

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE  
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ  
KATEDRA BIOLOGICKÝCH A LÉKAŘSKÝCH VĚD



**BAKALÁŘSKÁ PRÁCE**  
**LABORATORNÍ DIAGNOSTIKA DERMATOFYTÓZ**

Vedoucí bakalářské práce: Mgr. Marcela Vejsová, Ph.D.

HRADEC KRÁLOVÉ, 2014

NELA DRNKOVÁ

## **Poděkování**

Touto cestou bych chtěla poděkovat vedoucí práce Mgr. Marcele Vejsové, Ph.D. za výběr zajímavého tématu, za cenné rady, které mi poskytla a za drahocenný čas, který mi při sepisování práce věnovala. Poděkování patří i mé rodině a to za podporu, kterou mi během studia poskytovala.

„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci jsou řádně citovány. Práce nebyla použita k získání jiného nebo stejného titulu.“

V Hradci Králové

Nela Drnková

# Abstrakt

Autor: Nela Drnková

Název bakalářské práce: Laboratorní diagnostika dermatofytóz

Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Studijní obor: Zdravotní laborant

Má bakalářská práce je zaměřena na laboratorní diagnostiku dermatofytóz. Cílem této práce je vytvořit přehled metod, které se pro tuto diagnostiku využívají. Začátek je věnován obecným vlastnostem dermatofyt, jejich nomenklatuře, taxonomii a morfologii jednotlivých rodů. Velkou část práce tvoří přehled laboratorních metod. Jsou zde popsány jednotlivé typy mikroskopie, kultivační techniky, molekulární metody a metody imunologické. Konec práce se zabývá jednotlivými onemocněními, která jsou způsobena dermatofyty a jejich léčbou. Nejčastěji využívanými metodami pro laboratorní diagnostiku jsou světelná mikroskopie a kultivace.

**Klíčová slova:** dermatofyty, *Trichophyton*, *Microsporum*, *Epidermophyton*, laboratorní diagnostika, *tinea*

# Abstract

Author: Nela Drnková

Title of the bachelor thesis: Laboratory diagnosis of dermatophytosis

Charles University in Prague, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Degree course: Medical laboratory technician

My bachelor thesis is focused on laboratory diagnosis of dermatophytes. The purpose of this work is created summary of laboratory methods, which are used for diagnosis of dermatophytosis. Beginning of thesis is given to common characteristics of dermatophytes, taxonomony, nomenclature and morphology of individual genera. The big part of thesis creates summary of laboratory methods. There are described individual types of microscopy, cultural techniques, molecular methods and immunological methods. The end of the thesis is dealt with infections, which are caused by dermatophytes and their treatment. Light microscopy and culture are used most frequently.

**Key words:** dermatophytes, *Trichophyton*, *Microsporum*, *Epidermophyton*, laboratory diagnosis, *tinea*

# Obsah

## 1. Obsah

2. Použité zkratky .....	8
3. Úvod .....	10
4. Zadání – cíl práce .....	10
5. Obecné vlastnosti dermatofyt.....	11
6. Taxonomie a nomenklatura dermatofyt .....	13
6.1 Taxonomie.....	13
6.2 Nomenklatura .....	14
7. Morfologie dermatofyt.....	14
7.1 Rod Epidermophyton .....	16
7.1.1 <i>Epidermophyton floccosum</i> .....	16
7.2 Rod Microsporum .....	18
7.2.1 <i>Microsporum audouinii</i> .....	18
7.2.2 <i>Microsporum canis</i> .....	19
7.3 Rod Trichophyton.....	21
7.3.1 <i>Trichophyton rubrum</i> .....	21
7.3.2 <i>Trichophyton tonsurans</i> .....	24
8. Laboratorní diagnostika .....	26
8.1 Odběr materiálu .....	26
8.2 Mikroskopické vyšetřovací techniky .....	27
8.2.1 Louhový preparát.....	28
8.2.2 Fluorescenční mikroskopie.....	28
8.2.3 Konfokální mikroskopie.....	29
8.2.4 Elektronová mikroskopie .....	31
8.3 Kultivační techniky .....	33
8.3.1 Primokultivace.....	33
8.3.2 Mikrokultura .....	37

8.3.3	Biochemické a růstové testy .....	38
8.4	Molekulární metody.....	39
8.4.1	PCR .....	40
8.4.2	MALDI-TOF MS .....	42
8.5	Imunologické metody .....	43
8.5.1	Imunodifúze .....	44
8.5.2	Imunoelektroforéza .....	46
8.5.3	Komplementfixační reakce.....	46
8.5.4	ELISA.....	47
8.5.5	Kožní testy .....	48
8.5.6	Test transformace lymfocytů .....	49
8.5.7	Migračně inhibiční test.....	49
9.	Onemocnění způsobená dermatofyty.....	50
9.1	Tinea capitis .....	50
9.2	Tinea corporis.....	51
9.3	Tinea barbae .....	52
9.4	Tinea faciei .....	53
9.5	Tinea cruris.....	53
9.6	Tinea manuum .....	54
9.7	Tinea pedis .....	54
9.8	Tinea unguium.....	55
10.	Léčba dermatofytóz.....	56
11.	Diskuse .....	59
12.	Závěr.....	61
13.	Seznam obrázků .....	62
14.	Použitá literatura .....	63

## 2. Použité zkratky

Ag - antigen

CEP - Counter immunoelectrophoresis (protisměrná imuno elektroforéza)

CSLM - Confocal scanning laser microscopy (konfokální skenovací laserová mikroskopie)

CSTM - Confocal scanning tandem microscopy (konfokální skenovací tandemová mikroskopie)

DNA - Deoxyribonucleic acid (deoxyribonukleová kyselina)

EELS - Electron energy loss spectrometry (spektrometrie na základě ztráty energie elektronu)

EIA - Enzyme immuno assay (enzymová imunoanalýza)

ELISA - Enzyme-linked immunosorbent assay (enzymová imunoanalýza za použití pevné fáze)

ID - Imunodifúze

ICBN - International code of botanical nomenclature (Mezinárodní kód botanické nomenklatury)

IgA, IgE, IgG a IgM - Immunoglobulin A, E, G a M

ITS 1,2 - Internal transcribed spacer

KF - Komplementfixace

KOH - hydroxid draselný

KT - Kožní test

MALDI-TOF MS - Matrix assisted laser desorption ionization- time of flight mass spectrometry (hmotnostní spektrometrie s analyzátozem doby letu, při které se provádí ionizace laserem za účasti biomatrice)

MI - Migrační index

MIT - Migračně inhibiční test

MO - Migrace leukocytů bez přítomnosti antigenu

MX - Migrace leukocytů v přítomnosti antigenu



NaCl - Chlorid sodný

NaOH - Hydroxid sodný

PCR - Polymerase chain reaction (polymerázová řetězová reakce)

rDNA - ribozomální DNA

RAPD - PCR - Random amplification of polymorphic DNA (PCR založená na náhodné amplifikace polymorfních úseků DNA)

RFLP - Restriction fragment length polymorphism (polymorfizmus délky restričních fragmentů)

SEM - Scanning electron microscopy (rastrovací elektronová mikroskopie)

SGA - Sabouraudův glukózový agar

TEM - Transmission electron microscopy (transmisní elektronová mikroskopie)

TL - Transformace lymfocytů

### 3. Úvod

Dermatofyty jsou keratofilní houby náležící do rodů *Trichophyton*, *Epidermophyton* a *Microsporum*. Onemocnění, která způsobují, se nazývají dermatofytózy. Pro tato onemocnění se využívá také pojmenování *tinea* ve spojení s místem anatomické lokalizace postižení, příkladem je *tinea pedis*, což je dermatofytová infekce nohou. Dermatofyty jsou jednou z nejčastějších příčin povrchových infekcí vlasů, kůže a nehtů u člověka. Podle jejich rezervoáru se dělí na antropofilní, zoofilní a geofilní druhy. Mezi nejčastější antropofilní dermatofyty řadíme *Trichophyton rubrum* a *Trichophyton tonsurans*.

Četnost těchto infekcí je dána tím, že dermatofyty jsou primárně patogenní houby, které postihují, jak populaci zdravých, tak i populaci s oslabenou imunitou. V některých případech může být jedinec pouze asymptomatickým nositelem těchto hub. Přenos je prostřednictvím přímého kontaktu s infikovanou osobou, prostřednictvím infikovaných kožních buněk, vlasů, nebo předmětů.

Pro diagnostiku dermatofytóz se využívá celá řada laboratorních metod a v současné době mezi nejpoužívanější patří světelná mikroskopie louhového preparátu a kultivace i vzhledem ke svým nevýhodám. Kultivace dermatofytů trvá tři týdny a ne vždy nám dává spolehlivé výsledky, proto je v dnešní době snaha vyvinout metody, které poskytují spolehlivé výsledky během krátké doby. Správné určení druhu dermatofyta je důležité pro správné nasazení léčby.

### 4. Zadání – cíl práce

Tato bakalářská práce je zpracována za účelem získání informací o taxonomii, nomenklatuře dermatofyt, jejich vlastnostech, onemocněních, která způsobují a léčbě. Hlavním cílem práce je vytvořit přehled metod a nových trendů využívaných pro laboratorní diagnostiku dermatofytóz.

## 5. Obecné vlastnosti dermatofyt

Dermatofyty jsou skupina spolu úzce souvisejících mikroskopických hub, které mají schopnost napadat zrohovatělé tkáně (kůži, vlasy a nehty) lidí a zvířat. Infekce, které způsobují, nazýváme dermatofytózy nebo *tinea* a jsou většinou právě zpravidla omezeny na neživé a zrohovatělé vrstvy kůže. Je to z důvodu neschopnosti těchto hub proniknout hlouběji do tkáně u imunokompletních hostitelů. Reakce organismu na tyto infekce mohou být různé, od mírných až po velice závažné. Závisí to na reakci hostitele na produkty metabolismu těchto hub, na virulenci druhu, na anatomické lokalizaci a na místních faktorech životního prostředí (Weitzman a Summerbell 1995).

Dermatofyty jsou jednou z nejčastějších příčin houbových infekcí u lidí. Ročně se jimi nakazí milióny jednotlivců. Příkladem dermatofyty způsobeného onemocnění je *tinea pedis* (atletická noha), což je onemocnění, které vedlo v novodobé historii k imobilizaci významného počtu amerických vojáků. Další druhy způsobují například *tinea capitis*. *Tinea capitis* postihuje pokožku hlavy a je to významný pediatrický problém v městských oblastech.

Zodpovídají za infekce na různých částech těla včetně nohou, trupu, pokožky hlavy a nehtů. Na rozdíl od ostatních hub se přenáší snadno a mohou způsobovat infekce, jak u zdravých jedinců, tak i u jedinců s nějakou dysfunkcí imunity, což znamená, že jsou primárně patogenní. Odhady naznačují, že 30-70 % jedinců jsou asymptomatickými nositeli těchto hub. Přenáší se infikovanými kožními buňkami a vlasy, ale také přímým kontaktem a to zejména u dětí. Tyto infekce se běžně šíří ve veřejných zařízeních, jako jsou tělocvičny a bazény. Jejich výskyt je častější u mužů a je spojen především s teplými a vlhkými podmínkami (uzavřené a vysoké boty). Dále jsou také spojovány se specifickými věkovými skupinami (dospívající v pubertě, v dospělosti a ve stáří) (White a Henn 2010).

Za posledních 20 let byl zaznamenán rostoucí počet plísňových onemocnění shodný s dramatickým nárůstem těžce imunokompromitovaných pacientů. Tyto infekce bývají způsobeny především poškozením hostitelských obranných mechanismů vlivem virové infekce, hematologických poruch, jako jsou některé leukémie, vlivem transplantace orgánů či agresivnějšími a intenzivnějšími lékařskými postupy. Mnoho

klinických postupů, jako je chirurgie, používání katetrů, injekcí, záření, chemoterapie, antibiotika a steroidy jsou rizikovými faktory pro vznik plísňových onemocnění (Guarro *et al.* 1999).

Tyto mikroskopické houby rozdělujeme do tří skupin na základě jejich výskytu a způsobu přenosu. Jsou to antropofilní, zoofilní a geofilní druhy. Geofilní druhy se vyskytují v půdě a jen málokdy způsobují infekce u lidí. Zoofilní druhy se vyskytují u zvířat i lidí, ale infekce způsobují zřídka, obvykle způsobují akutní zánět po infekci. Antropofilní druhy nemají zvířecí rezervoár a způsobují infekce nejčastěji, proto jsou také velmi dobře kontrolovány. Nejčastěji způsobují chronické infekce, které vznikají následkem jejich adaptace lidskému hostiteli.

Schopnost pohlavně se rozmnožovat závisí u dermatofytů na typu hostitele. Antropofilní druhy ztratily schopnost se sexuálně rozmnožovat a jsou klonální. Tato klonální reprodukce může být u antropofilních dermatofytů výsledkem intenzivního imunitního tlaku ze strany hostitele. Mnoho druhů dermatofytů má pohlavní cyklus, který zahrnuje sexuální stádium houby známé, jako teleomorfa. Zdá se, že většina geofilních druhů má životaschopný pohlavní cyklus, zoofilní druhy si ho zachovávají zřídka a antropofilní druhy ztratily schopnost dokončit pohlavní cyklus. To naznačuje, že většina antropofilních druhů včetně *Trichophyton rubrum* se reprodukuje klonálně, a že jedna nebo několik klonálních linií mohou být zodpovědné za chronické mykotické infekce u lidí (White a Henn 2010).

Tyto houby jsou specializované na degradaci bílkovin. Řád Onygenales obsahuje některé čeledi (Arthrodermataceae), které jsou specializované na rozklad žáruvzdorných proteinů (například keratin). Druhy Arthroderma, včetně anamorfních dermatofytů a jejich sexuálních stádií produkují enzymy, které degradují keratin a další proteiny. Tyto enzymy se nazývají keratinázy a jsou produkovány všemi studovanými dermatofyty (Weitzman a Summerbell 1995).

## 6. Taxonomie a nomenklatura dermatofyt

### 6.1 Taxonomie

Taxonomie je umělý systém pro klasifikaci živých organismů. Pro tento účel mohou být použity různé koncepty o tom jak definovat druhy. V uplynulých letech nám pomohla analýza DNA lépe pochopit fylogenetické vztahy dermatofyt a tím odlišit i jednotlivé druhy dermatofyt. V některých případech druhy dříve považované za samostatné jsou dnes synonymní. Taxonomické pořadí dermatofytů musí být neustále aktualizováno (Brash 2008).

Až teprve před několika lety se staly patogenní houby dobře definovanou skupinou, některé z nich však byly omezeny na zeměpisné oblasti a byly dobře známy pouze klinickými lékaři. Nicméně situace se však nyní výrazně změnila, každý rok se objevuje asi 20 nových infekčních agens. Tyto nové oportunní patogeny zvýšily základ znalostí lékařské mykologie a byly také pozorovány neočekávané změny ve struktuře mykotických infekcí u lidí. Je také možné, že většina nově hlášených infekcí odhalila taxony, které dříve prošly bez povšimnutí, díky nedostatečné diagnostické odbornosti. Tato situace a rychlý objev velkého množství patogenů vytvořily rostoucí zájem o houbové systematiky. Tato taxonomie je dynamická a progresivní disciplína, která tedy vyžaduje změny v nomenklatuře. Tyto změny jsou však často obtížně pochopitelné pro lékaře a klinické mikrobiology. Další komplikací pro nezkušené mykology je to, že houby jsou většinou klasifikovány na základě jejich vzhledu spíše než na základě jejich biochemických a nutričních vlastností. To znamená, že v taxonomii hub mohou být použity různé koncepty. Obecně platí, že lékařští mykologové jsou obeznámeni pouze s jedním patogenním aspektem hub a to fází, která se vyvíjí podle nepohlavního rozmnožování. Obvykle mikrobiologové ignorují nebo mají málo informací o sexuálním stadiu těchto organismů. Nicméně, sexuální fáze jsou základem taxonomie a nomenklatury hub. Zdá se, že v blízké budoucnosti nám budou umožňovat molekulární techniky připojit patogenní a oportunistické houby k jejich sexuálnímu stadiu a začlenit je k přirozenějšímu taxonomickému systému (Guarro *et al.* 1999).

V předchozím odstavci bylo zmíněno, že existuje několik konceptů v druhové taxonomii. Jedním z konceptů je morfologicko-fyziologicko druhový koncept. Tento

koncept je založen pouze na přímé mikroskopii odebraných vzorků a na klinických příznacích pacienta infikovaného dermatofytem. Dalšími koncepty jsou ekologický, biologický, fylogenetický a polyfázický druhový koncept (Čmoková 2013).

Původce dermatofytóz řadíme do oddělení Deuteromycota, třídy Hyphomycetes a do tří anamorfních rodů *Trichophyton*, *Epidermophyton* a *Microsporum*. Některé dermatofyty, které jsou schopny sexuální reprodukce, hlavně zoofilní a geofilní druhy *Microsporum* a *Trichophyton* řadíme do teleomorfního rodu *Arthroderma*, čeledi Arthrodermataceae, řád Onygenales a oddělení Ascomycetes (Weitzman a Summerbell 1995).

## 6.2 Nomenklatura

Nomenklatura dermatofyt se řídí mezinárodně uznávanými pravidly latinské binomiky. Pravidla, která řídí bionomeklaturu jsou velmi rozmanitá a závislá na typu organismu. Názvosloví hub se řídí Mezinárodním kódem botanické nomenklatury (ICBN- International Code of Botanical Nomenclature), který je v platném znění přijat Mezinárodním botanickým kongresem. Veškeré navrhované změny kódu jsou publikovány v časopise *Taxon*, což je oficiální časopis mezinárodní asociace pro rostlinnou taxonomii a poté Mezinárodní botanický kongres diskutuje o schválení těchto změn. Tento kód má za cíl poskytnout stabilní způsob pojmenování taxonomické skupiny, vyloučit a odmítnout jména, která mohou způsobit chyby, dvojnásobnost, nebo zmatek (Guarro *et al.* 1999).

## 7. Morfologie dermatofyt

Klasifikace a identifikace hub je na rozdíl od jiných patogenů založena především na morfologických kritériích. Pro studium mikroskopické morfologie hub je vyžadováno použití světelného mikroskopu. Bohužel je většina hub při infekcích ve vegetativní fázi a v hostitelské tkáni jsou pozorovány pouze části hyf nebo jiné nespecifické struktury. I když pigmentace, tvar těchto hyf a přítomnost či nepřítomnost septa nám může dát představu o identitě houby, je však nutná houbová kultura pro přesnou identifikaci (Guarro *et al.* 1999).

Dermatofyty řadíme mezi dimorfní houby. Což znamená, že se tyto houby vyskytují ve dvou formách a to saprofytické a parazitární. Parazitární formu nacházíme ve vrstvách obsahující keratin, zde jsou hyfy a arthrospory, což jsou vlastně buněčné fragmenty z rozpadu hyf. Saprofytické stádium roste na agaru, vytváří zde mycelia s různým povrchem a zbarvením. Právě saprofytické stádium a jeho struktura má zásadní význam pro diagnostiku onemocnění způsobených těmito patogeny (Bednář *et al.* 1996).

Tělo dermatofyt neboli stélka (thallus) se skládá z vláken, která mají nestejně tvary. Tato vlákna nesou rozmnožovací buňky. Vlákna tvořící stélku nazýváme hyfy a spleť hyf je označována jako mycelium. Existují dva typy mycelií, a to mycelium vegetativní a mycelium vzdušné. Vegetativní mycelium se nachází v živném médiu, ze kterého si bere látky potřebné pro život. Mycelium vzdušné roste za přístupu vzduchu. Mycelium může nést reprodukční orgány, nebo může být bez nich. Mycelium s reprodukčními orgány nazýváme reprodukční mycelium. Jeden druh mycelia může přejít v jiný a naopak (Hübschmann a Frágnér 1962).

Pro dermatofyty je charakteristické, že jednotlivá vlákna tvořící mycelium jsou septovaná. Podle struktury a uspořádání vláken rozlišujeme několik typů mycelií. Spirální mycelia jsou charakteristická vlákny spirálovitého tvaru. Raketová mycelia mají vlákna, která jsou tvořena buňkami kyjovitého tvaru. Dalšími typy jsou mycelia hřebenovitá a parohovitá. Hřebenovitá mycelia tvoří buňky, které mají na svém povrchu jednotlivé výběžky. Parohovitá mycelia mají také na povrchu výběžky, které jsou však složitěji větveny. Posledním typem mycelia je mycelium s výdutěmi (Hübschmann a Frágnér 1962; Franc a Hejzlar 1984).

Stélka dermatofyt nese na svém povrchu konidie, což jsou reprodukční buňky vzniklé nepohlavní cestou (např. pučením). Jsou to jednoduché buňky různých tvarů, které se mohou nacházet jednotlivě nebo v uskupení. Rozlišujeme dva typy konidií a to mikrokonidie a makrokonidie. Mikrokonidie se u dermatofytů nacházejí na hyfách po stranách. Zde mohou být uspořádány po jednom, nebo v uskupení. Mikrokonidie mohou mít různé tvary, zpravidla však mají oválný nebo hruškovitý tvar. Makrokonidie jsou velké a mají různé tvary. Většinou jsou protáhlého, vřetenovitého, nebo hruškovitého tvaru. Mladé makrokonidie tvoří jedna buňka, která se postupně

rozděluje na jednotlivá septa přepážkami. Stejně jako u mikrokonidií mohou být jednotlivě, nebo v uskupení. Kromě těchto typů konidií, se u dermatofytů vyskytují ještě chlamydospory, což jsou buňky, které mají velice silnou stěnu. Většinou jsou přítomny tehdy, když nejsou vhodné podmínky pro život těchto hub. Mohou být postranní, vmezeřené (interkalární) a koncové (Hübschmann a Frágner 1962).

## **7.1 Rod *Epidermophyton***

Hlavním představitelem je *Epidermophyton floccosum*. Rod *Epidermophyton* má makrokonidie široce kyjovité, hladké s tenkou až středně silnou stěnou a s jedním až devíti septy. Obvykle jsou v hojném počtu a jsou jednotlivě nebo ve skupinách. Jejich velikost je 20-60 x 4-13  $\mu\text{m}$ . Mikrokonidie chybí. Tento rod má pouze dva známé druhy a pouze *E. floccosum* je patogenní (Weitzman a Summerbell 1995).

### **7.1.1 *Epidermophyton floccosum***

Na Sabouraudově glukózovém agaru (SGA) rostou kolonie obvykle pomalu, mají zelenohnědou, nebo khaki barvu s povrchem připomínající semiš, uprostřed jsou zvednuté a nařasené, okraje mají ploché a vnořené do agaru. Starší kultury mohou vytvářet pleomorfní chomáčky podhoubí. Obvykle je přítomen tmavý žluto-hnědý spodní pigment (Obr. 1). Pro tento druh jsou charakteristické tenkostěnné makrokonidie, které jsou většinou v trsech a rostou přímo z hyf (Obr. 2). Mikrokonidie nejsou přítomny (Mycology Adelaide 2014 [online]).





**Obrázek 1:** Makroskopický vzhled *Epidermophyton floccosum* s pleomorfními chomáčky podhoubí.

**Zdroj:** *Mycology Adelaide* [online]. The university of Adelaide c2014, citováno [28.3.2014]. Dostupné z:

<http://www.mycology.adelaide.edu.au/images/Epidermophyton1.gif>



**Obrázek 2:** Mikroskopický vzhled *Epidermophyton floccosum* s typickými tenkostěnnými makrokonidiemi.

**Zdroj:** *Mycology Adelaide* [online]. The university of Adelaide c2014, citováno [28.3.2014]. Dostupné z:

<http://www.mycology.adelaide.edu.au/images/Epidermophyton2.gif>

*Epidermophyton floccosum* je antropofilní dermatofyt s celosvětovým výskytem. Často způsobuje *tinea pedis*, *tinea cruris*, *tinea corporis* a onychomykózy. Není známo, že by *in vivo* napadal vlasy (Mycology Adelaide 2014 [online]).

## **7.2 Rod *Microsporium***

Hlavními zástupci jsou *Microsporium canis* a *Microsporium gypseum*. Makrokonidie jsou charakterizovány přítomností nerovné stěny, která může být jemně drsná, ostnatá nebo bradavičnatá. Makrokonidie mohou mít tenké, středně silné až tlusté stěny, mají od jednoho až do patnácti sept. Jejich velikost je 6-160 x 6-25 $\mu$ m. Mikrokonidie jsou přisedlé nebo připojené stopkou a tvar mají kyjovitý. Obvykle jsou uspořádány jednotlivě podél hyf nebo v hroznech, jako například u *Microsporium racemosum*, což je vzácný patogen (Weitzman a Summerbell 1995).

Do rodu *Microsporium* řadíme například *Microsporium audouinii*, *Microsporium canis*, *Microsporium gypseum* a *Microsporium persicolor* (Franc a Hejzlar 1984).

### **7.2.1 *Microsporium audouinii***

Kolonie jsou na Sabouraudově glukózovém agaru ploché, rozprostřené, šedavě-bílé až světle žlutohnědé, povrch připomíná hustý semiš. Spodní část může být žlutohnědé až červenohnědé barvy. Některé nemusí mít spodní pigment (Obr. 3). Makrokonidie a mikrokonidie jsou přítomny jen zřídka, většina kultur je sterilních. Některé však mohou příležitostně produkovat silnostěnné koncové nebo interkalární chlamydospory (Obr. 4). Když jsou přítomny makrokonidie, tak jsou obvykle delší, hladší a vřetenovitého tvaru, který je většinou nepravidelný. Pokud jsou přítomny mikrokonidie, tak mají hruškovitý až kyjovitý tvar a jsou podobné u většiny druhů *Microsporium*. Mohou zde být hřebenovité nebo raketovité hyfy (Mycology Adelaide 2014 [online]).



**Obrázek 3:** Kultura *Microsporum audouinii* na Sabouraudově agaru.

**Zdroj:** *Mycology Adelaide* [online]. The university of Adelaide c2014, citováno [28.3.2014]. Dostupné z: <http://www.mycology.adelaide.edu.au/images/aud1.gif>



**Obrázek 4:** Interkalární chlamydospory typické pro *Microsporum audouinii*.

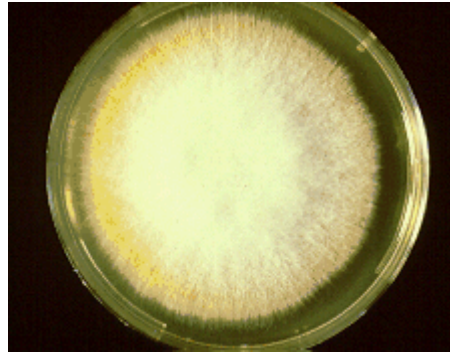
**Zdroj:** *Mycology Adelaide* [online]. The university of Adelaide c2014, citováno [28.3.2014]. Dostupné z: <http://www.mycology.adelaide.edu.au/images/aud2.gif>

Je to antropofilní houba způsobující nezánettivé infekce pokožky hlavy a kůže zejména u dětí. Bývala jednou z nejčastějších příčin epidemií *tinea capitis* v Evropě a Severní Americe, nyní se však stává méně frekventovanou (Mycology Adelaide 2014 [online]).

### **7.2.2 *Microsporum canis***

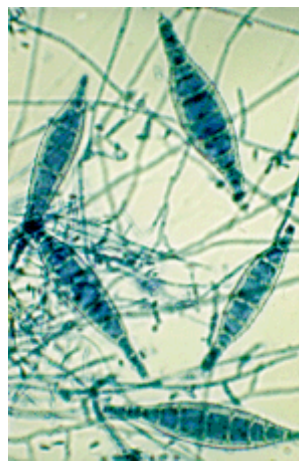
Kolonie jsou na SGA agaru ploché, šíří se do okolí, mají bílou až krémovou barvu, povrch je podobný bavlně a má radiální rýhy. Spodní část je zlatožlutá až

hnědožlutá, někdy může být i bez pigmentu (Obr. 5). Makrokonidie jsou většinou vřetenovité s 5-15ti buňkami, jsou bradavičnaté a silnostěnné a na konci mají terminální knoflík. Velikost je 35-100 x 12-25  $\mu\text{m}$  (Obr. 6). Mikrokonidií bývá jen několik a tvar mají hruškovitý až kyjovitý (Mycology Adelaide 2014 [online]).



**Obrázek 5:** Kolonie *Microsporium canis*.

**Zdroj:** *Mycology Adelaide* [online]. The university of Adelaide c2014, citováno [28.3.2014]. Dostupné z: <http://www.mycology.adelaide.edu.au/images/canis2.gif>



**Obrázek 6:** Typické vřetenovité makrokonidie *Microsporium canis*.

**Zdroj:** *Mycology Adelaide* [online]. The university of Adelaide c2014, citováno [28.3.2014]. Dostupné z: <http://www.mycology.adelaide.edu.au/images/canis3.gif>

Je to celosvětově rozšířený zoofilní dermatofyt. Často způsobuje kožní onemocnění u lidí a to zejména u dětí. Napadá vlasy, kůži a nehty zřídka. Hlavními zdroji infekce jsou kočky a psi (Mycology Adelaide 2014 [online]).

### **7.3 Rod *Trichophyton***

Hlavním představitelem je *Trichophyton rubrum*. Makrokonidie mají hladkou obvykle tenkou stěnu s jedním až dvanácti septy. Jsou hrazeny jednotlivě nebo ve skupinách a mohou být prodloužené, ve tvaru tužky, kyjovité, vřetenovité nebo válcovité. Velikost mají 8-86 x 4-14 $\mu$ m. Mikrokonidie jsou obvykle hojnější než makrokonidie a mohou být kulovité, hruškovité, kyjovité, přisedlé nebo na stopce. Nacházejí se buď jednotlivě po stranách hyf nebo v uskupení ve tvaru hroznů (Weitzman a Summerbell 1995).

Do rodu *Trichophyton* patří například *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Trichophyton schoenleinii*, *Trichophyton tonsurans*, *Trichophyton violaceum*, *Trichophyton verrucosum*, *Trichophyton equinum*, *Trichophyton concentricum*, *Trichophyton ajelloi*, *Trichophyton soudanense*, *Trichophyton megnini*, *Trichophyton gourvilii*, *Trichophyton simii* a další (Franc a Hejzlar 1984).

#### **7.3.1 *Trichophyton rubrum***

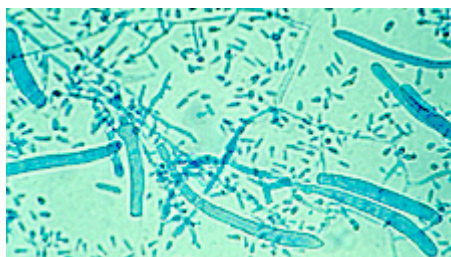
Rozlišujeme dva typy *T. rubrum*, typ prachový (jemný) a typ zrnitý.

Zrnitý typ má kolonie na Sabouraudově glukózovém agaru ploché až mírně vyvýšené s povrchem jako semiš a mají bílou až krémovou barvu (Obr. 7). Spodní pigment je růžovočervený. Mikroskopicky se zrnitý typ vyznačuje střední až bohatou produkcí kyjovitých až hruškovitých mikrokonidií a střední až vysokou produkcí tenkostěnných makrokonidií doutníkovitého tvaru. Makrokonidie může nebo nemusí mít koncové přívěsky (Obr. 8).



**Obrázek 7:** Makroskopický vzhled zrnitého *Trichophyton rubrum*.

**Zdroj:** *Mycology Adelaide* [online]. The university of Adelaide c2014, citováno [29.3.2014]. Dostupné z: <http://www.mycology.adelaide.edu.au/images/gran1.gif>



**Obrázek 8:** Mikrokonidie a makrokonidie typické pro zrnitý typ *Trichophyton rubrum*.

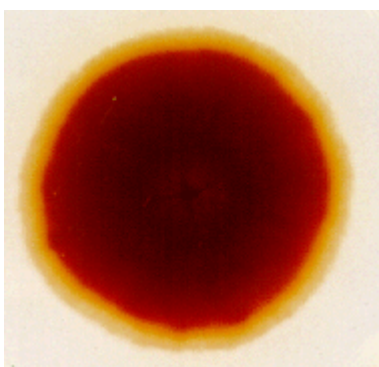
**Zdroj:** *Mycology Adelaide* [online]. The university of Adelaide c2014, citováno [29.3.2014]. Dostupné z: <http://www.mycology.adelaide.edu.au/images/gran3.gif>

Jemný typ má kolonie na Sabouraudově glukózovém agaru ploché až mírně vyvýšené s povrchem jako semiš až prachovým (Obr. 9). Spodní pigment má žlutohnědou až vínově-červenou barvu (Obr. 10). Jemný typ se vyznačuje malou až střední produkcí štíhlých kyjovitých mikrokonidií (Obr. 11). Makrokonidie chybí.



**Obrázek 9:** Kolonie *Trichophyton rubrum* prachový typ.

**Zdroj:** *Mycology Adelaide* [online]. The university of Adelaide c2014, citováno [29.3.2014]. Dostupné z: <http://www.mycology.adelaide.edu.au/images/downy1.gif>



**Obrázek 10:** Typický spodní pigment *Trichophyton rubrum* prachový typ.

**Zdroj:** *Mycology Adelaide* [online]. The university of Adelaide c2014, citováno [29.3.2014]. Dostupné z: <http://www.mycology.adelaide.edu.au/images/downy2.gif>



**Obrázek 11:** Kyjovité mikrokonidie *Trichophyton rubrum* typ prachový.

**Zdroj:** *Mycology Adelaide* [online]. The university of Adelaide c2014, citováno [29.3.2014]. Dostupné z: <http://www.mycology.adelaide.edu.au/images/downy3.gif>

Je to antropofilní dermatofyt. Prachový typ se stal nejrozšířenějším dermatofytem způsobující infekce u člověka. Často způsobuje chronické infekce kůže, nehtů a zřídka i pokožky hlavy. Zrnitý kmen je častou příčinou *tinea corporis* v jihovýchodní Asii a domorodců žijících na severu Austrálie. Zrnitý kmen je nadřazený prachovému typu. Ten se později vyvinul v mezerách mezi prsty (*tinea pedis*), když byl bývalý kmen importován do Evropy na přelomu století. Je také důležité zmínit, že existují kmeny, které se vyskytují mezi těmito dvěma kmeny (Mycology Adelaide 2014 [online]).

### **7.3.2 *Trichophyton tonsurans***

Kolonie mohou být na Sabouraudově glukózovém agaru podobné semiši až práškové. Uprostřed jsou vyvýšené a vrásčité, mohou mít radiální rýhy. Barva je od světle žlutohnědé (Obr. 12) až po žlutou, tato forma se nazývá sulfureum form (Obr. 13). Spodní pigment se pohybuje od žlutohnědé, červenohnědé až po sytě mahagonovou. Hyfy jsou široké, poměrně nepravidelné, velmi rozvětvené s mnoha přepážkami. Tvoří mikrokonidie i makrokonidie. Mikrokonidie mají různé velikosti, tvar a jsou v pravém úhlu k hyfám. Makrokonidie se nacházejí příležitostně, jsou hladké, tenkostěnné a nepravidelné (Obr. 14). Chlamydospory nacházíme ve starších kulturách (Mycology Adelaide 2014 [online]).





**Obrázek 12:** Kolonie *Trichophyton tonsurans* na Sabouraudově glukózovém agaru.

**Zdroj:** *Mycology Adelaide* [online]. The university of Adelaide c2014, citováno [29.3.2014]. Dostupné z: <http://www.mycology.adelaide.edu.au/images/tons2.gif>



**Obrázek 13:** Sulfureum form *Trichophyton tonsurans*.

**Zdroj:** *Mycology Adelaide* [online]. The university of Adelaide c2014, citováno [29.3.2014]. Dostupné z: <http://www.mycology.adelaide.edu.au/images/tons1.gif>



**Obrázek 14:** Mikrokonidie a makrokonidie typické pro *Trichophyton tonsurans*.

**Zdroj:** *Mycology Adelaide* [online]. The university of Adelaide c2014, citováno [29.3.2014]. Dostupné z: <http://www.mycology.adelaide.edu.au/images/tons4.gif>

Antropofilní houba s celosvětovým rozšířením. Způsobuje zánětlivé nebo chronické nezápětivé léze kůže, nehtů a pokožky hlavy. Je častou příčinou *tinea capitis* australských domorodců a amerických černochoů (Mycology Adelaide 2014 [online]).

## 8. Laboratorní diagnostika

Správná identifikace hub má zásadní význam, nejen pro klinickou diagnostiku, ale také v rostlinné patologii, v biotechnologiích, či v ekologických studiích. Je známo obrovské množství druhů hub, proto jsou taxonomové neustále zaneprázdnění poznáváním a popisováním nových druhů a jejich uskupováním do taxonů. Z tohoto důvodu se většině druhů dostalo jen omezené studie a to především studie jejich morfologických znaků. Nicméně, některé skupiny hub jsou studovány ve větší míře a to z důvodu jejich ekonomického či patologického významu. Kromě studia morfologických znaků se také využívá pro klasifikaci a identifikaci těchto hub také citlivost vůči chemikáliím či antimykotikům, molekulární techniky, fyziologické a biochemické testy, studium sekundárních metabolitů, ubichinon systémy, či složení mastných kyselin, buněčné stěny a bílkovin (Guarro *et al.* 1999).

### 8.1 Odběr materiálu

Dalo by se říci, že odběr materiálu je jeden z nejdůležitějších kroků laboratorní diagnostiky. Od správného odběru se dále odvíjí celá laboratorní diagnostika. Je několik zásad, které by se měly před a při odběrech materiálu dodržovat. První a velice důležitou zásadou je vysazení antimykotické léčby, uvádí se, že by to měly být 2-3 týdny a u nehtových infekcí 6 týdnů před odběrem. Pro odběr je důležité, abychom používali sterilní nástroje, abychom získali dostatečné množství materiálu, a aby byl materiál z různých míst postižení (Stuchlík 2007).

Prvním krokem při odběru jakéhokoliv materiálu, je pečlivé očištění místa postižení pomocí 70 % alkoholu či alkoholéteru. Předtím než se provede vlastní odběr, se musí nechat alkohol či alkoholéter zaschnout (Vosmík a Skořepová 1995).

Odběr šupin kůže se provádí tak, že se udělá seškrab z místa postižení. Odběr je nutno udělat z okraje léze, kde se nachází největší množství hub v proliferační fázi, pomocí tupého skalpelu. Je důležité, aby byl skalpel, se kterým pracujeme, před

vlastním odběrem sterilizován. Tímto se zabrání šíření další infekce (Vosmík a Skořepová 1995; Otčenášek *et al.* 1990).

Odběr materiálu z nehtů se provádí pomocí lancety. Materiál, který potřebujeme pro vyšetření, se odebírá ze spodní strany nehtu. Šupinky, které získáme, jako první nepoužíváme pro diagnostiku, protože mohou obsahovat saprofyty. Vlastní materiál, který bude sloužit pro vyšetření, se poté odebírá nově vysterilizovanou lancetou. Pro získání největšího množství dermatofytů se provádí odběr materiálu z místa mezi postiženou a zdravou oblastí nehtu (Vosmík a Skořepová 1995).

Vousy a vlasy se odebírají jednoduchým způsobem a to za použití epilační pinzety. Je důležité k vyšetření vybrat vlasy a vousy, které se liší barvou, tvarem popřípadě délkou od ostatních. Při odběru je důležité získat vlasy s cibulkou a opět je žádoucí provést odběr z okraje léze. Odběr stříháním nemá pro diagnostiku žádný význam (Otčenášek *et al.* 1990; Stuchlík 2007).

Pro odběr ze sliznic a z kožních lézí se využívá sterilního tampónu. Odběr se stejně, jako u odběru šupinek kůže a vlasů odebere z okraje. Po odebrání materiálu následuje okamžité naočkování na kulturační půdu.

Když dojde k postižení glans penis, tak se provede otisk postiženého místa na Sabouraudův agar. Stolice se odebírá do sterilní nádoby a měla by být nejpozději do dvou hodin dopravena do laboratoře (Vosmík a Skořepová 1995).

## **8.2 Mikroskopické vyšetřovací techniky**

Mikroskopické vyšetřovací techniky jsou ve většině případů prvními diagnostickými technikami, které se provádějí při podezření na dermatofytové infekce (Vosmík a Skořepová 1995). Jsou to jediné techniky pomocí, kterých jsme schopni sledovat morfologii hub a jejich buněčnou stavbu. Tyto metody pozorování nám pomohly pochopit fyziologii hub a ukázaly nám intracelulární a subcelulární struktury (Ahmad a Khan 2012)

### 8.2.1 Louhový preparát

Jedná se o nejsnadnější způsob provedení mikroskopického vyšetření, nicméně je tato metoda náročnější na odečítání z mikroskopu. Toto mikroskopické vyšetření nám dává pouze přibližné výsledky. Sledujeme, jestli se ve vyšetřovaném vzorku nacházejí, nebo nenacházejí hyfy. Při tomto vyšetření hraje důležitou roli zkušenost pracovníka. Nezkušený pracovník může zaměnit artefakty podobné vláknům za vlákna hub, nebo v případě přítomnosti arthrospor a blastospor může dojít k tomu, že houbová infekce není diagnostikována (Vosmík a Skořepová 1995).

Louhový preparát se používá pro diagnostiku povrchových houbových infekcí. Provedení, jak bylo napsáno výše, je velice jednoduché. Začíná se nanesením 20 % (10 %) roztoku hydroxidu draselného (nebo hydroxidu sodného) na podložní sklíčko, poté se přidá odebraný materiál, přiklopí se krycím sklíčkem a nechá se cca hodinu macerovat. Pro urychlení přípravy preparátu se může sklíčko s naneseným vzorkem zahřát nad plamenem. Přidání KOH nebo NaOH slouží k projasnění materiálu (Vosmík a Skořepová 1995; Otčenášek *et al.* 1990). Někdy se také může přidat do roztoku hydroxidu draselného černý nebo modročerný inkoust pro zvýraznění houbových organismů a jejich oddělení od okolního buněčného odpadu (Brodell *et al.* 1991).

Louhový preparát má jednu velkou nevýhodu a tou je, že je to preparát, který není trvalý. K prodloužení doby uchování se využívá glycerolu, který se přidá k roztoku louhu. Další nevýhodou je, že tato metoda není příliš vyhovující pro přípravu louhového preparátu z vlasů, je to z důvodu jejich rychlé degradace (Otčenášek *et al.* 1990).

### 8.2.2 Fluorescenční mikroskopie

Mikroskopický důkaz dermatofyt je značně zlepšen a urychlen zavedením používáním fluorescenčního mikroskopu v mykologických laboratořích. Příprava vzorků pro fluorescenční mikroskopii je snadná a rychlá. Další výhodou je že, roztok pro fluorescenční barvení vydrží dostatečně dlouho (Haack *et al.* 1987) a že je tato metoda velice citlivá. Fluorescenční mikroskopie umožňuje detekci fluorescenčních sloučenin i ve velice malém množství jako je  $10^{-18}$  mol (Ahmad a Khan 2012). Tato metoda vede

ke značnému snížení času potřebného k hodnocení preparátu. Pro konečnou identifikaci dermatofyt je však nutné mít houbovou kulturu (Haack *et al.* 1987).

Fluorescence může být indukována širokou škálou sloučenin, jako jsou například fluorescenční barviva, specifické protilátky nebo lektiny, které jsou konjugované s fluorescenčními markery nebo látky, které fluoreskují v určitých chemických prostředích (Ahmad a Khan 2012). Pro fluorescenční barvení hub se využívá optického rozjasňovače Blankofor. Je to díky jeho vysoké afinitě k  $\beta$ -glykosidicky vázaným polysacharidům, což ho činí být vhodným pro sledování glukanu a chitinu v buněčné stěně kvasinek a plísní (Rüchel a Schaffrinski 1999). Dalším fluorescenčním barvivem je calcofluor. Calcofluor je fluorescenční barvivo, které může být použito, jako specifická sonda pro lokalizaci vazby  $\beta$ 1-3 a  $\beta$ 1-4-D glukanu, které jsou v celulóze a chitinu (Ahmad a Khan 2012; Kotnik 2007).

Provedení také není nijak zvlášť náročné. Materiál je umístěn na podložní sklíčko, přidají se dvě kapky 10 % KOH a směs se smíchá. Pak se přidají dvě kapky fluorescenčního barviva, opět se směs zamíchá a navrch se přiloží krycí sklíčko. Takto zhotovený preparát je vystaven ultrafialovému světlu a lze pozorovat zeleně svítící části hub (Kotnik 2007).

Nevýhodou tohoto typu mikroskopie je to, že je používána jen zřídka, protože je třeba mít speciální zařízení. Dále si musíme dát pozor na kontaminanty preparátu, které mají ve své struktuře chitin nebo celulózu, protože nám mohou dávat falešné výsledky. Mezi tyto kontaminanty řadíme různé rostlinné součásti, textilní vlákna a podobně. (Vosmík a Skořepová 1995).

### **8.2.3 Konfokální mikroskopie**

Je to technika, která byla vyvinuta, jako technika s výhodami oproti světelné mikroskopii. Konfokální mikroskop se liší od světelného mikroskopu ve způsobu zachycení obrazu a jeho dopravením do obrazovky počítače. Hlavní rozdíl mezi nimi je v umístění štěrbiny v ohniskové rovině obrazu. U konfokální mikroskopie vstupuje laserový paprsek do hlavy mikroskopu, prochází dolů a dostává se ven z objektivu na povrch sklíčka, kde dochází k excitaci fluorescenčního barviva ve vzorku. Fluorescenční barvivo ve vzorku je excitováno laserovým paprskem, který způsobí emisi světla o delší

vlnové délce. Toto světlo se rozptyluje ve všech směrech. Fluorescenční záření je poté zachyceno objektivem. K přenesení fluorescenčního obrazu vzorku na obrazovku počítače slouží modul umístěný na vrcholu hlavy mikroskopu. V počítači je zachyceno pouze světlo z roviny zaostření (z ohniska), což vede k vytvoření jasnějšího obrazu a umožňuje získat optický profil vzorku.

Rozlišujeme dva základní typy konfokální mikroskopie, což je konfokální skenovací tandemová mikroskopie (CSTM - Confocal Scanning Tandem Microscopy) a konfokální skenovací laserová mikroskopie (CSLM - Confocal Scanning Laser Microscopy).

CSTM využívá rtuťové, wolframové nebo xenonové osvětlovače a má tu výhodu, že umožňuje sledování vzorku v reálném čase. Bohužel problémem této techniky je nízká intenzita světla.

CSLM využívá jako osvětlení laser. Standardně se většinou využívá argonový laser (488-514 nm vlnové délky) spolu s nebo bez helium-neonového laseru (633 nm vlnové délky). Sledování v reálném čase není k dispozici, díky riziku poškození oka laserem. Tato metoda je zaměřena na sledování do hloubky až několikaset mikrometrů, což závisí na povaze vzorku. Některé části také můžeme postupně získat v trojrozměrné struktuře. Vynález CSLM je znám pouze jako konfokální mikroskop (CF-Confocal Microscopy) a jedná se pravděpodobně o největší průlom v mikroskopii za poslední desetiletí (Ahmad a Khan 2012).

Tato metoda má hned několik výhod. Hlavní výhodou této mikroskopie je sledování objektu v trojrozměrné struktuře, jako je umístění mikroorganismů v přírodních či hostitelských prostředích, získávání kvantitativních údajů o buněčné struktuře hub, jako je tloušťka, šířka a obsah (Ahmad a Khan 2012). Je to neinvazivní, bezbolestná zobrazovací metoda pro kůži a jiné tkáně. Získáváme vynikající detail buňky srovnatelný s histologickým řezem. Tyto výhody jsou právě důležité pro zobrazování hyf dermatofytů. Hyfy dermatofytů lze jasně identifikovat v horní epidermis po aplikaci KOH. Hyfy se jeví jako tenké, jasné a lineární objekty. Zjistilo se, že použití kapky 10 % KOH *in vivo* za méně než minutu před zobrazením usnadní vizualizaci hyf. Hyfy a výsledný zánětlivý infiltrát mohou být viděny ve stejnou dobu, což minimalizuje riziko falešně pozitivního výsledku vlivem kontaminace. Hlavní

nevýhodou jsou náklady na zařízení, špatná dostupnost a v některých případech polohování sondy (Markus *et al.* 2001).

#### **8.2.4 Elektronová mikroskopie**

Elektronová mikroskopie se využívá, tam kde je potřeba docílit většího rozlišení než je u světelné mikroskopie. Využívá se zejména pro studium ultrastruktur, jak biologických, tak i nebiologických vzorků. Mykologům poskytuje získávat cenné morfologické a analytické údaje o ultrastruktuře. Tato mikroskopie se využívá především pro studium povrchových vlastností organismu, jeho morfologie a složení.

Elektronové mikroskopy využívají paprsku elektronů o vysoké energii pro sledování a charakterizaci materiálů v řádově nanometrech a mikrometrech.

Tato technika je využívána ve dvou režimech. Prvním je rastrovací elektronová mikroskopie (SEM- Scanning Electron Microscopy) ve spojení s rentgenovou mikroanalýzou. Druhým režimem je transmisní elektronová mikroskopie (TEM- Transmission Electron Microscopy), která pracuje v modu spektrometrie založené na ztrátě energie elektronu (EELS- Electron Energy Loss Spektrometry) (Ahmad a Khan 2012).

Technika TEM byla vynalezena před SEM. Používá se ke snímání pevných struktur, řezů a mrazem vyleptaných vzorků. Pomocí TEM získáváme ploché dvourozměrné obrazy. Tyto obrazy poskytují detailní informace o cytoplazmatické organizaci a při použití s imunolokalizací může být TEM použit pro studování složení buněčné stěny (Kaminskyj a Dahms 2007). Chemická fixace některých komponent, jako jsou proteiny (pomocí aldehydů, jako je glutaraldehyd, formaldehyd) nebo nenasycené tuky ( $\text{OsO}_4$  v přítomnosti imidazolu) a některé polysacharidy ( $\text{RuO}_4$ ) a jejich následné vložení do pryskyřice a obarvení těžkými kovy (acetát uranylu a citrát olovnatý) slouží k odlišení těchto součástí v houbové buňce (Ahmad a Khan 2012).

SEM poskytuje realistické trojrozměrné vizualizace s vysokým rozlišením. U hub se SEM většinou používá k dokumentaci morfologie a prostorových vztahů. Většina SEM vzorků, je zobrazeno při teplotě v okolní místnosti za vysokého vakua (cca  $10^{-8}$  torr), kde nejprve dochází k chemické fixaci, dehydrataci a k potažení vodivým

materiálem (zlato), aby se zabránilo nahromadění náboje z elektronového paprsku. Kromě chemické fixace se využívá fixace zmražením. Tyto metody nazýváme cryoSEM. CryoSEM může být použit pro zobrazování buněk ve zmraženém hydratovaném stavu. Tímto se stal významným krokem pro zobrazování s vysokým rozlišením pro buňky rostlin a hub (Kaminskyj a Dahms 2007). Buňky hub jsou poměrně snadno fixovány zmražením ve srovnání s chemickou fixací (Ahmad a Khan 2012). CryoSEM je termín, který zahrnuje studie s použitím vzorků, které jsou rychle zmrazené, nebo pomalu zmrazené za částečného vakua a vizualizovány jsou pomocí SEM za nízké teploty. Ke zmrazování vzorků se využívá pevného dusíku (-210°C), který zkapalní (-196°C) podle teploty vzorku, ale nedosáhne se jeho teploty varu (-192°C). Příprava vzorku (sublimace, tvorba povlaku) a vizualizace vzorku jsou prováděny mezi teplotami -180°C až -60°C. Při teplotě nad -135°C dochází k rekrystalizaci vody, což může mít vliv na ochranu tkání. Většina vzorků hub pro cryoSEM bylo po rozmražení zničeno v důsledku obsahu vody a škodlivým působením krystalů cytoplazmatického ledu na membránovou integritu (Kaminskyj a Dahms 2007). SEM zmražených hydratovaných vzorků poskytuje obrazy buněčných struktur, které nejsou ovlivněny chemickou reakcí (Ahmad a Khan 2012).

Hlavní výhodou elektronové mikroskopie je lepší rozlišení než ve světelné mikroskopii. Vzhledem k velké ostrosti je tato metoda vhodná k prohlížení velkého množství vzorků. Hlavním problémem pro zobrazování biologických vzorků při chemické fixaci je, že při přípravě vzorku dochází ke změnám v morfologii, na rozdíl od zmražených vzorků (Ahmad a Khan 2012). Nevýhodou cryoSEM je obtížnost při sledování vnitřní struktury a také náchylnost na vznik některých artefaktů, zejména při neúplné sublimaci povrchové vlhkosti, která zakrývá jemné povrchové vlastnosti. Dále je důležité zmínit ještě to, že pro elektronovou mikroskopii je potřeba speciální zařízení, proto touto metodou nedisponuje každá běžná laboratoř (Kaminskyj a Dahms 2007).



## **8.3 Kultivační techniky**

Kultivace patří k nepostradatelným vyšetřovacím technikám, které se provádí při diagnóze onemocnění způsobených dermatofyty. Kultura je cenným doplňkem přímé mikroskopie a provádí se i v případě, že mikroskopické vyšetření vyšlo negativní. Někdy nám může kultivace sama o sobě poskytnout dostatečné informace ke stanovení diagnózy (Otčenášek *et al.* 1990).

### **8.3.1 Primokultivace**

Primokultivace patří k diagnostickým metodám, které slouží k identifikaci dermatofytů. Pomocí této metody jsme schopni dermatofyty identifikovat na základě jejich makromorfologických vlastností (Vosmík a Skořepová 1995). Při určování dermatofytů na základě těchto vlastností sledujeme rychlost růstu kolonií, jejich barvu z obou stran, profil, texturu povrchu, okraje, půdorys a zarůstání do agaru (Otčenášek *et al.* 1990).

Pro primokultivaci využíváme izolační média. Existuje celá řada médií. Tato media vybíráme podle typu vzorků, které zpracováváme a podle provizorní diagnózy. Pevné materiály, jako jsou vlasy, nehty či šupiny kůže mohou být uchovávány až měsíce, zatímco vzorky, které obsahují tekutiny, musí být naočkovány na agar, co nejrychleji. Agar může být ve zkumavkách, kde je nanesen šikmo (Obr. 15) nebo může být v Petriho miskách (Obr. 16). Výhodou agarů v Petriho misce je, že zde má vzduch snadnější přístup, ale velkou nevýhodou je větší riziko kontaminace ze vzduchu.

Inokulace se provádí s malým množstvím materiálu, který máme nanesený na bakteriologické kličce. Materiál nanášíme na povrch agarů nebo lehce do agarů. U zkumavkového provedení očkujeme inokulum do 3-4 míst a u agarů na Petriho miskách do 5-8 míst. Je to z důvodu primární kontaminace. Jestliže došlo k primární kontaminaci nějaké části vzorku, tak můžeme dermatofyty zachytit z jiné části vzorku na médiu, která nebyla kontaminována.

Tekuté vzorky očkujeme na plotny způsobem stejným, jako v bakteriologii, tzv. izolačním způsobem. Inokulace ve zkumavkovém provedení se provádí pomocí bakteriologické kličky, se kterou děláme vlnovitý pohyb (Otčenášek *et al.* 1990).

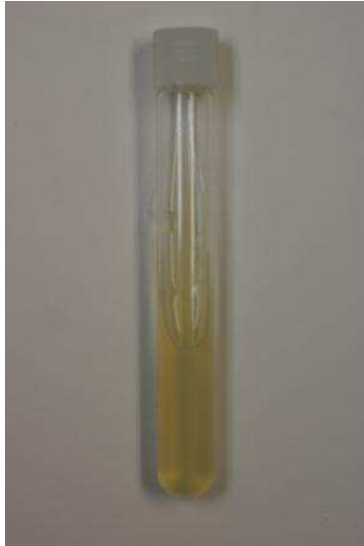
Inkubace probíhá při 25-27°C nebo 37°C. Někdy se provádí inkubace kultur na médiích při obou teplotách. U dermatofytů je důležité naočkování minimálně na dvě agarové plotny, je to z důvodu nižší záchytnosti (Otčenášek *et al.* 1990). Doba inkubace dermatofytů probíhá 3 týdny (Vosmík a Skořepová 1995).

Existuje celá řada kultivačních půd. Nejčastější izolační půdou pro houby je 2 % Sabouraudův glukózový agar (Otčenášek *et al.* 1990). Sabouraudův agar může být modifikovaný thiaminem nebo antibiotiky. Thiamin se přidává z důvodu nutriční náročnosti některých dermatofytů, jako je *Trichophyton verrucosum*. Nejčastěji používanými antibiotiky jsou chloramfenikol, případně chloramfenikol s gentamicinem (Vosmík a Skořepová 1995; Mycology Adelaide 2014 [online]). Antibiotika se přidávají z důvodu, aby potlačila růst bakteriální flóry, která může být přítomna na řadě klinických vzorků. Kromě bakteriální kontaminace může být i kontaminace saprofytickými houbami. Při podezření na kontaminaci saprofyty se využívá půd, které jsou obohaceny o cykloheximid. Tyto půdy nemohou být však inkubovány při 37°C (Otčenášek *et al.* 1990). Dále se také pro rutinní kultivaci a identifikaci hub využívá bramborový glukózový agar, kukuřičný agar a agar se sladovým výtažkem (Mycology Adelaide 2014 [online]).

Speciálními médii jsou brain heart infusion agar s 5% ovčí krví, lactrimel agar, který slouží ke tvorbě pigmentu u *Trichophyton rubrum*, Trichophyton agary č. 2-7, které slouží k odlišení jednotlivých druhů rodu *Trichophyton* nebo rýžový agar, který se používá k vyvolání sporulace a diferenciaci u *Microsporum audouinii*, *Microsporum canis* a *Microsporum distortum*. Slouží hlavně k odlišení *Microsporum canis*, který roste na rýžovém agaru velmi dobře (Obr. 17) od *Microsporum audouinii*, který neroste na rýžovém agaru vůbec nebo špatně. Obvykle je viditelné pouze hnědé zbarvení (Obr. 18). Sabouraudův glukózový agar s 5 % NaCl slouží pro kultivaci a diferenciaci *Trichophyton rubrum* a *Trichophyton mentagrophytes*. Agar Trichophyton 1 někdy nazýván, jako agar bez vitamínů slouží pro diferenciaci druhů *Trichophyton*. Posledním agarem je 1 % peptonový agar, který se používá pro kultivaci a diferenciaci (Mycology Adelaide 2014 [online]).

Velkou výhodou této metody je, že kromě sledování makromorfologických vlastností, jsme schopni za použití světelného mikroskopu sledovat i

mikromorfologické vlastnosti a to tím že mikroskopujeme okraje kolonií přes zkumavku nebo Petriho misku (Otčenášek *et al.* 1990).



**Obrázek 15:** Sabouraudův glukózový agar ve zkumavkovém provedení.

**Zdroj:** *Culture media supplies* [online]. Culture media and supplies c2011, citováno [29.3.2014]. Dostupné z:

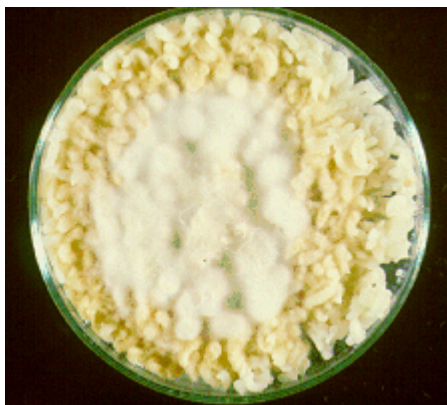
<http://www.culturemediasupplies.com/JMTSPics/3326tsa.JPG>



**Obrázek 16:** Sabouraudův glukózový agar v Petriho misce.

**Zdroj:** *Culture media supplies* [online]. Culture media and supplies c2011, citováno [29.3.2014]. Dostupné z:

<http://www.culturemediasupplies.com/images/media/CM150-P.JPG>



**Obrázek 17:** Růst *Microsporium canis* na rýžovém agaru.

**Zdroj:** *Mycology Adelaide* [online]. The university of Adelaide c2014, citováno [29.3.2014]. Dostupné z: <http://www.mycology.adelaide.edu.au/images/canis5.gif>



**Obrázek 18:** Růst *Microsporium audouinii* na rýžovém agaru.

**Zdroj:** *Mycology Adelaide* [online]. The university of Adelaide c2014, citováno [29.3.2014]. Dostupné z: <http://www.mycology.adelaide.edu.au/images/aud3.gif>

### 8.3.2 Mikrokultura

Mikrokultury slouží pro sledování mikroskopických vlastností neznámého dermatofyta. Jde vlastně o techniku, při které si připravíme mikroskopický preparát přímo z narostlých kultur (Otčenášek *et al.* 1990).

Existuje celá řada provedení, s tím že má většinou každá laboratoř svou osvědčenou metodu (Vosmík a Skořepová 1995).

Neobarvené mikrokultury můžeme připravit třemi způsoby. První způsob se provádí s tekutým Sabouraudovým glukózovým agarem ve zkumavce, jehož teplotu snížíme na 45-55°C, poté ho masivně naočkujeme kulturou dermatofyta a vše pořádně promícháme. Malé množství naočkovaného agaru dáme na podložní sklíčko, které máme položené na skleněné tyčince v předem připravené Petriho misce. V posledním kroku se agar přikryje krycím sklíčkem a přidá se pár mililitrů vody, aby se zamezilo vyschnutí. Druhý způsob se také provádí s tekutým Sabouraudovým agarem, který dáme na podložní sklíčko a pomocí bakteriologické kličky ho roztáhneme po celé ploše. Inokulace se provádí poté, co agar zaschne, vpichem. Pro poslední způsob potřebujeme čtvereček agar, který vyřízneme z agarové plotny. Tento čtvereček dáme na podložní sklíčko a nanese na něj čistou kulturu dermatofyta. Nakonec se nanese krycí sklíčko a inkubace probíhá ve vlhké komůrce.

Kromě neobarveného preparátu můžeme připravit preparát, který je obarvený. Pro přípravu tohoto preparátu potřebujeme opět vyříznutý čtvereček agarů, který dáme na podložní sklíčko umístěné v Petriho misce na skleněné tyčince. Pomocí bakteriologické kličky nanese inokulum doprostřed všech stran bločku, přikryjeme jej krycím sklíčkem a opět přidáme pár mililitrů vody pro zabránění vyschnutí. Inkubujeme pár dní při teplotě 27 nebo 37°C. Po dosažení ideální kultury odejmeme krycí sklíčko, na kterém máme část kultury a ponoříme jej do kapky laktofenolu s bavlnovou modří. Druhým způsobem provedení je, že se mycelium, které roste v agaru, který je na podložním sklíčku odřízne a agar se odstraní. V dalším kroku se na podložní sklíčko s myceliem kápne laktofenol s bavlnovou modří a poté jej přikryjeme krycím sklíčkem.

Výhodou této metody je, že sledujeme neporušené morfologické struktury houby. K jejich porušení většinou dochází při přípravě klasických mikroskopických preparátů přímo z kultury. Další výhodou je možnost sledovat v čase různá morfologická stádia vývoje těchto hub (Otčenášek *et al.* 1990).

### **8.3.3 Biochemické a růstové testy**

Dalšími nezastupitelnými metodami v mykologických laboratořích jsou biochemické a růstové testy. Jsou to metody, které napomáhají při určování dermatofytů se speciálními nároky. Kromě toho však také napomáhají při určování druhů, u kterých si nejsme jistí jejich identifikací nebo u druhů, které mají neobvyklou morfologii (Otčenášek *et al.* 1990).

K těmto testům řadíme například test perforace lidského vlasu. Tento test slouží k rozlišení *Trichophyton rubrum* a *Trichophyton mentagrophytes* a jeho variant. Metoda je to velice jednoduchá na provedení. Vlasy umístíme do lahvičky s vodou, inokulujeme testovanou houbou a inkubujeme při laboratorní teplotě. Jednotlivé vlasy poté pozorujeme pod mikroskopem obarvené v laktofenolu s bavlnovou modří. Izoláty *Trichophyton mentagrophytes* způsobují výrazné, přesně lokalizované díry a výrazné eroze na vlasu, na rozdíl od *Trichophyton rubrum*, u kterého tyto změny na vlasech nepozorujeme (Mycology Adelaide 2014 [online]). Dále se provádí také ureázový test. Tento test slouží k rozlišení *Trichophyton rubrum* a *Trichophyton mentagrophytes*. Pro

tento test využíváme speciální agar, který obsahuje močovinu a fenolovou červeň. Po 7 denní inkubaci při teplotě 25°C *Trichophyton mentagrophytes* zbarví půdu červeno-fialově. Toto zbarvení způsobuje ureáza, kterou tento dermatofyt produkuje. *Trichophyton rubum* půdu nezabarví. Je však důležité si dát pozor, protože při delší inkubaci mohou zbarvení způsobit i některé kmeny *Trichophyton rubrum*. Kromě ureázové aktivity se sleduje také lipázová aktivita či pigmentace na bramborovém agaru (Vosmík a Skořepová 1995). Dalším speciálním testem je kultivace na rýžovém agaru, který slouží k vyvolání sporulace a diferenciaci u *Microsporum audouinii*, *Microsporum canis* a *Microsporum distortum* (Mycology Adelaide 2014 [online]).

Kromě těchto testů sem také řadíme kultivace na speciálních půdách, které jsou obohaceny o růstové faktory. Nejčastějšími růstovými faktory jsou histidin, thiamin, kyselina nikotinová popřípadě její derivát nikotinamid a inositol. Histidin pro svůj růst v agaru vyžaduje *Trichophyton megninii*, kyselinu nikotinovou nebo nikotinamid potřebuje pro správný růst *Trichophyton equinum* var. *equinum* a thiamin je důležitou součástí půd pro kultivaci *Microsporum ferrugineum*, *Trichophyton tonsurans* a *Trichophyton verrucosum* (Otčenášek et al. 1990).

## **8.4 Molekulární metody**

Molekulární metody nám významně pomohly v několika posledních letech řešit taxonomické problémy s dermatofyty (Faggi et al. 2002). Tyto techniky jsou založené na detekci rozdílu v genotypu jednotlivých organismů (Liu et al. 2000) a řadíme sem PCR, polymorfismus délky restrikčních fragmentů, náhodné amplifikace polymorfních úseků DNA (RAPD- Random Amplification of Polymorphic DNA), PCR fingerprinting a Southern blotting. Jsou to metody, které jsou velice přesné, specifické, citlivé, rychlé a dobře reprodukovatelné (Kamiya et al. 2004).

Klasická identifikace dermatofyt je většinou založena na studii morfologických a fyziologických znaků. Identifikace na základě těchto znaků je zdlouhavý a namáhavý proces. Je důležité zmínit ještě to, že náročnost těchto metod je dána tím, že se stejné rody mohou mezi sebou lišit ve fenotypu, nebo že může organismus dokonce typický znak postrádat (Faggi et al. 2002), proto při této identifikaci hrají důležitou roli zkušenosti pracovníka (Kamiya et al. 2004). Je to tím, že vlastnosti fenotypu jsou

mnohem snáze ovlivnitelné vnějšími faktory, jako jsou změny teplot, používání různých médií a chemoterapie. Proto je diagnostika na základě těchto vlastností mnohdy obtížná (Faggi *et al.* 2001).

#### 8.4.1 PCR

Polymerázová řetězová reakce neboli PCR (Polymerase Chain Reaction) je velice citlivá a specifická metoda, která se používá k detekci mykotických buněk s velice malým množstvím DNA, jako je 1 pg (Kim *et al.* 2011).

PCR je schopna nasyntetizovat milióny kopií specifické sekvence DNA. To všechno se děje při jednoduché, rychlé a plně automatizované reakci. Provádí se *in vitro* a dochází při ní právě k enzymatické syntéze specifického úseku DNA. Při této reakci je nutná přítomnost dvou oligonukleotidů, které jsou známé jako primery. Tyto primery se spojují s opačným vláknem DNA a označují místo, které chceme amplifikovat. Na jednovláknovou DNA se váží, tak aby měly volné 3'OH konce pro syntézu. Nové vlákno DNA vzniká díky enzymu, který se nazývá DNA polymeráza. Je to enzym, který nasedá na primer a prodlužuje ho až ke koncovému primeru. Nové vlákno DNA je nasyntetizováno za účasti deoxyribonukleotidtrifosfátů, templátové DNA a primerů. Díky vysokým teplotám je nutné u PCR používat termostabilní DNA polymerázy, abychom je nemuseli při každém novém cyklu přidávat znovu. Nejčastěji se využívá *Taq* polymeráza. Tento název má podle *Thermus aquaticus*, což je bakterie, ze které byla vyizolována. Produkt vznikající po prodloužení primeru může sloužit jako templát pro další syntézu. PCR je charakteristická tím, že probíhá v neustále se opakujících cyklech. Každý cyklus se skládá z denaturace DNA, kde dojde k oddělení dvouvláknové DNA, v dalším kroku nasedají primery a v posledním kroku dochází k dosyntetizování druhého vlákna za účasti DNA polymerázy. Po každém cyklu dochází k exponenciálnímu nárůstu produktu. Kromě templátové DNA, primerů, DNA polymerázy a deoxyribonukleotidtrifosfátů je nutná ještě přítomnost dalších složek reakční směsi, jako jsou hořčičnaté ionty a pufr. Všechny složky reakční směsi musí být přítomné ve správné koncentraci. Kromě optimalizace jednotlivých koncentrací je nutné ještě optimalizovat teploty jednotlivých fází (Erlich 1989). Produkty syntézy se



rozdělují elektroforézou a jsou detekovány po obarvení ethidiumbromidem (Faggi *et al.* 2002).

Detekce dermatofytů u PCR je založena na jejich odlišnostech v DNA oproti jiným houbám. Dermatofyty mají odlišnosti oproti ostatním houbám na malých (18S), velkých (25S) ribozomálních RNA genech a v mitochondriální DNA. PCR značně přispěla k pochopení fylogenetických vztahů mezi dermatofyty a jinými houbami a zlepšila detekci a identifikaci běžných dermatofytů (Liu *et al.* 2000). Pro fylogenetickou identifikaci dermatofytů se nejčastěji využívá ITS 1 (Internal Transcribed Spacer) a ITS 2 primer (Kim *et al.* 2011). Systém těchto primerů je určen k amplifikaci fragmentu genu pro 18S podjednotku rRNA (Bock *et al.* 1994). Dalším často používaným primerem je jednoduchý oligonukleotid (GACA)<sub>4</sub>, který se používá u metody PCR fingerprinting. Tento primer je vhodný pro amplifikaci těchto druhů *Microsporum canis*, *Microsporum gypseum*, *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton ajelloi* a *Epidermophyton floccosum*. Mezi těmito druhy při PCR nebyly pozorovány žádné vnitrodruhové variability, zatímco u *Trichophyton mentagrophytes* byly pozorovány různé varianty. Tato metoda je vhodná pro identifikaci mladých kolonií, pro kolonie bez typických znaků pro jednotlivé druhy a pro mrtvé rody (Faggi *et al.* 2002). Kromě těchto primerů se také využívá dvojice primerů, která slouží k odlišení *Trichophyton tonsurans* od ostatních druhů *Trichophyton*. Tyto primery se nazývají tonsF1 a tonsR1 a byly navrženy pro ribozomální DNA, která se nachází mezi 18S a 5,8S (Yoshida *et al.* 2006). Nyní se provádí řada pokusů za účelem vytvořit široké spektrum obou primerů a reakčních podmínek pro identifikaci dermatofytů. Genotypové rozdíly jsou však mezi jednotlivými druhy velice malé, tak je vývoj druhově specifických primerů obtížný. Rozdíl počtu bází je mezi jednotlivými rody 1-2 maximálně 5-6 (Kim *et al.* 2011).

PCR je schopna rozlišit pouze omezený počet druhů proto je vhodná spíše pro identifikaci konkrétního rodu než identifikaci konkrétního druhu (Liu *et al.* 2000).

Kromě klasické PCR existují ještě PCR, které jsou nějakým způsobem upravené. Řadíme sem nested-PCR a multiplex-PCR, což je PCR, která využívá více než dvou primerů a je vhodná pro detekci většího množství mikroorganismů v jednom vzorku (Kim *et al.* 2011). Nested-PCR je modifikace klasické PCR, kde se také využívá systému dvou primerů. Jsou to primery vnější, což jsou ty, které nasedají v prvním cyklu

amplifikace a vnitřní, které nasedají ve druhém cyklu. Je to metoda, která může být považována za zlatý standard pro diagnostiku onychomykóz způsobených dermatofyty. Pro diagnostiku onychomykóz se využívá systému primerů, které jsou zaměřené na specifickou sekvenci chitin syntázy 1. Genu, nebo na ITS1 oblast (Čmoková 2013; Nagao *et al.* 2005; Garg *et al.* 2007). Jako první pár primerů pro ITS1 oblast, které se mohou využívat v první PCR, jsou například Univ-F a Univ-R, což jsou primery, které jsou schopné detekovat *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton mentagrophytes* a *Trichophyton tonsurans*. U druhé PCR se poté využívá primerů T.rub-F a T.rub-R pro *Trichophyton rubrum* a T.ment-F a T.ment-R pro *Trichophyton mentagrophytes* (Nagao *et al.* 2005). Prvními primery pro specifickou sekvenci chitin syntázy 1. genu jsou CHS1 1S a CHS1 1R a druhými primery jsou JF2 a JR2 (Garg *et al.* 2007).

PCR-RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) je metoda, která je navržena pro rychlou detekci dermatofytů na úrovni druhu (Bagyalakshmi *et al.* 2008). Tyto metody jsou založené na kombinaci dvou technik dohromady. Pro amplifikaci DNA se využívá klasické PCR. Produkty vznikající touto reakcí jsou v posledním kroku podrobeny restričnímu štěpení. Enzymy využívající se pro toto štěpení nazýváme restriční endonukleázy (Dubach *et al.* 2001). Tyto reakce mohou být zaměřené na 18S rDNA, ITS oblast nebo na geny DNA topoizomerázy II. (Bagyalakshmi *et al.* 2008; Kamiya *et al.* 2004). Jsou to metody, které jsou velice přesné, citlivé, spolehlivé a snižují čas diagnostiky oproti klasickým konvenčním metodám (Bagyalakshmi *et al.* 2008).

#### **8.4.2 MALDI-TOF MS**

MALDI-TOF MS (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization- Time Of Flight Mass Spectrometry) neboli hmotnostní spektrometrie s analyzátozem doby letu při, které se provádí ionizace laserem za účasti biomatrice. MALDI-TOF MS slouží k rychlé a přesné identifikaci běžně se vyskytujících druhů dermatofytů. Tato metoda představuje nový přístup k identifikaci mikroorganismů a je založena na tvorbě charakteristických spekter buněk (Alshawa *et al.* 2012).

Každý hmotnostní spektrometr se skládá ze tří částí. První částí je iontový zdroj, který převede vzorek na ionty v plynné fázi, druhou částí je hmotnostní analyzátor,

který rozdělí ionty na základě jejich poměru hmotnosti k náboji a třetí částí je detekční zařízení. Rozvoj ionizační techniky MALDI umožnil převést velké netěkavé biomolekuly, jako jsou bílkoviny na ionty. Z tohoto důvodu je právě tato metoda vhodná pro identifikaci bakterií, virů a hub (Croxatto *et al.* 2011).

Tato technika pracuje tak, že analyzuje obsah bílkovin v buňkách dermatofytů. Výsledkem této analýzy je spektrum, které je charakteristické pro jednoho daného dermatofyta. Identifikace probíhá na základě toho, že srovnáváme spektrum neznámého (identifikovaného) dermatofyta se spektry v referenční knihovně (Cassagne *et al.* 2011).

Pro analýzu metodou MALDI-TOF MS stačí malé množství kolonie, proto je to metoda, která nám poskytuje přesné výsledky už během 3-6 dní. Pomocí MALDI-TOF jsme schopni efektivně identifikovat dermatofyta, který způsobil onemocnění a také jsme schopni výrazně snížit čas odezvy (L'Ollivier *et al.* 2013).

## **8.5 Imunologické metody**

Imunologické metody jsou založeny na reakci hostitele na houbu, která pronikla do jeho organismu. Tyto metody jsou využívány, jako důkaz pro potvrzení humorální imunity, buněčné imunity a samotného agens. Kromě toho můžeme pomocí těchto metod získat informace o antigenní struktuře, informace o fylogenetických a příbuzenských vztazích, ale také nám můžou pomoci při léčbě a prevenci (Otčenášek *et al.* 1990).

Infekce způsobené dermatofyty vyvolávají specifickou imunitní odpověď, které se účastní, jak složky buněčné, tak složky humorální. Povaha imunitní reakce závisí na závažnosti dermatofytózy. Imunitní odpověď roste v závislosti na stupni zánětu, liší se v závislosti na druhu dermatofyta, druhu hostitele a na patofyziologickém stavu hostitele (Khosravi *et al.* 2012). K řadě obranných mechanismů, které člověka chrání před infekcí dermatofyty, patří  $\alpha$ -2 - makroglobulin, inhibitor keratinázy, nenasycený transferin, epidermální odlupování, lymfocyty, makrofágy, neutrofilové žírné buňky. Při dermatofytové infekci vyvíjí hostitel řadu protilátek (imunoglobulinů), jako jsou IgG, IgM, IgA a IgE, které nepomáhají v boji proti infekci. Největší hladiny protilátek nacházíme u lidí s chronickými dermatofytózami (Weitzman a Summerbell 1995).

U dermatofytů rozlišujeme dvě hlavní třídy antigenů a to jsou glykopeptidy a keratinázy. Proteinová část glykopeptidů stimuluje hlavně buněčnou imunitu a část cukerná stimuluje hlavně imunitu humorální. Keratinázy umožňují dermatofytům proniknutí do kůže a vyvolávají přecitlivělost oddáleného typu (Weitzman a Summerbell 1995). Dále také rozlišujeme antigeny podle toho, jestli jsou korpuskulární, což mohou být celé buňky hub, jejich buněčná stěna či ribozomy, nebo nekorpuskulární, kam řadíme toxiny, enzymy a různé produkty metabolismu hub (Otčenášek *et al.* 1990).

Pro diagnostiku dermatofytóz se využívá celá řada imunologických metod. Mezi nejdůležitější patří imunodifúze (ID), protisměrná imunoelektroforéza (CEP- Counter immunoelectrophoresis), komplementfixace (KF), ELISA (Enzyme-Linked-Imunosorbent Assay), kožní test (KT), transformace lymfocytů (TL) a migračně inhibiční test (MIT) (Otčenášek *et al.* 1990).

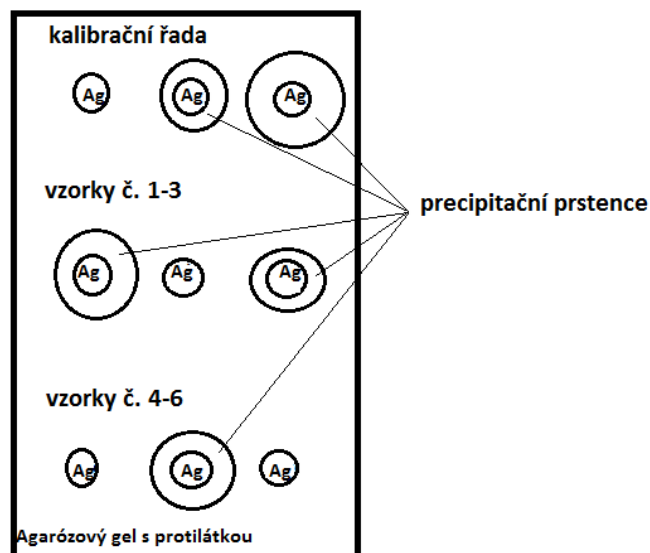
### **8.5.1 Imunodifúze**

Principem těchto metod je tvorba precipitátů, které vznikají reakcí antigenu s protilátkou (Bartůňková *et al.* 2011). Existuje celá řada provedení imunodifúze, například radiální imunodifúze, dvojitá imunodifúze a jednorozměrná dvojitá imunodifúze (Otčenášek *et al.* 1990).

Radiální imunodifúze je velice stará metoda, která se dnes už téměř nepoužívá. Její práci v dnešní době zaujímá turbidimetrie a nefelometrie. Reakce mezi antigenem a protilátkou probíhá ve vodorovném agarózovém gelu difúzí. U této metody je příslušná protilátka přimíchána do gelu, ve kterém jsou po utužení vytvořeny jamky, do kterých se přidává antigen. Gel musí být ve vodorovné poloze kvůli tomu, aby koncentrace protilátky a tloušťka gelu byla všude stejná. Poté co je antigen nanesen do jamky probíhá inkubace při laboratorní teplotě, která trvá většinou několik hodin, maximálně však 2 dny. Během inkubace dochází k tomu, že antigen difunduje z jamky do agaru, setkává se s protilátkou a reaguje s ní. Při reakci antigenu s protilátkou se vytváří precipitát, který má tvar prstence (Obr. 19). Průměr prstence se porovnává s kalibrační řadou, u níž známe koncentrace, a kterou jsme nanесли spolu se vzorky. Výpočtem jsme pak schopni určit koncentraci antigenu v našem vyšetřovaném

materiálu. Průměr prstence je přímo úměrný koncentraci antigenu, přítomném ve vzorku. Hlavní výhodou této metody je jednoduchá instrumentace, má však, ale i nevýhodu a tou je složité provedení, proto vyžaduje zkušeného pracovníka (Bartůňková *et al.* 2011).

Při dvojité imunodifúzi dochází k tomu, že antigen i protilátka pronikají do gelu společně. Jednorozměrná dvojité imunodifúze je metoda při, které spodní vrstva obsahuje protilátku, střední vrstva obsahuje pouze samotný gel a v horní vrstvě je přítomen antigen. Dochází k difúzi antigenu a protilátky, což způsobí tvorbu precipitátu ve střední vrstvě. Tato metoda se může dělat ve zkumavkách nebo na Petriho miskách (Otčenášek *et al.* 1990).



**Obrázek 19:** Jednoduchá radiální imunodifúze.

**Zdroj:** Káš, J., Kodíček, M., & Valentová, O. *Laboratorní techniky biochemie*. Praha: vydavatelství VŠCHT, 2005. ISBN 80-7080-586-2, upraveno

## 8.5.2 Imunoelektroforéza

Je to metoda, která kombinuje principy metod imunoprecipitace a elektroforézy. V prvním kroku dochází k rozdělení antigenů na základě jejich pohyblivosti v elektrickém poli a v druhém kroku reagují antigeny s protilátkami za vzniku precipitátu. Vše probíhá v prostředí agarózového gelu (Bartůňková *et al.* 2011).

Provedení je jednoduché nejdříve se nakape antigen do jamek v gelu a provede se klasická elektroforéza. Po ukončení elektroforézy se vyříznou asi ve vzdálenosti 4-6 mm od jamky, kde byl antigen malé žlábkové prohlubně, do kterých bude poté aplikována protilátka (sérum). Inkubace probíhá ve vlhké komůrce většinou po dobu 2-5 dní. V případě pozitivní reakce se mezi antigenem a protilátkou objevují obloučkovité precipitáty.

Kromě klasického provedení se provádí také raketová imunoelektroforéza, křížová imunoelektroforéza a protisměrná imunoelektroforéza, ta je z těchto technik pro diagnostiku dermatofytóz využívána nejvíce (Otčenášek *et al.* 1990).

Protisměrná imunoelektroforéza je vlastně dvojitá imunodifúze. Při této metodě dochází k současnému pohybu antigenu i protilátky. Opět se to provádí v agarózovém gelu, tentokrát jsou tam však vyříznuty dvě řady jamek. Do jamek blíž k anodě jsou nakapány protilátky (sérum) a do jamek blíž ke katodě je aplikován antigen. Po vložení elektrického pole antigen a protilátky migrují proti sobě a reagují spolu za vzniku precipitačních linií (Otčenášek *et al.* 1990). Je to metoda poměrně rychlá, precipitační linie lze pozorovat už po 30 minutách difúze. Tato metoda může být použita pouze pro antigeny se záporným nábojem (Káš *et al.* 2005).

Výhod těchto metod je hned několik. Jsou to metody standardní, cenově dostupné a nejsou nijak zvlášť náročné na provedení. Nevýhodou je však to, že pro odečítání a interpretaci výsledků, jsou v některých případech potřebné zkušenosti (Bartůňková *et al.* 2011).

## 8.5.3 Komplementfixační reakce

Komplementfixační reakce (někdy také nazývány, jako vazba komplementu) jsou reakce, které probíhají ve dvou fázích. Nejdříve se smísí pacientovo sérum s antigenem a komplementem. Při smísení dochází v přítomnosti protilátky k její vazbě

na antigen, k aktivaci a vyvázání komplementu. V dalším kroku se přidávají beraní erythrocyty a králičí hemolyzin. Když jsou v séru přítomné protilátky, tak není přítomen komplement, který by způsobil lýzu beraních erythrocytů (pozitivní reakce). V případě, že v pacientově séru nejsou přítomné protilátky, tak komplement zůstává volný a způsobuje lýzu beraních erythrocytů (negativní reakce).

Tato reakce se provádí, tak že séra ředíme geometrickou řadou, přidáme k nim vytitrovaný komplement a antigen. Vše se poté inkubuje 30 minut při teplotě 37° C. Po ukončení inkubace se přidá hemolyzin a beraní erythrocyty, opět se inkubuje za stejné teploty po stejnou dobu. Poslední zkumavka, ve které není hemolýza, informuje o titru protilátek v séru. Kromě komplementfixační reakce séra je nutné provést i kontroly. Provádí se, jak kontrola antigenu, tak kontrola séra. Při kontrole antigenu se akorát místo séra používá pufr a při kontrole séra se místo antigenu používá pufr. Pro usnadnění odečítání titru protilátek se může provést centrifugace. Kromě zkumavkového provedení existuje, také provedení na mikrotitračních destičkách. Výhodou těchto destiček je, že stačí malé množství vzorku a reagensů (Otčenášek *et al.* 1990).

#### **8.5.4 ELISA**

Metodu ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) řadíme mezi metody enzymové imunoanalýzy (EIA - Enzyme Immuno Assay). Tyto metody se rozdělují na homogenní a heterogenní. U homogenní enzymové imunoanalýzy nedochází k separaci volné a vázané frakce značených imunoreaktantů. Při heterogenních metodách je však nutné oddělit volné imunoreaktanty od imunoreaktantů vázaných v komplexu. Metodu ELISA řadíme právě mezi heterogenní. ELISA se provádí buď kompetitivní, nebo nekompetitivní. Kompetitivní ELISA může být v přímém a nepřímém provedení. Přímá ELISA slouží k přímé detekci antigenu a nepřímou metodou se stanovují protilátky (Káš *et al.* 2006).

ELISA je metoda, která se u dermatofytóz využívá hlavně pro nepřímý průkaz protilátek. Slouží k detekci velice malých titrů IgG, IgM a IgA protilátek (Otčenášek *et al.* 1990). Velice malé titry protilátek nezpůsobují vznik imunoprecipitátu, nebo může být imunoprecipitát tak malý, že ho nejsme schopni detekovat. Proto se u této metody

využívá toho, že na antigen naváže vhodný enzym. Nejčastěji používanými enzymy jsou alkalická fosfatáza a peroxidáza. Navázání enzymu probíhá ještě před interakcí mezi antigenem a protilátkou. Vznikem imunoprecipitátu získáme intenzivní signál, který jsme schopni detekovat (Káš *et al.* 2006).

ELISA bývá nejčastěji provedena v mikrotitračních destičkách, kde se jako pevného nosiče využívá stěn jamek, které obsahují manan nebo mananprotein. Provedení je jednoduché, do jamek se přidá sérum ředěné geometrickou řadou a vše se inkubuje při 37° C, 2 hodiny. Poté co se ustanoví rovnováha, se vzorek promyje promývacím pufrům a přidá se značená protilátka proti první přidané protilátce (proti lidskému IgG). Opět probíhá inkubace za stejných podmínek. Poté se destičky znovu promývají a jako indikátor se využívá o-fenylendiamin. Titr protilátek se rovná nejvyššímu ředění séra, které má ještě viditelné zabarvení ve srovnání s kontrolou. Jako kontrola se využívá promývací pufr (Káš *et al.* 2006; Otčenášek *et al.* 1990). Celková hladina IgE se také stanovuje nepřímou ELISA metodou a jako druhá protilátka se využívá protilátka proti lidskému IgE konjugovaná s alkalickou fosfatázou (Khosravi *et al.* 2012).

Výhodou ELISA je, že je to velice citlivá a specifická metoda, která se dá použít pro stanovení analytů v množství  $10^{-12}$ -  $10^{-9}$  g. Kromě dobré citlivosti a specificity, tato metoda umožňuje poměrně snadné stanovení velkého množství vzorků, což může být i její nevýhodou. V případě stanovení malého množství vzorků, musí být vždy spolu s měřením vzorků provedeno i měření kalibrační (Káš *et al.* 2006).

### **8.5.5 Kožní testy**

Kožní testy umožňují sledovat přecitlivělost *in vivo*. Mezi tyto testy patří Prickův test, skarifikace, intrakutánní a epikutánní testy.

Intrakutánní testy jsou nejčastější, antigen je při nich aplikován přímo do kůže a je zředěn v poměru 1: 1 000. Po aplikaci se hodnotí dva typy reakcí a to reakce časná a pozdní. Za 20-30 minut se hodnotí reakce časná, většinou se při ní objevuje pupen či erytém a po 24- 48 hodinách se hodnotí reakce pozdní, jako jsou indurace a otoky. Kromě klasické lokální reakce v místě aplikace antigenu, může dojít k reakci celkové.



Pro diagnostiku se využívají kožní testy s trichofytem. Pozitivní reakce vzniká při infekci nebo po prodělané infekci (Otčenášek *et al.* 1990).

Prickův test je metoda, při které se propíchnou kůže v oblasti předloktí jehlou a zavede se zředěný antigen. Kromě antigenu se musí také tento test provést s histaminem, jako pozitivní kontrola a s glycerinem, jako kontrola negativní. Po patnácti minutách se vyhodnocují průměry podlitin v místech vpichu. V případě, že je střední průměr podlitiny v místě vpichu větší než 3 mm, hodnotí se to jako reakce pozitivní (Khosravi *et al.* 2012).

Tyto metody slouží spíše jen pro potvrzení přítomnosti onemocnění (Otčenášek *et al.* 1990).

### **8.5.6 Test transformace lymfocytů**

Tento test se provádí u lymfocytů a využívá se zde jejich schopnosti podléhat různým transformacím vlivem přítomnosti specifického antigenu. Transformace můžeme sledovat a hodnotit pomocí mikroskopie, a to tak že sledujeme změny v morfologii. Počet lymfocytů transformovaných a počet lymfocytů netransformovaných se hodnotí na 200 buněk. Výsledek se uvádí jako počet transformovaných lymfocytů v procentech. Lymfocyty, které podlely transformaci, se liší od ostatních v barvě a velikosti, jsou světlejší a větší. Kromě mikroskopického hodnocení se provádí také, měření zabudování <sup>3</sup>H thymidinu do DNA. Tato metoda je složitější a hodnotí poměr mezi buňkami stimulovanými a nestimulovanými za 1 minutu (Otčenášek *et al.* 1990).

### **8.5.7 Migračně inhibiční test**

Tento test slouží ke sledování migrace či její inhibice u leukocytů. Může být proveden v kapilárách, nebo na agaru. V kapilárním provedení se do kapilár s leukocyty přidá antigen a inkubuje se při 37° C po dobu 24 hodin. Migrace leukocytů popřípadě její inhibice je poté sledována pod mikroskopem. V agarovém provedení se pohybují leukocyty v kruhových polích. Výsledkem je Migrační index (MI), který se vypočte jako poměr mezi migrujícími leukocyty v přítomnosti antigenu (MX) a bez přítomnosti antigenu (MO).

$$MI = \frac{MX}{MO}$$

Tato metoda by se měla udělat alespoň minimálně dvakrát a to v přítomnosti obou typů antigenů, jak korpuskulárních, tak i nekorpuskulárních (Otčenášek *et al.* 1990).

## 9. Onemocnění způsobená dermatofyty

Na začátku bylo řečeno, že jsou to keratofilní houby, jejichž infekce jsou omezeny pouze na oblasti kůže, vlasů a nehtů, a že se nazývají dermatofytózy nebo *tinea*. Infekce způsobené dermatofyty jsou pojmenovávány podle anatomické lokalizace. Prvním slovem z názvu je *tinea* a druhým slovem z názvu je latinský název místa na těle, kde došlo k postižení (Weitzman a Summerbell 1995).

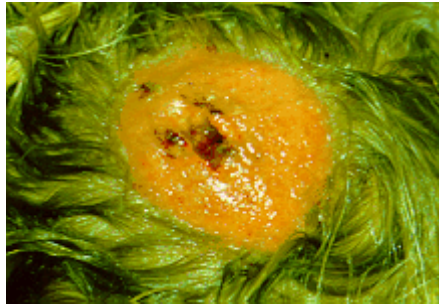
### 9.1 *Tinea capitis*

*Tinea capitis* je nejběžnější dermatofytóza postihující malé děti. Postihuje pokožku hlavy a vlasy. Přenos je podporován špatnou hygienou, přelidněním a může k němu dojít prostřednictvím kontaminovaných klobouků, kartáčů, povlaků, polštářů a jiných kontaminovaných předmětů.

Je charakterizována nepravidelnou, nebo dobře ohraničenou alopecií a šupinatěním. V případě, že jsou vlasy zduřelé, tak se lámou pár milimetrů od pokožky hlavy a vzniká "black dot" alopecie. Tato infekce může vést ke vzniku buňkami zprostředkované imunitní reakce, která se nazývá "kerion", což je sterilní, hnisavá a zánětlivá masa pokožky (Obr. 20). Krční a týlní uzliny mohou být výrazně zvětšeny (Barry a Hainer 2003). Infekce vlasu je popisována jako *ectothrix* nebo *endothrix*. *Ectothrix* je charakteristická tvorbou povlaku arthrokonidií na povrchu vlasu a *endothrix* je charakteristická, tím že arthrokonidie se tvoří uvnitř vlasů (Weitzman a Summerbell 1995).

Před rokem 1950 byla tato infekce v Severní Americe nejčastěji způsobena fluorescentními druhy *Microsporum*, proto se pro jejich diagnostiku využívala Woodova lampa. Při jejím použití svítí fluorescentní druhy *Microsporum* modrozeleně.

Dnes je však 90-95% těchto infekcí způsobeno *Trichophyton tonsurans*, který nezpůsobuje fluorescenci, a tak nemá využití Woodovy lampy pro diagnostiku téměř žádný význam. *Tinea capitis* je obecně identifikována na základě větvení hyf a spor při KOH mikroskopii (Barry a Hainer 2003).



**Obrázek 20:** Infekce “kerion“ způsobená *Microsporum canis*.

**Zdroj:** *Mycology Adelaide* [online]. The university of Adelaide c2014, citováno [28.3.2014]. Dostupné z: <http://www.mycology.adelaide.edu.au/images/derm23.gif>

## **9.2 *Tinea corporis***

*Tinea corporis* se obvykle objevuje jako jedna nebo více šupinatých lézí, které jsou mírně vyvýšené se zarudlými okraji a s ostrými marginacemi (Obr. 21). Tyto léze se nejčastěji nacházejí na obličeji, trupu a končetinách. Tento druh dermatofytózy může být způsoben kterýmkoliv dermatofytem (Barry a Hainer 2003; Vosmík a Skořepová 1995).

Diagnóza se opírá o klinické projevy a o vyšetření šupinek kůže z oblasti léze pomocí louhového preparátu (Barry a Hainer 2003).



**Obrázek 21:** *Tinea corporis* způsobená *Microsporum canis*.

**Zdroj:** *Mycology Adelaide* [online]. The university of Adelaide c2014, citováno [28.3.2014]. Dostupné z: <http://www.mycology.adelaide.edu.au/images/derm16.gif>

### **9.3 *Tinea barbae***

*Tinea barbae* je onemocnění postihující vousy a pokožku v oblasti, kde se nacházejí vousy (Obr. 22). Tato infekce se nejčastěji vyskytuje u dospělých mužů, ale také u žen trpících ochlupením. Nejčastější příčinou jsou zoofilní druhy, jako je *Trichophyton verrucosum*, *Trichophyton mentagrophytes* var. *mentagrophytes* a *Trichophyton mentagrophytes* var. *erinacei*, což vede k tomu, že jsou nejčastěji postižení zemědělci. Forma může být od mírné, povrchové až po závažnou zánětlivou folikulitidu s vředy (Barry a Hainer 2003; Weitzman a Summerbell 1995).

Diagnostika je u tohoto onemocnění poměrně usnadněna klinickým obrazem, který je většinou typický pro toto onemocnění. Zda se jedná o dermatofytózu popřípadě o jaký druh dermatofyta se jedná, se zjišťuje mykologickým vyšetřením vousů, šupin, nebo obsahu puchýřů. V případě, že je *tinea barbae* způsobena *Microsporum canis* se využívá Woodovo světlo (Vosmík a Skořepová 1995).



**Obrázek 22:** *Tinea barbae* způsobená *Trichophyton rubrum*.

**Zdroj:** *Mycology Adelaide* [online]. The university of Adelaide c2014, citováno [28.3.2014]. Dostupné z: <http://www.mycology.adelaide.edu.au/images/derm18.gif>

#### **9.4 *Tinea faciei***

Postihuje nevousatou část pokožky obličeje. Pacient si většinou stěžuje na svědění a pálení a obvykle se to zhoršuje při expozici slunečnímu záření. Většinou jsou přítomny anulární či kulovité červené skvrny. Často jsou však červené oblasti nejasné a není přítomné žádné vyvýšení léze ani šupinatění, proto je tento typ dermatofytózy někdy nazýván "*tinea incognito*". Nejčastější příčinou je *Trichophyton mentagrophytes* a *Trichophyton rubrum* (Barry a Hainer 2003; Vosmík a Skořepová 1995).

Pro stanovení diagnózy se sleduje klinický obraz a provádí se KOH mikroskopie šupin kůže získaných z oblasti léze (Barry a Hainer 2003).

#### **9.5 *Tinea cruris***

*Tinea cruris* často také nazývaná jako "jock itch" je dermatofytová infekce v oblasti třísel. Kromě třísel postihuje také přilehlé oblasti stehen a může se rozšířit na hýždě a břicho (Obr. 23). Je to dermatofytóza, která se častěji vyskytuje u mužů a je spojována s *tinea pedis*. Nastává tehdy, když je okolní teplota a vlhkost vysoká. Pacienti si u tohoto onemocnění většinou stěžují na pálení a svědění. Léze jsou červené až červenohnědé, pokryté suchými šupinkami a jsou většinou bilaterální a často asymetrické. Přítomna je také ostrá hranice mezi přechodem zdravé a postižené

pokožky, která bývá často poseta malými puchýřky. Nejčastějšími původci jsou *Trichophyton rubrum* a *Epidermophyton floccosum* (Barry a Hainer 2003; Weitzman a Summerbell 1995).

Při diagnostice hraje důležitou roli mikroskopické vyšetření louhového preparátu a kulturační vyšetření (Vosmík a Skořepová 1995).



**Obrázek 23:** *Tinea cruris* způsobená *Trichophyton rubrum* rozšířená na hýždě.

**Zdroj:** *Mycology Adelaide* [online]. The university of Adelaide c2014, citováno [28.3.2014]. Dostupné z: <http://www.mycology.adelaide.edu.au/images/derm10.gif>

## 9.6 *Tinea manuum*

*Tinea manuum* je plísňová infekce, která postihuje většinou jednu, nebo občas obě ruce. Často se vyskytuje u pacientů trpících *tinea pedis*. Oblast dlaně bývá suchá a hyperkeratonická. Nejčastějším původcem je *Trichophyton rubrum* (Barry a Hainer 2003; Weitzman a Summerbell 1995).

Diferenciální diagnóza zahrnuje kontaktní dermatitidu, lupénku a tvorbu mozolů. Vlastní diagnostika je pomocí louhového preparátu připraveného ze šupin nebo krytů puchýřků. Kromě mikroskopického vyšetření je nutné provést ještě kultivaci (Barry a Hainer 2003; Vosmík a Skořepová 1995).

## 9.7 *Tinea pedis*

*Tinea pedis* neboli atletická noha má tři formy a to interdigitální, hyperkeratotická a vezikulo-bulózní. Interdigitální forma je nejčastější a vyznačuje se

prasklinami, macerací, šupinatěním v prostorech mezi prsty, většinou je to u čtvrtého a pátého prstu (Obr. 24). Pacienti s touto formou si stěžují na svědění, nebo pálení. Druhá forma je nejčastěji způsobena *Trichophyton rubrum* a kůže na chodidlech je chronicky šupinatá a zesílená s hyperkeratózou. Chodidla, paty a kotníky jsou zarudlé. Vezikulo-bulózní forma je charakterizována přítomností puchýřků, váčků a obvykle je na chodidlech (Barry a Hainer 2003).

Vzhledem k tomu, že je klinický obraz u každé formy jiný, je obtížné podle příznaků určit původce. Při diagnóze hraje důležitou mikroskopickou a kulturační vyšetření odebraného materiálu (Vosmík a Skořepová 1995).



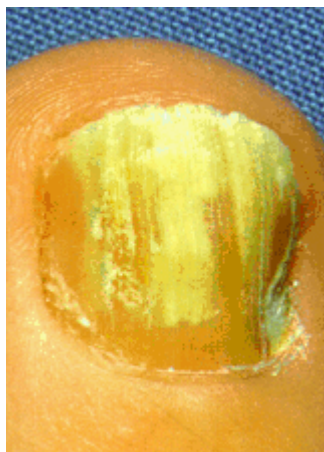
**Obrázek 24:** Inrerdigitální forma *tinea pedis* způsobená *Trichophyton rubrum*.

**Zdroj:** *Mycology Adelaide* [online]. The university of Adelaide c2014, citováno [28.3.2014]. Dostupné z: <http://www.mycology.adelaide.edu.au/images/derm2.gif>

## 9.8 *Tinea unguium*

*Tinea unguium* je dermatofytová infekce nehtů (Obr. 25), řadí se mezi onychomykózy. Mezi rizikové faktory pro toto onemocnění řadíme stáří, diabetes, špatně padnoucí boty a *tinea pedis*. Rozlišujeme dva hlavní typy. První je invazivní subungiální (distální a proximální) a druhým typem je povrchová bílá infekce (*leuconychia trichophytica*). Nejčastějšími původci jsou *Trichophyton rubrum* a *Trichophyton mentagrophytes* (Barry a Hainer 2003; Weitzman a Summerbell 1995).

Pro diagnózu *tinea unguium* se využívá hlavně kulturační vyšetření (Vosmík a Skořepová 1995).



**Obrázek 25:** *Tinea unguium* způsobená *Trichophyton rubrum*.

**Zdroj:** *Mycology Adelaide* [online]. The university of Adelaide c2014, citováno [28.3.2014]. Dostupné z: <http://www.mycology.adelaide.edu.au/images/derm11.gif>

## 10. Léčba dermatofytóz

V současné době dochází k velkému nárůstu mykotických infekcí kůže, vlasů a nehtů. Vzhledem k poměrně vysoké incidenci se zvyšuje i zájem o léčbu těchto onemocnění, proto je snaha neustále vytvářet nová, specifická a účinná antimykotika, jak pro léčbu místní, tak pro léčbu celkovou (Vosmík a Skořepová 1995). Lokální terapie se využívá v případě akutních onemocnění. Při této léčbě se aplikují antimykotické přípravky, jako jsou masti, pasty, krémy, pudry a spreje na místo postižení. Je důležité, aby byly přípravky aplikovány pravidelně, většinou 2x denně a pro správné залечení je vhodné používat lokální přípravky ještě dva týdny po vymizení příznaků. Léčba celková se volí tehdy, když je dermatomykóza rozsáhlá, chronická, jde o onychomykózu nebo v případě, že nebyla úspěšná lokální léčba (Kuklová 2002) Rozlišují se hlavní tři skupiny antimykotik. Jsou to polyenová, azolová a alylaminová antimykotika. Mezi polyenová antimykotika se řadí amfotericin B, nystatin a natamycin. Azolová antimykotika se dělí na imidazolová (klotrimazol, mikonazol, ekonazol a ketokonazol, který je jako jediný z nich určen pro perorální léčbu) a triazolová (flukonazol, itrakonazol a terkonazol). K alylaminovým antimykotikům patří naftifin a terbinafin. Existují také antimykotika, která se neřadí ani do jedné z těchto skupin, je to například griseofulvin (Vosmík a Skořepová 1995).



Lokální léčba u *tinea capitis* není příliš účinná, proto se využívají spíše systémová antimykotika. Nejčastějším používaným antimykotikem je terbinafin v dávce 250 mg, který se podává perorálně po dobu 4 týdnů. Lokální antimykotika se používají především za účelem zabránění dalšímu šíření infekce (Barry a Hainer 2003; Grohová a Hercogová 2010).

Pro léčbu *tinea corporis* se obvykle využívá lokálních imidazolových a alylaminových antimykotik (Vosmík a Skořepová 1995). Opět je důležité, aby pacient s léčbou pokračoval i dva týdny po vymizení klinických příznaků. V případě rozsáhlejších infekcí či hlubších infekcí se volí léčba celková. Při celkové léčbě se užívá každý den terbinafin 250 mg po dobu 2-4 týdnů, nebo itrakonazol 100 mg popřípadě 400 mg také každý den po dobu 2 týdnů, nebo v případě 400 mg po dobu 1 týdne (Grohová a Hercogová 2010).

*Tinea faciei* je léčena většinou pomocí lokálních antimykotik, která jsou aplikována po dobu 6 týdnů. V případě, že se nachází postižení v těsné blízkosti oka, se využívá celkových antimykotik (Grohová a Hercogová 2010).

*Tinea barbae* je léčena celkovými antimykotiky, jako jsou griseofulvin, terbinafin a itrakonazol (Weitzman a Summerbell 1995). Terbinafin je však lékem první volby a používá se v dávce 250 mg každý den po dobu 4 týdnů. V případě, že se jedná o infekci, kde jsou přítomny i kvasinky se užívá každý den itrakonazol v dávce 200 mg po dobu 4 týdnů (Grohová a Hercogová 2010).

*Tinea manuum* je léčena lokálními imidazolovými, nebo alylaminovými antimykotiky. V případě selhání léčby je nutná léčba celková pomocí griseofulvinu, ketokonazolu, nebo itrakonazolu (Vosmík a Skořepová 1995).

*Tinea pedis* je léčena lokálními antimykotiky imidazolového typu, cyklopyroxolaminy nebo alylaminy. V případě selhání lokální léčby se používá terbinafin 250 mg každý den po dobu 4 týdnů (Grohová a Hercogová 2010).

*Tinea unguium* je nejodolnější dermatofytóza (Weitzman a Summerbell 1995). Může být léčena lokálními či systémovými antimykotiky, nebo jejich kombinací. Lokální léčby se využívá v případě, že postižení nehtu není větší než 25% a v případě, že se nejedná o palec. Nejlepším lokálním antimykotikem v ČR je nehtový lak, který obsahuje

5% amorolfín. Systémová léčba se využívá v případě, že jsou postiženy palce na nohou, či 4 a více nehtů, nebo více jak 25% nehtové ploténky, nebo v případě neúspěchu lokální léčby. Pro tuto léčbu je využíván terbinafin 250 mg každý den po dobu 3-4 měsíců nebo itrakonazol 400mg, který se podává v pulzním režimu dvakrát denně jeden týden. Po týdnu následuje 3 týdny přestávka, po které následuje další týden léčby, takto se to opakuje 3-4x (Litvik 2009).

Pro léčbu *tinea cruris* se využívá lokálních antimykotik ve formě pudrů či gelů, je to z důvodu velice dobré resorbce v oblasti třísel (Grohová a Hercogová 2010).

Kromě klasické léčky antimykotiky je v současné době v České republice dostupná léčba s *Pythium oligandrum*. Je to mikroorganismus, který řadíme do říše Chromista - Stramenopila. Tento organismus se nachází na rozhraní mezi houbami a řasami. Jeho antimykotické účinky spočívají v tom, že vnikne pomocí svých vláken do hostitele, což je v tomto případě plíseň nebo kvasinka, které se poté stávají zdrojem živin. Poté, co vyčerpá živiny, opouští místo svého působení a toto místo může opět osídlit přirozená mikroflóra (Pythium 2009 [online]).

## 11. Diskuse

Kultivace a příprava louhového preparátu patří mezi nejčastěji využívané metody v diagnostice dermatofytóz. Louhový preparát většinou slouží pouze pro potvrzení, zda se jedná o dermatofytózu. Samotná kultivace slouží poté pro určení konečné diagnózy. Má však jednu velkou nevýhodu a tou je, že trvá poměrně dlouhou dobu. Pro dermatofyty je nutná kultivace po dobu tří týdnů (Vosmík a Skořepová 1995). Proto je v poslední době snaha vyvinout techniky, které umožní rychlejší určení patogena, který onemocnění způsobil. Včasné určení diagnózy hraje velice důležitou roli pro zahájení antimykotické léčby.

Kromě dlouhého času potřebného pro kultivaci, je další nevýhodou kultivace to, že některé kolonie mohou vykazovat atypické znaky, nebo mohou typické znaky postrádat (Otčenášek *et al.* 1990). Proto se k identifikaci těchto dermatofytů využívá biochemických testů, jako jsou kultivace na speciálních půdách, ureázová či lipázová aktivita, schopnost perforace lidského vlasu *in vitro*, tvorba pigmentu na bramborovém agaru či růst na rýžovém agaru (Mycology Adelaide 2014 [online]). Tyto biochemické testy velice dobře napomáhají určení druhu dermatofyta, je však nutná další kultivace či inkubace, což vede k prodloužení času potřebného pro diagnostiku a tím i k dalšímu prodloužení zahájení léčby.

V současné době dochází k velkému rozvoji molekulárních metod, proto je jim část této práce věnována. Mezi tyto diagnostické metody patří například PCR, její modifikace a MALDI-TOF MS. MALDI-TOF MS je metoda, která je využívána pro diagnostiku dermatofytóz poměrně nově a výrazně snižuje čas potřebný pro určení původce onemocnění. Výhodou těchto metod není jen to, že výrazně snižují čas potřebný pro diagnostiku, ale jsou také velice přesné, citlivé a specifické (Kamiya *et al.* 2004). Nyní však tyto metody nejsou rozšířené v každé laboratoři a disponují jimi pouze velké či specializované laboratoře.

Kromě toho, že dochází k velkému rozmachu molekulárních metod, dochází naopak k úpadku metod imunologických. Jsou to metody, které většinou slouží pouze pro potvrzení humorální či buněčné imunity, popřípadě samotného agens. Mohou však také poskytovat užitečné informace o fylogenetických a příbuzenských vztazích.

Důležitou roli mají také při samotné léčbě a prevenci, jako je očkování. Imunologické metody jsou velice rozmanité, existuje jich celá řada, všechny jsou však založené na jednoduchém principu, který spočívá v reakci antigenu s protilátkou. Je tedy patrné, že těmito metodami dokazujeme protilátky, jejichž tvorbu vyvolal příslušný antigen, což je v našem případě dermatofyt, nebo dokazujeme samotného původce onemocnění (Otčenášek *et al.* 1990).

Vzhledem k velké řadě výhod, které poskytují molekulární metody, je možné, že se do budoucna stanou standardními metodami, které se budou provádět při podezření na dermatofytózu, a že jimi bude disponovat klasická mykologická laboratoř. Hlavně díky své rychlosti a přesnosti umožní včasné zahájení antimykotické léčby poměrně špatně léčitelných dermatofytóz.

## 12. Závěr

Tato bakalářská práce vytváří přehled laboratorních metod, které se využívají pro diagnostiku dermatofytóz především v klasických mykologických laboratořích. Kromě principů jsou zde popsány i výhody a nevýhody jednotlivých metod.

Nejčastějšími technikami, které se využívají pro diagnostiku dermatofytóz, jsou světelná mikroskopie a kultivace. Světelná mikroskopie slouží pouze pro potvrzení, zda se jedná o dermatofytózu či ne. Kultivace je poté důležitá pro určení konečné diagnózy. Slouží pro sledování makromorfologických i mikromorfologických vlastností. Ne vždy však dává spolehlivé výsledky. Některé dermatofyty mohou vykazovat atypické znaky, nebo mohou typické znaky postrádat. V tomto případě se využívá biochemických či růstových testů jako je růst na rýžovém agaru a podobně. Těmito technikami disponuje každá mykologická laboratoř a jsou to základní vyšetření, která se provádí při podezření na dermatofytózu. Kultivace má však jednu velkou nevýhodu a tou je třítydenní inkubace.

Pro rychlejší určení druhu dermatofyta se využívá molekulárních technik jako je MALDI-TOF MS. Pomocí MALDI-TOF MS můžeme dermatofyty identifikovat do 1 týdne někdy i dříve. Mají ještě celou řadu dalších výhod, díky kterým dochází v poslední době k neustálému zvyšování počtu laboratoří, které jimi disponují.

Ostatní metody popsané v práci, nejsou v praxi tolik rozšířené. Fluorescenční a elektronové mikroskopy mají sice lepší rozlišení oproti světelnému mikroskopu, ale díky finanční náročnosti nejsou součástí každé mykologické laboratoře. Imunologické metody neslouží většinou pro přímý průkaz agens, proto jsou opomíjeny a využívány zřídka. Metody PCR a její modifikace jsou používány spíše ve speciálních laboratořích (molekulární biologie).

## 13. Seznam obrázků

<b>Obrázek 1:</b> Makroskopický vzhled <i>Epidermophyton floccosum</i> s pleomorfními chomáčky podhoubí .....	17
<b>Obrázek 2:</b> Mikroskopický vzhled <i>Epidermophyton floccosum</i> s typickými tenkostěnnými makrokonidiiemi. ....	17
<b>Obrázek 3:</b> Kultura <i>Microsporum audouinii</i> na Sabouraudově agaru. ....	19
<b>Obrázek 4:</b> Interkalární chlamydospory typické pro <i>Microsporum audouinii</i> . ....	19
<b>Obrázek 5:</b> Kolonie <i>Microsporum canis</i> . ....	20
<b>Obrázek 6:</b> Typické větvenité makrokonidie <i>Microsporum canis</i> . ....	20
<b>Obrázek 7:</b> Makroskopický vzhled zrnitého <i>Trichophyton rubrum</i> .....	22
<b>Obrázek 8:</b> Mikrokonidie a makrokonidie typické pro zrnitý typ <i>Trichophyton rubrum</i> . ....	22
<b>Obrázek 9:</b> Kolonie <i>Trichophyton rubrum</i> prachový typ.....	23
<b>Obrázek 10:</b> Typický spodní pigment <i>Trichophyton rubrum</i> prachový typ.....	23
<b>Obrázek 11:</b> Kyjovité mikrokonidie <i>Trichophyton rubrum</i> typ prachový.....	24
<b>Obrázek 12:</b> Kolonie <i>Trichophyton tonsurans</i> na Sabouraudově glukózovém agaru. ....	25
<b>Obrázek 13:</b> Sulfureum form <i>Trichophyton tonsurans</i> . ....	25
<b>Obrázek 14:</b> Mikrokonidie a makrokonidie typické pro <i>Trichophyton tonsurans</i> . ....	25
<b>Obrázek 15:</b> Sabouraudův glukózový agar ve zkumavkovém provedení. ....	35
<b>Obrázek 16:</b> Sabouraudův glukózový agar v Petriho misce. ....	36
<b>Obrázek 17:</b> Růst <i>Microsporum canis</i> na rýžovém agaru. ....	36
<b>Obrázek 18:</b> Růst <i>Microsporum audouinii</i> na rýžovém agaru.....	37
<b>Obrázek 19:</b> Jednoduchá radiální imunodifúze. ....	45
<b>Obrázek 20:</b> Infekce "kerion" způsobená <i>Microsporum canis</i> .....	51
<b>Obrázek 21:</b> <i>Tinea corporis</i> způsobená <i>Microsporum canis</i> . ....	52
<b>Obrázek 22:</b> <i>Tinea barbae</i> způsobená <i>Trichophyton rubrum</i> . ....	53
<b>Obrázek 23:</b> <i>Tinea cruris</i> způsobená <i>Trichophyton rubrum</i> rozšířená na hýždě.....	54
<b>Obrázek 24:</b> Inerdigitální forma <i>tinea pedis</i> způsobená <i>Trichophyton rubrum</i> . ....	55
<b>Obrázek 25:</b> <i>Tinea unguium</i> způsobená <i>Trichophyton rubrum</i> . ....	56

## 14. Použitá literatura

### Odborná literatura

1. AHMAD, Iqbal a KHAN, Mohd Sajjad Ahmad. Microscopy: in mycological research with especial reference to ultrastructures and biofilm studies. In: MENDEZ-VILAS, Editor A. *Current microscopy contributions to advances in science and technology*. Badajoz: Formatex Research Center, 2012, s. 646-659. ISBN 978-849-3984-359.
2. BARTŮŇKOVÁ, Jiřina a PAULÍK Milan. *Vyšetřovací metody v imunologii*. 2., přeprac. a dopl. vyd. Praha:Grada, 2011, 168 s., [4] s. obr. příl. ISBN 978-80-247-3533-7.
3. BEDNÁŘ, M., FRAŇKOVÁ, V., SCHINDLER, J., SOUČEK, A., a VÁVRA, J. *Lékařská mikrobiologie: bakteriologie, virologie, parazitologie*. 1. vyd. Praha: Marvil, 1996, 558 s.
4. ČMOKOVÁ, Adéla. *Molekulární metody v epidemiologii a taxonomii dermatofyt*. Praha, 2013. 40s. Bakalářská práce na Přírodovědecké fakultě Univerzity Karlovy.
5. FRANC, Břetislav a HEJZLAR, Miroslav. *Základy lékařské mikrobiologie: základy lékařské mykologie a laboratorní diagnostika původců mykotických onemocnění*. 1. vyd. Praha: Státní pedagogické nakladatelství, 1984, 62 s.
6. HŮBSCHMANN, Karel a FRAGNER Petr. *Dermatofyta a kožní choroby jimi vyvolané: mykologická a klinická studie*. 1. vyd. Praha: ČSAV, 1962, 195s.
7. KÁŠ, Jan, KODÍČEK Milan a VALENTOVÁ Olga. *Laboratorní techniky biochemie*. 1. vyd. Praha: VŠCHT, 2005. ISBN 80-708-0586-2.
8. OTČENÁŠEK, M., HEJTMÁNEK, M., MANYCH, J., a TOMŠÍKOVÁ, A. *Vyšetřovací metody při mykotických onemocněních*. 1. vyd. Praha: Avicenum, 1990, 152 s. ISBN 80-201-0059-8.
9. VOSMÍK, František a SKOŘEPOVÁ Magdalena. *Dermatomykózy: diagnostika a terapie dermatologických mykotických infekcí*. 1. vyd. Praha: Galén, c1995. 140 s. ISBN 80-85824-23-x.

## Odborné články

1. ALSHAVA, T., BERETTI, J., L. LACROIX, C., FEUILHADE, M., DAUPHIN, B., QUESNE, G., HASSOUNI, N., NASSIF, X., a BOUGNOUX, M., E. Successful Identification of Clinical Dermatophyte and Neoscytalidium Species by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry. *Journal of Clinical Microbiology* [online]. July 2012, Vol. 50, No. 7, s. 2277-2281. [citováno 10.3.2014]. ISSN 1098-660x. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3405581/>
2. BAGYLAKSHMI, R., SENTHIVELAN, B., THERESE, K., L., MURUGUSUNDRAM, S., a MADHAVAN, H., N. Application of polymerase chain reaction (PCR) and PCR based restriction fragment length polymorphysim for detection and identication of dermatophytes from dermatological speciemens. *Indian Journal of Dermatology* [online]. 2008, Vol. 53, iss. 1, s. 15-20. [citováno 10.3.2014]. ISSN 1998-3611. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2784578/>
3. BARRY, L., a HAINER, M., D. Dermatophyte infection. *American Family Physician* [online]. January 2003, Vol. 67, iss. 1, s. 101-109. [citováno 25.3.2014]. ISSN: 1532-0650. Dostupné z: <http://www.aafp.org/afp/2003/0101/p101.html>
4. BOCK, M., MAIWALD, M., KAPPE, R., NICKEL, P., A NÄHER, H. Polymerase chain reaction-based detection of dermatophyte DNA with a fungus- specific primer system. *Mycoses* [online]. March 1994, Vol. 37, iss. 3-4, s. 79-84. [citováno 12.3.2014]. ISSN 1439-0507. Pouze abstrakt databáze Wiley Online Library. Dostupné z: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1439-0507.1994.tb00781.x/abstract>
5. BRASH, J. Dermatophytenspezies. *Der Hautarzt* [online]. 2008, Vol. 59, iss. 12, s. 971-979. [citováno 23.2.2014]. ISSN 1432-1173. Pouze abstrakt databáze Pubmed. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=dermatophyten+spezies>
6. BRODELL, R., HELMS, S., E., a SNELSON, M., E. Office dermatologic testing: the KOH preparating. *American Family Physician* [online]. June 1991, Vol. 43, iss. 6, s.



2061-2065. [citováno 18.2.2014]. ISSN 1532-0650. Pouze abstrakt databáze Pubmed. Dostupné z:

[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Snelson%20ME%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor\\_uid=1828323](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Snelson%20ME%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=1828323)

7. CASSAGNE, C., RANQUE, S., NORMAND, A., C., FOURQUET, P., PLANARD, CH., HENDRICKX, M., a PIARROUX, R. Mould Routine Identification in the Clinical Laboratory by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-Of-Flight Mass Spectrometry. *Public Library of Science* [online]. December 2011, Vol. 6, iss. 12, s. neuvadeny. [citováno 10.3.2014]. ISSN 1932-6203. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3237453/>
8. CROXATTO, A., PRODHOM, G., a GREUB, G. Applications of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical diagnostic mikrobiology. *Microbiology Reviews* [online]. 2011, Vol. 36, iss. 2, s. 380-407. [citováno 10.3.2014]. ISSN 1098-6618. Dostupné z: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1574-6976.2011.00298.x/full>
9. DUBACH, M., LACROIX, C., FEUILHADE, M., DE CHAUVIN, LE GALL, I., GJUDICELLI, C., LORENZO, F., a DEROUIN F. Rapid Discrimination among Dermatophytes, *Scytalidium* spp., and Other Fungi with a PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism Ribotyping Method. *Journal of Clinical Microbiology* [online]. February 2001, Vol. 39, No. 2, s 685-690. [citováno 12.3.2014]. ISSN 1098-660x. Dostupné z: <http://jcm.asm.org/content/39/2/685.full>
10. ERLICH, H., D. Polymerase chain reaction. *Journal of Clinical Microbiology* [online]. January 1989, Vol. 9, No. 6, s. 437-448. [citováno 12.3.2014]. ISSN 1098-660x. Dostupné z: <http://link.springer.com/article/10.1007/BF00918012>
11. FAGGI, E., PINI, G., CAMPISI, E., BERTELLINI, CH., DIFONZO, E., a MANCIANTI, F. Application of PCR to Distinguish Common Species of Dermatophytes, *Journal of Clinical Microbiology* [online]. September 2001, Vol. 39, No. 9, s. 3382-3385. [citováno 12.3.2014]. ISSN 1098-660x. Dostupné z: <http://jcm.asm.org/content/39/9/3382.long>

12. FAGGI, E., PINI, G., a CAMPISI, E. PCR fingerprinting for Identification of Common species of Dermatophytes. *Journal of Clinical Microbiology* [online]. December 2002, Vol. 40, No. 12, s. 4804-4805. [citováno 13.3.2014]. ISSN 1098-660x. Dostupné z: <http://jcm.asm.org/content/40/12/4804.long>
13. GARG, J., TILAK, R., SINGH, S., GULATI, A., K., GARG, A., PRAKASH, P., a NATH, G. Evaluation of Pan- Dermatophyte Nested PRC in Diagnosis of Onychomycosis. *Journal of Clinical Microbiology* [online]. October 2007, Vol. 45, No. 10, s. 3443-3445. [citováno 13.3.2014]. ISSN 1098-660x. Dostupné z: <http://jcm.asm.org/content/45/10/3443.long>
14. GROHOVÁ, H a HERCOGOVÁ, J. Dermatomykózy. *Postgraduální medicína*. [online]. 7.4 2010, příloha 4/2010 [citováno 26.3.2014]. ISSN 1214-7664. Dostupné z: <http://zdravi.e15.cz/clanek/postgradualni-medicina/dermatomykozy-450833>
15. GUARRO, J., GENÉ, J., a STCHIGEL, A., M. Developments in fungal taxonomy. *Clinical Microbiology Reviews* [online]. July 1999, Vol. 12, No. 3, s. 454-500. [citováno 10.2.2014]. ISSN 1098-6618. Dostupné z: <http://cmr.asm.org/content/12/3/454.long>
16. HAACK, D., ZELLER, R., a BÖHM, K., H. Fluorescence microscopy detection of dermatophytes with Blankophor. *Tierärztliche Praxis* [online]. 1987, Vol. 15, No. 4, s. 385-391. [citováno 18.2.2014]. ISSN 1434-1220. Pouze abstrakt databáze Pubmed. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3441917>
17. KAMINSKYJ, S., G., W., a DAHMS, T., E., S. High spatial resolution surface imaging and analysis of fungal cells using SEM and AFM. *Micron* [online]. June 2008, Vol. 39, iss. 4, s. 349-361. [citováno 20.2.2014]. ISSN 0968-4328. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S096843280700176X>
18. KAMIYA, A., KIKUCHI, A., TOMITA, Y., a KANBE, T. PCR and PCR-RFLP techniques targeting the DNA topoisomerase II gene for rapid clinical diagnosis of the etiologic agent of dermatophytosis. *Journal of Dermatological Science* [online]. February 2004, Vol. 34, iss. 1, s. 35-48. [citováno 22.3.2014]. ISSN 0923-1811.

Pouze abstrakt databáze Journal of Dermatological Science. Dostupné z:  
[http://www.jdsjournal.com/article/S0923-1811\(03\)00245-7/abstract](http://www.jdsjournal.com/article/S0923-1811(03)00245-7/abstract)

19. KHOSRAVI, A., R., SHOKRI, A., a MANSOURI, P. Immediate hypersensitivity and serum IgE antibody responses in patients with dermatophytosis. *Asian Pacific Journal of Allergy and Immunology* [online]. March 2012, Vol. 30, iss. 1, s. 40-47. [citováno 9.3.2014]. ISSN 0125-877x. Dostupné z:  
<http://apjai.digitaljournals.org/index.php/apjai/article/viewFile/514/793>
20. KIM, J., Y., CHOE, Y., B., AHN, K., J., a LEE, Y., W. Identification of Dermatophytes Using Multiplex Polymerase Chain Reaction. *Annals of Dermatology* [online]. August 2011, Vol. 23, No. 3, s. 304-312. [citováno 15.3.2014]. ISSN 2005-3894. Dostupné z:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3162259/#!po=82.1429>
21. KUKLOVÁ, I. Dermatomykózy epidemiologie, klinický obraz a léčba. *Zdravotnictví a medicína* [online]. 10.10.2002, příloha 41/2002 [citováno 26.3.2014]. ISSN 2336-2987. Dostupné z: <http://zdravi.e15.cz/clanek/priloha-lekarske-listy/dermatomykozy-epidemiologie-klinicky-obraz-a-lecba-148777>
22. LITVIK, R. Lokální a systémová léčba onychomykóz- doporučení pro praxi. *Remedia* [online]. 19.1. 2009, ročník 1/2009, s. 9-13. [citováno 26.3.2014]. ISSN 0862-8947. Dostupné z: <http://www.remédia.cz/Okruhy-temat/Dermatovenerologie/Lokalni-a-systemova-lecba-onychomykoz-doporuceni-pro-praxi/8-U-xj.magarticle.aspx>
23. LIU, D., COLOE, S., BAIRD, R., a PEDERSEN, J. Application of PCR to the identification of dermatophyte fungi. *Journal of Clinical Microbiology* [online]. 2000, Vol. 49, No. 6, s. 493-497. [citováno 15.3.2014]. ISSN 1098-660x. Dostupné z: <http://jmm.sgmjournals.org/content/49/6/493.long>
24. L'OLLIVIER, C., CASSAGNE, C., NORMAND, A., C., BOCHARA, J., P., CONTET-AUDONNEAU, N., HENDROCKX, M., FOURQUET, P., COULIBALY, O., PIARROUX, R., a RANQUE, S. A MALDI-TOF MS procedure for clinical dermatophyte species identification in the routine laboratory. *Medical Mycology* [online]. October 2013, Vol. 51, No. 7, s. 713-720. [citováno 10.3.2014]. ISSN 1460-2709. Pouze

abstrakt                  databáze                  Pubmed.                  Dostupné                  z:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23611419>

25. MARCUS, R., HUIZARA, M., ANDERSON, R., R., a GONZÁLES, S. A Better Potassium Hydroxide Preparation? In Vivo Diagnosis of Tinea With Confocal Microscopy. *Archives of Dermatology* [online]. August 2001, Vol. 137, No. 8, s. 1076-1078. [citováno 19.2.2014]. ISSN 1538-3652. Dostupné z: <http://archderm.jamanetwork.com/article.aspx?articleid=478452>.
26. NAGAO, K., SUGITA, T., OUCHI, T., a NISHIKAWA, T. Identification of *Trichophyton rubrum* by nested PCR analysis from paraffin embedded specimen in trichophytia profunda acuta of the glabrous skin. *Japanese Journal of Medical Mycology* [online]. 2005, Vol. 46, s. 129-132. [citováno 22.3.2014]. ISSN 0916-4804. Dostupné z: [https://www.istage.ist.go.jp/article/jjmm1990/46/2/46\\_2\\_129\\_pdf](https://www.istage.ist.go.jp/article/jjmm1990/46/2/46_2_129_pdf)
27. RÚCHEL, R., a SCHAFFRINSKI, M. Versatile Fluorescent Staining of Fungi in Clinical Specimens by Using the Optical Brightener Blankophor. *Journal of Clinical Microbiology* [online]. August 1999, Vol. 37, No. 7, s. 2694-2696. [citováno 18.2.2014]. ISSN 1098-660x. Dostupné z: <http://jcm.asm.org/content/37/8/2694.long>
28. STUČHLÍK, David. Dermatomykózy. *Medicína pro praxi* [online]. 2007, Roč. 4, Č. 7-8, s. 320-324. [citováno 5.3.2014]. ISSN 1803-5310. Dostupné z: <http://www.medicinapropraxi.cz/pdfs/med/2007/07/09.pdf>
29. WEITZMAN, I., a SUMMERBELL, R., C. The dermatophytes. *Clinical Microbiology Reviews* [online]. April 1995, Vol. 8, No. 2, s. 240-259. [citováno 2.2.2014]. ISSN 1098-6618. Dostupné z: <http://cmr.asm.org/content/8/2/240.long>
30. WHITE, T., a HENN, M. Genomic Determinants of Infection Competence In Dermatophyte Fungy. *Dermatophyte White Paper* [online]. 2011 (Rok uvedený na internetové stránce), s. 1-12. [citováno 4.2.2014]. Dostupné z: [https://www.genome.gov/Pages/Research/Sequencing/SeqProposals/Dermatophyte\\_WP\\_seq.pdf](https://www.genome.gov/Pages/Research/Sequencing/SeqProposals/Dermatophyte_WP_seq.pdf)

31. YOSHIDA, E., MAKIMURA, K., MIRHENDI, H., KANEKO, T., HIRUMA, M., KASAI, T., UCHIDA, K., YAMAGUCHI, K., a TSUBOI, R. Rapid identification of *Trichophyton tonsurans* by specific PCR based on DNA sequences of nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) 1 region. *Journal of Dermatological science* [online]. June 2006, Vol. 42, iss. 3, s. 225-230. [citováno 22.3.2014]. ISSN 0923-1811. Pouze abstrakt databáze Journal of Dermatological Science. Dostupné z: [http://www.idsjournal.com/article/S0923-1811\(06\)00003-X/abstract](http://www.idsjournal.com/article/S0923-1811(06)00003-X/abstract)

### Internetové zdroje

1. Culture media supplies . *Culture media and supplies* [online]. c2011 [citováno 29.3.2014]. Dostupné z: <http://www.culturemediasupplies.com/images/media/CM150-P.JPG>
2. Mycology Adelaide. *The university of Adelaide* [online]. c2014 [citováno 5.2.2014]. Dostupné z: [http://www.mycology.adelaide.edu.au/Fungal\\_Descriptions/Dermatophytes/](http://www.mycology.adelaide.edu.au/Fungal_Descriptions/Dermatophytes/)
3. PYTHIUM. Chytrá houba- *Pythium oligandrum* [online]. c2009 [citováno 4.4.2014]. Dostupné z: <http://www.pythium.eu/cs/>