA bez přidavku ATM (růstová kontrola, jamka č. 4). Ve stejném pořadí, avšak v jamkách, které byly v řadě za sebou, byla ATM seřazena i u 24-jamkové destičky (znázorněno na **Obrázku 7**).

Obrázek 7. Fotodokumentace růstu šesti kmenů *Aspergillus fumigatus* ve 24-jamkové destičce, obsahující azolová léčiva: itrakonazol, vorikonazol a posakonazol, a kontrolní jamku obsahující Sabouraudův dextrózový agar bez přidavku antimykotik



Dále médium obsahovalo antibiotikum (ATB), konkrétně roztok chloramfenikolu (finální koncentrace 0,2 mg/l média) (SIGMA-ALDRICH, Saint Louis, MO, USA) v etylalkoholu, aby bylo zabráněno kontaminaci bakteriemi. Roztoky ATM a ATB, byly přidány do média až po jeho sterilizaci, aby nebyla zničena jejich účinnost. Kromě zmíněných pracovních roztoků obsahovalo médium použité pro přípravu destiček činidla zmíněná v **Tabulce 8**. Objem média na 1 jamku v destičce byl 1 ml. Hotové destičky byly skladovány v chladu ve 4 °C po dobu maximálně 6 měsíců.

Tabulka 8. Seznam činidel pro přípravu agarových destiček, obsahující antimykotika

Název činidla	Množství	Poznámka
RPMI 1640	900 ml	Ve formě prášku
D (+) glukóza	18 g	
Bacto™ Agar	20 g	
Pufr MOPS	34,53 mg	0,165 M
Chloramfenikol	10 ml	Pracovní roztok s EtOH (100 mg/ml)
Azolové antimykotikum	10 ml	Pracovní roztok v DMSO

Pro vytvoření suspenze inokula byly kmeny *A. fumigatus* kultivovány po dobu 2 až 5 dnů při 37 °C, aby bylo dosaženo přiměřené sporulace. Sporulující kultury byly poté zality 5 ml vody obsahující 0,01% detergentu Tween20. Konidie byly pomocí sterilní vatové štětičky jemně setřeny a rozvířeny na Petriho misce tak, aby vznikla suspenze spor. Suspenze byla z Petriho misky přenesena pomocí pipety do sterilní zkumavky a byla promíchána za užití vortexového mixéru (2000 rpm) po dobu přibližně 15 sekund. Denzita suspenze byla upravena na zákal 0,5 McFarlandovy stupnice, a to přidáním sterilní destilované vody. Pak bylo dosaženo homogenizace roztoku opětovným vortexováním s důrazem na nepřítomnost shluků hyf hub. Konečná suspenze byla ponechána k odstátí a následně byly všechny jamky na destičce inokulovány 25 µl suspenze.

Inokulované destičky byly inkubovány po dobu 48 hodin při 37 °C. Poté byl růst zhodnocen vizuálně. Pokud byl zaznamenán okem viditelný růst, tak byl kmen hodnocen jako potenciálně azol-rezistentní. Příkladem je fotodokumentace 24-jamkové destičky, která je výše na **Obrázku 7**. Na snímku je zřetelně viditelný nárůst mycelia v prvním sloupci screeningové destičky v prvních čtyřech jamkách, obsahujících médium s příměsí ITR. Tento postup umožnil simultánní screening rezistence na všechna 3 klinicky nejužívanější azolová léčiva (Guinea *et al.* 2019c). Pro identifikaci exaktní hodnoty MIC čtyř azolů, byla posléze užitá mikrodiluční metoda popsaná níže (viz **kapitola 2.5**).

2.5 Identifikace hodnoty minimální inhibiční koncentrace (MIC)

Přesná hodnota minimální inhibiční koncentrace MIC pro daná ATM byla stanovena u všech kmenů potenciálně rezistentních dle screeningu popsaného výše (**kapitola 2.5.**). Bylo postupováno podle standardizované metodiky EUCAST, protokolem E.Def 9.3 (Arendrup *et al.* 2016). Tento postup byl proveden ve Zdravotní ústavu se sídlem v Ústí nad Labem, Praha pod dohledem RNDr. Pavlína Lyskové, PhD. Toto pracoviště je jediné v České republice, které zmíněnou metodiku v současnosti provozuje. Celkem bylo otestováno 323 kmenů *A. fumigatus*, 173 z klinického materiálu a 150 z půdních vzorků.

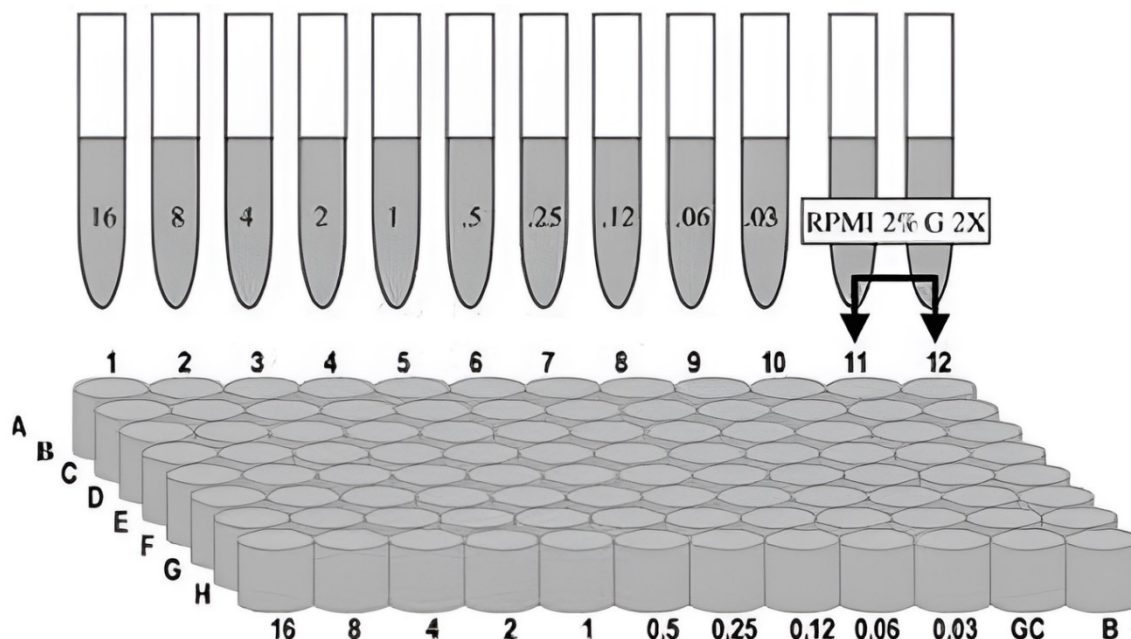
Pro testování byly použity 96-jamkové mikrodiluční destičky (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) – viz **obrázek 8**. Metoda je založena na přípravě pracovních roztoků ATM (v pořadí ITR, VOR, POS a isavuconazol ISA) v ředících řadách v doporučeném RPMI médiu, obsahujícím 2 % glukózy. Jeho pH bylo upraveno na hodnotu 7 přidáním MOPS (3-(N-morfolino)propansulfonová kyselina). Přesné složení média je uvedeno v **Tabulce 9**.

Tabulka 9. Složení média RPMI 1640 na 900 ml destilované vody s příměsí 2 % glukózy a MOPS

Název	Množství	Složka
RPMI	900 ml	Destilovaná H ₂ O
	20,8 g	RPMI 1640
	69,06 g	MOPS pufr
	36 g	Glukóza

Koncentrace jednotlivých ATM v mikrodiluční destičce je znázorněna na **Obrázku 8** převzato z Rodríguez-Tudela *et al.* (2003). Hodnoty v jednotkách mg/l jsou viditelné pod schématem. Na jedné destičce bylo možno testovat citlivost vůči 4 ATM u 2 kmenů *A. fumigatus* zároveň. První kmen v řadách A až D, a druhý kmen v řadách E až H. Hodnoty koncentrace ATM v médiu v jamkách destiček byly následující: zleva ve sloupci č. 1 byla hodnota nejvyšší 16 mg/l, která postupně klesala až k hodnotě 0,03 mg/l nacházející se ve sloupci č. 10. Růstové kontrolní jamky ve sloupci č. 11 a č. 12 obsahovaly pouze RPMI médium bez ATM.

Obrázek 8. Rozředění koncentrace antimykotik (mg/l) v mikrodiluční 96-jamkové destičce



Převzato z (Rodríguez-Tudela *et al.* 2003)

Postup pro vytvoření suspenze inokula *A. fumigatus* byl velmi podobný postupu přípravy inokula v **kapitole 2.4**. Avšak izoláty byly v tomto případě inkubovány po dobu až 14 dní, aby došlo k dostatečné sporulaci. Pak bylo přidáno 5 ml vody obsahující 0,01% detergentu Tween20. Následně po setření konidií sterilní vatovou tyčinkou byla suspenze přenesena pomocí sterilní stříkačky. Za využití sterilních nylonových filtrů s póry o velikost 11 μm (Merck, Česká republika) byla suspenze přefiltrována do sterilní zkumavky. K úpravě suspenze na koncentraci ekvivalentní 0,5 McFarlandova zákalu byl opět využit spektrofotometr Nanodrop ND-1000. Po dobu 15 s byla suspenze mixována za použití vortexového mixéru (200 rpm), aby bylo dosaženo její homogenizace. Přidáním sterilní destilované vody v poměru 10:1 byla suspenze zředěna na konečnou požadovanou koncentraci $2-5 \times 10^5$ cfu/ml.

Získaným inokulem, konkrétně 100 µl, byla každá jamka ve sloupci č. 1 až č. 11 v mikrodiluční destičce inokulována. Jak již bylo zmíněno, sloupce č. 11 a č. 12 neobsahovaly kmeny *A. fumigatus* z důvodu vyloučení kontaminace ATM. Sloupec č. 12 však inokulován suspenzí nebyl a sloužil tedy pouze pro kontrolu sterility média a jako negativní kontrola. Destičky byly inkubovány ve 34 až 37 °C po dobu 48 hodin. Postup byl přizpůsoben dle (Lysková 2019). Posléze byla mikrotitrační destička vizuálně vyhodnocena na bílém i černém podkladu. Za hodnotu MIC je považována ta koncentrace, ve které není okem viditelný žádný růst hyf. Právě koncentrace v této jamce určuje hodnotu MIC. Hodnoty byly stanoveny pro každý kmen zvlášť.

Hodnocení proběhlo za pomoci využití klinických breakpointů, což jsou hodnoty koncentrace látek určující rezistenci, aktuálně stanovených komisí EUCAST pro každé užití ATM. Jejich hodnoty jsou v Tabulce 1, kapitola 1.3, a byly převzaty z materiálů publikovaných EUCAST AFST (<https://www.eucast.org/astoffungi/clinicalbreakpointsforantifungals/>). Pokud naměřená hodnota MIC byla rovna, či nižší než hodnota ve sloupci „citlivost“, tak byly kmeny vůči danému ATM označeny za citlivé (C). Naopak kmeny, které měly hodnoty vyšší, než je ve sloupci „rezistence“, byly označeny za rezistentní (R). Poslední sloupec obsahuje ATU hodnoty, které značí nejisté zařazení citlivosti testovaného izolátu k ATM (Guinea 2020).

Kmeny, u které měly hodnotu v ATU, byly dle pravidel, stanovených EUCAST ASFT (https://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/AFST/Clinical_breakpoints/AFST_BP_v10.0_200204_updatd_links_200924.pdf) dále řazeny buď jako rezistentní, citlivé anebo se postupovalo dle pravidel zmíněných v následujícím odstavci. Takže byl při ATU hodnotě např. u testovaného kmenu sekvenován gen *cyp51A*, pro zjištění případných mutací způsobujících azolovou rezistenci. A teprve po tomto kroku mohl být testovaný kmen zařazen jako C nebo R. Případně byly testované izoláty s nejistým vyhodnocením citlivosti k ATM testovány opakovaně, dokud nebylo vyhodnocení citlivosti izolátů jednoznačné. Tato následující základní pravidla ATU, byla komisí EUCAST stanovena z toho důvodu, aby byly výsledky MIC azolů jednoznačné. Žádný z testovaných izolátů by tudíž neměl být chybně označen jako C nebo R. Takové pochybení by totiž mohlo vést k volbě nesprávného lékařského postupu při léčbě aspergilózy, což by v nejhorším případě mohlo dopadnout dokonce jako selhání léčby pacientů a ke zvýšení mortality.

Pro izoláty, u kterých MIC hodnoty byly stanoveny v ATU, platila následující pravidla:

- 1) **ITR** – Označit jako rezistentní s komentářem
- 2) **VOR** – Označit za rezistentní s komentářem (viz kapitola **3.2.2 Tabulka 17**)
- 3) **POS** – Pokud je izolát citlivý vůči ITR, označit za citlivý s komentářem; pokud je rezistentní vůči ITR, označit za rezistentní s doporučením zaslat izolát do referenční laboratoře pro sekvenaci *cyp51A* a ověření MIC hodnot
- 4) **ISA** – Pokud je VOR wild-type, označit za citlivý s komentářem; pokud není VOR wild-type, tak je v praxi doporučeno označit kmen za rezistentní a zaslat izolát do referenční laboratoře pro sekvenaci *cyp51A* a ověření MIC hodnot (to také proběhlo v rámci této práce)

2.6 Statistické zpracování dat

Získané hodnoty MIC testovaných pro jednotlivá ATM u 173 klinických a 150 půdních izolátů byly podrobeny deskriptivním statistickým výpočtům. Každé ATM (ITR, VOR, POS a ISA) bylo ve všech případech testováno zvlášť. Kromě minimální a maximální hodnoty, byl zjištěn medián a geometrický průměr.

Dále byl soubor izolátů rozdělen podle pohlaví a věku pacientů, místa odběru a roku izolace vzorků, a byl zkoumán vztah mezi proměnnými a distribucí kmenů ARAf. K testování závislosti mezi proměnnými a výskytem azolové rezistence byl použit χ^2 test v programu Excel. Hladina statistické významnosti byla $p = 0,05$. Nulová hypotéza zněla, že jsou obě veličiny statisticky nezávislé. Alternativní hypotézou bylo, že jsou na sobě obě veličiny závislé. Tímto testováním bylo ověřeno, zda u zkoumaných izolátů *A. fumigatus* existuje souvislost výskytu rezistence vůči azolovým léčivům a zkoumanými proměnnými.

3. Výsledky

3.1 Screening antifungální rezistence k azolovým derivátům

3.1.1 Identifikace klinických izolátů a rozdělení dle substrátů

Ke druhové identifikaci pomocí sekvenace genu *CaM* nebo *benA* bylo přistoupeno u všech klinických izolátů pro ověření správnosti identifikace a pro vyloučení kryptických druhů, které jsou obtížně morfologicky rozeznatelné od *A. fumigatus*. Z počátku byl pro identifikaci zvolen gen *CaM* (n = 11), od kterého ale bylo upuštěno z důvodu nemožnosti získat PCR produkt nebo kvalitní DNA sekvenci u části izolátů. Amplifikovaný úsek genu *CaM* měl 676-689 bází, a obsahoval 3 introny a 4 exony. U ostatních vzorků byl sekvenován úsek genu *benA* o délce v rozmezí od 386 do 395 bází, který obsahoval 3 introny a 3 exony. Identifikováno bylo celkem 301 izolátů *A. fumigatus*, které byly dále testovány.

Odhaleno bylo i 34 izolátů, původně morfologicky identifikovaných jako *A. fumigatus*, které náležely do jiných druhů a byly tedy vyřazeny z dalších analýz. Jmenovitě bylo 16 izolátů identifikováno jako: *Aspergillus lentulus* (n = 5), *A. fischeri* (n = 3), *A. quadrilineatus* (n = 3), *A. aureolus* (n = 2), *A. flavus* (n = 1), *A. ochraceus* (n = 1) a *A. spinosus* (n = 1). Ostatní vyřazené izoláty patřily do rodu *Penicillium* (n = 18).

Klinické izoláty *A. fumigatus* (n = 301) byly rozděleny do osmi skupin dle substrátů/lokalizací, ze kterých byly izolovány (Tabulka 1): dolní cesty dýchací, horní cesty dýchací, zevní zvukovod, stěr z rány, mozek, krev, moč a syntetické materiály. Přičemž skupina dolních cest dýchacích zahrnovala podskupiny sputum, endotracheální aspirát (ETA) a bronchoalveolární laváž (BAL) společně s bronchoalveolární tekutinou (BAT).

3.1.2 Screening azolové rezistence klinických izolátů

Veškeré klinické izoláty *A. fumigatus* byly testovány na přítomnost ARAf kmenů dle protokolu E.Def 10.1 (viz Metodologie, kapitola 2.4). Z tohoto testování vyšlo 122 izolátů (40,5 %) jako rezistentních vůči alespoň jednomu z testovaných azolových derivátů (ITR, VOR, POS). Celkem byly 3 izoláty rezistentní vůči všem testovaným azolům, 27 rezistentních vůči kombinaci 2 azolů a zbývajících 92 rezistentních vůči 1 azolu. Nejčastěji byla rezistence prokázána u ITR (72,1 % ze 122 rezistentních izolátů). Pro VOR byly testované vzorky rezistentní o něco méně častěji (52,5 %), případně byly vůči němu rezistentní v kombinaci s ITR (22,9 %). Vůči POS bylo rezistentních nejméně izolátů, a to pouze v kombinaci s jiným azolem (2,46 %). Jinými slovy, izolovaná rezistence vůči POS zjištěna nebyla.

Již v procesu testování bylo podezřelé, jak velký byl počet detekovaných rezistentních izolátů. Proto byly destičky, obsahující médium s ATM vyráběny ve více sériích, aby se dala porovnat jejich účinnost a zjistit tak, jaká chyba v procesu výroby mohla nastat. Až v pozdní fázi přípravy této práce bylo objasněno, že nedostatečná účinnosti ATM, zejména ITR, byla způsobena nižším než doporučeným pH média, ve kterém byly ATM rozpuštěny. Jak bylo zjištěno u *Candida albicans*, ale také u *A. fumigatus* (Danby *et al*, 2012; Te Dorsthorst *et al*, 2004; Wiederhold, 2021), pH média může výrazně ovlivnit výsledky testování u azolových ATM a amfotericinu B a může dojít k tzv. falešnému určení rezistence. Když pH média v testech citlivosti k ATM klesne z neutrální (pH 7) na kyselou hodnotu (<5), tak mohou být výsledné hodnoty MIC vyšší, než by byly za normálních okolností. Právě k tomuto pochybení došlo a některé kmeny určené screeningem jako rezistentní, byly takto určeny nesprávně, jak později prokázalo i testování mikrodiluční metodou, která je popsána níže (**viz kapitola 2.5**). Velké množství izolátů bylo proto pro ujištění výsledků testováno vícekrát na odlišných sériích screeningových destiček. Izoláty byly vyhodnoceny jako rezistentní pouze tehdy, pokud byl zaznamenán růst mycelia při dvou a více testování screeningem.

3.1.3 Stanovení hodnot minimální inhibiční koncentrace azolových antimykotik u klinických izolátů protokolem E.Def 9.3

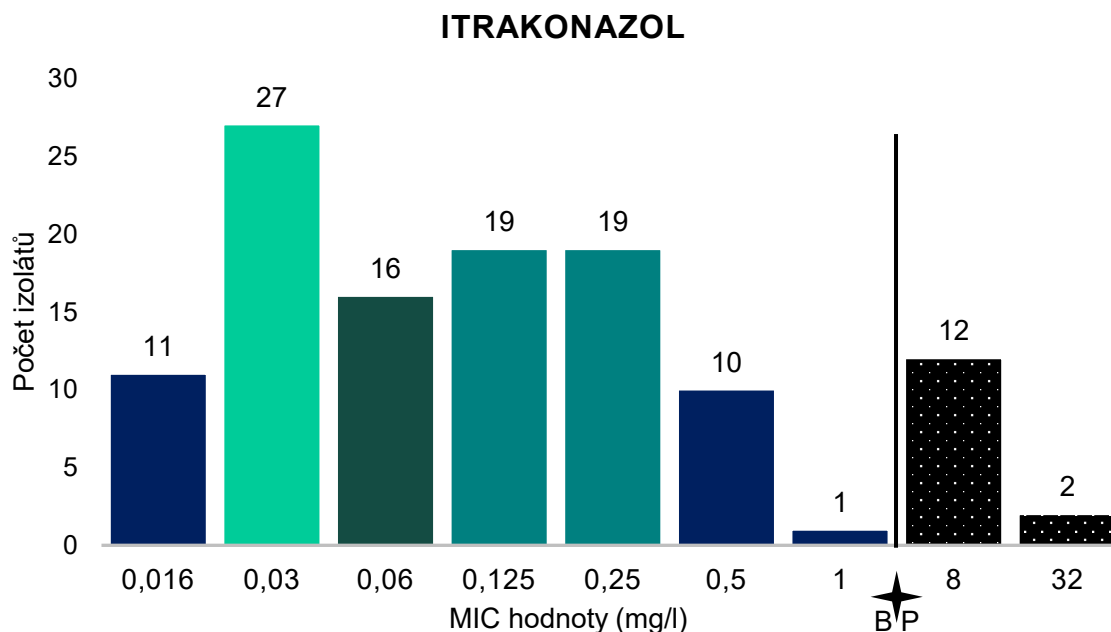
Ověření přesné hodnoty MIC testovaných ATM proběhlo u všech izolátů, které byly vyselektovány jako rezistentní screeningovou metodou – celkem tedy u 122 izolátů *A. fumigatus*. Zároveň s nimi bylo testováno dalších 51 izolátů, u kterých bylo na základě nejistých výsledků testu E.Def 10.1 podezření na výskyt rezistence. Zmíněných 51 izolátů, které byly vybrány k testování MIC společně s 122 kmeny, byly vybrány na základě nárůstu mycelia pouze na jedné ze série destiček.

Celkem tedy byla tedy hodnota MIC zjišťována u 173 kmenů pro VOR, POS a ISA. U ITR byly zjišťovány hodnoty pro 117 izolátů, a to z toho důvodu, že u 56 izolátů došlo k pochybení při postupu práce, konkrétně při zacházení s ATM. ITR totiž nesmí být skladován při teplotě nad 25 °C. Ale je možné, že byl po nějakou dobu skladován chybně v teplotě, která přesáhla danou hodnotu. Proto při zjištění tohoto pochybení bylo ATM vyměněno, a teprve hodnoty těch izolátů, které byly testovány novým ATM, byly brány v potaz.

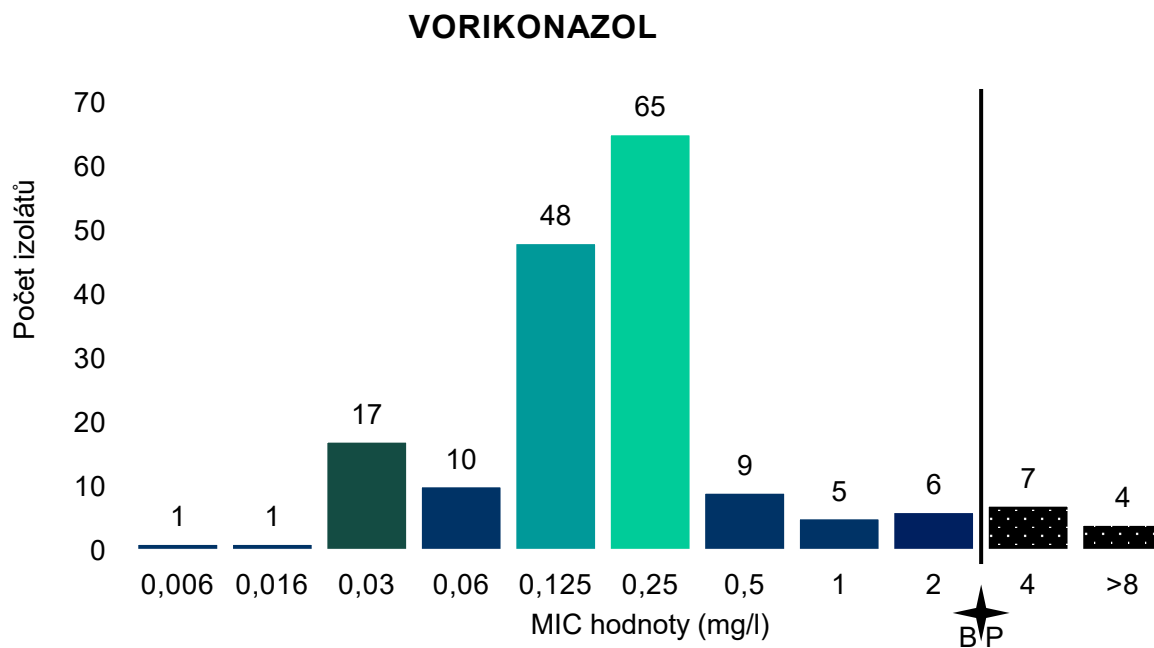
K testování byl využit protokol E.Def 9.3 (viz Metodologie, kapitola 2.5.). Naměřené hodnoty MIC každého studovaného vzorku se nachází v Příloze 2. Ve sloupcových **Grafech 1.1 až 1.4** byly znázorněny počty kmenů pro každou testovanou hodnotu MIC a dané ATM.

V **Grafu 1.1** U ITR mělo nejvíce izolátů nízké hodnoty MIC, nejčastější byla hodnota 0,03 mg/l. Většina ARAf izolátů vykazovala hodnotu MIC 8 mg/l média. Nad hodnotou breakpointu, tedy nad 2 mg/l, se vyskytovalo 13 izolátů. U VOR bylo rezistentních 17 izolátů, z nichž 3 izoláty patřily do hodnot ATU, která je stejná pro ITR, VOR i ISA. V **Grafu 1.2** lze vidět, že u VOR bylo celkem 113 izolátů řazeno do dvou nejčtenějších hodnot MIC, konkrétně 0,125 mg/l a 0,25 mg/l, a ostatních krajních hodnot bylo dohromady pouze 60. U POS bylo v **Grafu 1.3** maximum izolátů v hodnotě MIC 0,125 mg/l média. Tato hodnota je blízko k hodnotě breakpointu POS, což je 0,25 mg/l. POS měl počet rezistentních izolátů stejný jako měl VOR, tedy celkem 17 ARAf. Z čehož 15 izolátů přesáhlo hodnotu breakpointu. Další 2 izoláty nepřesáhly hodnotu breakpointu 0,25 mg/l, avšak spadaly do kategorie ATU, Díky pravidlům ATU, bylo stanoveno, že se dají tyto dva izoláty také považovat za rezistentní. U ISA (**Graf 1.4**) byl nejvyšší počet izolátů (n = 102) zařazen do stejných nejčtenějších hodnot MIC, jako měl VOR. Oba Grafy 1.2 a 1.4 měly nejvíce izolátů v hodnotě 0,25 mg/l média.

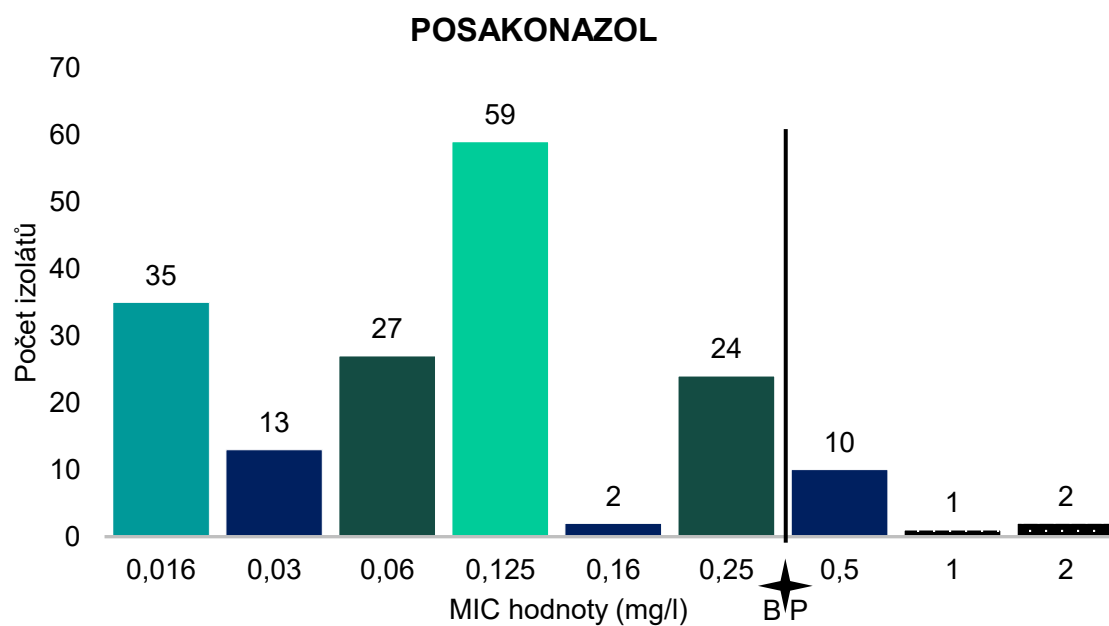
Graf 1.1 Počet klinických izolátů *Aspergillus fumigatus* přiřazený k hodnotám minimální inhibiční koncentrace itrakonazolu u 117 izolátů



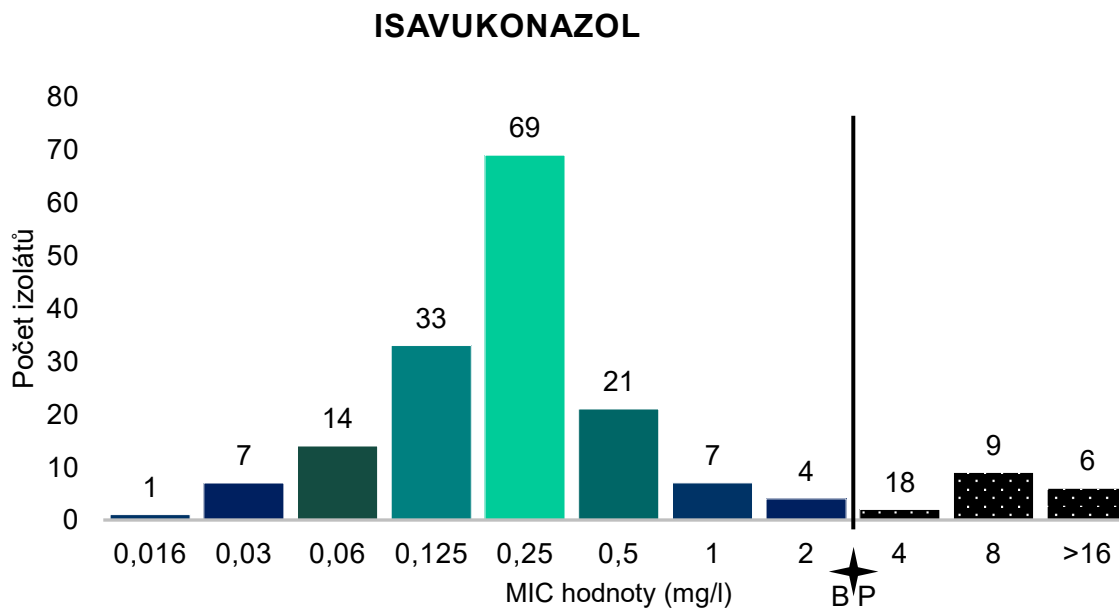
Graf 1.2 Počet klinických izolátů *Aspergillus fumigatus* přiřazený k hodnotám minimální inhibiční koncentrace vorikonazolu u 173 izolátů



Graf 1.3 Počet klinických izolátů *Aspergillus fumigatus* přiřazený k hodnotám minimální inhibiční koncentrace posakonazolu u 173 izolátů



Graf 1.4 Počet klinických izolátů *Aspergillus fumigatus* přiřazený k hodnotám minimální inhibiční koncentrace isavukonazolu u 173 izolátů



Izoláty byly skórovány jako citlivé nebo rezistentní dle hodnot breakpointů aktuálně zveřejněných společností EUCAST AFST (viz Úvod, **kapitola 1.3, Tabulka 1**).

Metodikou EUCAST, protokolem E.Def 9.3, byla z celkem testovaných 173 izolátů potvrzena rezistence vůči azolovým ATM u 19 izolátů. Přičemž u 2 pacientů byl vzorek *A. fumigatus* odebrán ve 2 různých obdobích a byl izolován z odlišných tkání. Rezistentní izoláty byly tedy potvrzeny u 17 pacientů a z toho u 2 pacientů opakovaně v průběhu léčby. V **Tabulce 10** je v posledních dvou sloupcích vypsáno, mimo jiné, zastoupení rezistentních izolátů rozřazených dle toho, z jakých substrátů byly izolovány.

Tabulka 10 obsahuje základní informace týkající se izolátů, a to včetně počtu ARAf kmenů. Ty byly nejčastěji izolovány z dolních cest dýchacích (nebo také konkrétně z podskupiny sputum). Zajímavostí je, že kromě mozku, byla největší proporce kmenů ARAf u horních cest dýchacích. Rezistentní kmeny tvořily totiž více než polovinu testovaných izolátů v dané skupině substrátů. Ostatní více početné skupiny substrátů, které zahrnovaly více než 40 izolátů, měly jen o něco nižší hodnoty proporce ARAf kmenů, než měla výsledná prevalence všech klinických izolátů.

Tabulka 10. Přehled izolátů *Aspergillus fumigatus* dle substrátů, ze kterých byly získány, počet a proporce azol-rezistentních kmenů (ARAF)

Původ izolátů	Počet izolátů	Počet žen	Počet mužů	Průměrný věk	Počet ARAf	Proporce ARAf *
Dolní cesty dýchací	236	86	150	62,7	11	4,66 %
- Sputum	145	55	89	54	9	6,2 %
- ETA	52	14	37	60,9	-	-
- BAL/BAT	39	17	23	63,4	2	5,1 %
Horní cesty dýchací	7	5	2	30,1	4	57,1 %
Zevní zvukovod	43	15	28	44,8	2	4,6 %
Stěr z rány	5	1	4	40,4	1	20 %
Mozek	1	-	1	65	1	100 %
Krev	3	1	2	46,7	-	-
Moč	1	-	1	66	-	-
Syntetické materiály	5	1	4	58,8	-	-
CELKOVÝ POČET	301	109	192	54,4	19	6,31 % ze 301

ETA, endotracheální aspirát; BAL, bronchoalveolární laváž; BAT, bronchoalveolární tekutina

*proporce ARAf z celkového počtu vzorků pro daný substrát v %

V porovnání obou testování azolové rezistence (screeningovou metodou E.Def 10.1 a mikrodiluční metodou E.Def 9.3) byl tedy velký nepoměr v záchytu rezistence. Důvodů, proč screeningová metoda vyhodnotila nadměrně vysoký počet izolátů jako rezistentních, je několik. Test protokolem E.Def 10.1 není zdaleka tak přesný a některé kmeny s hraniční hodnotou rezistence mohou být vyhodnoceny jako falešně pozitivní. Nejpodstatnějším důvodem bylo ale nedostatečně kontrolované pH růstového média, které nebylo při přípravě screeningových destiček dodrženo, jak bylo zmíněno v **kapitole 2.4**. Celkové výsledky touto chybou ale ovlivněny nebyly, protože veškeré izoláty vyhodnocené screeningem jako rezistentní, byly následně testovány metodou E.Def 9.3 pro zjištění hodnoty MIC.

V **Tabulce 11** je shrnut počet izolátů vyhodnocených jako ATU, citlivých a rezistentních izolátů u každého z testovaných ATM. Dále je uvedeno zastoupení rezistentních kmenů k danému ATM z celkového počtu ARAf. U ISA hodnota MIC všech 19 izolátů přesahovala hodnotu breakpointu, naopak pouze 13 z 19 rezistentních izolátů vykazovalo rezistenci k ITR. Nejvíce izolátů, které spadaly do ATU měl VOR 3.

Tabulka 11. Rezistence vůči testovaným antimykotikům – itrakonazol, vorikonazol, posakonazol a isavukonazol a zastoupení rezistence vůči nim

ATM	Počet izolátů ATU	Počet citlivých izolátů	Počet ARAf izolátů	Zastoupení rezistence z počtu mezi rezistentními izoláty	Zastoupení rezistence z celkového počtu izolátů
ITR	0	6	13	68,42 %	4,32 %
VOR	3	2	17	89,47 %	5,65 %
POS	2	4	15	78,95 %	4,98 %
ISA	2	0	19	100 %	6,31 %
Celkem	7		z 19	z 19 (100 %)	z 301 (100 %)

ATM, antimykotikum; ITR, itrakonazol, VOR, vorikonazol; POS, posakonazol;

ATU (Area of Technical Uncertainty); ARAf, azol-rezistentní *Aspergillus fumigatus*

V této práci tedy byla zjištěna 6,3 % prevalence azolové rezistence mezi klinickými izoláty *A. fumigatus*. Neboli 93,7 % izolátů reagovalo *in vitro* na všechna testovaná azolová ATM. Míra rezistence tedy nepřesahuje 10 %, a tudíž není nutné modifikovat postupy pro léčbu infekcí působených *A. fumigatus*. Z celku 259 testovaných pacientů, byly nalezeny kmeny ARAf u 17 pacientů. Tím pádem izoláty *A. fumigatus* 93,44 % pacientů, reagovaly alespoň na jedno z testovaných azolových ATM. Zatímco u 6,56 % pacientů byly detekovány kmeny ARAf.

3.1.4 Statistické vyhodnocení dat klinických izolátů

Pro výpočet aritmetického a geometrického průměru z hodnot MIC všech testovaných kmenů byla využita data získaná protokolem E.Def 9.3. Výpočet tohoto průměru byl zapsán do **Tabulky 12** pro všechna čtyři testovaná ATM. Nejnižší průměrnou hodnotu MIC měl POS, a naopak nejvyšší měl ITR. Lze si všimnout, že hodnota geometrického průměru MIC VOR byla o třetinu nižší, než hodnota ITR a ISA. A to i přes to, že jejich hraniční hodnota je stejná, tedy 2 mg/l. Nejvyšší hodnotu geometrického průměru MIC měl ISA.

Tabulka 12. Průměrné hodnoty minimální inhibiční koncentrace všech izolátů *Aspergillus fumigatus* testovaných metodou E.Def 9.3 pro itrakonazol, vorikonazol, posakonazol a isavukonazol v mg/l

Antimykotikum	Aritmetický průměr	Geometrický průměr	Minimální hodnota	Maximální hodnota
Itrakonazol (n = 117)	1,50	0,14	0,016	32,00
Vorikonazol (n = 173)	0,93	0,21	0,006	32,00
Posakonazol (n = 173)	0,15	0,08	0,016	2,00
Isavukonazol (n = 173)	1,47	0,30	0,016	32,00

Tabulka 13. Průměrné hodnoty minimální inhibiční koncentrace rezistentních izolátů *Aspergillus fumigatus* testovaných metodou E.Def 9.3 pro itraconazol, vorikonazol, posakonazol a isavuconazol v mg/l

Antimykotikum	Aritmetický průměr	Geometrický průměr	Minimální hodnota	Maximální hodnota
Itraconazol (n = 19)	8,66	4,08	0,25	32,00
Vorikonazol (n = 19)	6,67	4,41	1,00	32,00
Posakonazol (n = 19)	0,49	0,40	0,13	2,00
Isavuconazol (n = 19)	10,12	8,11	2,00	32,00

Také byly porovnány získané hodnoty MIC rezistentních izolátů mezi všemi institucemi. V **Příloze 5**, jsou zaznamenány jejich hodnoty mediánu, dále pak hodnoty minimální, maximální a průměrné. Také byly spočteny průměrné hodnoty MIC kmenů *ARAF*, které jsou vypsány v **Tabulce 13**. Výrazně vyšší hodnotu MIC měly vzorky zaslané z Motola. ZÚ Praha shromáždil vzorků nejvíce, jeho hodnoty MIC byly o dost nižší než z Motola. Dále byla testována závislost přítomnosti azolové rezistence u klinických izolátů a 4 proměnných: rok izolace, místo odběru vzorku, věk pacientů a pohlaví pacientů. Výsledky testování jsou uvedeny v **Tabulce 14**. Podrobný výpočet proměnných lze najít v **Příloze 6**.

Tabulka 14. Výsledky testování závislosti výskytu azolové rezistence na čtyřech proměnných pomocí Chi² testu

Proměnné	X ²	df	p-hodnota
Pohlaví	2,37	1	0,1239
Věk	0,97	2	0,6150
Lokace	0,98	2	0,6115
Rok izolace	19,55	2	0,0001

Vzorky byly izolovány v období mezi lety 2019 až 2021, a byla testována závislost výskytu rezistence a rokem jejich izolace. Výsledná p hodnota byla pod hranicí významnosti 5 %, a byla tedy zjištěna souvislost mezi výskytem rezistence a rokem izolace. To potvrzuje fakt, že roku 2019 byly shromážděny jen 4 rezistentní izoláty, v roce 2020 8 izolátů a v 2021 celkem 7 izolátů. Mezi roky 2019 a 2020 byl tedy zaznamenán významný nárůst počtu rezistentních kmenů. Naopak nebyla zjištěna souvislost mezi výskytem rezistence z hlediska místa izolace: ZÚ Praha - 7 rezistentních izolátů, ZÚ Ostrava - 7 rezistentních izolátů, a Fakultní nemocnice v Motole - 5 rezistentních izolátů. Věk pacientů byl skórován do 3 kategorií: <30 let, 31-60 let, >61 let. Ani v tomto případě nebyla zjištěna souvislost mezi rozložením rezistentních kmenů v těchto věkových kategoriích. K podobnému závěru vedlo i testování závislosti výskytu rezistence a pohlavím pacientů (**Tabulka 14**).

3.1.5 Půdní izoláty

3.1.5.1 Stanovení přítomnosti azolové rezistence a MIC

Veškeré půdní izoláty z ekologického zemědělství (EKO; n = 150) jsou uvedeny v **Příloze 3.1**. V **Příloze 3.2** jsou pak všechny půdní izoláty ze zemědělství, kde jsou užívány azolové fungicidy (AZOL; n = 150). Všechny půdní kmeny *A. fumigatus* byly identifikovány pouze na základě morfologických znaků (typický vzhled kolonií) a fyziologických vlastností (termotolerance – růst při 48 °C).

Z těchto 300 kmenů byla na počátku studie polovina vyhodnocena jako potenciálně rezistentní vůči azolům na základě izolačních technik, kdy izolační médium pro rezistentní kmeny obsahovalo ITR v koncentraci odpovídající klinickému breakpointu pro toto léčivo. Avšak kvůli metodickým problémům s pH média (viz **kapitola 3.1.2**) zjištěným při testování klinických kmenů, bylo předpokládáno, že izoláty vyhodnocené jako rezistentní, byly pravděpodobně vyhodnoceny nesprávně (falešná rezistence). Z každé lokality, tedy z obou typů hospodaření, bylo výsledně vybráno 15 izolátů vyhodnocených screeningem jako rezistentních pro ověření rezistence pomocí metodiky E.Def 9.3 (viz Metodika, **kapitola 2.5**). Výsledky tohoto testování pro jednotlivé izoláty a 4 ATM (ITR, VOR, POS a ISA) jsou uvedeny v **Přílohách 3.1 a 3.2**.

Celkem tedy u 150 testovaných půdních izolátů jsou zapsány přesné hodnoty MIC (mg/l) ke každému ze 4 azolových ATM. Pouze u vzorků, u kterých nebyl růst mycelia při testování MIC vůbec pozorován, případně pokud se jednalo o tak nízkou hodnotu, že bylo obtížné ji stanovit a bylo naprosto zřejmé, že je izolát citlivý vůči ATM – bylo do tabulky místo číselných hodnot zapsáno jen písmeno C (Citlivý).

Souhrnná data pro jednotlivé lokality shrnuje **Tabulka 15**. Ke všem 4 ATM byl z dat MIC jejich izolátů zaznamenán geometrický průměr a rozmezí jejich hodnot. Co se týče rozlišení hodnot geometrického průměru MIC obou typů polí, hodnoty polí v ekologickém zemědělství byly mírně vyšší než hodnoty polí, kde byly azolové fungicidy využívány.

Deskriptivní statistické zpracování získaných půdních MIC proběhlo u všech testovaných ATM, tedy ITR, VOR, POS a ISA. Uvedena je minimální hodnota MIC, aritmetický průměr, geometrický průměr, medián, rozptyl a maximální hodnoty MIC izolátů z půdního prostředí. Všechny hodnoty se nachází v **Příloze 7**.

Tabulka 15. Průměrné hodnoty minimální inhibiční koncentrace polních izolátů

Okres	Lokalita	ITR		VOR		POS		ISA	
		Geo. průměr	Rozptyl hodnot	Geo. průměr	Rozptyl hodnot	Geo. průměr	Rozptyl hodnot	Geo. průměr	Rozptyl hodnot
		mg/l	mg/l ²	mg/l	mg/l ²	mg/l	mg/l ²	mg/l	mg/l ²
Kutná Hora	Vlkaneč ¹	0,13	0,00	0,57	0,07	0,08	0,00	0,83	0,05
Kutná Hora	Filipov u Čáslavi ²	0,22	0,02	0,64	0,06	0,12	0,01	1,00	0,14
Louny	Úlovice ¹	0,11	0,00	0,50	0,11	0,06	0,00	0,88	0,05
Louny	Panenský Týnec ²	0,14	0,07	0,59	0,07	0,06	0,01	0,71	0,22
Plzeň	Chrást u Plzně ¹	0,14	0,01	0,58	0,15	0,07	0,00	0,77	0,39
Plzeň	Červený Hrádek u Plzně ²	0,13	0,00	0,64	0,24	0,08	0,01	0,69	0,09
Praha	Ruzyně ¹	0,19	0,02	0,61	0,05	0,12	0,01	1,00	0,19
Praha	Sedlec u Líbeznic ²	0,12	0,01	0,56	0,08	0,06	0,00	0,67	0,10
Tábor	Stoklasná Lhota ¹	0,13	0,07	0,38	0,15	0,07	0,00	0,34	0,17
Tábor	Dolní Hořice ²	0,15	0,06	0,47	0,13	0,07	0,00	0,77	0,20

¹ EKO, ekologická pole; ² AZOL, pole, u nichž byly užívány azolové fungicidy

V Tabulce 16. byly souhrnně analyzovány hodnoty všech 10 polí, která byla rozřazena do dvou skupin, dle typu hospodaření: EKO a AZOL. Výsledek byl překvapující, protože vzhledem k tomu, že byly na polích užívány fungicidy po dobu několika let, byly očekávány vyšší hodnoty u AZOL polí. Hodnoty EKO polí byly ale buď identické, nebo byly téměř stejně vysoké jako u AZOL polí. To platilo pro všechna testovaná ATM. Největší rozdíl hodnot byl zaznamenán u VOR.

Z těchto dat byly dále vypočteny následující hodnoty: minimum, aritmetický průměr, geometrický průměr, rozptyl, medián, maximum a rozmezí hodnot (viz **Příloha 8**).

Tabulka 16. Průměrné hodnoty minimální inhibiční koncentrace (geometrický průměr) azolových derivátů polních izolátů podle typů polností

Typ pole	Itrakonazol	Vorikonazol	Posakonazol	Isavukonazol
	mg/l	mg/l	mg/l	mg/l
EKO	0,14	0,51	0,08	0,73
AZOL	0,15	0,58	0,08	0,75

EKO, ekologická pole; AZOL, pole, u nichž byly užívány azolové fungicidy

Hodnota žádného ze 150 izolátů, původně označených za rezistentní, ve výsledku nepřerostla hraniční hodnoty breakpointu pro rezistenci. Rezistence tedy nebyla u půdních izolátů prokázána i přes to, že byla část vzorků testovaná opakovaně. Tyto výsledky byly potvrzeny i další nezávislou metodikou, tzv. diskovou, kdy byly kmeny inokulovány jednotlivě na Petriho misky, na jejichž médium byly umístěny 3 tablety obsahující buď ITR, VOR nebo POS. A dle toho, jak velké byly inhibiční zóny, byly zaznamenány hodnoty nárůstu. Žádný z izolátů ale nenarostl do dostatečné blízkosti tak, aby mohl být prohlášen jako rezistentní.

Důvodů, proč nebyl žádný rezistentní půdní izolát nalezen, je několik. Zprvé mohla mít velký vliv již zmíněná problematika citlivosti ATM na pH růstového média, kdy při snížení její hodnoty z neutrální na hodnotu nižší, kyselejší, mohou ATM ztrácet svoji účinnost (Danby *et al.*, 2012; Te Dorsthorst *et al.*, 2004; Wiederhold, 2021).

Dalším velkým zjištěním, zda byly z testovaných půdních vzorků nalezeny i izoláty rezistentní vůči ATM, bylo to, že v jiných studiích, jako je například (Barber *et al.*, 2020), bylo použito mnohonásobně vyššího počtu půdních izolátů. Namísto stovek vzorků, studie obsahovala tisíce vzorků. Tím byla zvýšena pravděpodobnost izolace nejen citlivých aspergilů z půdních vzorků, ale také pár rezistentních. Rezistence vůči azolovým derivátům se pohybovala mezi 1-3 %. Nepoměr rezistentních a citlivých vzorků je tedy velmi výrazný. Při takto nízké prevalenci je nález rezistentních kmenů tím pádem komplikovanější, jelikož je potřeba izolovat a otestovat citlivost na ATM velkého množství půdních vzorků. Z toho plyne, že pravděpodobnost výskytu půdních ARAf z 300 testovaných izolátů, byla poměrně nízká. Tento vliv, společně s vlivem problematiky citlivostí ATM na pH při postupu testování rezistence, znesnadnily možnost rezistentní izoláty získat.

3.2 Molekulární analýza

3.2.1 Sekvenace genu *cyp51A* a analýza nesynonymních mutací

Z celkového počtu 301 kmenů z klinického prostředí bylo odhaleno 19 *ARAF* kmenů rezistentních alespoň k jednomu, nebo více testovaným azolovým ATM. U těchto kmenů byl sekvenován gen *cyp51A*, v němž se nejčastěji nachází mutace způsobující rezistenci.

U 8 z 19 kmenů byly nalezeny bodové mutace, tedy u 42,11 %. U 11 ze vzorků (57,89 %) nebyla mutace v testované oblasti sekvence nalezena a azolová rezistence bude v těchto případech způsobena nestudovanými mechanismy nezávislými na genu *cyp51A*.

Podrobný seznam všech rezistentních kmenů s typy zjištěných mutací a dalšími údaji spojenými s těmito kmeny je uveden v **Tabulce 17**.

V **Grafu 2** a **Tabulce 18** pak můžeme souhrnně vidět procentuální zastoupení 5 mechanismu rezistence (označených A až E) podle mechanismu (rezistence závislá či nezávislá na *cyp51A*) nebo zjištěné mutace.

Nejvyšší procentuální zastoupení měl typ A, což byly rezistence, které nebyly závislé na *cyp51A*. Z mutací, nacházejících se v genu *cyp51A*, se nejčastěji vyskytoval typ B neboli bodová mutace L98H, identifikovaná u čtyř izolátů. Mutace L98H je běžně spojena i se změnou v promotoru genu ($TR_{34}/L98H$), který ale nebyl sekvenován. Mutace Y121F/T289A se vyskytla u dvou izolátů. S těmito dvěma typy mutací je vždy spojena i mutace v promotorové oblasti genu ($TR_{46}/Y121F/T289A$), avšak tato jeho část sekvenována v této práci nebyla. Dále jeden izolát nesl bodové mutace F46Y, M172V a E427K a poslední izolát nesl tytéž bodové mutace, ale navíc měl i mutace N2488T a D255E.

Tabulka 17. Seznam klinických azol-rezistentních izolátů *Aspergillus fumigatus* odhalených v této práci

ID vzorku	CCF	Mutace v <i>cyp51A</i>	ITR	VOR	POS	ISA	Substrát	Město	Věk	Pohlaví	Primární onemocnění
CF1775/19	6649	-	>8	8	0,5	16	Sputum	Rohatec	17	Ž	CF s plicními projevy
CF1827/19	6650	-	>8	4	0,5	8	Sputum	Touškov	12	M	CF s plicními projevy
MY20219/19	6651	F46Y/M172V/N248T/ D255E/E427K	>8	4	0,5	8	Sputum	Osek	69	M	Plicní transplantát
MY21237/19	-	L98H	>8	4	0,5	8	Sputum	Praha	17	Ž	Jiné vrozené vady DS
MY22308/20	6675	-	>8	4	0,5	8	Sputum	Hrádek nad Nisou	30	M	CF s plicními projevy
NPL831/21A	6676	-	0,25	>16	0,125	>16	BAT	Praha	68	Ž	Pneumonie
NPL1362/21	6674	-	0,25	8	0,5	>8	ETA	Praha	67	Ž	Ateroskleróza končetinových tepen,
NPL1370/21	-	-	>8	2	0,25	8	ETA	Praha	67	Ž	Ateroskleróza končetinových tepen,
NPL695/20	6653	-	>32	2	0,25	4	ETA	Příbram	77	M	Bolesti bederní krajiny
NPL705/19A	6440	L98H	>32	4	0,5	8	BAL	Praha	40	M	Pneumonie
NPL886/21	6654	L98H	>8	4	0,25	8	ETA	Praha	65	M	COVID-19
NPL934/21	6655	L98H	>8	4	0,25	8	Mozkový absces	Praha	65	M	COVID-19
CLIS12207/20	6656	-	0,25	2 ^{1*}	0,25 ^{2*}	2 ^{3*}	Sputum	Český Těšín	35	Ž	B-buněčný lymfom NS
CLIS2124/21	6600 6657	TR₄₆/Y121F/T289A	>8	32	2	32	Sputum	Karviná	75	Ž	COVID-19
CLIS3840/20	6658	F46Y/M172V/E427K	0,25	1	0,25	2	Výtěr z ucha	Ostrava	43	Ž	OMA, akutní zánět středního ucha
CLIS4313/21	6601	TR₄₆/Y121F/T289A	>8	32	0,5	32	Sputum	Ostrava	66	Ž	Flegmóna prstů
CLIS6024/20	6677	-	>8	2 ^{1*}	0,5	4	Stěr z rány	Bruntál	43	M	Jiná určená poranění více částí těla
CLIS6494/20	6659	-	0,25	2 ^{1*}	0,25 ^{2*}	2 ^{3*}	Výtěr z ucha	Ostrava	45	M	Otitis externa
CLIS9306/20	6678	-	0,5	1	2	>16	Sputum	Ostrava	72	M	Chronická lymfocytární leukemie

CCF, Culture Collection of Fungi; ITR, itraconazol; VOR, vorikonazol; POS, posakonazol; ISA, isavuconazol; M, muž; Ž, žena;

BAT, bronchoalveolární tekutina; ETA, endotracheální aspirát; CF, cystická fibróza, DS, dýchací soustava; OMA, acute otitis media

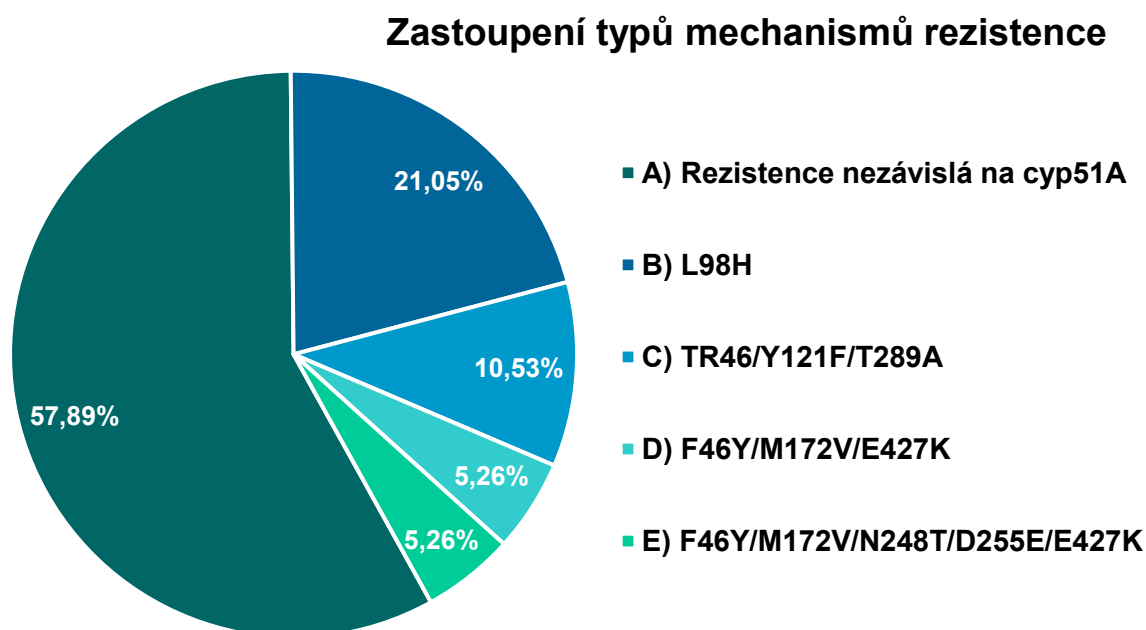
*ATU (Area of Technical Uncertainty), hodnota citlivosti nejistého zařazení

1 V některých klinických situacích (formy neinvazivních infekcí) lze VOR použít za předpokladu, že je zajištěna dostatečná expozice

2 MIC hodnota 0.25 mg/l je o jedno ředění nad breakpointem citlivosti v důsledku překrývajících se wild-type a non-wild type populací

3 V praxi je doporučeno zaslat izolát do referenční laboratoře pro sekvenaci genu *cyp51A* a confirmaci MIC hodnot

Graf 2. Procentuální distribuce pěti selektovaných typů molekulárních mechanismů rezistence azol-rezistentních izolátů *Aspergillus fumigatus*



Tabulka 18. Rozdělení pěti selektovaných molekulárních mechanismů azolové rezistence 19 klinických izolátů *Aspergillus fumigatus*

Molekulární typ rezistence	Typ rezistence nebo mutace	Počet pacientů	Počet izolátů	Zastoupení typu rezistence
A	Rezistence nezávislá na <i>cyp51A</i>	10	11	57,89 %
B	L98H	3	4	21,05 %
C	TR ₄₆ /Y121F/T289A	2	2	10,53 %
D	F46Y/M172V/E427K	1	1	5,26 %
E	F46Y/M172V/N248T/D255E/E427K	1	1	5,26 %
Celkem		17	19	100 %

V **Tabulce 19** lze vidět vůči kolika ze 4 testovaných ATM (ITR, VOR, POS a ISA) byla prokázána rezistence současně a jaký typ rezistence se u daných kombinací rezistencí vyskytuje. Tedy vůči jednomu, dvěma, třem, nebo čtyřem ATM zároveň. K počtu ATM jsou přiřazena seskupení typů mutací, která jsou zmíněna v **Tabulce 9**.

Rezistence vůči ISA se vyskytovala nejčastěji, a to u všech 19 izolátů. Naopak rezistence k ITR se vyskytovala pouze v případě, že byla rezistence i vůči všem 3 ostatním ATM, a celkově jen u 13 izolátů. Vůči 3 ATM zároveň se rezistence vyskytovala jen v případě kombinace VOR, POS a ISA. Pokud se vyskytovala rezistence ke 2 ATM současně, vždy to byla kombinace s ISA, a to buď s VOR, nebo s POS. Počet rezistentních izolátů vůči VOR i POS byl celkově stejný (n = 17).

Co se týče molekulárních typů, tak nejpočetnější typ A byl spojen s rezistencí ke 2, 3 a 4 ATM zároveň. U rezistence k 1 ATM se vyskytoval typ D. U izolátů rezistentních vůči 4 ATM současně se vyskytovaly všechny typy mutací kromě typu D.

Tabulka 10. Distribuce rezistence vůči jednomu až čtyřem azolovým antimykotikům současně u azol-rezistencích izolátů *Aspergillus fumigatus*

Počet ATM	Počet izolátů	ITR	VOR	POS	ISA	Molekulární typ rezistence
1ATM	1	-	-	-	1	D
2ATM	2	-	1	1	2	2×A
3ATM	3	-	3	3	3	3×A
4ATM	13	13	13	13	13	6×A, 4×B, 2×C, 1×E
Celkem	19	13	17	17	19	19

ATM, antimykotikum; ITR, itraconazol, VOR, vorikonazol; POS, posakonazol

4. Diskuze

4.1 Prevalence azolové rezistence v klinickém prostředí v České republice

Aspergillus fumigatus je celosvětově rozšířený půdní druh, který je nejčastějším původcem oportunních infekcí mezi vláknitými houbami. Invazivní aspergilóza, která představuje život ohrožující infekci, postihuje převážně pacienty po transplantacích, nebo jinak immunosuprimované jedince (Latgé, 1999, 2001; Patterson *et al.*, 2016; Walsh *et al.*, 2008). V mnoha zemích je v současnosti pozorován extrémní nárůst rezistence k azolovým derivátům, které zastávají první linii léčby IA (Astvad *et al.*, 2014; Langfeldt *et al.*, 2022; Lestrade *et al.*, 2019).

V České republice byly již dříve detekovány 2 izoláty *A. fumigatus*, které měly zvýšenou hodnotu MIC azolových derivátů (Lockhart *et al.*, 2011). Avšak prevalence azolové rezistence na větším vzorku klinických izolátů doposud stanovena nebyla, přestože je znalost lokální situace určující pro léčebná schémata.

Aspergilózu nejčastěji způsobuje druh *A. fumigatus* (Latgé, 1999). Mimo něj však toto onemocnění způsobují i další méně běžné druhy, taktéž označované za kryptické (např. *A. lentulus*, nebo druhy z komplexu *A. viridinutans*), jejichž prevalence v klinickém materiálu se může pohybovat od 11 do 19 % (Balajee *et al.* 2009, Alastruey-Izquierdo *et al.* 2014, Negri *et al.* 2014, Sabino *et al.* 2014, Hubka *et al.* 2018). Na rozdíl od *A. fumigatus*, tyto druhy někdy vykazují vůči azolovým derivátům tzv. přirozenou rezistenci, která je pro mykopatogeny vrozená. Hodnoty rezistence k ATM jsou tím pádem u těchto kryptických druhů primárně zvýšené. Kdežto u *A. fumigatus* jsou zvýšené hodnoty MIC druhotně získané při vystavení kmenu daným ATM (Lyskova *et al.*, 2018). Identifikace na úroveň druhu, která je u kryptických druhů obtížná, se na řadě klinických pracovišť neprovádí. Přitom je to spolu se zjištěním citlivosti k ATM (Alastruey-Izquierdo *et al.*, 2014; Perlin *et al.*, 2017; Rivero-Menendez *et al.*, 2016) jeden z předpokladů pro správnou volbu antimykotické léčby, protože profily antifungálních citlivostí jsou často druhově specifické (Nedel & Pasqualotto, 2014).

Prvním ze dvou cílů diplomové práce bylo zjistit prevalenci azolové rezistence v ČR v klinickém prostředí. Pro tento účel bylo během 3 let shromážděno celkem 301 klinických izolátů ze tří klinických pracovišť. Všechny poskytnuté izoláty byly identifikovány pomocí molekulárně-genetických metod pro ověření správnosti identifikace a odlišení kryptických druhů. Pro testování citlivosti vůči azolům byly izoláty nejdříve testovány pomocí metodiky na screeningových destičkách protokolem E.Def 10.1 (Guinea *et al.*, 2019; Jorgensen *et al.*,

2020). Touto metodou bylo selektováno 122 kmenů rezistentních vůči alespoň jednomu z testovaných azolů (ITR, VOR a POS). U dalších 51 kmenů byly výsledky testování nejisté, proto byly posléze společně testovány přesnější mikrodiluční metodou E.Def 9.3 (Lucio *et al.* 2022), kterou byly zjištěny přesné hodnoty MIC u ITR, VOR, POS a ISA (Arendrup *et al.*, 2016; Jorgensen *et al.*, 2020). Touto metodou bylo výsledně stanoveno 19 izolátů jako azol-rezistentních. Veškeré izoláty byly rezistentní vůči ISA. Dále 17 ARAf izolátů bylo rezistentních k VOR, stejné množství k POS a 15 izolátů k ITR.

Lékem první volby nejen v ČR pro léčbu IA je VOR, případně ISA (Maertens, 2004; Maertens *et al.*, 2016; Maertens *et al.*, 2021; Ullmann *et al.*, 2018). Pokud je prevalence rezistence vyšší než 10 %, je doporučeno přistoupit ke změně empirické nebo profylaktické léčby. Pro závěry vedoucí k této změně by mělo být na daném území testováno alespoň 100 izolátů *A. fumigatus* (Verweij *et al.*, 2015). V této diplomové práci byla stanovena hodnota prevalence azolové rezistence v klinickém materiálu v ČR na 6,3 % z celku 301 klinických izolátů *A. fumigatus*. Získanou hodnotu 6,3 % lze tedy považovat za mírně alarmující, není však důvodem pro změnu léčebných postupů (Ullmann *et al.*, 2018; Verweij *et al.*, 2015).

Situace v zahraničí byla zrekapitulována v úvodu této práce, kde byl uveden přehled prevalencí azolové rezistence vybraných států. V Evropě je problematika studována nejvíce. V porovnání s 10 vybranými evropskými státy (**Tabulka 1**), měly pouze dva z nich vyšší hodnotu než ČR, konkrétně Nizozemí s hodnotou prevalence 11,3 % a Turecko s hodnotou 10,2 %. Podobná situace jako v ČR byla zaznamenána v Itálii s prevalencí rezistence u *A. fumigatus* 6,25 % (Lazzarini *et al.*, 2016). Jedinou mimoevropskou zemí, která předčila hodnotu ČR bylo Japonsko, kde míra rezistence dosáhla 12,7 % (**Tabulka 2**) (Tsuchido *et al.*, 2019). Z toho vyplývá, že je prevalence rezistence v ČR oproti jiným zemím světa nadprůměrná. Toto zjištění přispívá k tomu, aby byla situace azolové rezistence v klinickém prostředí dále podrobněji studována.

4.2 Vznik rezistence v půdním prostředí a její šíření

Jsou dva způsoby vzniku azolové rezistence. Prvním je vznik azol-rezistentních kmenů v organismu pacienta, například při profylaxi nebo dlouhodobé léčbě azolovými medikamenty. S tímto typem rezistence jsou spojovány specifické mutace v genu *cyp51A*, např. G54, G138, M220 anebo G448 (Arendrup *et al.*, 2010; Howard *et al.*, 2006; Rivero-Menendez *et al.*, 2016). Častější je však vznik rezistence v zemědělském prostředí, kde jsou celosvětově ve velkém množství užívány azolové fungicidy k ochraně plodin proti plísním (Rhodes *et al.*, 2022; Zhang *et al.*, 2021). Při současné intenzifikaci zemědělské produkce však většina států nemůže z ekonomických důvodů přistoupit na bezvýhradné užívání neazolových fungicidů (Camps *et al.*, 2012b; Tullio, 2012). Zároveň není prevalence azolové rezistence ve vnějším prostředí bohužel ve většině států vůbec stanovena a často není ani nastíněna její situace.

Šíření rezistentních kmenů je velmi jednoduché a efektivní. Teprve nedávno byla prokázána souvislosti mezi rezistentními kmeny z vnějšího prostředí a kmeny z pacientů s aspergilózou. Předpokládá se, že se pacienti nakazí kmeny, u nichž byla rezistence přítomna již ve vnějším prostředí (Ener *et al.* 2022, Rhodes *et al.* 2022b) (c(Berger *et al.* 2017, Buil *et al.* 2019, Garcia-Rubio *et al.* 2020, Risum *et al.* 2022, Zhou *et al.* 2022)itace). Bylo totiž prokázáno, že s rezistencí vznikající v půdním prostředí jsou spojeny specifické mutace, které kromě bodových mutací v genu zahrnují i změny TR promotoru genu *cyp51A*, např. TR₄₆/Y121F/T289A (Garcia-Rubio *et al.* 2020, Chen *et al.* 2020, Nywening *et al.* 2020).

Původ vzniku rezistence izolátů, u kterých je pozměněna TR promotoru genu *cyp51A*, je téměř výlučně jen ve vnějším prostředí, byla nejčtenější i v této diplomové práci. Celkem u 4 z 8 izolátů, byla nejčastěji detekována mutace TR₃₄/L98H, která vzniká při vystavení kmenů azolovým fungicidům např. v zemědělství (Meis *et al.* 2016, Abdolrasouli *et al.* 2018, Riat *et al.* 2018, Risum *et al.* 2020, Verweij *et al.* 2020, Rhodes *et al.* 2022b, Rhodes *et al.* 2022a)

. Právě mutace, u nichž byla zjištěna mutace v genu *cyp51A* pocházející z vnějšího prostředí, neslo 6 z 8 ARAf izolátů této diplomové práce. Zmíněných 6 izolátů zahrnovalo kromě zmíněných čtyř TR₃₄/L98H, ještě další dva izoláty, které mělytaktéž nesynonymní muatce podpořen TR promotoru %-. Dá se tedy říci, že na celkové míře azolové rezistence na území ČR v klinickém materiálu se minimálně měrou 75 % podílí užívání azolových fungicidů v zemědělství.(Abdolrasouli *et al.* 2018, Riat *et al.* 2018, Risum *et al.* 2020, Rhodes *et al.* 2022b, Rhodes *et al.* 2022a)

Pro prokázání jasných souvislostí mezi kmeny *A. fumigatus* z klinického a půdního prostředí v ČR byl stanoven cíl druhý. Bylo jím zjistit prevalenci azolové rezistence

a převažující molekulární mechanismy rezistence ve vnějším prostředí. Proto byly odebrány vzorky půdy, ze kterých bylo ve výsledku izolováno 300 kmenů *A. fumigatus*. Celkem 150 vzorků pocházelo z běžného zemědělství, kde jsou azolové fungicidy využívány a dalších 150 izolátů bylo z polí ekologického hospodářství. Rezistentní izoláty byly vyselektovány testováním rezistence na Petriho miskách, které obsahovaly médium s ITR. Potvrzení rezistence selektovaných kmenů a zjištění přesné hodnoty jejich MIC pro daná ATM, proběhlo metodou E.Def 9.3, stejně jako u klinických izolátů. Výsledky testování ale neprokázaly ani jediný rezistentní izolát pocházející z půdních vzorků. Prevalenci azolové rezistence a její mechanismy v půdním prostředí tedy nebylo možné detailněji studovat. To však téměř s jistotou neznamená, že se rezistentní izoláty v prostředí v ČR nenachází.

Důvodem, proč v prvním kroku bylo vyselektováno 150 zdánlivě rezistentních izolátů, bylo pochybení v postupu výroby média. Jak již bylo zmíněno ve výsledcích, azolové deriváty jsou citlivé na pH média a při přesažení neutrálních hodnot pH média do hodnot kyselých, ztrácí azoly svoji účinnost (Te Dorsthorst *et al.* 2004, Danby *et al.* 2012, Wiederhold & Verweij 2020, Wiederhold 2021). Dle postupu protokolů E.Def 9.3 a 10.1 u klinických i půdních izolátů bylo pH média sice při výrobě destiček měřeno. Přesto při selekci kmenů pro měření hodnot MIC k okyselení média s obsahem ITR mohlo dojít, protože bylo pH měřeno pouze v průběhu jeho výroby, a ne ve finálním kroku. To vedlo k falešnému zachycení izolátů, které byly v prvním kroku nesprávně vyhodnoceny jako rezistentní.

Podobný problém nastal i v klinické části studie, kdy prvotní screening zachytil falešně vysoký počet kmenů ($n = 173$) jako azol-rezistentních metodou E.Def 10.1, ale výsledný počet rezistentních kmenů zjištěných metodou E.Def 9.3 byl mnohem nižší ($n = 19$). Doporučením pro následující studium azolové rezistence je pH média u obou zmíněných testování velmi bedlivě sledovat a průběžně testovat.

Jedním z důvodů, proč nebyl ze zkoumaných vzorcích půdy izolován žádný rezistentní kmen, může být i výsledný počet izolovaných kmenů. Ve vnějším prostředí jsou totiž rezistentní kmeny izolovány pouze v 0.5 až v 5 % případů. Většina studií, zabývajících se výskytem rezistentních kmenů, však hlásí výskyt mezi 1 až 3 % CFU (Berger *et al.*, 2017; Ener *et al.*, 2022; Vermeulen *et al.*, 2013; Verweij *et al.*, 2020). Proto se pro stanovení prevalence v prostředí často volí zkoumaný počet izolátů v rámci tisíců. Vzhledem k tomu, že bylo v diplomové práci výsledně zvoleno pouze 300 půdních izolátů, pravděpodobnost výskytu rezistentních kmenů byla v takto omezeném počtu nízká. Je proto možné vyslovit doporučení pro budoucí studie, aby bylo testováno a izolováno větší množství kmenů a vzorků, a tím pravděpodobnost zachytu rezistentních kmenů zvýšit.

K porovnání genotypů rezistentních izolátů a jejich mutací mezi prostředími, dle kterých by se dala odhadovat jejich příbuznost, bohužel nebyl shromážděn vhodný materiál. Důraz byl tedy kladen na prevalenci v klinickém prostředí, kterou se podařilo určit jako 6,3%, a dále na molekulární podklad rezistence u azol-rezistentních kmenů (viz další kapitola). Vzhledem k celosvětově se zvyšujícímu počtu případů IA způsobených azol-rezistentními izoláty *A. fumigatus* je však doporučeno prevalenci rezistence v ČR dále sledovat (Husain & Camargo 2019, Arastehfar *et al.* 2021, Bartoletti *et al.* 2021, Prattes *et al.* 2021). Testování citlivosti na azolová ATM by mělo zůstat neoddělitelnou součástí běžných postupů léčby pacientů, u kterých byl *A. fumigatus* izolován.

4.3 Molekulární mechanismy rezistence

Všechny triazolové deriváty cílí na regresi produkce ergosterolu. Ten je pro membrány buněk hub esenciální a působením azolů tedy dojde k jejímu narušení. To je pro patogen letální (Becher & Wirsal, 2012). Azolová rezistence je ve většině případů způsobena substitucemi AMK v genu *cyp51A*. Různé typy molekulárních mechanismů rezistence mají odlišné charakteristické vlastnosti. Díky tomu, že způsobů změny sekvence je více, tak je často možné vyvodit z jakého prostředí původ vzniku mutace pochází. Dále se dá odhadnout i citlivost k ATM. Dalším účelem diplomové práce bylo proto podrobit všechny ARAf izoláty molekulární analýze na přítomnost mutací v genu *cyp51A*. Pro tento účel byly získány sekvence genu *cyp51A*, a celkově u 8 z 19 izolátů byly nalezeny mutace vedoucí k substitucím AMK.

U 11 izolátů (57,9 % z celku ARAf) mutace nalezeny nebyly. Tyto izoláty byly rezistentní vůči buď 2, 3 nebo 4 ATM současně, takže jejich profily rezistence byly rozmanité. V různých studiích byl zjištěn procentuální podíl rezistentních izolátů, které nenesly mutace v genu *cyp51*, od 19,7 % až do 43 % (Bueid *et al.*, 2010; Bueid *et al.*, 2012; Risum *et al.*, 2022). V této práci bylo tedy v porovnání s danými studiemi zjištěno vyšší procento izolátů, které nejsou dependentní na genu *cyp51A*, než je obvyklé. Je ale potřeba zmínit, že existují i studie, kde byla více jak polovina izolátů, které neměly mutaci v *cyp51A*.

Známými mechanismy rezistence, které nemají podklad v mutacích přítomných v genu *cyp51A*, jsou například: zvýšená exprese genu *cyp51A* nebo efluxních pump vypuzujících azolová ATM ven z buňky. Dalšími mechanismy jsou mutace v genu *hapE*, nebo exogenní import cholesterolu do membrán patogenu (Arendrup *et al.*, 2010; Camps *et al.*, 2012a; Hortschansky *et al.*, 2007; Chen *et al.*, 2020; Xiong *et al.*, 2005). Nedávná studie z Nizozemí odhalila, že mechanismy rezistence nacházející se mimo gen *cyp51*, nabývají na stále větším významu (Buil *et al.*, 2019). Nejen použitím CRISPR-Cas9 technologie bylo prokázáno, že

bodové mutace v jiných genech, než je v *cyp51*, mohou také způsobit azolovou rezistenci (Ballard *et al.*, 2019). V poslední době byl též objeven mechanismus dependentní na Ca²⁺ signální dráze calcineurin-CrzA (Li *et al.*, 2019). Všechny tyto recentní studie ukazují, že je třeba se i nadále mechanismy azolové rezistence, které se netýkají změn v *cyp51A*, zabývat.

Azolová rezistence, která nevzniká u pacientů léčených azolovými deriváty většinou neobsahuje jen samotné nesynonymní mutace. Izoláty u kterých rezistence vzniká ve vnějším prostředí, jsou nacházeny TR části promotoru genu *cyp51*, vedoucí k nadměrné expresi genu *cyp51A*. Tyto repetice se vyskytují buď společně s nesynonymními mutacemi v genu *cyp51A*, nebo bez nich. Mezi tyto mutace vzniklé v prostředí náleží obě kosmopolitně nejčastější mutace TR₃₄/L98H a TR₄₆/Y121F/T289A (Garcia-Rubio *et al.* 2020, Chen *et al.* 2020, Nywening *et al.* 2020). Izoláty s těmito mutacemi s původem vzniku ve vnějším prostředí byly detekovány nejčastěji i v této diplomové práci. Nejčastěji detekovanou mutací byla TR₃₄/L98H (n = 2), která je celosvětově nejčastěji identifikovanou mutací u ARAf z klinických vzorků i vzorků z vnějšího prostředí (až 75 % případů). Je spojena s rezistencí především vůči VOR a ITR, může ale způsobit rezistenci vůči všem triazolovým léčivům (pan-azol rezistentní). Kombinace bodové mutace L98H s mutací v promotoru genu TR₄₆ způsobuje, že dochází k mnohem vyšší expresi genu *cyp51A*. Při výskytu izolované mutace v promotoru TR₄₆ bez mutace L98H je exprese mnohonásobně nižší (Hagiwara *et al.* 2016, Hagiwara 2020)(Howard *et al.*, 2009; Chowdhary *et al.*, 2013; Mellado *et al.*, 2001; Verweij *et al.*, 2007). V této práci se zmíněná mutace vyskytovala u poloviny ARAf izolátů, tedy u 4 z 8 rezistentních klinických izolátů, u kterých byly nalezeny nesynonymní mutace. Všechny izoláty s touto mutací byly rezistentní vůči všem 4 zkoumaných ATM.

Dále byla u 2 z 8 ARAf izolátů s nesynonymními mutacemi nalezena mutace, jejíž původ vzniku je také ve vnějším prostředí (Hof 2008, Snelders *et al.* 2009) (Chowdhary *et al.* 2014, Burks *et al.* 2021, Fraaije *et al.* 2021). Tato mutace je také často nacházena mezi klinických kmeny, kde její nález poukazuje na to, podobně jako u TR₃₄/L98H, že se pacient infikoval již rezistentním kmenem již dříve z vnějšího prostředí. Takže rezistence nevznikla v průběhu léčby. Ve studiích z řady dalších států je detekována mutace TR₄₆/Y121F/T289A jen o něco méně častěji než u předchozího mechanismu. To odpovídá míře, výskytu TR₄₆/Y121F/T289A v této práci, protože bylo zastoupení izolátů nesoucích zmíněnou mutaci s druhou nejvyšší četností (n = 2) (Alvarez-Moreno *et al.*, 2017; Astvad *et al.*, 2014; Montesinos *et al.*, 2014; van der Linden *et al.*, 2013).

Každý ze dvou zbývajících izolátů nesl pouze různé bodové mutace, u nichž se předpokládá vznik v průběhu léčby, tedy přímo v pacientovi léčeném azolovými léčivy. Izolát s bodovými mutacemi F46Y/M172V/E427K byl pan-azol rezistentní. Zajímavostí je, že kmen

ARAF, který nesl stejnou mutaci byl izolován již před zavedením azolových fungicidů, což bylo počátkem 80. let 20. století (Peterson 1992, Maertens 2004).

Poslední rezistentní izolát s detekovanými mutacemi v *cyp51A* byl naopak jako jediný rezistentní vůči 1 ATM, konkrétně ISA a nesl mutaci F46Y/M172V/N248T/D255E/E427K. Výskyt kmenu s touto mutací byl hlášen například ve Francii, v Portugalsku nebo Taiwanu (Pinto *et al.* 2018, Lavergne *et al.* 2019, Hsu *et al.* 2022). Kombinace těchto bodových mutací, jsou spojeny variabilním profilem citlivostí k azolům. Často jsou tyto kmeny s těmito mutacemi citlivé, ale vykazují vyšší hodnoty MIC při srovnání s wild-type kmeny. Vznik této mutace je obecně předpokládán v klinickém prostředí.

Detekce molekulárních mechanismů azolové rezistence má zásadní vliv na pochopení vzniku a šíření azolové rezistence v ČR. Fakt, že pro léčbu aspergilózy existuje minimum alternativních léčiv, představuje klinickou hrozbu, mající za následek zhoršenou prognózu pacientů. Proto je třeba dále sledovat úroveň rezistence v ČR a studovat její molekulární podstatu.

5. Závěr

V posledním desetiletí je zaznamenán zvyšující se počet studií týkajících se kosmopolitně rozšířených vláknitých hub rodu *Aspergillus*. Nejčastějším zástupcem rodu je druh *Aspergillus fumigatus*, který může způsobit oportunní mykózu aspergilózu, která může mít při její invazivní formě vysokou mortalitu (Lestrade *et al.* 2019b). Azolová ATM jsou v léčbě aspergilózy takřka nenahraditelná. To představuje riziko selhání léčby, které může nastat při komplikacím způsobeným rezistencí k ATM. Současným problémem je totiž extrémní nárůst počtu ARAf kmenů, které nereagují na azolová léčiva. Zároveň se zvyšuje počet studií potvrzujících výskyt ARAf kmenů i ve vnějším prostředí, například v agrikultuře, ve které jsou azolové fungicidy taktéž esenciální.

V České republice byly již dříve izolovány dva ARAf kmeny, ale situace azolové rezistence doposud v ČR stanovená nebyla. Z toho důvodu bylo prvním cílem této diplomové práce zjistit prevalenci azolové rezistence v klinickém materiálu. Ze tří klinických institucí bylo v letech 2019 až 2021 shromážděno 301 izolátů *A. fumigatus*. Všechny izoláty byly podrobeny testu citlivosti na čtyři nejčastěji užívaná azolová ATM (ITR, VOR, POS a ISA). Pomocí dvou různých protokolů E.Def 10.1 a E.Def 9.3 stanovených komisí EUCAST, bylo nalezeno 19 rezistentních kmenů. Zjištěná prevalence azolové rezistence v ČR byla stanovená na 6,3 %. Tato hodnota se dá považovat za mírně alarmující.

Jelikož hodnota prevalence nepřesáhla 10 %, není nutné doporučit změnu v terapeutických postupech u pacientů. Ve většině případů aspergilóz je tedy možné zůstat u monoterapie VOR či ISA. Je však nutné brát v potaz, který typ aspergilózy je pacientovi diagnostikován, protože různé typy aspergilózy mají odlišná léčebná schémata viz kapitola 1.5. Zároveň je samozřejmě potřeba dbát na individuální přístup, a to především k rizikovým pacientům s oslabeným imunitním systémem a komorbiditami. Proto je nutné v klinické sféře pokračovat ve studiu celkové situace azolové rezistence v ČR. Tato situace se může dynamicky měnit, takže je vhodné ji nadále monitorovat. Z toho vyplývá, že by bylo vhodné ve zdravotnických laboratořích zavést rutinní testování citlivosti k azolovým ATM pomocí metodiky E.Def 9.3 u klinických vzorků *A. fumigatus*. Epidemiologickou situaci je třeba kontinuálně sledovat a v případě zjištěné změny včas reagovat, a zavést opatření.

Způsoby vzniku rezistence se vyznačují odlišnými typy mutací a kmeny s různými mutacemi se zároveň odlišuje profily citlivostí k ATM. Existují dva způsoby původu rezistence. Prvním je vznik v klinickém prostředí při léčbě pacientů azolovými ATM. Poměrně nedávno bylo také potvrzeno, že ke druhému způsobu vzniku rezistence vede nadměrné užívání azolových fungicidních přípravků. Právě tento způsob vzniku rezistence ve vnějším prostředí

představuje hlavní riziko, přičemž azolové fungicidy jsou užívány celosvětově. V roce 2022 byl také potvrzen přenos mutací z vnějšího do klinického prostředí, což velmi přiblížilo chápání šíření mechanismů azolové rezistence.

U všech klinických ARAf izolátů byl sekvenován gen *cyp51A*. Výsledně byly nalezeny mutace podmiňující rezistenci u 8 z 19 izolátů. Vzhledem k tomu, že se ve většině studií pohybuje počet izolátů ARAf, které nenesly mutace v genu *cyp51*, mezi 19,7-43 %, je počet izolátů v diplomové práci odpovídající 57,89 %, poměrně vysoký. Avšak mechanismů rezistence, která není způsobena změnami v *cyp51A*, poslední dobou přibývá (Arastehfar *et al.* 2021, Ener *et al.* 2022, Chen *et al.* 2022, Rhodes *et al.* 2022b, Risum *et al.* 2022). Proto by bylo vhodné v následujících studiích testovat také tyto mechanismy.

Celkem byly nalezeny čtyři typy mutací. Dvě nejčastěji detekované mutace TR₃₄/L98H a TR₄₆/Y121F/T289A, uvedené v diplomové práci, jsou zároveň také celosvětově nejčastěji identifikované, a to jak v klinickém, tak i v půdním prostředí (Chen *et al.* 2016, Meis *et al.* 2016, Alvarez-Moreno *et al.* 2017, Wang *et al.* 2018, Burks *et al.* 2021). Vznik rezistence je ve vnějším prostředí, kromě bodových mutací mají také většinou mutaci i v promotoru genu (TR₃₄ nebo TR₄₆). Proto má pravděpodobně všech 6 zmíněných mutací původ v půdním prostředí, což ve výsledku představuje většinu vzorků.

Rezistentní vůči všem 4 ATM byl i izolát nesoucí bodové mutace F46Y/M172V/E427K. Stejně substituce AMK společně se dvěma dalšími mutacemi nesl poslední izolát, konkrétně mutace F46Y/M172V/N248T/D255E/E427K. U tohoto izolátu bylo jedinečné, že byl rezistentní pouze vůči 1 ATM – ISA, a k ostatním azolům byl citlivý. Původ rezistence těchto dvou posledních izolátů pramení pravděpodobně z klinického prostředí, kde dochází často ke vzniku rezistence při profylaxi a dlouhodobé léčbě pacientů azolovými ATM (Lavergne *et al.* 2019, Hsu *et al.* 2022). Právě k tomu dochází u izolátů, které nesou určité bodové mutace (např. substituce AMK v pozici G54, G138, M220 apod.) (Chowdhary *et al.* 2015, Chowdhary *et al.* 2017, Hsu *et al.* 2022)

Pro zjištění situace ARAf kmenů ve vnějším prostředí bylo druhým cílem diplomové práce zjistit prevalenci azolové rezistence v půdním prostředí v ČR. Výsledně bylo z 10 polí s různým typem hospodaření izolováno 300 půdních kmenů. Polovina z EKO polí a polovina z AZOL polí. U nich byly získány hodnoty MIC čtyř azolových derivátů. Bohužel však žádný z izolátů nebyl azol-rezistentní. Z tohoto důvodu nebylo možné vztahy mezi kmeny ARAf z obou typů prostředí molekulární studovat. Vzhledem k velkému množství zpracovaných vzorků se ale jedná o přínosný základ pro další komplexnější výzkum.

Je zřejmé, že většina států nemůže přistoupit z ekonomických důvodů v intenzivním zemědělství na bezvýhradné užívání neazolových fungicidů (Alvarez-Moreno *et al.* 2019, Jørgensen *et al.* 2021, Zhou *et al.* 2021). To je hlavním důvodem, proč je třeba zohledňovat místní situaci azolové rezistence nejen ve zdravotnictví, ale současně i na polích. pro zlepšení prognózy V klinické sféře hraje významnou roli včasné podání cílené léčby pacientovi. V tomto ohledu je nutné zavést testování citlivosti klinických kmenů *A. fumigatus* k azolovým ATM za použití vhodné a přesné metodiky. Dále je potřeba rozlišovat kryptické druhy, které mají často jiné profily antifungálních citlivostí. Zároveň je na místě podpořit studie na poli výzkumu nových léčiv, které by mohly azoly alespoň částečně nahradit. Léčebné postupy aspergilózy je třeba i nadále zlepšovat tak, aby byla snížena mortalita pacientů. Proto je nutný monitoring i regulace užívání azolových derivátů jak v klinickém prostředí, tak i v zemědělství. Všechna tato opatření přispějí k zachování využitelnosti azolových ATM a zároveň i azolových fungicidů.

6. Seznam použité literatury

- Abdolrasouli, A., M. A. Petrou, H. Park, *et al.* 2018. Surveillance for Azole-Resistant *Aspergillus fumigatus* in a Centralized Diagnostic Mycology Service, London, United Kingdom, 1998-2017. *Front Microbiol* **9**: 2234.
- Abdolrasouli, A., J. Rhodes, M. A. Beale, *et al.* 2015. Genomic Context of Azole Resistance Mutations in *Aspergillus fumigatus* Determined Using Whole-Genome Sequencing. *mBio* **6**: e00536.
- Alanio, A., S. Dellièrre, S. Fodil, *et al.* 2020. Prevalence of putative invasive pulmonary aspergillosis in critically ill patients with COVID-19. *The Lancet Respiratory Medicine* **8**: e48-e49.
- Alastruey-Izquierdo, A., L. Alcazar-Fuoli, & M. Cuenca-Estrella. 2014. Antifungal Susceptibility Profile of Cryptic Species of *Aspergillus*. *Mycopathologia* **178**: 427-433.
- Alvarez-Moreno, C., R.-A. Lavergne, F. Hagen, *et al.* 2017. Azole-resistant *Aspergillus fumigatus* harboring TR34/L98H, TR46/Y121F/T289A and TR53 mutations related to flower fields in Colombia. *Scientific Reports* **7**: 45631.
- Alvarez-Moreno, C., R.-A. Lavergne, F. Hagen, *et al.* 2019. Fungicide-driven alterations in azole-resistant *Aspergillus fumigatus* are related to vegetable crops in Colombia, South America. *Mycologia* **111**: 217-224.
- Arastehfar, A., A. Carvalho, J. Houbraken, *et al.* 2021. *Aspergillus fumigatus* and aspergillosis: From basics to clinics. *Stud Mycol* **100**: 100115.
- Arendrup, M. C. 2014. Update on antifungal resistance in *Aspergillus* and *Candida*. *Clinical Microbiology and Infection* **20**: 42-48.
- Arendrup, M. C., G. Kahlmeter, J. Guinea, *et al.* 2021. How to: perform antifungal susceptibility testing of microconidia-forming dermatophytes following the new reference EUCAST method E.Def 11.0, exemplified by *Trichophyton*. *Clinical Microbiology and Infection* **27**: 55-60.
- Arendrup, M. C., E. Mavridou, K. L. Mortensen, *et al.* 2010. Development of azole resistance in *Aspergillus fumigatus* during azole therapy associated with change in virulence. *PLoS One* **5**: e10080.
- Arendrup, M. C., J. Meletiadis, J. W. Mouton, *et al.* 2016. EUCAST technical note on isavuconazole breakpoints for *Aspergillus*, itraconazole breakpoints for *Candida* and updates for the antifungal susceptibility testing method documents. *Clinical Microbiology and Infection* **22**: 571 e571-574.
- Astvad, K. M., R. H. Jensen, T. M. Hassan, *et al.* 2014. First detection of TR46/Y121F/T289A and TR34/L98H alterations in *Aspergillus fumigatus* isolates from azole-naïve patients in Denmark despite negative findings in the environment. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **58**: 5096-5101.
- Balajee, S. A., R. Kano, J. W. Baddley, *et al.* 2009. Molecular identification of *Aspergillus* species collected for the Transplant-Associated Infection Surveillance Network. *Journal of Clinical Microbiology* **47**: 3138-3141.
- Balkis, M. M., S. D. Leidich, P. K. Mukherje, *et al.* 2002. Mechanisms of fungal resistance. *Drugs* **62**: 1025-1040.

- Bartoletti, M., R. Pascale, M. Cricca, *et al.* 2021. Epidemiology of Invasive Pulmonary Aspergillosis Among Intubated Patients With COVID-19: A Prospective Study. *Clinical Infectious Diseases* **73**: e3606-e3614.
- Becher, R., & S. G. Wirsal. 2012. Fungal cytochrome P450 sterol 14 α -demethylase (CYP51) and azole resistance in plant and human pathogens. *Appl Microbiol Biotechnol* **95**: 825-840.
- Berger, S., Y. El Chazli, A. F. Babu, *et al.* 2017. Azole Resistance in *Aspergillus fumigatus*: A Consequence of Antifungal Use in Agriculture? *Front Microbiol* **8**: 1024.
- Bongomin, F., S. Gago, R. Oladele, *et al.* 2017. Global and Multi-National Prevalence of Fungal Diseases—Estimate Precision. *Journal of Fungi* **3**: 57.
- Bowyer, P., C. B. Moore, R. Rautemaa, *et al.* 2011. Azole antifungal resistance today: focus on *Aspergillus*. *Curr Infect Dis Rep* **13**: 485-491.
- Brahm H. Segal, M. D. 2009. Medical progress - Aspergillosis *The New England Journal of Medicine* **34**: 1870-1884.
- Brown, G. D., D. W. Denning, N. A. Gow, *et al.* 2012. Hidden killers: human fungal infections. *Sci Transl Med* **4**: 165rv113.
- Bueid, A., S. J. Howard, C. B. Moore, *et al.* 2010. Azole antifungal resistance in *Aspergillus fumigatus*: 2008 and 2009. *J Antimicrob Chemother* **65**: 2116-2118.
- Bueid, A., E. Marjanovic, P. Bowyer, *et al.* 2012. Laboratory epidemiology and mechanisms of azole resistance in *Aspergillus fumigatus*. University of Manchester, Great Britain.
- Buil, J. B., R. K. Hare, B. J. Zwaan, *et al.* 2019. The fading boundaries between patient and environmental routes of triazole resistance selection in *Aspergillus fumigatus*. *PLoS pathogens* **15**: e1007858.
- Burks, C., A. Darby, L. Gomez Londono, *et al.* 2021. Azole-resistant *Aspergillus fumigatus* in the environment: Identifying key reservoirs and hotspots of antifungal resistance. *PLoS Pathog* **17**: e1009711.
- Camps, S. M., B. E. Dutilh, M. C. Arendrup, *et al.* 2012a. Discovery of a HapE mutation that causes azole resistance in *Aspergillus fumigatus* through whole genome sequencing and sexual crossing. *PLoS One* **7**: e50034.
- Camps, S. M., J. W. van der Linden, Y. Li, *et al.* 2012b. Rapid induction of multiple resistance mechanisms in *Aspergillus fumigatus* during azole therapy: a case study and review of the literature. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **56**: 10-16.
- Camps, S. M. T., B. E. Dutilh, M. C. Arendrup, *et al.* 2012c. Discovery of a hapE Mutation That Causes Azole Resistance in *Aspergillus fumigatus* through Whole Genome Sequencing and Sexual Crossing. *PLoS One* **7**: e50034.
- Cao, D., F. Wang, S. Yu, *et al.* 2021. Prevalence of Azole-Resistant *Aspergillus fumigatus* is Highly Associated with Azole Fungicide Residues in the Fields. *Environmental Science & Technology* **55**: 3041-3049.
- da Silva Ferreira, M. E., I. Malavazi, M. Savoldi, *et al.* 2006. Transcriptome analysis of *Aspergillus fumigatus* exposed to voriconazole. *Curr Genet* **50**: 32-44.

- Danby, C. S., D. Boikov, R. Rautemaa-Richardson, *et al.* 2012. Effect of pH on In Vitro Susceptibility of *Candida glabrata* and *Candida albicans* to 11 Antifungal Agents and Implications for Clinical Use. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **56**: 1403-1406.
- Denning, D. W., J. Cadranet, C. Beigelman-Aubry, *et al.* 2016. Chronic pulmonary aspergillosis: rationale and clinical guidelines for diagnosis and management. *Eur Respir J* **47**: 45-68.
- Ener, B., C. Ergin, D. Gulmez, *et al.* 2022. Frequency of azole resistance in clinical and environmental strains of *Aspergillus fumigatus* in Turkey: a multicentre study. *J Antimicrob Chemother* **77**: 1894-1898.
- Escribano, P., T. Pelaez, P. Munoz, *et al.* 2013. Is azole resistance in *Aspergillus fumigatus* a problem in Spain? *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **57**: 2815-2820.
- Escribano, P., B. Rodriguez-Sanchez, J. Diaz-Garcia, *et al.* 2021. Azole resistance survey on clinical *Aspergillus fumigatus* isolates in Spain. *Clinical Microbiology and Infection* **27**: 1170 e1171-1170 e1177.
- Etienne, K. A., E. L. Berkow, L. Gade, *et al.* 2021. Genomic Diversity of Azole-Resistant *Aspergillus fumigatus* in the United States. *mBio* **12**: e0180321.
- Ferreira, M. E., A. L. Colombo, I. Paulsen, *et al.* 2005. The ergosterol biosynthesis pathway, transporter genes, and azole resistance in *Aspergillus fumigatus*. *Med Mycol* **43 Suppl 1**: S313-319.
- Fraaije, B. A., S. L. Atkins, R. F. Santos, *et al.* 2021. Epidemiological Studies of Pan-Azole Resistant *Aspergillus fumigatus* Populations Sampled during Tulip Cultivation Show Clonal Expansion with Acquisition of Multi-Fungicide Resistance as Potential Driver. *Microorganisms* **9**.
- Garcia-Rubio, R., I. Gonzalez-Jimenez, J. Lucio, *et al.* 2020. Characterization of *Aspergillus fumigatus* cross-resistance between clinical and DMI azole drugs. *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY*.
- Glass, N. L. 1995. Development of Primer Sets Designed for Use with the PCR To Amplify Conserved Genes from Filamentous Ascomycetes. *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY*.
- Gonzalez-Jimenez, I., J. Lucio, J. Amich, *et al.* 2020. A Cyp51B Mutation Contributes to Azole Resistance in *Aspergillus fumigatus*. *J Fungi (Basel)* **6**.
- Gray, K. C., D. S. Palacios, I. Dailey, *et al.* 2012. Amphotericin primarily kills yeast by simply binding ergosterol. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**: 2234-2239.
- Guinea, J. 2020. Updated EUCAST Clinical Breakpoints against *Aspergillus*, Implications for the Clinical Microbiology Laboratory. *Journal of Fungi* **6**: 343.
- Guinea, J., P. E. Verweij, J. Meletiadis, *et al.* 2019a. How to: EUCAST recommendations on the screening procedure E.Def 10.1 for the detection of azole resistance in *Aspergillus fumigatus* isolates using four-well azole-containing agar plates. *Clinical Microbiology and Infection* **25**: 681-687.
- Guinea, J., P. E. Verweij, J. Meletiadis, *et al.* 2019b. How to: EUCAST recommendations on the screening procedure E.Def 10.1 for the detection of azole resistance in *Aspergillus fumigatus* isolates using four-well azole-containing agar plates. *Clinical Microbiology and Infection* **25**: 681-687.

- Guinea, J., P. E. Verweij, J. Meletiadis, *et al.* 2019c. How to: EUCAST recommendations on the screening procedure E.Def 10.1 for the detection of azole resistance in *Aspergillus fumigatus* isolates using four-well azole-containing agar plates. *Clin Microbiol Infect* **25**: 681-687.
- Hagiwara, D. 2020. Isolation of azole-resistant *Aspergillus fumigatus* from imported plant bulbs in Japan and the effect of fungicide treatment. *Journal of Pesticide Science* **45**: 147-150.
- Hagiwara, D., A. Watanabe, K. Kamei, *et al.* 2016. Epidemiological and Genomic Landscape of Azole Resistance Mechanisms in *Aspergillus* Fungi. *Front Microbiol* **7**: 1382.
- Hare, R. K., J. B. Gertsen, K. M. T. Astvad, *et al.* 2019. In Vivo Selection of a Unique Tandem Repeat Mediated Azole Resistance Mechanism (TR120) in *Aspergillus fumigatus* cyp51A, Denmark. *Emerging Infectious Diseases* **25**: 577-580.
- Hof, H. 2008. Is there a serious risk of resistance development to azoles among fungi due to the widespread use and long-term application of azole antifungals in medicine? *Drug Resistance Updates* **11**: 25-31.
- Hokken, M. W. J., J. Zoll, J. P. M. Coolen, *et al.* 2019. Phenotypic plasticity and the evolution of azole resistance in *Aspergillus fumigatus*; an expression profile of clinical isolates upon exposure to itraconazole. *BMC Genomics* **20**: 28.
- Hollomon, D. 2017. Does agricultural use of azole fungicides contribute to resistance in the human pathogen *Aspergillus fumigatus*? *Pest Manag Sci* **73**: 1987-1993.
- Hortschansky, P., M. Eisendle, Q. Al-Abdallah, *et al.* 2007. Interaction of HapX with the CCAAT-binding complex--a novel mechanism of gene regulation by iron. *EMBO Journal* **26**: 3157-3168.
- Hortschansky, P., M. Misslinger, J. Mörl, *et al.* 2020. Structural basis of HapEP88L-linked antifungal triazole resistance in *Aspergillus fumigatus*. *Life Science Alliance* **3**: e202000729.
- Houbraken, J., S. Kocsubé, C. M. Visagie, *et al.* 2020. Classification of *Aspergillus*, *Penicillium*, *Talaromyces* and related genera (Eurotiales): An overview of families, genera, subgenera, sections, series and species. *Studies in Mycology* **95**: 5-169.
- Hsu, T. H., P. Y. Huang, Y. C. Fan, *et al.* 2022. Azole Resistance and cyp51A Mutation of *Aspergillus fumigatus* in a Tertiary Referral Hospital in Taiwan. *J Fungi (Basel)* **8**.
- Hubka, V., V. Barrs, Z. Dudova, *et al.* 2018. Unravelling species boundaries in the *Aspergillus viridinutans* complex (section *Fumigati*): opportunistic human and animal pathogens capable of interspecific hybridization. *Persoonia* **41**: 142-174.
- Husain, S., & J. F. Camargo. 2019. Invasive Aspergillosis in solid-organ transplant recipients: Guidelines from the American Society of Transplantation Infectious Diseases Community of Practice. *Clinical Transplantation* **33**: e13544.
- Chen, M., G. Zhong, S. Wang, *et al.* 2022. Deletion of *cox7c* Results in Pan-Azole Resistance in *Aspergillus fumigatus*. *Antimicrob Agents Chemother* **66**: e0015122.
- Chen, P., J. Liu, M. Zeng, *et al.* 2020. Exploring the molecular mechanism of azole resistance in *Aspergillus fumigatus*. *J Mycol Med* **30**: 100915.
- Chen, Y., Z. Lu, J. Zhao, *et al.* 2016. Epidemiology and Molecular Characterizations of Azole Resistance in Clinical and Environmental *Aspergillus fumigatus* Isolates from China. *Antimicrob Agents Chemother* **60**: 5878-5884.

- Chowdhary, A., C. Sharma, S. Kathuria, *et al.* 2014. Azole-resistant *Aspergillus fumigatus* with the environmental TR46/Y121F/T289A mutation in India. *J Antimicrob Chemother* **69**: 555-557.
- Chowdhary, A., C. Sharma, S. Kathuria, *et al.* 2015. Prevalence and mechanism of triazole resistance in *Aspergillus fumigatus* in a referral chest hospital in Delhi, India and an update of the situation in Asia. *Front Microbiol* **6**: 428.
- Chowdhary, A., C. Sharma, & J. F. Meis. 2017. Azole-Resistant Aspergillosis: Epidemiology, Molecular Mechanisms, and Treatment. *J Infect Dis* **216**: S436-S444.
- Jensen, R. H. 2016. *Aspergillus fumigatus* Isolates from Azole-Naive Patients in Denmark despite Negative Findings in the Environment. University of Copenhagen.
- Jorgensen, K. M., J. Guinea, J. Meletiadis, *et al.* 2020. Revision of EUCAST breakpoints: consequences for susceptibility of contemporary Danish mould isolates to isavuconazole and comparators. *J Antimicrob Chemother* **75**: 2573-2581.
- Jørgensen, K. M., M. Helleberg, R. K. Hare, *et al.* 2021. Dissection of the Activity of Agricultural Fungicides against Clinical *Aspergillus* Isolates with and without Environmentally and Medically Induced Azole Resistance. *Journal of Fungi* **7**: 205.
- Katoh, K., & D. M. Standley. 2013. MAFFT Multiple Sequence Alignment Software Version 7: Improvements in Performance and Usability. *Molecular Biology and Evolution* **30**: 772-780.
- Koehler, P., M. Bassetti, A. Chakrabarti, *et al.* 2021. Defining and managing COVID-19-associated pulmonary aspergillosis: the 2020 ECMM/ISHAM consensus criteria for research and clinical guidance. *The Lancet Infectious Diseases* **21**: e149-e162.
- Krishnan Natesan, S., & P. Chandrasekar. 2016. Isavuconazole for the treatment of invasive aspergillosis and mucormycosis: current evidence, safety, efficacy, and clinical recommendations. *Infection and Drug Resistance* **Volume 9**: 291-300.
- Krzych, Ł. J., Z. Putowski, K. Gruca, *et al.* 2022. Mortality in critically ill COVID-19 patients with fungal infections: a comprehensive systematic review and meta-analysis. *Polish Archives of Internal Medicine*.
- Kurtz, M. B., I. B. Heath, J. Marrinan, *et al.* 1994 Morphological Effects of Lipopeptides against *Aspergillus fumigatus* Correlate with Activities against (1,3)- β -D-Glucane. *Microbial Agents and Chemotherapy* **38**: 1480-1489.
- Lai, C. C., & W. L. Yu. 2021. COVID-19 associated with pulmonary aspergillosis: A literature review. *J Microbiol Immunol Infect* **54**: 46-53.
- Lamoth, F. 2016. *Aspergillus fumigatus*-Related Species in Clinical Practice. *Front Microbiol* **7**: 683.
- Lamoth, F., & T. Calandra. 2022. Pulmonary aspergillosis: diagnosis and treatment. *European Respiratory Review* **31**: 220114.
- Latgé, J.-P. 1999. *Aspergillus fumigatus* and Aspergillosis. *Clinical Microbiology Reviews*.
- Latgé, J.-P. 2001. The pathobiology of *Aspergillus fumigatus*. *Trends in Microbiology* **9**.
- Lavergne, R. A., F. Morio, I. Danner-Boucher, *et al.* 2019. One year prospective survey of azole resistance in *Aspergillus fumigatus* at a French cystic fibrosis reference centre: prevalence and mechanisms of resistance. *J Antimicrob Chemother* **74**: 1884-1889.

- Lepesheva, G. I., & M. R. Waterman. 2007. Sterol 14 α -demethylase cytochrome P450 (CYP51), a P450 in all biological kingdoms. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* **1770**: 467-477.
- Lestrade, P. P., R. G. Bentvelsen, A. Schauwvlieghe, *et al.* 2019a. Voriconazole Resistance and Mortality in Invasive Aspergillosis: A Multicenter Retrospective Cohort Study. *Clinical Infectious Diseases* **68**: 1463-1471.
- Lestrade, P. P. A., J. B. Buil, M. T. Van Der Beek, *et al.* 2020. Paradoxal Trends in Azole-Resistant *Aspergillus fumigatus* in a National Multicenter Surveillance Program, the Netherlands, 2013–2018. *Emerging Infectious Diseases* **26**: 1447-1455.
- Lestrade, P. P. A., J. F. Meis, W. J. G. Melchers, *et al.* 2019b. Triazole resistance in *Aspergillus fumigatus*: recent insights and challenges for patient management. *Clinical Microbiology and Infection* **25**: 799-806.
- Letscher-Bru, V., & R. Herbrecht. 2003. Caspofungin: the first representative of a new antifungal class. *J Antimicrob Chemother* **51**: 513-521.
- Lucio, J., I. Gonzalez-Jimenez, R. Garcia-Rubio, *et al.* 2022. An expanded agar-based screening method for azole-resistant *Aspergillus fumigatus*. *Mycoses* **65**: 178-185.
- Lysková, P. 2019. Testování citlivosti kryptických druhů aspergilů ze sekce Fumigati a Nidulantes mikrodilučními standardizovanými metodami. Univerzita Palackého v Olomouci.
- Maertens, J. A. 2004. History of the development of azole derivatives. *Clinical Microbiology and Infection* **10**: 1-10.
- Makvandi, P., U. Josic, M. Delfi, *et al.* 2021. Drug Delivery (Nano)Platforms for Oral and Dental Applications: Tissue Regeneration, Infection Control, and Cancer Management. *Advanced Science* **8**: 2004014.
- Mann, P. A., R. M. Parmegiani, S.-Q. Wei, *et al.* 2003. Mutations in *Aspergillus fumigatus* Resulting in Reduced Susceptibility to Posaconazole Appear To Be Restricted to a Single Amino Acid in the Cytochrome P450 14 α -Demethylase. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **47**: 577-581.
- Meis, J. F., A. Chowdhary, J. L. Rhodes, *et al.* 2016. Clinical implications of globally emerging azole resistance in *Aspergillus fumigatus*. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **371**.
- Mellado, E., G. Garcia-Effron, M. J. Buitrago, *et al.* 2005. Targeted Gene Disruption of the 14- α Sterol Demethylase (cyp51A) in *Aspergillus fumigatus* and Its Role in Azole Drug Susceptibility. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **49**: 2536-2538.
- Mortensen, K. L., R. H. Jensen, H. K. Johansen, *et al.* 2011. *Aspergillus* species and other molds in respiratory samples from patients with cystic fibrosis: a laboratory-based study with focus on *Aspergillus fumigatus* azole resistance. *J Clin Microbiol* **49**: 2243-2251.
- Nedel, W. L., & A. C. Pasqualotto. 2014. Treatment of infections by cryptic *Aspergillus* species. *Mycopathologia* **178**: 441-445.
- Negri, C. E., S. S. Gonçalves, H. Xafranski, *et al.* 2014. Cryptic and Rare *Aspergillus* Species in Brazil: Prevalence in Clinical Samples and *In Vitro* Susceptibility to Triazoles. *Journal of Clinical Microbiology* **52**: 3633-3640.

- Nierman, W. C., A. Pain, M. J. Anderson, *et al.* 2005. Genomic sequence of the pathogenic and allergenic filamentous fungus *Aspergillus fumigatus*. *Nature* **438**: 1151-1156.
- Nywening, A. V., J. M. Rybak, P. D. Rogers, *et al.* 2020. Mechanisms of triazole resistance in *Aspergillus fumigatus*. *Environ Microbiol* **22**: 4934-4952.
- Ogawa, Y., K. Murata, K. Hasegawa, *et al.* 2022. Clinical characteristics of patients with coronavirus disease 2019-associated pulmonary aspergillosis on mechanical ventilation: A single-center retrospective study in Japan. *J Infect Chemother*.
- Ortiz, S. C., K. Pennington, D. D. Thomson, *et al.* 2022. Novel Insights into *Aspergillus fumigatus* Pathogenesis and Host Response from State-of-the-Art Imaging of Host-Pathogen Interactions during Infection. *J Fungi (Basel)* **8**.
- Ozmerdiven, G. E., S. Ak, B. Ener, *et al.* 2015. First determination of azole resistance in *Aspergillus fumigatus* strains carrying the TR34/L98H mutations in Turkey. *J Infect Chemother* **21**: 581-586.
- Page, A. V., & W. C. Liles. 2008. Posaconazole: A New Agent for the Prevention and Management of Severe, Refractory or Invasive Fungal Infections. *Canadian Journal of Infectious Diseases and Medical Microbiology* **19**: 297-305.
- Patterson, T. F., G. R. Thompson, 3rd, D. W. Denning, *et al.* 2016. Practice Guidelines for the Diagnosis and Management of Aspergillosis: 2016 Update by the Infectious Diseases Society of America. *Clinical Infectious Diseases* **63**: e1-e60.
- Paul, S., D. Diekema, & W. S. Moye-Rowley. 2017. Contributions of both ATP-Binding Cassette Transporter and Cyp51A Proteins Are Essential for Azole Resistance in *Aspergillus fumigatus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **61**.
- Perfect, J. R., G. M. Cox, J. Y. Lee, *et al.* 2001. The Impact of Culture Isolation of *Aspergillus* Species: A Hospital-Based Survey of Aspergillosis. *Clinical Infectious Diseases* **33**: 1824-1833.
- Peterson, S. W. 1992. *Neosartorya pseudofischeri* sp. nov. and its relationship to other species in *Aspergillus* section Fumigati. *Mycological Research* **96**: 547-554.
- Peyton, L. R., S. Gallagher, & M. Hashemzadeh. 2015. Triazole antifungals: a review. *Drugs Today (Barc)* **51**: 705-718.
- Pinto, E., C. Monteiro, M. Maia, *et al.* 2018. *Aspergillus* Species and Antifungals Susceptibility in Clinical Setting in the North of Portugal: Cryptic Species and Emerging Azoles Resistance in *A. fumigatus*. *Front Microbiol* **9**: 1656.
- Prattes, J., T. Valentin, M. Hoenigl, *et al.* 2021. Invasive pulmonary aspergillosis complicating COVID-19 in the ICU - A case report. *Med Mycol Case Rep* **31**: 2-5.
- Price, C. L., J. E. Parker, A. G. Warrilow, *et al.* 2015. Azole fungicides - understanding resistance mechanisms in agricultural fungal pathogens. *Pest Manag Sci* **71**: 1054-1058.
- Ren, J., X. Jin, Q. Zhang, *et al.* 2017. Fungicides induced triazole-resistance in *Aspergillus fumigatus* associated with mutations of TR46/Y121F/T289A and its appearance in agricultural fields. *J Hazard Mater* **326**: 54-60.
- Repentigny, d. 2001. The Impact of Culture Isolation of *Aspergillus* Species A Hospital-Based Survey of Aspergillosis. *Clinical Infectious Diseases* **33**: 1824-1833.

- Resendiz Sharpe, A., K. Lagrou, J. F. Meis, *et al.* 2018. Triazole resistance surveillance in *Aspergillus fumigatus*. *Med Mycol* **56**: 83-92.
- Rhodes, J., A. Abdolrasouli, K. Dunne, *et al.* 2022a. Population genomics confirms acquisition of drug-resistant *Aspergillus fumigatus* infection by humans from the environment. *Nature Microbiology* **7**: 663-674.
- Rhodes, J., A. Abdolrasouli, K. Dunne, *et al.* 2022b. Population genomics confirms acquisition of drug-resistant *Aspergillus fumigatus* infection by humans from the environment. *Nat Microbiol* **7**: 663-674.
- Riat, A., J. Plojoux, K. Gindro, *et al.* 2018. Azole Resistance of Environmental and Clinical *Aspergillus fumigatus* Isolates from Switzerland. *Antimicrob Agents Chemother* **62**.
- Risum, M., R. K. Hare, J. B. Gertsen, *et al.* 2020. Azole-Resistant *Aspergillus fumigatus* Among Danish Cystic Fibrosis Patients: Increasing Prevalence and Dominance of TR34/L98H. *Front Microbiol* **11**: 1850.
- Risum, M., R. K. Hare, J. B. Gertsen, *et al.* 2022. Azole resistance in *Aspergillus fumigatus*. The first 2-year's Data from the Danish National Surveillance Study, 2018-2020. *Mycoses* **65**: 419-428.
- Rivero-Menendez, O., A. Alastruey-Izquierdo, E. Mellado, *et al.* 2016. Triazole Resistance in *Aspergillus* spp.: A Worldwide Problem? *J Fungi (Basel)* **2**.
- Rodríguez-Tudela, J. L., F. Barchiesi, J. Bille, *et al.* 2003. Method for the determination of minimum inhibitory concentration (MIC) by broth dilution of fermentative yeasts. *Clinical Microbiology and Infection* **9**: i-viii.
- Rybak, J. M., J. R. Fortwendel, & P. D. Rogers. 2019. Emerging threat of triazole-resistant *Aspergillus fumigatus*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **74**: 835-842.
- Sabino, R., C. Verissimo, H. Parada, *et al.* 2014. Molecular screening of 246 Portuguese *Aspergillus* isolates among different clinical and environmental sources. *Med Mycol* **52**: 519-529.
- Salmanton-García, J., R. Sprute, J. Stemler, *et al.* 2021. COVID-19–Associated Pulmonary *Aspergillosis*, March–August 2020. *Emerging Infectious Diseases* **27**: 1077-1086.
- Samson, R. A., C. M. Visagie, J. Houbraken, *et al.* 2014. Phylogeny, identification and nomenclature of the genus *Aspergillus*. *Studies in Mycology* **78**: 141-173.
- Serrano-Lobo, J., A. Gomez, E. Reigadas, *et al.* 2022. Screening of azole resistance in *Aspergillus fumigatus* using the EUCAST E.Def 10.2 azole-containing agar method: a single study suggests that filtration of conidial suspensions prior to inoculum preparation may not be needed. *Mycoses*.
- Sharma, C., F. Hagen, R. Moroti, *et al.* 2015. Triazole-resistant *Aspergillus fumigatus* harbouring G54 mutation: Is it de novo or environmentally acquired? *J Glob Antimicrob Resist* **3**: 69-74.
- Simon, L., T. Demeautis, D. Dupont, *et al.* 2021. Azole resistance in *Aspergillus fumigatus* isolates from respiratory specimens in Lyon University Hospitals, France: prevalence and mechanisms involved. *Int J Antimicrob Agents* **58**: 106447.
- Snelders, E., R. A. Huis In 't Veld, A. J. Rijs, *et al.* 2009. Possible environmental origin of resistance of *Aspergillus fumigatus* to medical triazoles. *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY* **75**: 4053-4057.

- Snelders, E., A. Karawajczyk, G. Schaftenaar, *et al.* 2010. Azole resistance profile of amino acid changes in *Aspergillus fumigatus* CYP51A based on protein homology modeling. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **54**: 2425-2430.
- Snelders, E., H. A. van der Lee, J. Kuijpers, *et al.* 2008. Emergence of azole resistance in *Aspergillus fumigatus* and spread of a single resistance mechanism. *PLoS Med* **5**: e219.
- Tashiro, M., K. Izumikawa, A. Minematsu, *et al.* 2012. Antifungal susceptibilities of *Aspergillus fumigatus* clinical isolates obtained in Nagasaki, Japan. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **56**: 584-587.
- Te Dorsthorst, D. T. A., J. W. Mouton, C. J. P. Van Den Beukel, *et al.* 2004. Effect of pH on the In Vitro Activities of Amphotericin B, Itraconazole, and Flucytosine against *Aspergillus* Isolates. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **48**: 3147-3150.
- Tsuchido, Y., M. Tanaka, S. Nakano, *et al.* 2019. Prospective multicenter surveillance of clinically isolated *Aspergillus* species revealed azole-resistant *Aspergillus fumigatus* isolates with TR34/L98H mutation in the Kyoto and Shiga regions of Japan. *Med Mycol* **57**: 997-1003.
- Ullmann, A. J., J. M. Aguado, S. Arikan-Akdagli, *et al.* 2018. Diagnosis and management of *Aspergillus* diseases: executive summary of the 2017 ESCMID-ECMM-ERS guideline. *Clinical Microbiology and Infection* **24**: e1-e38.
- van der Linden, J. W., M. C. Arendrup, A. Warris, *et al.* 2015. Prospective multicenter international surveillance of azole resistance in *Aspergillus fumigatus*. *Emerging Infectious Diseases* **21**: 1041-1044.
- van der Linden, J. W., E. Snelders, G. A. Kampinga, *et al.* 2011. Clinical implications of azole resistance in *Aspergillus fumigatus*, The Netherlands, 2007-2009. *Emerging Infectious Diseases* **17**: 1846-1854.
- Verweij, P. E., M. Ananda-Rajah, D. Andes, *et al.* 2015. International expert opinion on the management of infection caused by azole-resistant *Aspergillus fumigatus*. *Drug Resistance Updates* **21-22**: 30-40.
- Verweij, P. E., S. J. Howard, W. J. Melchers, *et al.* 2009. Azole-resistance in *Aspergillus*: proposed nomenclature and breakpoints. *Drug Resistance Updates* **12**: 141-147.
- Verweij, P. E., P. P. Lestrade, W. J. Melchers, *et al.* 2016. Azole resistance surveillance in *Aspergillus fumigatus*: beneficial or biased? *J Antimicrob Chemother* **71**: 2079-2082.
- Verweij, P. E., J. A. Lucas, M. C. Arendrup, *et al.* 2020. The one health problem of azole resistance in *Aspergillus fumigatus*: current insights and future research agenda. *Fungal Biology Reviews* **34**: 202-214.
- W., D. D., V. K., O. K. L., *et al.* 1997. Itraconazole Resistance in *Aspergillus fumigatus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **41**: 1364-1368.
- Walsh, T. J., E. J. Anaissie, D. W. Denning, *et al.* 2008. Treatment of aspergillosis: clinical practice guidelines of the Infectious Diseases Society of America. *Clinical Infectious Diseases* **46**: 327-360.

- Wang, H. C., J. C. Huang, Y. H. Lin, *et al.* 2018. Prevalence, mechanisms and genetic relatedness of the human pathogenic fungus *Aspergillus fumigatus* exhibiting resistance to medical azoles in the environment of Taiwan. *Environ Microbiol* **20**: 270-280.
- Wiederhold, N. P. 2021. Antifungal Susceptibility Testing: A Primer for Clinicians. *Open Forum Infect Dis* **8**: ofab444.
- Wiederhold, N. P., & P. E. Verweij. 2020. *Aspergillus fumigatus* and pan-azole resistance: who should be concerned? *Curr Opin Infect Dis* **33**: 290-297.
- Xiong, Q., S. A. Hassan, W. K. Wilson, *et al.* 2005. Cholesterol import by *Aspergillus fumigatus* and its influence on antifungal potency of sterol biosynthesis inhibitors. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **49**: 518-524.
- Zhang, J., A. J. M. Debets, P. E. Verweij, *et al.* 2021. Azole-Resistance Development; How the *Aspergillus fumigatus* Lifecycle Defines the Potential for Adaptation. *Journal of Fungi* **7**: 599.
- Zhang, J., J. Van Den Heuvel, A. J. M. Debets, *et al.* 2017. Evolution of cross-resistance to medical triazoles in *Aspergillus fumigatus* through selection pressure of environmental fungicides. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* **284**: 20170635.
- Zhou, D., G. A. Korfanty, M. Mo, *et al.* 2021. Extensive Genetic Diversity and Widespread Azole Resistance in Greenhouse Populations of *Aspergillus fumigatus* in Yunnan, China. *mSphere* **6**.
- Zhou, D., R. Wang, X. Li, *et al.* 2022. Genetic Diversity and Azole Resistance Among Natural *Aspergillus fumigatus* Populations in Yunnan, China. *Microb Ecol* **83**: 869-885.

Příloha 1. Spotřeba šesti azolových fungicidů na pěti vybraných polích mezi lety 2014 až 2019

Půdní vzorek č.	Datum	Cyprokonazol	Epoxykonazol	Flusilazol	Metkonazol	Propikonazol	Tebukonazol
2001BO	05.09.2014	0,013	0,009	0,007			0,027
2001BO	06.03.2015	0,011	0,009	0,007			0,012
2001BO	03.03.2016	0,004	0,016	0,005			0,019
2001BO	28.02.2017	0,01	0,013	0,005			0,043
2001BO	13.03.2018	0,004	0,016				0,031
2002BO	04.07.2014		0,013				
2002BO	26.02.2015		0,024				
2002BO	25.02.2016		0,024				
2002BO	07.03.2017		0,016				
2002BO	15.03.2018		0,018				
3023BO	06.08.2014		0,003	0,014			0,058
3023BO	11.03.2015		0,004	0,014		0,006	0,03
3023BO	17.03.2016			0,011			0,01
3023BO	14.03.2017			0,009			0,01
3023BO	26.03.2018			0,005			0,005
4023BO	01.08.2014					0,003	0,011
4023BO	11.03.2015						0,005
4023BO	02.03.2016						0,007
4023BO	06.03.2017			0,003			0,003
4023BO	09.03.2018		0,008	0,003			0,017
5005BO	22.07.2014		0,032	0,028			0,14
5005BO	16.03.2015		0,027	0,023			0,07
5005BO	22.03.2016		0,011	0,018			0,061
5005BO	16.03.2017		0,029	0,025			0,079
5005BO	05.10.2017		0,021	0,017	0,017		0,048
5005BO	15.03.2018		0,022	0,015	0,004		0,05
5005BO	03.10.2018		0,015	0,01	0,004		0,042

Příloha 2. Seznam veškerých klinických izolátů *Aspergillus fumigatus*

Instituce	ID vzorku ¹	SCR v.1 ²	ITR	VOR	POS	ISA	Substrát	Věk	Primární onemocnění
Motol	CF1775/19	ITR	>8	8	0,5	16	Sputum	17	CF s plicními projevy
Motol	CF1827/19	ITR	>8	4	0,5	8	Sputum	12	CF s plicními projevy
Motol	CF1885/19	-	-	-	-	-	Sputum	24	CF NS
Motol	CF1945/19	ITR	0,5	0,25	0,125	0,125	Sputum	22	CF s plicními projevy
Motol	K11882/19	ITR	0,125	0,25	0,06	0,06	Zevní zvukovod	73	Serózní OMA
Motol	MY1290/19	ITR, VOR	0,125	0,5	0,03	0,5	Sputum	27	CF s plicními projevy
Motol	MY1543/19	ITR	0,03	0,25	0,016	0,25	Sputum	30	CF s plicními projevy
Motol	MY1754/19	ITR	0,125	0,25	0,16	0,25	Sputum	35	CF s plicními projevy
Motol	MY19802/19	-	-	-	-	-	Sputum	26	Plicní transplantát
Motol	MY19846/19	ITR	0,06	0,5	0,016	0,5	Sputum	68	Plicní transplantát
Motol	MY19861/19	-	-	-	-	-	Sputum	82	CHOPN s akutní exacerbací NS
Motol	MY19878/19	-	-	-	-	-	Aspirát DCD	36	Respirační selhání
Motol	MY19937/19	ITR	0,03	0,25	0,03	0,06	Aspirát DCD	57	CHOPN s akutní exacerbací NS
Motol	MY20103/19	-	-	-	-	-	Sputum	11	Mukopurulentní chronická bronchitida
Motol	MY20219/19	ITR, VOR	>8	4	0,5	8	Sputum	69	Plicní transplantát
Motol	MY20382/19	-	-	-	-	-	Sputum	67	Plicní transplantát
Motol	MY20460/19	ITR	0,06	0,03	0,06	0,03	Sputum	19	CF s plicními projevy
Motol	MY20481/19	-	-	-	-	-	Sputum	21	CF s plicními projevy
Motol	MY20504/19	ITR	0,016	0,06	0,016	0,06	Sputum	43	CF s plicními projevy
Motol	MY20516/19	-	-	-	-	-	Zevní zvukovod	14	Atrézie choan
Motol	MY20653/19	-	-	-	-	-	Sputum	69	B-buněčný lymfom z velkých buněk, difuzní
Motol	MY20659/19	ITR	0,06	0,25	0,06	1	Aspirát DCD	10	Vrozená mitrální stenóza
Motol	MY20687/19	-	-	-	-	-	Aspirát DCD	10	Vrozená mitrální insuficience
Motol	MY20695/19	-	-	-	-	-	Sputum	52	Plicní transplantát
Motol	MY20711/19	ITR, VOR	0,016	0,25	0,016	0,25	Aspirát DCD	68	CHOPN s akutní exacerbací NS

Instituce	ID vzorku ¹	SCR v.1 ²	ITR	VOR	POS	ISA	Substrát	Věk	Primární onemocnění
Motol	MY20736/19	-	-	-	-	-	Sputum	10	Mukopurulentní chronická bronchitida
Motol	MY21132/19	ITR	0,016	0,125	0,06	0,25	Aspirát DCD	56	Jiné bakteriální infekce neurčené lokalizace
Motol	MY21168/19	-	-	-	-	-	Sputum	72	Sepse NS
Motol	MY21186/19	ITR	0,125	0,25	0,03	0,25	Zevní zvukovod	31	Neinfekční AOE
Motol	MY21199/19	-	-	-	-	-	BAT	17	CF s jinými projevy
Motol	MY21234/19	-	-	-	-	-	BAT	45	Plicní transplantát
Motol	MY21237/19	ITR, VOR	>8	4	0,5	8	Sputum	17	Jiné určené vrozené vady DS
Motol	MY21246/19	-	-	-	-	-	Sputum	19	Jiné určené vrozené vady DS
Motol	MY21324/20	ITR	0,06	0,125	0,016	0,25	Sputum	18	CF s plicními projevy
Motol	MY21392/20	ITR	0,03	0,25	0,016	0,5	Výtěr z nosu	4	Akutní lymfoblastická leukemie
Motol	MY21406/20	ITR, VOR	0,03	0,06	0,016	0,125	ETA	66	Mozkový infarkt NS
Motol	MY21418/20	ITR	0,25	0,125	0,25	0,125	Aspirát DCD - fibroaspirát	30	CF s plicními projevy
Motol	MY21426/20	-	-	-	-	-	Zevní zvukovod	62	Jiný CSOM
Motol	MY21436/20	VOR	0,03	0,06	0,03	0,125	Sputum	59	Plicní transplantát
Motol	MY21568/20	VOR	0,03	0,047	0,016	0,25	Aspirát DCD - fibroaspirát	30	CF s plicními projevy
Motol	MY21575/20	ITR, VOR	0,016	0,25	0,03	0,125	Sputum	70	Plicní transplantát
Motol	MY21580/20	ITR	0,03	0,25	0,016	0,25	ETA	69	Mnohočetný myelom
Motol	MY21622/20	ITR	0,03	0,125	0,016	0,25	Sputum	60	Plicní transplantát
Motol	MY21641/20	ITR	0,03	0,25	0,016	0,25	Aspirát DCD - fibroaspirát	72	Čistá hypercholesterolemie
Motol	MY21702/20	-	-	-	-	-	Sputum	30	CF s plicními projevy
Motol	MY21748/20	-	-	-	-	-	Sputum	36	Plicní transplantát
Motol	MY21789/20	ITR	0,25	0,125	0,125	0,125	Aspirát DCD - fibroaspirát	70	Chronický vřed
Motol	MY21924/20	-	-	-	-	-	Aspirát DCD - fibroaspirát	57	Astma NS
Motol	MY21993/20	-	0,125	0,094	0,032	0,125	Sputum	23	Plicní transplantát
Motol	MY22075/20	ITR, VOR	0,016	0,006	0,016	0,125	Aspirát DCD	67	Plicní transplantát

Instituce	ID vzorku ¹	SCR v.1 ²	ITR	VOR	POS	ISA	Substrát	Věk	Primární onemocnění
Motol	MY22086/20	ITR	0,016	0,125	0,016	0,125	Sputum	26	CF s plicními projevy
Motol	MY22098/20	-	-	-	-	-	Aspirát DCD - fibroaspirát	60	Plicní transplantát
Motol	MY22100/20	ITR	0,06	0,5	0,03	0,25	Aspirát DCD - fibroaspirát	60	Plicní transplantát
Motol	MY22136/20	VOR	0,03	0,125	0,03	0,125	ETA	77	Zlomenina obou kotníků bez posunutí úlomků
Motol	MY22178/20	ITR	0,06	0,25	0,016	0,25	Sputum	20	CF s plicními projevy
Motol	MY22308/20	ITR, VOR	>8	4	0,5	8	Sputum	30	CF s plicními projevy
Motol	MY22351/20	ITR	0,25	0,125	0,064	0,25	Aspirát DCD - fibroaspirát	30	CF s plicními projevy
Motol	MY22404/20	VOR	0,125	0,125	0,125	0,06	Sputum	45	Plicní transplantát
Motol	MY22405/20	VOR	0,03	0,125	0,016	0,25	Aspirát DCD - fibroaspirát	71	Abnormální nálezy při diagn. zobrazení plic
Motol	MY22465/20	-	-	-	-	-	ETA	70	Dvanáctníkový vřed - akutní s perforací
Motol	MY22490/20	ITR	0,03	0,25	0,016	0,5	Sputum	12	CF se střevními projevy
Motol	MY22563/20	ITR	0,125	0,064	0,047	0,06	Aspirát DCD - fibroaspirát	72	Dušnost – dyspnoe
Motol	MY22607/20	ITR	0,125	0,19	0,047	0,38	BAT	57	Pneumonie NS
Motol	MY22861/20	-	-	-	-	-	Sputum	25	CF s plicními projevy
Motol	MY22913/20	-	-	-	-	-	ETA	85	COVID-19
ZÚ Praha	NPL 1064/21	-	-	-	-	-	BAT	71	Sepse
ZÚ Praha	NPL 1355/21	-	-	-	-	-	Aspirát tracheální	82	Mozkový infarkt
ZÚ Praha	NPL 1359/21	-	-	-	-	-	Aspirát tracheální	48	COVID-19
ZÚ Praha	NPL 1373/21	-	-	-	-	-	Sputum	75	Mnohočetný myelom
ZÚ Praha	NPL 716/21	-	-	-	-	-	Punktát pleurální	49	COVID-19
ZÚ Praha	NPL 751/21	-	-	-	-	-	BAT	49	COVID-19
ZÚ Praha	NPL 789/21	-	-	-	-	-	Otisk LDK	45	Popáleniny více částí těla, vč. popáleniny 3. st
ZÚ Praha	NPL 831/21A	ITR, VOR	0,25	>16	0,125	>16	BAT	68	Pneumonie
ZÚ Praha	NPL 865/21	-	-	-	-	-	Sputum	71	Městnavé selhání srdce

Instituce	ID vzorku ¹	SCR v.1 ²	ITR	VOR	POS	ISA	Substrát	Věk	Primární onemocnění
ZÚ Praha	NPL 873/21	-	-	-	-	-	Ucho L	31	Serózní OMA
ZÚ Praha	NPL 988/21	-	-	-	-	-	ETA	74	Akutní tubulo-intersticiální nefritida
ZÚ Praha	NPL1011/19	-	-	-	-	-	Zevní zvukovod	48	Serózní OMA
ZÚ Praha	NPL1032/20	-	-	-	-	-	Sputum	11	CF
ZÚ Praha	NPL1033/19	ITR	0,25	0,03	0,06	0,125	Ucho L	35	Otitis externa
ZÚ Praha	NPL1051/20	-	-	-	-	-	Sputum	47	Dilatovaná kardiomyopatie
ZÚ Praha	NPL1063/20	-	-	-	-	-	Sputum	74	Akutní respirační selhání, Typ I [hypoxický]
ZÚ Praha	NPL1077/20	-	-	-	-	-	Sputum	54	Městnavé selhání srdce
ZÚ Praha	NPL1078/20	-	-	-	-	-	Sputum	47	Jiná určená poranění postihující více částí těla
ZÚ Praha	NPL1080/20	-	-	-	-	-	Ucho L	53	Otitis externa
ZÚ Praha	NPL1081/20	ITR, VOR	0,03	0,125	0,016	0,25	Sputum	68	CHOPN
ZÚ Praha	NPL1083/20	ITR	0,016	0,125	0,016	0,125	Sputum	50	Pneumonie
ZÚ Praha	NPL1092/20	ITR	0,016	0,03	0,016	0,03	Hemokultura	54	Městnavé selhání srdce
ZÚ Praha	NPL1362/21	ITR, VOR	>8	2	0,25	8	Aspirát tracheální	67	Ateroskleróza končetinových tepen, bez gangrény
ZÚ Praha	NPL1093/20	-	-	-	-	-	Sputum	74	Onemocnění DS
ZÚ Praha	NPL1104/20	-	-	-	-	-	BAT	53	Jiná onemocnění plic
ZÚ Praha	NPL1107/20	VOR	0,125	0,03	0,25	0,125	Sputum	51	Pneumonie
ZÚ Praha	NPL1124/20	VOR	0,03	0,25	0,016	0,5	Ucho	42	Otitis externa
ZÚ Praha	NPL113/20	-	-	-	-	-	BAT	88	Pneumonie
ZÚ Praha	NPL1130/20	VOR	0,03	0,125	0,016	0,25	BAT	45	Akutní respirační selhání, Typ I [hypoxický]
ZÚ Praha	NPL1134/19	-	-	-	-	-	Ucho P	50	Otitis externa
ZÚ Praha	NPL1136/20	ITR, VOR	0,03	0,06	0,016	0,125	Aspirát bronchiální	71	Chronická ischemická choroba srdeční
ZÚ Praha	NPL1139/20	-	0,5	0,125	0,25	0,125	Ucho	38	Otitis externa
ZÚ Praha	NPL1141/20	-	-	-	-	-	Aspirát tracheální	71	Chronická ischemická choroba srdeční
ZÚ Praha	NPL1145/19	-	-	-	-	-	Sputum	52	Srdeční zástava s úspěšnou resuscitací

Instituce	ID vzorku ¹	SCR v.1 ²	ITR	VOR	POS	ISA	Substrát	Věk	Primární onemocnění
ZÚ Praha	NPL1154/20 = 1159	-	-	-	-	-	Sputum	74	CHOPN
ZÚ Praha	NPL1159/20	VOR	0,03	0,25	0,03	0,25	Sputum	74	CHOPN
ZÚ Praha	NPL1161/20	-	-	-	-	-	Aspirát bronchiální	43	Virová pneumonie
ZÚ Praha	NPL1167/20	-	-	-	-	-	BAT	63	CHOPN
ZÚ Praha	NPL1168/20	-	-	-	-	-	Sputum	76	Bronchopneumonie
ZÚ Praha	NPL1175/20	-	-	-	-	-	Kardiostimulační elektroda	64	Paroxysmální fibrilace síní
ZÚ Praha	NPL1181/20	ITR	0,03	0,125	0,016	0,25	Ucho	56	Otitis externa
ZÚ Praha	NPL1186/20	VOR	0,016	0,03	0,016	0,03	BAT	79	Pneumonie
ZÚ Praha	NPL1189/20	VOR	0,5	0,25	0,25	1	Sputum	73	COVID-19
ZÚ Praha	NPL1190/20	-	-	-	-	-	Sputum	49	Dilatovaná kardiomyopatie
ZÚ Praha	NPL1191/20	VOR	0,06	0,25	0,016	0,5	Sputum	53	Aneuryzma hrudní aorty, roztržené
ZÚ Praha	NPL1195/20	-	-	-	-	-	Ucho	14	Hnisavý OMA
ZÚ Praha	NPL1202/19	-	-	-	-	-	Výtěr nos	41	Jiný transplantovaný orgán a tkáň
ZÚ Praha	NPL1213/20	-	-	-	-	-	Nos výtěr	36	Nitrolební absces a granulom
ZÚ Praha	NPL1224/19	ITR, VOR	0,03	0,125	0,03	0,25	BAT střední lalok	71	Bronchopneumonie
ZÚ Praha	NPL1243/20	-	-	-	-	-	ETA	70	Pneumonie
ZÚ Praha	NPL1248/19	-	-	-	-	-	Sputum	66	Pneumonie
ZÚ Praha	NPL1265/19	-	-	-	-	-	Sputum	44	Biliární akutní pankreatitida
ZÚ Praha	NPL1276/19	-	-	-	-	-	Sputum	61	Akutní infarkt myokardu
ZÚ Praha	NPL128/18	-	-	-	-	-	BAT	59	Hemoptýza
ZÚ Praha	NPL1287/20	VOR	0,125	0,5	0,125	1	Aspirát bronchiální	73	Virová pneumonie
ZÚ Praha	NPL1289/20	VOR	0,125	0,125	0,016	0,25	Nos výtěr	31	Klasický Hodgkinův lymfom nodulárně sklerotický
ZÚ Praha	NPL1299/20	ITR	0,03	0,125	0,03	0,25	Ucho P	42	Hnisavý OMA
ZÚ Praha	NPL1318/20	VOR	0,06	0,016	0,06	0,016	Ucho	60	Otitis externa
ZÚ Praha	NPL1327/20	-	-	-	-	-	ETA	73	Paroxysmální tachykardie
ZÚ Praha	NPL1331/19	-	-	-	-	-	Sputum	72	Fibrilace a flutter síní

Instituce	ID vzorku ¹	SCR v.1 ²	ITR	VOR	POS	ISA	Substrát	Věk	Primární onemocnění
ZÚ Praha	NPL134/21	-	-	-	-	-	Sekret bronchiální	34	Chronická plicní aspergilóza
ZÚ Praha	NPL1348/19	-	-	-	-	-	Sputum	44	Biliární akutní pankreatitida
ZÚ Praha	NPL1370/19	-	-	-	-	-	Ucho L	29	Otitis externa
ZÚ Praha	NPL1370/21	ITR, VOR	>8	2	0,25	8	Aspirát tracheální	67	Ateroskleróza končetinových tepen, bez gangrény
ZÚ Praha	NPL141/19	-	-	-	-	-	BAT	73	Pneumonie
ZÚ Praha	NPL1444/19	-	-	-	-	-	Ucho P	31	Otitis externa
ZÚ Praha	NPL1545/19	VOR	0,125	0,06	0,125	0,06	Sekret bronchiální	33	Pneumonie
ZÚ Praha	NPL1570/19 = 1370	-	-	-	-	-	Ucho L	29	Otitis externa
ZÚ Praha	NPL168/20	-	-	-	-	-	Sputum	64	Astma
ZÚ Praha	NPL170/20	-	-	-	-	-	Aspirát Bronchiální	62	Pneumonie
ZÚ Praha	NPL175/20	-	-	-	-	-	Sputum	65	Pneumonie
ZÚ Praha	NPL184/20	ITR, VOR	0,25	0,03	0,016	0,03	Ucho P	43	Serózní OMA
ZÚ Praha	NPL196/20	-	-	-	-	-	Aspirát bronchiální	72	Pneumonie
ZÚ Praha	NPL202/20	-	0,03	0,5	0,016	0,25	Sputum	66	Pneumonie
ZÚ Praha	NPL206/20	ITR	0,06	0,03	0,06	0,03	Moč	76	Jiný transplantovaný orgán a tkáň
ZÚ Praha	NPL211/20	-	-	-	-	-	Ucho	22	Otitis externa
ZÚ Praha	NPL242/20	-	-	-	-	-	BAT	72	Pneumonie
ZÚ Praha	NPL244/20	-	-	-	-	-	Sputum	72	Pneumonie
ZÚ Praha	NPL270/20	-	-	-	-	-	BAT	66	Městnavé selhání srdce
ZÚ Praha	NPL282/20	-	-	-	-	-	ETA	61	Akutní nebo subakutní selhání jater
ZÚ Praha	NPL284/20	-	-	-	-	-	Sekret bronchiální	61	Pneumonie
ZÚ Praha	NPL290/20A	ITR, VOR	0,016	0,03	0,016	0,03	BAT	85	ZN - průduška a plíce
ZÚ Praha	NPL341/20	-	-	-	-	-	Krusta z DÚ	47	Aspergilóza
ZÚ Praha	NPL349/20	-	-	-	-	-	Krusta DÚ	47	Defibrinační syndrom
ZÚ Praha	NPL366/20	-	-	-	-	-	Ucho L	23	Otitis externa
ZÚ Praha	NPL381/20	ITR	0,06	0,25	0,06	0,25	Ucho L	31	Otitis externa

Instituce	ID vzorku ¹	SCR v.1 ²	ITR	VOR	POS	ISA	Substrát	Věk	Primární onemocnění
ZÚ Praha	NPL383/20	VOR	0,25	0,03	0,125	0,06	Aspirát tracheální	56	COVID-19
ZÚ Praha	NPL405/20	ITR	0,06	0,03	0,06	0,06	Sputum	73	Astma
ZÚ Praha	NPL406/20	-	-	-	-	-	BAL levý	73	Alveolární a parietoalveolární stavy
ZÚ Praha	NPL406/20	-	-	-	-	-	BAL Levý	73	Alveolární a parietoalveolární stavy
ZÚ Praha	NPL407/20	-	-	-	-	-	Aspirát tracheální	79	COVID-19
ZÚ Praha	NPL414/20	VOR	0,06	1	0,016	1	Sputum	36	Transplantovaná ledvina
ZÚ Praha	NPL43/20	VOR	-	-	-	-	BAT	72	Pneumonie
ZÚ Praha	NPL431/20	-	-	-	-	-	Sekret bronchiální	62	Pneumonie
ZÚ Praha	NPL432/20	ITR	0,03	0,03	0,016	0,03	Sputum	65	Pneumonie
ZÚ Praha	NPL444/19	-	-	-	-	-	BAL	93	CHOPN
ZÚ Praha	NPL468/20	VOR	0,25	1	0,25	1	Sputum	68	Pneumonie
ZÚ Praha	NPL47/20	-	-	-	-	-	Ucho L	42	Otitis externa
ZÚ Praha	NPL476/20	-	0,25	0,125	0,125	0,125	Sputum	62	Akutní respirační selhání, Typ I [hypoxický]
ZÚ Praha	NPL496/20	-	-	-	-	-	Kanyla endotracheální	71	Sepse, původce: Staphylococcus aureus
ZÚ Praha	NPL500/20	VOR	0,016	0,125	0,016	0,125	žluč	66	Záněť žlučových cest
ZÚ Praha	NPL510/20	-	-	-	-	-	Otisk PDK	47	Popáleniny více částí těla, vč. popáleniny 3. st
ZÚ Praha	NPL518/20	-	-	-	-	-	Sputum	47	Městnavé selhání srdce
ZÚ Praha	NPL520/20	VOR	0,5	0,125	0,125	0,25	BAL	47	Městnavé selhání srdce
ZÚ Praha	NPL568/20	-	-	-	-	-	Ucho P	43	Otitis externa
ZÚ Praha	NPL618/20	VOR	0,125	0,03	0,125	0,06	BAL	65	Jiná akutní pankreatitida
ZÚ Praha	NPL645/20	-	-	-	-	-	Ucho L	53	Otitis externa
ZÚ Praha	NPL66/21	-	-	-	-	-	Ucho L	32	Otitis externa
ZÚ Praha	NPL668/20	-	-	-	-	-	Sputum	75	CHOPN
ZÚ Praha	NPL673/20	-	-	-	-	-	BAL	64	Pneumonie
ZÚ Praha	NPL678/19	-	-	-	-	-	BAL	70	Bronchopneumonie
ZÚ Praha	NPL685/20	-	-	-	-	-	Aspirát tracheální	71	ZN - hlava slinivky břišní

Instituce	ID vzorku ¹	SCR v.1 ²	ITR	VOR	POS	ISA	Substrát	Věk	Primární onemocnění
ZÚ Praha	NPL695/20	ITR	>32	2	0,25	4	Sekret bronchiální	77	Bolesti dolní části zad; bederní krajina
ZÚ Praha	NPL696/20	VOR	1	0,125	0,5	0,125	Sputum	70	Cirhóza jater
ZÚ Praha	NPL697/20	VOR	0,25	0,25	0,125	0,5	Sputum	48	Dilatovaná kardiomyopatie
ZÚ Praha	NPL701/20	VOR	0,03	0,125	0,016	0,125	Stěr rána PDK	43	Diabetes mellitus 2. typu
ZÚ Praha	NPL705/19A = CCF 6440	ITR, POS	>32	4	0,5	8	BAL	40	Pneumonie
ZÚ Praha	NPL705/19B	-	-	-	-	-	BAL	40	Pneumonie
ZÚ Praha	NPL706/19	VOR	0,06	0,125	0,016	0,25	BAL	53	Pneumonie
ZÚ Praha	NPL728/19	VOR	0,25	0,03	0,125	0,06	Ucho L	79	Atikoantrální CSOM
ZÚ Praha	NPL733/19	-	-	-	-	-	Sputum	86	ZN - průduška a plíce
ZÚ Praha	NPL734/19	-	-	-	-	-	BAL	62	Pneumonie
ZÚ Praha	NPL757/19	ITR, VOR	0,5	0,125	0,25	0,25	Aspirát bronchiální	86	Akutní peritonitida
ZÚ Praha	NPL757/20	-	-	-	-	-	Ucho P	60	Otitis externa
ZÚ Praha	NPL759/19	-	-	-	-	-	Ucho L	59	Otitis externa
ZÚ Praha	NPL775/19	ITR, VOR	0,125	0,03	0,06	0,125	Ucho L	39	Absces zevního ucha
ZÚ Praha	NPL801/19	VOR	0,25	0,03	0,125	0,06	Sputum	60	Kámen žlučových cest
ZÚ Praha	NPL804/19	VOR	0,03	0,25	0,06	0,5	Ucho L	79	Atikoantrální CSOM
ZÚ Praha	NPL840/20	VOR	0,06	0,25	0,06	0,5	Ucho	64	Otitis externa
ZÚ Praha	NPL846/21	-	-	-	-	-	Sputum	58	COVID-19
ZÚ Praha	NPL870/19	ITR	0,25	0,06	0,125	0,06	BAL	75	Bronchopneumonie
ZÚ Praha	NPL879/20	-	-	-	-	-	BAT	86	Akutní tubulo-intersticiální nefritida
ZÚ Praha	NPL89/20	VOR	0,03	0,125	0,16	0,5	Sputum	75	Pneumonie
ZÚ Praha	NPL897/19	-	-	-	-	-	Sputum	66	Pneumonie
ZÚ Praha	NPL919/20	ITR	0,125	0,06	0,06	0,06	Ucho L	44	Serózní OMA
ZÚ Praha	NPL886/21	ITR, VOR, POS	>8	4	0,25	8	Mozková tkáň, absces	65	COVID-19
ZÚ Praha	NPL934/21	ITR, VOR	>8	4	0,25	8	Aspirát tracheální	65	COVID-19
ZÚ Praha	NPL938/19	-	-	-	-	-	BAT	70	Pneumonie
ZÚ Praha	NPL943/19	-	-	-	-	-	Ucho L	44	Záněť Eustachovy trubice

Instituce	ID vzorku ¹	SCR v.1 ²	ITR	VOR	POS	ISA	Substrát	Věk	Primární onemocnění
ZÚ Praha	NPL948/20	-	-	-	-	-	BAT	87	Onemocnění DS
ZÚ Praha	NPL955/20	-	-	-	-	-	BAT	37	Pneumonie
ZÚ Praha	NPL959/19	VOR	0,5	0,25	0,25	0,25	Ucho L	59	Zánět Eustachovy trubice
ZÚ Praha	NPL983/20	-	-	-	-	-	BAT	68	Pneumonie
ZÚ Praha	NPL990/20	ITR, VOR	0,125	0,03	0,06	0,125	Sputum	74	CHOPN
ZÚ Ostrava	CLIS10321/19	-	-	0,25	0,125	0,125	Sputum	64	Mnohočetný myelom
ZÚ Ostrava	CLIS10370/19	-	-	0,125	0,125	0,25	BAL	71	Lymfom z plášťové zóny
ZÚ Ostrava	CLIS10379/19	-	-	-	-	-	Výtěr z ucha	67	Jiná Otitis externa
ZÚ Ostrava	CLIS10394/19	ITR	-	0,25	0,125	0,125	Sputum	10	Jiné vrozené vady slinivky břišní a pankreatického vývodu
ZÚ Ostrava	CLIS10554/20	-	-	0,25	0,125	0,5	Sputum	73	COVID-19
ZÚ Ostrava	CLIS10702/19	-	-	-	-	-	Výtěr z ucha	23	Atikoantrální CSOM
ZÚ Ostrava	CLIS10862/19	-	-	0,5	0,25	0,5	Sputum	50	Zlomenina dolního konce holenní kosti - Zavřená
ZÚ Ostrava	CLIS10942/20	-	-	0,125	0,064	0,25	Sputum	72	Jiná Crohnova nemoc
ZÚ Ostrava	CLIS11115C/19	-	-	0,25	0,064	0,25	Sputum	71	Dolní lalok, bronchus nebo plíce
ZÚ Ostrava	CLIS11250/19	-	0,25	0,25	0,12	0,5	Sputum	69	Plicní mykobakteriální infekce
ZÚ Ostrava	CLIS11340/19	-	-	-	-	-	Sputum	67	Porucha výživy
ZÚ Ostrava	CLIS11376/19	-	-	0,25	0,12	0,25	Sputum	69	Hlavní bronchus - novotvary
ZÚ Ostrava	CLIS11377/19	-	-	0,25	0,12	0,5	Sputum	74	Pneumonie NS
ZÚ Ostrava	CLIS11413/20	ITR, VOR	0,25	0,125	0,25	0,125	Sputum	61	Respirační selhání
ZÚ Ostrava	CLIS1144B/20	ITR	-	0,125	0,5	0,25	Sputum	35	Jiná určená poranění postihující více částí těla
ZÚ Ostrava	CLIS11528/19	-	-	0,25	0,125	0,5	Sputum	72	ZN vedlejších dutin
ZÚ Ostrava	CLIS11878B/19	-	-	0,125	0,125	0,25	Sputum	54	Jiné intersticiální plicní nemoci s fibrózou
ZÚ Ostrava	CLIS118880/19	ITR	0,125	0,125	0,125	0,125	Sputum	55	Astma NS
ZÚ Ostrava	CLIS11942C/19	-	-	0,125	0,125	0,25	Sputum	69	Průdušnice, průduška a plíce - novotvar
ZÚ Ostrava	CLIS12137/20	ITR	0,03	0,125	0,03	0,25	Sputum	64	CHOPN NS
ZÚ Ostrava	CLIS12207/20	ITR, VOR	0,25	2	0,25	2	Sputum	35	B-buněčný lymfom NS

Instituce	ID vzorku ¹	SCR v.1 ²	ITR	VOR	POS	ISA	Substrát	Věk	Primární onemocnění
ZÚ Ostrava	CLIS12214/19	-	-	0,25	0,125	0,25	Sputum	53	Monoklonální gamapatie neurčeného významu
ZÚ Ostrava	CLIS12224/19	-	-	0,25	0,125	0,25	Stěr z rány, podbřišek	14	Jiná určená poranění postihující více částí těla
ZÚ Ostrava	CLIS12496B/19	-	-	0,125	0,125	0,25	Sputum	79	Flebitida a tromboflebitida
ZÚ Ostrava	CLIS12513B/19	-	-	-	-	-	Sputum	22	Virové onemocnění lidské imunodeficiencie [HIV]
ZÚ Ostrava	CLIS12545/20	ITR	-	0,25	0,125	0,25	Sputum	82	Respirační selhání
ZÚ Ostrava	CLIS12546/20	-	-	0,125	0,125	0,25	Sputum	75	Dyspepsie
ZÚ Ostrava	CLIS12550/19	ITR, VOR	0,125	0,5	0,06	1	Sputum	56	Akutní bronchitida NS
ZÚ Ostrava	CLIS12645/20	ITR	-	0,25	0,064	0,25	Sputum	76	Akutní respirační selhání
ZÚ Ostrava	CLIS12982/20	-	-	0,125	0,064	0,25	Stěr z rány	51	Žilní městky DK se vředem
ZÚ Ostrava	CLIS13037/20	-	-	0,125	0,125	0,25	Sputum	82	Leukemie NS
ZÚ Ostrava	CLIS13147/20	-	-	0,25	0,125	0,25	Sputum	16	Dušnost – dyspnoe
ZÚ Ostrava	CLIS1356/20	-	0,06	0,25	0,125	0,5	Sputum	77	Jiné a neurčené infekční nemoci
ZÚ Ostrava	CLIS1530/20	-	-	0,125	0,125	0,25	Sputum	78	CHOPN NS
ZÚ Ostrava	CLIS2092/20	ITR, VOR	0,06	0,25	0,03	0,5	Sputum	68	Non-Hodgkinův lymfom NS
ZÚ Ostrava	CLIS2124/21	ITR VOR	>8	32	2	32	ETA	75	COVID-19
ZÚ Ostrava	CLIS2291/20	-	-	-	-	-	Sputum	44	Akutní bronchitida NS
ZÚ Ostrava	CLIS2398/20	-	-	0,25	0,064	0,25	Sputum	72	Chronické respirační selhání
ZÚ Ostrava	CLIS275/20	-	-	0,25	0,125	0,25	Sputum	15	CF NS
ZÚ Ostrava	CLIS2955/20	ITR	0,03	0,25	0,016	0,5	Sputum	65	Horní třetina jícnu - novotvar
ZÚ Ostrava	CLIS2956/20	ITR, VOR	0,5	1	0,25	>16	Sputum	63	Jiné intersticiální plicní nemoci s fibrózou
ZÚ Ostrava	CLIS2965/20	-	-	0,25	0,125	0,25	Sputum	63	Jiné intersticiální plicní nemoci s fibrózou
ZÚ Ostrava	CLIS3075/20	ITR	0,5	0,06	0,25	0,25	Sputum	56	Selhání levé komory
ZÚ Ostrava	CLIS3097/20	-	-	0,25	1	0,25	Sputum	57	Jiné a neurčené infekční nemoci
ZÚ Ostrava	CLIS3310/20	ITR	0,125	0,06	0,06	0,06	ETA	56	Sepse NS
ZÚ Ostrava	CLIS3493/20	-	-	-	-	-	Sputum	54	Mnohočetný myelom
ZÚ Ostrava	CLIS3817/20	-	-	0,25	0,125	0,25	ETA	83	Městnavé selhání srdce
ZÚ Ostrava	CLIS3840/20	ITR	0,25	1	0,25	2	Výtěr z ucha	43	OMA

Instituce	ID vzorku ¹	SCR v.1 ²	ITR	VOR	POS	ISA	Substrát	Věk	Primární onemocnění
ZÚ Ostrava	CLIS4313/21	ITR, VOR, POS	>8	32	0,5	32	Sputum	66	Flegmóna – celulitida – prstů ruky a nohy
ZÚ Ostrava	CLIS4474/20	-	-	-	-	-	Sputum	65	Akutní bronchitida NS
ZÚ Ostrava	CLIS4644/20	VOR, ITR	-	0,125	0,125	0,125	Stěr z rány	51	Zlomenina horního konce ulnae
ZÚ Ostrava	CLIS4738/20	-	-	0,125	0,125	0,125	Sputum	54	Astma NS
ZÚ Ostrava	CLIS4743/20	-	-	0,25	0,125	0,125	Sputum	75	Akutní infarkt myokardu NS
ZÚ Ostrava	CLIS4775B/20	-	-	-	-	-	Sputum	78	Pneumonie NS
ZÚ Ostrava	CLIS5076/20	-	-	0,25	0,125	0,25	ETA	52	Biliární akutní pankreatitida
ZÚ Ostrava	CLIS5076/20	ITR	-	0,25	0,125	0,25	ETA	53	Biliární akutní pankreatitida
ZÚ Ostrava	CLIS5585/20	ITR	-	0,25	0,125	0,5	Sputum	1	Respirační selhání
ZÚ Ostrava	CLIS5622/20	ITR	-	0,25	0,125	0,25	Sputum	65	Dolní lalok, bronchus nebo plíce
ZÚ Ostrava	CLIS5656B/20	-	-	-	-	-	Sputum	39	Virové onemocnění lidské imunodeficience [HIV]
ZÚ Ostrava	CLIS5754/20	-	-	0,25	0,125	0,25	Sputum	74	Pupeční kýla s neprůchodností bez gangrény
ZÚ Ostrava	CLIS6024/20	ITR	>8	2	0,5	4	Stěr z rány	43	Jiná určená poranění postihující více částí těla
ZÚ Ostrava	CLIS6168/20	ITR	-	0,125	0,25	0,125	Sputum	59	Astma NS
ZÚ Ostrava	CLIS6173/20	-	-	0,25	0,25	0,25	Stěr z hrtanu	62	Hrtan – larynx NS - novotvar
ZÚ Ostrava	CLIS6365/20	-	-	0,25	0,064	0,25	Bronchiální sekret	54	Jiná určená onemocnění DS
ZÚ Ostrava	CLIS6391/20	-	-	0,25	0,125	0,25	Sputum	67	ZN
ZÚ Ostrava	CLIS6413/20	-	-	-	-	-	Sputum	16	Nemoc nebo patologický stav NS
ZÚ Ostrava	CLIS6494/20	VOR	0,25	2	0,25	2	Výtěr z ucha	45	Otitis externa NS
ZÚ Ostrava	CLIS6860/20	-	-	0,25	0,125	0,25	ETA	67	Respirační selhání
ZÚ Ostrava	CLIS6923/20	-	-	0,25	0,25	0,25	Katetr z bronchu	67	Průdušnice, průduška a plíce - novotvar
ZÚ Ostrava	CLIS697/20	ITR	-	0,25	0,125	0,25	Sputum	65	ZN
ZÚ Ostrava	CLIS7119B/20	-	-	-	-	-	Výtěr z ucha	66	Neinfekční AOE
ZÚ Ostrava	CLIS7169B/20	-	-	0,25	0,125	0,125	Sputum	68	Astma NS
ZÚ Ostrava	CLIS735/20	-	-	0,5	0,25	0,5	Sputum	61	Mnohočetný myelom
ZÚ Ostrava	CLIS7384/20	-	0,5	0,5	0,06	1	Sputum	67	COVID-19

Instituce	ID vzorku ¹	SCR v.1 ²	ITR	VOR	POS	ISA	Substrát	Věk	Primární onemocnění
ZÚ Ostrava	CLIS7468B/20	-	0,25	0,125	0,125	0,25	Sputum	82	Sarkoidóza plic a mízních uzlin
ZÚ Ostrava	CLIS7777/20	-	-	0,25	0,125	0,25	Výtěr z nosu	5	Zrakový nerv – nervus opticus - novotvar
ZÚ Ostrava	CLIS7813/20	-	-	-	-	-	Sputum	69	Astma NS
ZÚ Ostrava	CLIS7844B/20	VOR	-	0,25	0,25	0,25	Sputum	15	Sepse NS
ZÚ Ostrava	CLIS7965/20	-	-	-	-	-	Výtěr z ucha	20	Zánět Eustachovy trubice
ZÚ Ostrava	CLIS8027/20	-	-	-	-	-	Výtěr z ucha	60	Neinfekční AOE
ZÚ Ostrava	CLIS8074/20	ITR	-	0,25	0,064	0,25	Sputum	53	Respirační selhání
ZÚ Ostrava	CLIS8077/20	-	-	0,25	0,125	0,25	Sputum	67	Virová pneumonie NS
ZÚ Ostrava	CLIS8379/20	-	-	0,25	0,125	0,25	Sputum	41	Poranění tračnicku – coloni - s otevřenou ránou do dutiny
ZÚ Ostrava	CLIS8495/19	-	-	0,125	0,125	-	Tkáň střední ucho	50	Střední ucho, nosní dutina a vedlejší dutiny nosní
ZÚ Ostrava	CLIS8683/20	-	-	0,125	0,125	0,125	Sputum	59	Jiná určená poranění postihující více částí těla
ZÚ Ostrava	CLIS8747/20	-	-	0,125	0,125	0,125	Sputum	72	Mozkový infarkt
ZÚ Ostrava	CLIS8896/20	-	-	0,25	0,125	0,25	Sputum	45	Akutní pankreatitida NS
ZÚ Ostrava	CLIS8908 /20	-	-	-	-	-	Sputum	37	Astma NS
ZÚ Ostrava	CLIS8998/20	-	-	-	-	-	Sputum	16	CF NS
ZÚ Ostrava	CLIS9029C/20	-	-	0,25	0,125	0,25	Sputum	66	Sepse NS
ZÚ Ostrava	CLIS9306/20	ITR	0,5	1	2	>16	Sputum	72	Chronická lymfocytární leukemie z B-buněk
ZÚ Ostrava	CLIS9882/20	ITR	-	0,125	0,125	0,125	Odsátí z bronchu	72	COVID-19

ITR, itrakonazol; VOR, vorikonazol; POS, posakonazol; ISA, isavukonazol

¹ID vzorku, označení vzorku; ²Screeningová metoda antifungální rezistence protokolem E.Def 10.1

Příloha 3.1 Seznam veškerých polních izolátů *Aspergillus fumigatus* z polí v ekologickém zemědělství

Lokalita	ID vzorku ¹	Datum sběru	Datum izolace	Izolační médium	ITR	VOR	POS	ISA	Vyhodnocení
Kutná Hora	EKU1C-1	14.5.2020	3.10.2020	SDA+STR+CHL					
Kutná Hora	EKU1C-2	14.5.2020	3.10.2020	SDA+STR+CHL					
Kutná Hora	EKU1C-3	14.5.2020	3.10.2020	SDA+STR+CHL					
Kutná Hora	EKU1R-1	14.5.2020	3.10.2020	SDA+STR+CHL+ITR	0,125	0,5	0,125	1	citlivý
Kutná Hora	EKU1R-2	14.5.2020	3.10.2020	SDA+STR+CHL+ITR	0,125	0,5	0,06	0,5	citlivý
Kutná Hora	EKU1R-3	14.5.2020	3.10.2020	SDA+STR+CHL+ITR	0,125	1	0,06	1	citlivý
Kutná Hora	EKU2C-1	14.5.2020	3.10.2020	SDA+STR+CHL					
Kutná Hora	EKU2C-2	14.5.2020	3.10.2020	SDA+STR+CHL					
Kutná Hora	EKU2C-3	14.5.2020	3.10.2020	SDA+STR+CHL					
Kutná Hora	EKU2R-1	14.5.2020	10.10.2020	SDA+STR+CHL+ITR	C	C	C	C	citlivý
Kutná Hora	EKU2R-2	14.5.2020	10.10.2020	SDA+STR+CHL+ITR	C	C	C	C	citlivý
Kutná Hora	EKU2R-3	14.5.2020	10.10.2020	SDA+STR+CHL+ITR	C	C	C	C	citlivý
Kutná Hora	EKU3C-1	14.5.2020	3.10.2020	SDA+STR+CHL					
Kutná Hora	EKU3C-2	14.5.2020	3.10.2020	SDA+STR+CHL					
Kutná Hora	EKU3C-3	14.5.2020	3.10.2020	SDA+STR+CHL					
Kutná Hora	EKU3R-1	14.5.2020	3.10.2020	SDA+STR+CHL+ITR	C	C	C	C	citlivý
Kutná Hora	EKU3R-2	14.5.2020	3.10.2020	SDA+STR+CHL+ITR	0,125	1	0,125	1	citlivý
Kutná Hora	EKU3R-3	14.5.2020	3.10.2020	SDA+STR+CHL+ITR	0,125	0,5	0,125	1	citlivý
Kutná Hora	EKU4C-1	14.5.2020	3.10.2020	SDA+STR+CHL					
Kutná Hora	EKU4C-2	14.5.2020	3.10.2020	SDA+STR+CHL					
Kutná Hora	EKU4C-3	14.5.2020	3.10.2020	SDA+STR+CHL					
Kutná Hora	EKU4R-1	14.5.2020	3.10.2020	SDA+STR+CHL+ITR	0,125	1	0,125	1	citlivý
Kutná Hora	EKU4R-2	14.5.2020	3.10.2020	SDA+STR+CHL+ITR	0,25	0,5	0,06	1	citlivý
Kutná Hora	EKU4R-3	14.5.2020	3.10.2020	SDA+STR+CHL+ITR	0,125	0,5	0,125	1	citlivý
Kutná Hora	EKU5C-1	14.5.2020	3.10.2020	SDA+STR+CHL					
Kutná Hora	EKU5C-2	14.5.2020	3.10.2020	SDA+STR+CHL					

Lokalita	ID vzorku ¹	Datum sběru	Datum izolace	Izolační médium	ITR	VOR	POS	ISA	Vyhodnocení
Kutná Hora	EKU5C-3	14.5.2020	3.10.2020	SDA+STR+CHL					
Kutná Hora	EKU5R-1	14.5.2020	3.10.2020	SDA+STR+CHL+ITR	0,125	0,5	0,06	0,5	citlivý
Kutná Hora	EKU5R-2	14.5.2020	3.10.2020	SDA+STR+CHL+ITR	0,125	0,5	0,06	1	citlivý
Kutná Hora	EKU5R-3	14.5.2020	3.10.2020	SDA+STR+CHL+ITR	0,125	0,25	0,06	0,5	citlivý
Louny	ELO1C-1	22.5.2020	24.8.2020	SDA+STR+CHL					
Louny	ELO1C-2	22.5.2020	10.10.2020	SDA+STR+CHL					
Louny	ELO1C-3	22.5.2020	10.10.2020	SDA+STR+CHL					
Louny	ELO1R-1	22.5.2020	10.9.2020	SDA+STR+CHL+ITR	C	C	C	C	citlivý
Louny	ELO1R-2	22.5.2020	10.9.2020	SDA+STR+CHL+ITR	0,25	1	0,06	1	citlivý
Louny	ELO1R-3	22.5.2020	10.9.2020	SDA+STR+CHL+ITR	0,125	0,5	0,125	1	citlivý
Louny	ELO2C-1	22.5.2020	24.8.2020	SDA+STR+CHL					
Louny	ELO2C-2	22.5.2020	10.9.2020	SDA+STR+CHL					
Louny	ELO2C-3	22.5.2020	10.10.2020	SDA+STR+CHL					
Louny	ELO2R-1	22.5.2020	10.9.2020	SDA+STR+CHL+ITR	C	C	C	C	citlivý
Louny	ELO2R-2	22.5.2020	10.9.2020	SDA+STR+CHL+ITR	0,25	1	0,06	1	citlivý
Louny	ELO2R-3	22.5.2020	10.9.2020	SDA+STR+CHL+ITR	0,06	0,5	0,016	1	citlivý
Louny	ELO3C-1	22.5.2020	24.8.2020	SDA+STR+CHL					
Louny	ELO3C-2	22.5.2020	24.8.2020	SDA+STR+CHL					
Louny	ELO3C-3	22.5.2020	10.10.2020	SDA+STR+CHL					
Louny	ELO3R-1	22.5.2020	10.9.2020	SDA+STR+CHL+ITR	0,06	0,125	0,06	1	citlivý
Louny	ELO3R-2	22.5.2020	10.9.2020	SDA+STR+CHL+ITR	0,06	0,5	0,125	1	citlivý
Louny	ELO3R-3	22.5.2020	10.9.2020	SDA+STR+CHL+ITR	0,125	1	0,06	1	citlivý
Louny	ELO4C-1	22.5.2020	24.8.2020	SDA+STR+CHL					
Louny	ELO4C-2	22.5.2020	10.10.2020	SDA+STR+CHL					
Louny	ELO4C-3	22.5.2020	10.10.2020	SDA+STR+CHL					
Louny	ELO4R-1	22.5.2020	10.9.2020	SDA+STR+CHL+ITR	C	C	C	C	citlivý
Louny	ELO4R-2	22.5.2020	10.9.2020	SDA+STR+CHL+ITR	0,125	0,125	0,03	0,25	citlivý

Lokalita	ID vzorku ¹	Datum sběru	Datum izolace	Izolační médium	ITR	VOR	POS	ISA	Vyhodnocení
Louny	ELO4R-3	22.5.2020	10.9.2020	SDA+STR+CHL+ITR	0,06	0,5	0,06	1	citlivý
Louny	ELO5C-1	22.5.2020	24.8.2020	SDA+STR+CHL					
Louny	ELO5C-2	22.5.2020	24.8.2020	SDA+STR+CHL					
Louny	ELO5C-3	22.5.2020	10.10.2020	SDA+STR+CHL					
Louny	ELO5R-1	22.5.2020	10.9.2020	SDA+STR+CHL+ITR	0,125	0,5	0,06	1	citlivý
Louny	ELO5R-2	22.5.2020	10.9.2020	SDA+STR+CHL+ITR	0,125	1	0,125	1	citlivý
Louny	ELO5R-3	22.5.2020	10.9.2020	SDA+STR+CHL+ITR	C	C	C	C	citlivý
Plzeň	EPL1C-1	18.5.2020	22.7.2020	SDA+STR+CHL					
Plzeň	EPL1C-2	18.5.2020	22.7.2020	SDA+STR+CHL					
Plzeň	EPL1C-3	18.5.2020	22.7.2020	SDA+STR+CHL					
Plzeň	EPL1R-1	18.5.2020	20.10.2020	SDA+STR+CHL+ITR	C	C	C	C	citlivý
Plzeň	EPL1R-2	18.5.2020	20.10.2020	SDA+STR+CHL+ITR	C	C	C	C	citlivý
Plzeň	EPL1R-3	18.5.2020	20.10.2020	SDA+STR+CHL+ITR	0,25	1	0,125	2	citlivý
Plzeň	EPL2C-1	18.5.2020	3.8.2020	SDA+STR+CHL					
Plzeň	EPL2C-2	18.5.2020	3.8.2020	SDA+STR+CHL					
Plzeň	EPL2C-3	18.5.2020	3.8.2020	SDA+STR+CHL					
Plzeň	EPL2R-1	18.5.2020	20.8.2020	SDA+STR+CHL+ITR	C	C	C	C	citlivý
Plzeň	EPL2R-2	18.5.2020	20.8.2020	SDA+STR+CHL+ITR	0,25	0,25	0,06	2	citlivý
Plzeň	EPL2R-3	18.5.2020	20.8.2020	SDA+STR+CHL+ITR	0,125	1	0,125	1	citlivý
Plzeň	EPL3C-1	18.5.2020	10.10.2020	SDA+STR+CHL					
Plzeň	EPL3C-2	18.5.2020	10.10.2020	SDA+STR+CHL					
Plzeň	EPL3C-3	18.5.2020	10.10.2020	SDA+STR+CHL					
Plzeň	EPL3R-1	18.5.2020	27.10.2020	SDA+STR+CHL+ITR	0,06	0,06	0,03	0,25	citlivý
Plzeň	EPL3R-2	18.5.2020	27.10.2020	SDA+STR+CHL+ITR	0,25	1	0,06	1	citlivý
Plzeň	EPL3R-3	18.5.2020	27.10.2020	SDA+STR+CHL+ITR	0,125	1	0,125	1	citlivý
Plzeň	EPL4C-1	18.5.2020	10.10.2020	SDA+STR+CHL					
Plzeň	EPL4C-2	18.5.2020	10.10.2020	SDA+STR+CHL					

Lokalita	ID vzorku ¹	Datum sběru	Datum izolace	Izolační médium	ITR	VOR	POS	ISA	Vyhodnocení
Plzeň	EPL4C-3	18.5.2020	10.10.2020	SDA+STR+CHL					
Plzeň	EPL4R-1	18.5.2020	23.10.2020	SDA+STR+CHL+ITR	C	C	C	C	citlivý
Plzeň	EPL4R-2	18.5.2020	23.10.2020	SDA+STR+CHL+ITR	C	C	C	C	citlivý
Plzeň	EPL4R-3	18.5.2020	23.10.2020	SDA+STR+CHL+ITR	C	C	C	C	citlivý
Plzeň	EPL5C-1	18.5.2020	10.10.2020	SDA+STR+CHL					
Plzeň	EPL5C-2	18.5.2020	10.10.2020	SDA+STR+CHL					
Plzeň	EPL5C-3	18.5.2020	10.10.2020	SDA+STR+CHL					
Plzeň	EPL5R-1	18.5.2020	27.10.2020	SDA+STR+CHL+ITR	C	C	C	C	citlivý
Plzeň	EPL5R-2	18.5.2020	27.10.2020	SDA+STR+CHL+ITR	0,125	0,5	0,06	1	citlivý
Plzeň	EPL5R-3	18.5.2020	27.10.2020	SDA+STR+CHL+ITR	0,25	0,5	0,03	0,5	citlivý
Praha	EPR1C-1	20.5.2020	12.6.2020	SDA+STR+CHL					
Praha	EPR1C-2	20.5.2020	12.6.2020	SDA+STR+CHL					
Praha	EPR1C-3	20.5.2020	12.6.2020	SDA+STR+CHL					
Praha	EPR1R-1	20.5.2020	20.10.2020	SDA+STR+CHL+ITR	0,5	1	0,25	1	citlivý
Praha	EPR1R-2	20.5.2020	20.10.2020	SDA+STR+CHL+ITR	0,125	0,5	0,06	1	citlivý
Praha	EPR1R-3	20.5.2020	20.10.2020	SDA+STR+CHL+ITR	0,25	1	0,125	1	citlivý
Praha	EPR2C-1	20.5.2020	22.7.2020	SDA+STR+CHL					
Praha	EPR2C-2	20.5.2020	22.7.2020	SDA+STR+CHL					
Praha	EPR2C-3	20.5.2020	22.7.2020	SDA+STR+CHL					
Praha	EPR2R-1	20.5.2020	3.8.2020	SDA+STR+CHL+ITR	0,25	1	0,25	1	citlivý
Praha	EPR2R-2	20.5.2020	3.8.2020	SDA+STR+CHL+ITR	0,25	0,5	0,25	1	citlivý
Praha	EPR2R-3	20.5.2020	3.8.2020	SDA+STR+CHL+ITR	0,5	0,5	0,25	2	citlivý
Praha	EPR3C-1	20.5.2020	29.7.2020	SDA+STR+CHL					
Praha	EPR3C-2	20.5.2020	3.8.2020	SDA+STR+CHL					
Praha	EPR3C-3	20.5.2020	3.8.2020	SDA+STR+CHL					
Praha	EPR3R-1	20.5.2020	3.8.2020	SDA+STR+CHL+ITR	C	C	C	C	citlivý
Praha	EPR3R-2	20.5.2020	3.8.2020	SDA+STR+CHL+ITR	0,125	0,5	0,06	1	citlivý

Lokalita	ID vzorku ¹	Datum sběru	Datum izolace	Izolační médium	ITR	VOR	POS	ISA	Vyhodnocení
Praha	EPR3R-3	20.5.2020	3.8.2020	SDA+STR+CHL+ITR	0,25	0,5	0,125	1	citlivý
Praha	EPR4C-1	20.5.2020	22.7.2020	SDA+STR+CHL					
Praha	EPR4C-2	20.5.2020	3.8.2020	SDA+STR+CHL					
Praha	EPR4C-3	20.5.2020	3.8.2020	SDA+STR+CHL					
Praha	EPR4R-1	20.5.2020	3.8.2020	SDA+STR+CHL+ITR	0,03	0,5	0,03	0,5	citlivý
Praha	EPR4R-2	20.5.2020	3.8.2020	SDA+STR+CHL+ITR	0,125	0,5	0,125	1	citlivý
Praha	EPR4R-3	20.5.2020	3.8.2020	SDA+STR+CHL+ITR	0,25	1	0,06	1	citlivý
Praha	EPR5C-1	20.5.2020	29.7.2020	SDA+STR+CHL					
Praha	EPR5C-2	20.5.2020	22.7.2020	SDA+STR+CHL					
Praha	EPR5C-3	20.5.2020	22.7.2020	SDA+STR+CHL					
Praha	EPR5R-1	21.5.2020	20.8.2020	SDA+STR+CHL+ITR	0,125	0,5	0,125	2	citlivý
Praha	EPR5R-2	21.5.2020	20.8.2020	SDA+STR+CHL+ITR	0,25	0,5	0,125	1	citlivý
Praha	EPR5R-3	21.5.2020	20.8.2020	SDA+STR+CHL+ITR	0,25	0,5	0,125	0,5	citlivý
Tábor	ETA1C-1	15.5.2020	22.7.2020	SDA+STR+CHL					
Tábor	ETA1C-2	15.5.2020	22.7.2020	SDA+STR+CHL					
Tábor	ETA1C-3	15.5.2020	10.10.2020	SDA+STR+CHL					
Tábor	ETA1R-1	15.5.2020	23.10.2020	SDA+STR+CHL+ITR	C	C	C	C	citlivý
Tábor	ETA1R-2	15.5.2020	23.10.2020	SDA+STR+CHL+ITR	0,125	1	0,125	1	citlivý
Tábor	ETA1R-3	15.5.2020	23.10.2020	SDA+STR+CHL+ITR	1	1	0,125	1	citlivý
Tábor	ETA2C-1	15.5.2020	10.10.2020	SDA+STR+CHL					
Tábor	ETA2C-2	15.5.2020	23.10.2020	SDA+STR+CHL					
Tábor	ETA2C-3	15.5.2020	23.10.2020	SDA+STR+CHL					
Tábor	ETA2R-1	15.5.2020	20.8.2020	SDA+STR+CHL+ITR	0,125	0,125	0,25	0,25	citlivý
Tábor	ETA2R-2	15.5.2020	20.8.2020	SDA+STR+CHL+ITR	0,06	0,25	0,03	0,25	citlivý
Tábor	ETA2R-3	15.5.2020	20.8.2020	SDA+STR+CHL+ITR	0,016	0,03	0,016	0,06	citlivý
Tábor	ETA3C-1	15.5.2020	3.8.2020	SDA+STR+CHL					
Tábor	ETA3C-2	15.5.2020	3.8.2020	SDA+STR+CHL					

Lokalita	ID vzorku ¹	Datum sběru	Datum izolace	Izolační médium	ITR	VOR	POS	ISA	Vyhodnocení
Tábor	ETA3C-3	15.5.2020	3.8.2020	SDA+STR+CHL					
Tábor	ETA3R-1	15.5.2020	20.8.2020	SDA+STR+CHL+ITR	0,06	1	0,06	0,125	citlivý
Tábor	ETA3R-2	15.5.2020	20.8.2020	SDA+STR+CHL+ITR	0,06	0,25	0,03	0,25	citlivý
Tábor	ETA3R-3	15.5.2020	20.8.2020	SDA+STR+CHL+ITR	0,125	0,5	0,06	1	citlivý
Tábor	ETA4C-1	15.5.2020	3.8.2020	SDA+STR+CHL					
Tábor	ETA4C-2	15.5.2020	3.8.2020	SDA+STR+CHL					
Tábor	ETA4C-3	15.5.2020	3.8.2020	SDA+STR+CHL					
Tábor	ETA4R-1	15.5.2020	20.8.2020	SDA+STR+CHL+ITR	0,125	0,5	0,03	0,25	citlivý
Tábor	ETA4R-2	15.5.2020	20.8.2020	SDA+STR+CHL+ITR	C	C	C	C	citlivý
Tábor	ETA4R-3	15.5.2020	20.8.2020	SDA+STR+CHL+ITR	0,25	1	0,125	1	citlivý
Tábor	ETA5C-1	15.5.2020	16.10.2020	SDA+STR+CHL					
Tábor	ETA5C-2	15.5.2020	16.10.2020	SDA+STR+CHL					
Tábor	ETA5C-3	15.5.2020	16.10.2020	SDA+STR+CHL					
Tábor	ETA5R-1	15.5.2020	20.8.2020	SDA+STR+CHL+ITR	0,25	0,125	0,125	0,06	citlivý
Tábor	ETA5R-2	15.5.2020	20.8.2020	SDA+STR+CHL+ITR	0,5	1	0,125	1	citlivý
Tábor	ETA5R-3	15.5.2020	20.8.2020	SDA+STR+CHL+ITR	0,125	0,5	0,06	0,5	citlivý

ITR, itrakonazol; VOR, vorikonazol; POS, posakonazol; ISA, isavukonazol; C, citlivý; SDA, Sabouraud Dextrose Agar; STR, streptomycin; CHL, chloramfenikol

¹ID vzorku, označení vzorku

3.2 Seznam veškerých polních izolátů *Aspergillus fumigatus* z polí v zemědělství, kde jsou užívány azolové fungicidy

Lokalita	ID vzorku ¹	Datum sběru	Datum izolace	Izolační médium	ITR	VOR	POS	ISA	Vyhodnocení
Kutná Hora	FKU1C-1	15.5.2020	10.10.2020	SDA+STR+CHL					
Kutná Hora	FKU1C-2	15.5.2020	10.10.2020	SDA+STR+CHL					
Kutná Hora	FKU1C-3	15.5.2020	10.10.2020	SDA+STR+CHL					
Kutná Hora	FKU1R-1	15.5.2020	3.10.2020	SDA+STR+CHL+ITR	0,25	0,5	0,125	1	citlivý
Kutná Hora	FKU1R-2	15.5.2020	3.10.2020	SDA+STR+CHL+ITR	0,25	0,5	0,125	C	citlivý
Kutná Hora	FKU1R-3	15.5.2020	3.10.2020	SDA+STR+CHL+ITR	0,5	0,5	0,25	2	citlivý
Kutná Hora	FKU2C-1	15.5.2020	3.10.2020	SDA+STR+CHL					
Kutná Hora	FKU2C-2	15.5.2020	3.10.2020	SDA+STR+CHL					
Kutná Hora	FKU2C-3	15.5.2020	3.10.2020	SDA+STR+CHL					
Kutná Hora	FKU2R-1	15.5.2020	27.10.2020	SDA+STR+CHL+ITR	0,125	1	0,125	1	citlivý
Kutná Hora	FKU2R-2	15.5.2020	3.11.2020	SDA+STR+CHL+ITR	0,125	0,5	0,06	1	citlivý
Kutná Hora	FKU2R-3	15.5.2020	3.11.2020	SDA+STR+CHL+ITR	0,25	0,5	0,25	1	citlivý
Kutná Hora	FKU3C-1	15.5.2020	3.10.2020	SDA+STR+CHL					
Kutná Hora	FKU3C-2	15.5.2020	3.10.2020	SDA+STR+CHL					
Kutná Hora	FKU3C-3	15.5.2020	3.10.2020	SDA+STR+CHL					
Kutná Hora	FKU3R-1	15.5.2020	3.10.2020	SDA+STR+CHL+ITR	0,25	1	0,125	1	citlivý
Kutná Hora	FKU3R-2	15.5.2020	3.10.2020	SDA+STR+CHL+ITR	0,25	1	0,25	1	citlivý
Kutná Hora	FKU3R-3	15.5.2020	3.10.2020	SDA+STR+CHL+ITR	C	C	C	C	
Kutná Hora	FKU4C-1	15.5.2020	3.10.2020	SDA+STR+CHL					
Kutná Hora	FKU4C-2	15.5.2020	3.10.2020	SDA+STR+CHL					
Kutná Hora	FKU4C-3	15.5.2020	3.10.2020	SDA+STR+CHL					
Kutná Hora	FKU4R-1	15.5.2020	3.10.2020	SDA+STR+CHL+ITR	0,5	1	0,25	1	citlivý
Kutná Hora	FKU4R-2	15.5.2020	3.10.2020	SDA+STR+CHL+ITR	C	C	C	C	citlivý
Kutná Hora	FKU4R-3	15.5.2020	3.10.2020	SDA+STR+CHL+ITR	C	C	C	C	citlivý
Kutná Hora	FKU5C-1	15.5.2020	3.10.2020	SDA+STR+CHL					
Kutná Hora	FKU5C-2	15.5.2020	3.10.2020	SDA+STR+CHL					

Lokalita	ID vzorku ¹	Datum sběru	Datum izolace	Izolační médium	ITR	VOR	POS	ISA	Vyhodnocení
Kutná Hora	FKU5C-3	15.5.2020	3.10.2020	SDA+STR+CHL					
Kutná Hora	FKU5R-1	15.5.2020	20.10.2020	SDA+STR+CHL+ITR	C	C	C	C	citlivý
Kutná Hora	FKU5R-2	15.5.2020	20.10.2020	SDA+STR+CHL+ITR	0,125	0,5	0,03	0,5	citlivý
Kutná Hora	FKU5R-3	15.5.2020	20.10.2020	SDA+STR+CHL+ITR	0,125	0,5	0,06	1	citlivý
Louny	FLO1C-1	23.5.2020	24.8.2020	SDA+STR+CHL					
Louny	FLO1C-2	23.5.2020	24.8.2020	SDA+STR+CHL					
Louny	FLO1C-3	23.5.2020	24.8.2020	SDA+STR+CHL					
Louny	FLO1R-1	23.5.2020	10.9.2020	SDA+STR+CHL+ITR	0,06	0,25	0,03	1	citlivý
Louny	FLO1R-2	23.5.2020	10.9.2020	SDA+STR+CHL+ITR	1	1	0,25	2	citlivý
Louny	FLO1R-3	23.5.2020	10.9.2020	SDA+STR+CHL+ITR	0,06	0,5	0,03	0,25	citlivý
Louny	FLO2C-1	23.5.2020	24.8.2020	SDA+STR+CHL					
Louny	FLO2C-2	23.5.2020	24.8.2020	SDA+STR+CHL					
Louny	FLO2C-3	23.5.2020	24.8.2020	SDA+STR+CHL					
Louny	FLO2R-1	23.5.2020	10.9.2020	SDA+STR+CHL+ITR	0,03	0,5	0,06	0,5	citlivý
Louny	FLO2R-2	23.5.2020	10.9.2020	SDA+STR+CHL+ITR	0,25	0,5	0,03	1	citlivý
Louny	FLO2R-3	23.5.2020	10.9.2020	SDA+STR+CHL+ITR	C	C	C	C	
Louny	FLO3C-1	23.5.2020	24.8.2020	SDA+STR+CHL					
Louny	FLO3C-2	23.5.2020	24.8.2020	SDA+STR+CHL					
Louny	FLO3C-3	23.5.2020	24.8.2020	SDA+STR+CHL					
Louny	FLO3R-1	23.5.2020	10.9.2020	SDA+STR+CHL+ITR	0,125	0,5	0,06	1	citlivý
Louny	FLO3R-2	23.5.2020	10.9.2020	SDA+STR+CHL+ITR	0,25	1	0,06	1	citlivý
Louny	FLO3R-3	23.5.2020	10.9.2020	SDA+STR+CHL+ITR	0,125	0,5	0,06	1	citlivý
Louny	FLO4C-1	23.5.2020	24.8.2020	SDA+STR+CHL					
Louny	FLO4C-2	23.5.2020	24.8.2020	SDA+STR+CHL					
Louny	FLO4C-3	23.5.2020	24.8.2020	SDA+STR+CHL					
Louny	FLO4R-1	23.5.2020	10.9.2020	SDA+STR+CHL+ITR	C	C	C	C	citlivý
Louny	FLO4R-2	23.5.2020	10.9.2020	SDA+STR+CHL+ITR	0,125	0,5	0,06	0,5	citlivý

Lokalita	ID vzorku ¹	Datum sběru	Datum izolace	Izolační médium	ITR	VOR	POS	ISA	Vyhodnocení
Louny	FLO4R-3	23.5.2020	10.9.2020	SDA+STR+CHL+ITR	0,25	0,5	0,125	0,5	citlivý
Louny	FLO5C-1	23.5.2020	24.8.2020	SDA+STR+CHL					
Louny	FLO5C-2	23.5.2020	24.8.2020	SDA+STR+CHL					
Louny	FLO5C-3	23.5.2020	24.8.2020	SDA+STR+CHL					
Louny	FLO5R-1	23.5.2020	10.9.2020	SDA+STR+CHL+ITR	0,06	1	0,03	0,5	citlivý
Louny	FLO5R-2	23.5.2020	20.10.2020	SDA+STR+CHL+ITR	0,25	1	0,25	0,5	citlivý
Louny	FLO5R-3	23.5.2020	20.10.2020	SDA+STR+CHL+ITR	C	C	C	C	citlivý
Plzeň	FPL1C-1	19.5.2020	22.7.2020	SDA+STR+CHL					
Plzeň	FPL1C-2	19.5.2020	22.7.2020	SDA+STR+CHL					
Plzeň	FPL1C-3	19.5.2020	22.7.2020	SDA+STR+CHL					
Plzeň	FPL1R-1	19.5.2020	20.8.2020	SDA+STR+CHL+ITR	C	C	C	C	citlivý
Plzeň	FPL1R-2	19.5.2020	20.8.2020	SDA+STR+CHL+ITR	0,06	0,5	0,06	0,5	citlivý
Plzeň	FPL1R-3	19.5.2020	20.8.2020	SDA+STR+CHL+ITR	0,25	1	0,06	1	citlivý
Plzeň	FPL2C-1	19.5.2020	3.8.2020	SDA+STR+CHL					
Plzeň	FPL2C-2	19.5.2020	3.8.2020	SDA+STR+CHL					
Plzeň	FPL2C-3	19.5.2020	3.8.2020	SDA+STR+CHL					
Plzeň	FPL2R-1	19.5.2020	20.8.2020	SDA+STR+CHL+ITR	0,125	0,5	0,06	1	citlivý
Plzeň	FPL2R-2	19.5.2020	20.8.2020	SDA+STR+CHL+ITR	0,125	0,25	0,125	0,5	citlivý
Plzeň	FPL2R-3	19.5.2020	20.8.2020	SDA+STR+CHL+ITR	0,125	1	0,06	1	citlivý
Plzeň	FPL3C-1	19.5.2020	10.10.2020	SDA+STR+CHL					
Plzeň	FPL3C-2	19.5.2020	10.10.2020	SDA+STR+CHL					
Plzeň	FPL3C-3	19.5.2020	10.10.2020	SDA+STR+CHL					
Plzeň	FPL3R-1	19.5.2020	23.10.2020	SDA+STR+CHL+ITR	C	C	C	C	citlivý
Plzeň	FPL3R-2	19.5.2020	23.10.2020	SDA+STR+CHL+ITR	0,125	0,5	0,03	0,25	citlivý
Plzeň	FPL3R-3	19.5.2020	23.10.2020	SDA+STR+CHL+ITR	0,125	1	0,06	1	citlivý
Plzeň	FPL4C-1	19.5.2020	10.10.2020	SDA+STR+CHL					
Plzeň	FPL4C-2	19.5.2020	10.10.2020	SDA+STR+CHL					

Lokalita	ID vzorku ¹	Datum sběru	Datum izolace	Izolační médium	ITR	VOR	POS	ISA	Vyhodnocení
Plzeň	FPL4C-3	19.5.2020	10.10.2020	SDA+STR+CHL					
Plzeň	FPL4R-1	19.5.2020	23.10.2020	SDA+STR+CHL+ITR	C	C	C	C	citlivý
Plzeň	FPL4R-2	19.5.2020	23.10.2020	SDA+STR+CHL+ITR	C	C	C	C	citlivý
Plzeň	FPL4R-3	19.5.2020	23.10.2020	SDA+STR+CHL+ITR	0,125	0,5	0,06	1	citlivý
Plzeň	FPL5C-1	19.5.2020	10.10.2020	SDA+STR+CHL					
Plzeň	FPL5C-2	19.5.2020	10.10.2020	SDA+STR+CHL					
Plzeň	FPL5C-3	19.5.2020	10.10.2020	SDA+STR+CHL					
Plzeň	FPL5R-1	19.5.2020	23.10.2020	SDA+STR+CHL+ITR	0,125	0,5	0,25	0,5	citlivý
Plzeň	FPL5R-2	19.5.2020	23.10.2020	SDA+STR+CHL+ITR	0,125	0,5	0,06	0,5	citlivý
Plzeň	FPL5R-3	19.5.2020	23.10.2020	SDA+STR+CHL+ITR	0,25	2	0,25	1	citlivý
Praha	FPR1C-1	21.5.2020	12.6.2020	SDA+STR+CHL					
Praha	FPR1C-2	21.5.2020	12.6.2020	SDA+STR+CHL					
Praha	FPR1C-3	21.5.2020	12.6.2020	SDA+STR+CHL					
Praha	FPR1R-1	21.5.2020	20.10.2020	SDA+STR+CHL+ITR	0,06	0,5	0,06	1	citlivý
Praha	FPR1R-2	21.5.2020	20.10.2020	SDA+STR+CHL+ITR	0,25	0,5	0,125	1	citlivý
Praha	FPR1R-3	21.5.2020	20.10.2020	SDA+STR+CHL+ITR	0,0125	0,125	0,016	0,06	citlivý
Praha	FPR2C-1	21.5.2020	29.7.2020	SDA+STR+CHL					
Praha	FPR2C-2	21.5.2020	8.10.2020	SDA+STR+CHL					
Praha	FPR2C-3	21.5.2020	8.10.2020	SDA+STR+CHL					
Praha	FPR2R-1	21.5.2020	3.8.2020	SDA+STR+CHL+ITR	C	C	C	C	citlivý
Praha	FPR2R-2	21.5.2020	3.8.2020	SDA+STR+CHL+ITR	0,25	1	0,06	1	citlivý
Praha	FPR2R-3	21.5.2020	3.8.2020	SDA+STR+CHL+ITR	0,25	1	0,06	1	citlivý
Praha	FPR3C-1	21.5.2020	22.7.2020	SDA+STR+CHL					
Praha	FPR3C-2	21.5.2020	22.7.2020	SDA+STR+CHL					
Praha	FPR3C-3	21.5.2020	22.7.2020	SDA+STR+CHL					
Praha	FPR3R-1	21.5.2020	3.8.2020	SDA+STR+CHL+ITR	0,06	0,5	0,03	0,5	citlivý
Praha	FPR3R-2	21.5.2020	3.8.2020	SDA+STR+CHL+ITR	0,125	1	0,125	1	citlivý

Lokalita	ID vzorku ¹	Datum sběru	Datum izolace	Izolační médium	ITR	VOR	POS	ISA	Vyhodnocení
Praha	FPR3R-3	21.5.2020	3.8.2020	SDA+STR+CHL+ITR	0,06	0,5	0,06	0,5	citlivý
Praha	FPR4C-1	21.5.2020	22.7.2020	SDA+STR+CHL					
Praha	FPR4C-2	21.5.2020	22.7.2020	SDA+STR+CHL					
Praha	FPR4C-2	21.5.2020	8.10.2020	SDA+STR+CHL					
Praha	FPR4R-1	21.5.2020	20.8.2020	SDA+STR+CHL+ITR	C	C	C	C	citlivý
Praha	FPR4R-2	21.5.2020	20.8.2020	SDA+STR+CHL+ITR	0,25	0,5	0,06	0,5	citlivý
Praha	FPR4R-3	21.5.2020	20.8.2020	SDA+STR+CHL+ITR	0,25	0,5	0,03	1	citlivý
Praha	FPR5C-1	20.5.2020	22.7.2020	SDA+STR+CHL+ITR					
Praha	FPR5C-2	20.5.2020	1.7.2020	SDA+STR+CHL+ITR					
Praha	FPR5C-3	20.5.2020	29.7.2020	SDA+STR+CHL+ITR					
Praha	FPR5R-1	21.5.2020	20.8.2020	SDA+STR+CHL	C	C	C	C	citlivý
Praha	FPR5R-2	21.5.2020	20.8.2020	SDA+STR+CHL	0,25	1	0,125	1	citlivý
Praha	FPR5R-3	21.5.2020	20.8.2020	SDA+STR+CHL	0,125	0,5	0,125	1	citlivý
Tábor	FTA1C-1	16.5.2020	22.7.2020	SDA+STR+CHL					
Tábor	FTA1C-2	16.5.2020	10.10.2020	SDA+STR+CHL					
Tábor	FTA1C-3	16.5.2020	10.10.2020	SDA+STR+CHL					
Tábor	FTA1R-1	16.5.2020	20.8.2020	SDA+STR+CHL+ITR	0,25	0,25	0,03	1	citlivý
Tábor	FTA1R-2	16.5.2020	20.8.2020	SDA+STR+CHL+ITR	0,125	0,125	0,125	0,125	citlivý
Tábor	FTA1R-3	16.5.2020	20.8.2020	SDA+STR+CHL+ITR	0,25	1	0,125	1	citlivý
Tábor	FTA2C-1	16.5.2020	29.7.2020	SDA+STR+CHL					
Tábor	FTA2C-2	16.5.2020	22.7.2020	SDA+STR+CHL					
Tábor	FTA2C-3	16.5.2020	22.7.2020	SDA+STR+CHL					
Tábor	FTA2R-1	16.5.2020	20.8.2020	SDA+STR+CHL+ITR	1	0,25	0,06	2	citlivý
Tábor	FTA2R-2	16.5.2020	20.8.2020	SDA+STR+CHL+ITR	0,25	1	0,06	1	citlivý
Tábor	FTA2R-3	16.5.2020	20.8.2020	SDA+STR+CHL+ITR	0,25	0,25	0,06	0,5	citlivý
Tábor	FTA3C-1	16.5.2020	3.8.2020	SDA+STR+CHL					
Tábor	FTA3C-2	16.5.2020	3.8.2020	SDA+STR+CHL					

Lokalita	ID vzorku ¹	Datum sběru	Datum izolace	Izolační médium	ITR	VOR	POS	ISA	Vyhodnocení
Tábor	FTA3C-3	16.5.2020	3.8.2020	SDA+STR+CHL					
Tábor	FTA3R-1	16.5.2020	20.8.2020	SDA+STR+CHL+ITR	C	C	C	C	citlivý
Tábor	FTA3R-2	16.5.2020	20.8.2020	SDA+STR+CHL+ITR	0,125	0,5	0,06	1	citlivý
Tábor	FTA3R-3	16.5.2020	20.8.2020	SDA+STR+CHL+ITR	0,03	0,25	0,03	0,5	citlivý
Tábor	FTA4C-1	16.5.2020	16.10.2020	SDA+STR+CHL					
Tábor	FTA4C-2	16.5.2020	16.10.2020	SDA+STR+CHL					
Tábor	FTA4C-3	16.5.2020	16.10.2020	SDA+STR+CHL					
Tábor	FTA4R-1	16.5.2020	20.8.2020	SDA+STR+CHL+ITR	0,125	1	0,06	1	citlivý
Tábor	FTA4R-2	16.5.2020	20.8.2020	SDA+STR+CHL+ITR	0,125	0,5	0,06	1	citlivý
Tábor	FTA4R-3	16.5.2020	20.8.2020	SDA+STR+CHL+ITR	0,25	1	0,25	1	citlivý
Tábor	FTA5C-1	16.5.2020	3.8.2020	SDA+STR+CHL					
Tábor	FTA5C-2	16.5.2020	3.8.2020	SDA+STR+CHL					
Tábor	FTA5C-3	16.5.2020	3.8.2020	SDA+STR+CHL					
Tábor	FTA5R-1	16.5.2020	20.8.2020	SDA+STR+CHL+ITR	0,03	0,25	0,03	0,5	citlivý
Tábor	FTA5R-2	16.5.2020	20.10.2020	SDA+STR+CHL+ITR	0,125	0,5	0,06	1	citlivý
Tábor	FTA5R-3	16.5.2020	20.10.2020	SDA+STR+CHL+ITR	0,125	1	0,125	1	citlivý

ITR, itrakonazol; VOR, vorikonazol; POS, posakonazol; ISA, isavukonazol; C, citlivý; SDA, Sabouraud Dextrose Agar; STR, streptomycin; CHL, chloramfenikol

¹ID vzorku, označení vzorku

Příloha 4.

Výsledné hodnoty minimální inhibiční koncentrace azol-rezistentních kmenů *Aspergillus fumigatus* získaných ze třech klinických institucí vůči čtyřem azolovým léčivům v mg/l

Pracoviště	ID vzorku	CCF	ITR	VOR	POS	ISA
Motol						
Motol	CF1775/19	6649	8,00	8,00	0,50	16,00
Motol	CF1827/19	6650	8,00	4,00	0,50	8,00
Motol	MY20219/19	6651	8,00	4,00	0,50	8,00
Motol	MY21237/19	-	8,00	4,00	0,50	8,00
Motol	MY22308/20	6675	8,00	4,00	0,50	8,00
ZÚ Praha						
ZÚ Praha	NPL 831/21A	6676	0,25	16,00	0,13	16,00
ZÚ Praha	NPL1362/21	6674	0,25	8,00	0,50	8,00
ZÚ Praha	NPL1370/21	-	8,00	2,00	0,25	8,00
ZÚ Praha	NPL695/20	6653	32,00	2,00	0,25	4,00
ZÚ Praha	NPL705/19A	6440	32,00	4,00	0,50	8,00
ZÚ Praha	NPL886/21	6654	8,00	4,00	0,25	8,00
ZÚ Praha	NPL934/21	6655	8,00	4,00	0,25	8,00
ZÚ Ostrava						
ZÚ Ostrava	CLIS12207/20	6656	0,25	2,00	0,25	2,00
ZU Ostrava	CLIS2124/21	6600, 6657	8,00	32,00	2,00	32,00
ZU Ostrava	CLIS3840/20	6658	0,25	1,00	0,25	2,00
ZU Ostrava	CLIS4313/21	6601	8,00	32,00	0,50	32,00
ZU Ostrava	CLIS6024/20	6677	8,00	2,00	0,50	4,00
ZU Ostrava	CLIS6494/20	6659	0,25	2,00	0,25	2,00
ZU Ostrava	CLIS9306/20	6678	0,50	1,00	2,00	16,00

CCF, Culture Collection of Fungi; ITR, itrakonazol; VOR, vorikonazol; POS, posakonazol; ISA, isavukonazol

Příloha 5.

Deskriptivní statistické výpočty minimálních inhibičních koncentrací čtyř azolových derivátů (ITR, VOR, POS a ISA) všech rezistentních izolátů *Aspergillus fumigatus* z klinického prostředí metodou E.Def 9.3, zahrnující minimální hodnotu, aritmetický průměr, geometrický průměr, medián a maximální hodnotu v mg/l

ITRAKONAZOL					
Pracoviště	Minimum	Aritmetický průměr	Geometrický průměr	Medián	Maximum
Motol	8,00	8,80	8,00	8,00	8,00
ZU Praha	0,25	12,64	4,42	8,00	32,00
ZU Ostrava	0,25	3,61	1,22	0,50	8,00

VORIKONAZOL					
Pracoviště	Minimum	Aritmetický Průměr	Geometrický průměr	Medián	Maximum
Motol	4,00	4,80	4,59	4,00	8,00
ZU Praha	2,00	5,71	4,42	4,00	16,00
ZU Ostrava	1,00	10,29	3,62	2,00	32,00

POSAKONAZOL					
Pracoviště	Minimum	Aritmetický Průměr	Geometrický průměr	Medián	Maximum
Motol	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50
ZU Praha	0,13	0,30	0,28	0,25	0,50
ZU Ostrava	0,25	0,82	0,55	0,50	2,00

ISAVUKONAZOL					
Pracoviště	Minimum	Aritmetický Průměr	Geometrický průměr	Medián	Maximum
Motol	2,8,00	9,60	9,19	8,00	16,00
ZU Praha	4,00	8,57	8,00	8,00	16,00
ZU Ostrava	2,00	12,86	6,56	4,00	32,00

Příloha 6.

Postup výpočtu nezávislosti mezi azolovou rezistencí klinických izolátů *Aspergillus fumigatus* a pohlavím pacientů pomocí chi-kvadrát testu

Pohlaví	Pozorované hodnoty		
	rezistentní	citlivý	celkem
M	9	183	192
Ž	10	99	109
Celkem	19	282	301

Pohlaví	Očekávané hodnoty		
	rezistentní	citlivý	celkem
M	12	180	192
Ž	7	102	109
Celkem	19	282	301

Pohlaví	(O-E) ² /E	
	rezistentní	citlivý
M	0,80	0,05
Ž	1,41	0,10

X ²	df	p-hodnota
2,3668	1	0,1239

Postup výpočtu nezávislosti mezi azolovou rezistencí klinických izolátů *Aspergillus fumigatus* a věkem pacientů pomocí chi-kvadrát testu

Věk	Pozorované hodnoty		
	rezistentní	citlivý	celkem
1-30	4	43	47
31-60	5	103	108
nad 61	10	136	146
Celkem	19	282	301

Věk	Očekávané hodnoty		
	rezistentní	citlivý	celkem
1-30	3	44,0	47,0
31-60	7	101	108,0
nad 61	9	137	146
Celkem	19	282	301

Věk	(O-E) ² /E	
	rezistentní	citlivý
1-30	0,36	0,02
31-60	0,48	0,03
nad 61	0,07	0,00

X ²	df	p-hodnota
0,9723	2	0,6150

Postup výpočtu nezávislosti mezi azolovou rezistencí klinických izolátů *Aspergillus fumigatus* a lokací odběrného místa vzorků pomocí chi-kvadrát testu

Lokace	Pozorované hodnoty		
	rezistentní	citlivý	celkem
ZÚ Praha	7	137	144
ZÚ Ostrava	7	85	92
Motol	5	60	65
Celkem	19	282	301

Lokace	Očekávané hodnoty		
	rezistentní	citlivý	celkem
ZÚ Praha	9	135	145
ZÚ Ostrava	6	86	92
Motol	4	61	65
Celkem	19	282	301

Lokace	(O-E) ² /E	
	rezistentní	citlivý
ZÚ Praha	0,480	0,032
ZÚ Ostrava	0,245	0,017
Motol	0,196	0,013

X ²	df	p-hodnota
0,9836	2	0,6115

Postup výpočtu nezávislosti mezi azolovou rezistencí klinických izolátů *Aspergillus fumigatus* a rokem izolace vzorků pomocí chi-kvadrát testu

Rok izolace	Pozorované hodnoty		
	rezistentní	citlivý	celkem
2019	2	44	46
2020	6	191	197
2021	11	47	58
Celkem	19	283	301

Rok izolace	Očekávané hodnoty		
	rezistentní	citlivý	celkem
2019	3	43	46
2020	12	185	197
2021	4	54	58
Celkem	19	282	301

Rok izolace	(O-E) ² /E	
	rezistentní	citlivý
2019	0,281	0,019
2020	3,330	0,224
2021	14,711	0,991

X ²	df	p-hodnota
19,5570	2	0,0001

Příloha 7.

Deskriptivní statistické výpočty minimálních inhibičních koncentrací čtyř azolových derivátů všech testovaných polních izolátů *Aspergillus fumigatus* metodou E.Def 9.3, zahrnující minimální hodnotu, průměr, aritmetický průměr, geometrický průměr, rozptyl, medián, maximální hodnotu a rozmezí hodnot v mg/l

		ITRAKONAZOL						
Lokalita		Min	Arit. průměr	Geo. průměr	Rozptyl	Medián	Max	Rozmezí
Kutná Hora	Vlkaneč	0,13	0,14	0,13	0,00	0,13	0,25	0,13
Kutná Hora	Filipov u Čáslavi	0,13	0,25	0,22	0,02	0,25	0,50	0,38
Louny	Úlovice	0,06	0,12	0,11	0,00	0,13	0,25	0,19
Louny	Panenský Týnec	0,03	0,22	0,14	0,07	0,13	1,00	0,97
Plzeň	Chrást u Plzně	0,06	0,16	0,14	0,01	0,13	0,25	0,19
Plzeň	Červený Hrádek u Plzně	0,06	0,14	0,13	0,00	0,13	0,25	0,19
Praha	Ruzyně	0,03	0,23	0,19	0,02	0,25	0,50	0,47
Praha	Sedlec u Líbeznic	0,01	0,16	0,12	0,01	0,19	0,25	0,24
Tábor	Stoklasná Lhota	0,02	0,22	0,13	0,07	0,13	1,00	0,98
Tábor	Dolní Hořice	0,03	0,22	0,15	0,06	0,13	1,00	0,97

		VORIKONAZOL						
Lokalita		Min	Arit. průměr	Geo. průměr	Rozptyl	Medián	Max	Rozmezí
Kutná Hora	Vlkaneč	0,25	0,61	0,57	0,07	0,50	1,00	0,75
Kutná Hora	Filipov u Čáslavi	0,50	0,68	0,64	0,06	0,50	1,00	0,50
Louny	Úlovice	0,13	0,61	0,50	0,11	0,50	1,00	0,88
Louny	Panenský Týnec	0,25	0,65	0,59	0,07	0,50	1,00	0,75
Plzeň	Chrást u Plzně	0,06	0,71	0,58	0,15	0,50	2,00	1,94
Plzeň	Červený Hrádek u Plzně	0,25	0,75	0,64	0,24	0,50	2,00	1,75
Praha	Ruzyně	0,50	0,64	0,61	0,05	0,50	1,00	0,50
Praha	Sedlec u Líbeznic	0,13	0,64	0,56	0,08	0,50	1,00	0,88
Tábor	Stoklasná Lhota	0,03	0,56	0,38	0,15	0,50	1,00	0,97
Tábor	Dolní Hořice	0,13	0,59	0,47	0,13	0,50	1,00	0,88

POSAKONAZOL

Lokalita		Min	Arit. průměr	Geo. průměr	Rozptyl	Medián	Max	Rozmezí
Kutná Hora	Vlkaneč	0,06	0,09	0,08	0,00	0,06	0,13	0,07
Kutná Hora	Filipov u Čáslavi	0,03	0,15	0,12	0,01	0,13	0,25	0,22
Louny	Úlovice	0,02	0,07	0,06	0,00	0,06	0,13	0,11
Louny	Panenský Týnec	0,03	0,09	0,06	0,01	0,06	0,25	0,22
Plzeň	Chrást u Plzně	0,03	0,09	0,07	0,00	0,06	0,25	0,22
Plzeň	Červený Hrádek u Plzně	0,03	0,10	0,08	0,01	0,06	0,25	0,22
Praha	Ruzyně	0,03	0,14	0,12	0,01	0,13	0,25	0,22
Praha	Sedlec u Líbeznic	0,02	0,07	0,06	0,00	0,06	0,13	0,11
Tábor	Stoklasná Lhota	0,02	0,09	0,07	0,00	0,06	0,25	0,23
Tábor	Dolní Hořice	0,03	0,09	0,07	0,00	0,06	0,25	0,22

ISAVUKONAZOL								
Lokalita		Min	Arit. průměr	Geo. průměr	Rozptyl	Medián	Max	Rozmezí
Kutná Hora	Vlkaneč	0,50	0,86	0,83	0,05	1,00	1,00	0,50
Kutná Hora	Filipov u Čáslavi	0,50	1,05	1,00	0,14	1,00	2,00	1,50
Louny	Úlovice	0,25	0,93	0,88	0,05	1,00	1,00	0,75
Louny	Panenský Týnec	0,25	0,81	0,71	0,22	0,75	2,00	1,75
Plzeň	Chrást u Plzně	0,25	0,89	0,77	0,39	1,00	2,00	1,75
Plzeň	Červený Hrádek u Plzně	0,25	0,75	0,69	0,09	1,00	1,00	0,75
Praha	Ruzyně	0,50	1,07	1,00	0,19	1,00	2,00	1,50
Praha	Sedlec u Líbeznic	0,06	0,80	0,67	0,10	1,00	1,00	0,94
Tábor	Stoklasná Lhota	0,06	0,52	0,34	0,17	0,25	1,00	0,94
Tábor	Dolní Hořice	0,13	0,89	0,77	0,20	1,00	2,00	1,88

Příloha 8.

Deskriptivní statistické výpočty minimálních inhibičních koncentrací čtyř azolových derivátů všech testovaných polních izolátů rozdělených do dvou typů odběrných polí (AZOL, EKO) metodou E.Def 9.3, zahrnující minimální hodnotu, průměr, aritmetický průměr, geometrický průměr, rozptyl, medián, maximální hodnotu a rozmezí hodnot v mg/l

ITRAKONAZOL							
	Min	Arit. průměr	Geo. průměr	Rozptyl	Medián	Max	Rozmezí
	<i>mg/l</i>	<i>mg/l</i>	<i>mg/l</i>	<i>mg/l²</i>	<i>mg/l</i>	<i>mg/l</i>	<i>mg/l</i>
AZOL	0,01	0,20	0,15	0,03	0,13	1,00	0,99
EKO	0,02	0,18	0,14	0,02	0,13	1,00	0,98

AZOL, pole, u nichž byly užívány azolové fungicidy; EKO, ekologická pole

VORIKONAZOL							
	Min	Arit. průměr	Geo. průměr	Rozptyl	Medián	Max	Rozmezí
	<i>mg/l</i>	<i>mg/l</i>	<i>mg/l</i>	<i>mg/l²</i>	<i>mg/l</i>	<i>mg/l</i>	<i>mg/l</i>
AZOL	0,13	0,66	0,58	0,11	0,50	2,00	1,88
EKO	0,03	0,62	0,51	0,10	0,50	1,00	0,97

AZOL, pole, u nichž byly užívány azolové fungicidy; EKO, ekologická pole

POSAKONAZOL

	Min	Arit. průměr	Geo. průměr	Rozptyl	Medián	Max	Rozmezí
	<i>mg/l</i>	<i>mg/l</i>	<i>mg/l</i>	<i>mg/l²</i>	<i>mg/l</i>	<i>mg/l</i>	<i>mg/l</i>
AZOL	0,02	0,10	0,08	0,01	0,06	0,25	0,23
EKO	0,03	0,62	0,08	0,00	0,06	0,25	0,22

AZOL, pole, u nichž byly užívány azolové fungicidy; EKO, ekologická pole

ISAVUKONAZOL

	Min	Arit. průměr	Geo. průměr	Rozptyl	Medián	Max	Rozmezí
	<i>mg/l</i>	<i>mg/l</i>	<i>mg/l</i>	<i>mg/l²</i>	<i>mg/l</i>	<i>mg/l</i>	<i>mg/l</i>
AZOL	0,06	0,86	0,75	0,15	1,00	2,00	1,94
EKO	0,06	0,88	0,73	0,19	1,00	2,00	1,94

AZOL, pole, u nichž byly užívány azolové fungicidy; EKO, ekologická pole