

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



DIPLOMOVÁ PRÁCE

Laboratorní diagnostika plísní rodu *Fusarium*

Bc. PETRA VITÁČKOVÁ

Vedoucí diplomové práce: RNDr. Klára Konečná, Ph.D.

Konzultant: MUDr. Vanda Chrenková

HRADEC KRÁLOVÉ, 2018

Poděkování

Především děkuji své konzultantce MUDr. Vandě Chrenkové za její pochopení, trpělivost i cenné rady. Velké díky patří i vedoucí práce, RNDr. Kláře Konečné, Ph.D., za její pečlivou kontrolu a přínosnou kritiku. V neposlední řadě děkuji své rodině za neutuchající a trpělivou podporu, kterou mi během mého 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

Petra Vitáčková

OBSAH

Obsah.....	5
ABSTRAKT	7
ABSTRACT	8
ÚVOD.....	9
ZADÁNÍ – CÍL PRÁCE	10
1 Vláknité mikromycety (plísně)	11
1.1 Základní charakteristika plísní	11
1.2 Systematika plísní.....	12
1.3 Výskyt a význam plísní	15
1.3.1 Negativní význam plísní.....	15
1.3.2 Pozitivní význam plísní	15
1.4 Onemocnění vyvolaná plísněmi	16
1.4.1 Mykózy	16
1.4.2 Mykoalergie	17
1.4.3 Mykotoxikózy	18
1.5 Morfologie plísní	20
1.6 Rozmnožování plísní.....	21
1.6.1 Nepohlavní rozmnožování	21
1.6.2 Pohlavní rozmnožování	22
2 Rod <i>Fusarium</i>	23
2.1 Úvod.....	23
2.2 Taxonomické zařazení	24
2.3 Morfologie.....	25
2.3.1 Makrokonidie	26
2.3.2 Mikrokonidie	26
2.3.3 Chlamydokonidie	27
2.3.4 Morfologie teleomorfních stádií.....	28
2.4 Patogenita a patogeneze	28

2.5	Fuzáriové mykotoxiny.....	30
2.5.1	Trichotheceny.....	30
2.5.2	Fumonisinyl.....	31
2.5.3	Zearalenon.....	31
3	Metody laboratorní diagnostiky v lékařské mykologii.....	32
3.1	Odběr a zpracování materiálu.....	32
3.2	Mikroskopické vyšetření.....	33
3.2.1	Používané techniky.....	33
3.3	Histologické vyšetření.....	35
3.4	Kultivační vyšetření.....	36
3.4.1	Hemokultivace.....	37
3.5	Stanovení citlivosti k antimykotikům.....	37
3.6	Identifikace izolovaných mikromycet.....	39
3.6.1	Makroskopická identifikace.....	39
3.6.2	Mikroskopická identifikace.....	39
3.6.3	Biochemická identifikace.....	40
3.7	Sérologické metody.....	40
3.8	Molekulárně-biologické metody.....	41
3.8.1	Hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF.....	41
3.8.2	PCR metody.....	42
4	ZÁVĚR.....	44
	POUŽITÉ ZKRATKY.....	45
	SEZNAM TABULEK.....	46
	SEZNAM OBRÁZKŮ.....	47
	POUŽITÁ LITERATURA.....	48

ABSTRAKT

Předkládaná diplomová práce se zabývá laboratorní diagnostikou vláknitých mikromycet (plísňí) rodu *Fusarium* v laboratořích lékařské mykologie. Nejprve je věnován prostor pro obecné seznámení s vláknitými mikromycetami. Následuje samostatná kapitola zaměřená na popis rodu *Fusarium*, a to především ve vztahu k humánní medicíně. Poslední část práce sumarizuje aktuální možnosti laboratorní diagnostiky vláknitých mikromycet, se zaměřením na rod *Fusarium*.

Invazivní infekce způsobené vláknitými mikroskopickými houbami jsou stále častější komplikací, zvláště u imunokompromitovaných pacientů. Postihují nejčastěji nemocné s hematologickou malignitou a pacienty po transplantaci krvetvorných buněk nebo solidních orgánů. Nejběžnějším původcem těchto infekcí je jednoznačně rod *Aspergillus*. Avšak v posledních letech jsou stále častěji popisovány případy infekcí způsobených méně častými vláknitými houbami, včetně *Fusarium* spp. Invazivní mykotické infekce jsou spojeny s velice vysokou mortalitou. Zásadním požadavkem se tak stává rychlost a přesnost diagnózy.

Základním kamenem pro laboratorní diagnostiku invazivních infekcí způsobených vláknitými mikromycetami jsou konvenční metody – mikroskopie, kultivace a histologické vyšetření. Tyto postupy jsou však časově náročné a mnohdy vykazují omezenou citlivost a/nebo specifitu. Průkaz mykotického agens přináší obvykle až v pozdějších stádiích onemocnění, a mohou tak vést k falešně negativním výsledkům. Z těchto důvodů se v mykologii stále více začínají prosazovat nové techniky (sérologické a molekulárně-biologické metody), které mohou pomoci zvýšit citlivost a rychlost diagnostiky invazivních mykotických infekcí.

Klíčová slova: plísně, rod *Fusarium*, laboratorní diagnostika

ABSTRACT

Submitted diploma thesis deals with laboratory diagnostics of filamentous micromycetes (moulds) genus *Fusarium* in the laboratories of medical mycology. In the first part of the diploma thesis is dedicated space for general familiarization with filamentous microscopic fungi. Next separate chapter describes the genus *Fusarium*, especially in relation to human medicine. The final part of the diploma thesis summarizes current possibilities of laboratory diagnostics of filamentous micromycetes, focusing on the genus *Fusarium*.

Invasive infections caused by filamentous fungi are increasingly common complication, especially in immunocompromised patients. In most cases they affect the patients with hematologic malignancy and patients after hematopoietic stem cell transplantation or solid organ transplantation. The most common etiological agent of such infections is unambiguously the *Aspergillus* genus. However, in recent years, increasingly cases of infections due to less common filamentous fungi, including *Fusarium* spp. are described. Invasive fungal infections are associated with very high mortality. The basic requirement thus becomes the speed and accuracy of diagnosis.

The most important methods for the laboratory diagnostics of invasive infections caused by filamentous fungi are conventional methods – microscopy, cultivation and histological examination. However, these procedures are time consuming and often exhibit limited sensitivity and/or specificity. It is possible to have detection causative agent only at later stages of the disease, which can lead to false negative results. For these reasons, new techniques are being promoted in mycology (serologic and molecular-biology methods), which can help to increase the sensitivity and speed of diagnostic of invasive fungal infections.

Keywords: moulds, genus *Fusarium*, laboratory diagnostics

ÚVOD

V posledních desetiletích dochází k významnému nárůstu incidence invazivních mykóz způsobených vláknitými mikromycetami. Absolutní většinu případů představuje invazivní aspergilóza. Avšak v etiologii invazivních mykóz se stále častěji uplatňují i takzvané vzácné, dříve zcela raritní vláknité mikroskopické houby, jako je například *Fusarium* spp.

ZADÁNÍ – CÍL PRÁCE

Cílem této diplomové práce bylo na základě studia literárních pramenů podat ucelený přehled o aktuálních možnostech diagnostiky infekcí vyvolaných vláknitými houbami rodu *Fusarium*, v laboratořích lékařské mykologie.

1 VLÁKNITÉ MIKROMYCETY (PLÍSNĚ)

1.1 Základní charakteristika plísní

Jako plísně (mikroskopické vláknité houby, vláknité mikromycety) označujeme vícebuněčné, vláknité, eukaryotní, pokročile heterotrofní mikroskopické organismy, vyznačující se v převážné většině saprofytickým, méně často parazitickým způsobem výživy. Plísně náležejí do samostatné říše hub (*Fungi*) a společně s kvasinkami a kvasinkovitými (yeast-like) mikroorganismy tvoří skupinu tzv. mikroskopických hub (mikromycet). [1, 2, 3]

Hojně využívaný český název pro vláknité mikromycety – „plísně“ zavedl v polovině 19. století všestranný český přírodovědec Jan Svatopluk Presl. V jeho díle „Wšeobecný rostlinopis“ z roku 1846 nalezneme i kapitolu nazvanou „Hauby“, kde se kromě jiného dočteme o celém řádu „plisňowité“ (*hyphomycetes*). Avšak nutno podotknout, že zde jméno „plíseň“ striktně vymezil jen pro zástupce rodu *Mucor*. Později se však s tímto pojmenováním nešetřilo, a v současnosti má mnohem širší význam. [2, 4, 5]

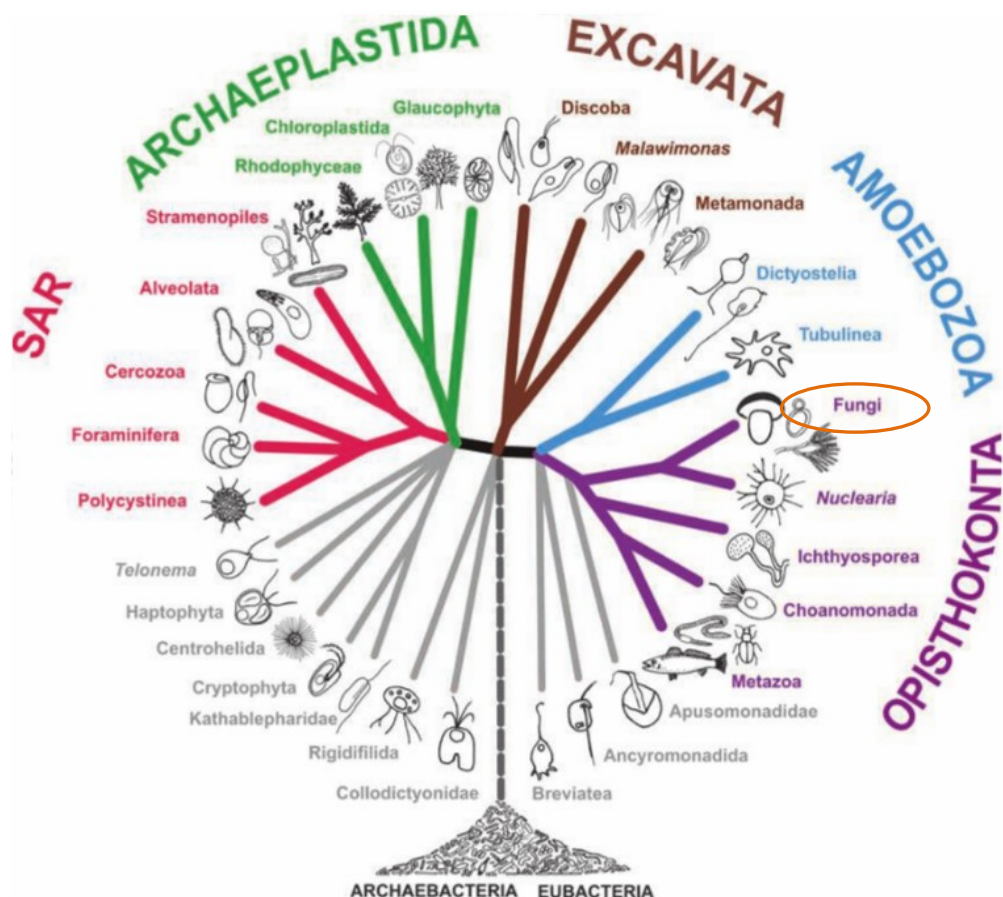


Obr. 1 Portrét Jana Svatopluka Presla [6]

Pro zajímavost lze ještě dodat, že označení „plíseň“ pro určitou skupinu hub není ryze českou záležitostí, ale má ekvivalent i v mnoha dalších jazycích, kupříkladu v němčině (der Schimmelpilze), angličtině (mould), francouzštině (moisissure) či italštině (la muffa). [3, 7, 8]

1.2 Systematika plísní

Na úvod nutno poznamenat, že říše hub představuje značně heterogenní skupinu organismů, jejichž systematické zařazení není z hlediska fylogenetického a taxonomického vůbec jednoduché. Již tvůrce přírodovědné nomenklatury Carl von Linné se pokoušel houby taxonomicky zařadit. Tehdy je ve své „Systematicce přírody“ z roku 1735, umístil po bok zástupců říše rostlin. A aby vyjádřil, jaký zmatek mu tyto organismy v jeho systému tropí, připsal ještě poznámku: „*Fungorum ordo chaos est* – řád hub je chaotický“. [2, 3]



Obr. 2 Schéma fylogeneze eukaryotních organismů s vyznačením říše hub (Fungi) [10] (upraveno)

Prokázáním samostatného fylogenetického vývoje a morfologických i biochemických odlišností, však byly nakonec houby vyloučeny z říše rostlin a dnes tvoří samostatný celek. Na základě analýzy sekvence aminokyselin řady enzymů se zjistilo, že fylogeneticky mají dokonce blíže k živočichům než ke svým bývalým sousedům – rostlinám. V současnosti jsou houby spolu s živočichy sdružovány do superskupiny Opisthokonta (**Obr. 2**). [2, 9, 10, 11]



Obr. 3 Systém říše hub podle 9. vydání "Dictionary of fungi" (Kirk et al. 2001), upravený podle učebnice "Sinice, řasy, houby, mechorošty a podobné organismy v současné biologii" (Kalina et Váňa 2005) [12] (upraveno)

Říši hub lze dle upraveného 9. vydání "Dictionary of fungi" klasifikovat do šesti oddělení (**Obr. 3**): *Microsporidiomycota*, *Chytridiomycota*, *Zygomycota*, *Glomeromycota*, *Ascomycota* a *Basidiomycota*. [12] Na základě mnoha fylogenetických studií, však klasifikace hub v posledních letech prošla značnými změnami, a i tato uvedená klasifikace je zastaralá a nepřesná. Domnívám se však, že pro účely této práce je uvedený systém dostačující.

Notné zmatky v klasifikaci hub způsobuje i skutečnost, že houby jsou schopny střídat pohlavní a nepohlavní způsob rozmnožování. Mohou se tak vyskytovat ve dvou formách – stádiích, jež bývají morfologicky značně odlišné. To vedlo k tomu, že anamorfní (asexuální) a teleomorfní (sexuální) stádia, byla dříve považována za zcela odlišné druhy hub, a proto i jinak pojmenována. [2, 9, 13]

U hub s pleomorfním životním cyklem, tedy u těch, v jejichž životním cyklu se vyskytuje jak pohlavní, tak nepohlavní stádium, bylo systematické zařazení založeno na základě znalosti jejich teleomorfy. Mohla se používat ale obě jména – anamorfy i teleomorfy (tzv. duální nomenklatura). Snahou moderní mykologie je však používat pro jeden organizmus jen jedno jméno (“one fungus – one name”). [14, 15]

Nyní však bude zaměřena pozornost pouze na plísně. Běžně se takto označují veškeré houbovité organismy, které vytvářejí mycelium (podhoubí), jež prorůstá substrát a pokrývá jej jemným vláknitým povlakem. [16]

V mykologii, však termín „plísně“ v původním užším významu zahrnoval pouze určité skupiny tzv. nižších hub, a to houby oddělení *Chytridiomycota* (př. rakovinovec bramborový či též plíseň skrytá bramborová), *Zygomycota* (př. plíseň hlavičková) a také *Oomycota* (př. plíseň bramborová), které jsou ale nyní řazeny do eukaryotické superskupiny SAR (*Stramenopila*, *Alveolata*, *Rhizaria*). Avšak postupně tento termín přerostl svůj původní úzký význam a dnes se užívá pro všechny vláknité mikroskopické houby. Název „plíseň“ nemá systematickou hodnotu. [11, 17, 18, 19]

Podle způsobu rozmnožování jsou vláknité mikromycety zařazovány buď do oddělení *Zygomycota* (houby spájivé), *Ascomycota* (houby vřeckovýtrusné), nebo do uměle vytvořeného pomocného pododdělení mitosporických hub (*Deuteromycota*, *Fungi imperfecti*), které zahrnuje pouze nepohlavně se rozmnožující houby. [1, 19]

Pro účely lékařské mykologie lze mikroskopické vláknité houby rozdělit dle jejich morfologických a klinických charakteristik na:

- zygomycety,
- hyalinní mikromycety,
- pigmentované mikromycety (skupina *Dematiaceae*)
- a dermatofyta. [13]

1.3 Výskyt a význam plísní

Vláknité mikroskopické houby jsou všudypřítomné. Náleží k prastarým obyvatelům naší planety, jejichž stáří se dle fosilních pozůstatků odhaduje na 460 milionů let. Od nepaměti představují neoddelitelnou součást životního a pracovního prostředí člověka. Spory plísní se vyskytují v půdě, vodě, ovzduší, na povrchu živých a odumřelých organismů, na předmětech a plochách, či v krmivech a potravinách. [2, 3]

Jedná se v převážné většině o saprofytické organismy, které v ekosystémech plní nezastupitelnou úlohu destruentů (dekompozitorů). Za pomoci své bohaté enzymatické výbavy rozkládají organickou hmotu a významně tak přispívají ke koloběhu látek a energie v přírodě. Díky své značné morfologické různorodosti a přizpůsobivosti k nejrozmanitějším ekologickým podmínkám, se mohou plísně vyskytovat prakticky všude tam, kde je organická hmota. Zvládají extrémní okolní podmínky. Přežívají a rostou i v prostředí relativně chudém na živiny, při nízkém pH i nízkých teplotách a snášejí i nižší vlhkost. Pouze malá část vláknitých mikroskopických hub se adaptovala k parazitismu jiných organismů, včetně člověka. [2, 3, 7, 19, 20]

1.3.1 Negativní význam plísní

Vláknité mikromycety mohou působit na člověka i jiné organismy značně nepříznivě. Napadají kulturní i divoce rostoucí rostliny, parazitují studenokrevné a teplokrevné živočichy a jsou s to zapříčinit chorobné stavy i u člověka. Lidské zdraví ovlivňují prostřednictvím jimi kontaminovaných potravin, alergizací či přímo vyvoláním mykotické infekce. Některé plísně navíc produkují toxické látky – mykotoxiny a mohou být příčinou tzv. mykotoxikóz. [7, 21]

Další nežádoucí efekt vláknitých mikroskopických hub spočívá v rozkladu a znehodnocení nejrůznějších materiálů, potravinářských surovin, potravin či krmiv uložených v nevhodných podmínkách. K neblahému výsledku se může navíc připojit toxinogenní potenciál některých plísní, a přibývá tak i riziko intoxikace. [8, 19, 21]

1.3.2 Pozitivní význam plísní

Ovšem na vláknité mikroskopické houby není nutno pohlížet, pouze jako na výhradně negativní činitele. Tyto mikroorganismy našly své využití v mnoha výrobních odvětvích lidské činnosti. Především v potravinářském průmyslu (např. při výrobě sýrů,

trvanlivých salámů, vína, kyseliny citronové či různých asijských fermentovaných potravin) a ve farmaceutickém průmyslu při výrobě antibiotik i jiných léčiv. Plísně lze také využít k čištění odpadních vod, dekontaminaci půdy či k biologické ochraně rostlin. [2, 8, 21]

1.4 Onemocnění vyvolaná plísněmi

Vláknité mikromycety jsou schopny vyvolat tři různé skupiny chorobných stavů: mykózy, mykoalergie a mykotoxikózy.

1.4.1 Mykózy

Nejvýznamnější skupinu chorob představují mykózy. Jedná se o pravá infekční onemocnění vyvolávaná převážně mikromycetami patřící mezi vřeckovýtrusné (*Ascomycota*) nebo mitosporické houby (*Deuteromycota*) a jen zcela výjimečně i mezi houby stopkovýtrusné (*Basidiomycota*).

Mykotické infekce dělíme nejčastěji podle anatomické lokalizace na povrchové (superficiální), kožní (kutánní), podkožní (subkutánní) a hluboké (systémové, orgánové, viscerální). Podle rozsahu postižení pak rozeznáváme mykózy lokalizované, kdy je postižen pouze jeden orgán nebo určitá anatomická lokalita, a systémové (diseminované, generalizované), kdy jsou zasaženy dva a více orgánů. [2, 22]

Kožní mykózy patří k nejčastějším infekcím vyvolanými mikromycetami. Postihují pouze keratinizované vrstvy kůže a jejich adnexa (vlasy, chlupy a nehty). Dál do hlubších tkání nepronikají. Nejčastějšími původci jsou dermatofyty – skupina blízce příbuzných keratofilních hub, která je tvořena třemi rody: *Trichophyton*, *Microsporum* a *Epidermophyton*. Značná četnost těchto infekcí je dána tím, že dermatofyty jsou obligátně patogenní a napadají i osoby s normálně vyvinutou imunitou. [16, 22]

Systémové mykotické infekce jsou onemocnění postihující vnitřní orgány, které mohou diseminovat a přejít do septického stavu, zvláště u imunoalterovaných pacientů. Rozlišujeme endemické (primární) a oportunní (sekundární) mykózy.

Endemické mykózy jsou způsobené dimorfní houbami, které jsou primárně patogenní a mohou vyvolat infekci i u lidí s nenarušenou obranyschopností, kteří vstoupili do endemické oblasti jejich výskytu (především americký kontinent). Do této

skupiny patří zejména histoplazmóza, kokcidioidomykóza, blastomykóza a parakokcidioidomykóza.

Naproti tomu původci oportunních mykotických infekcí jsou ubikvitární a pro zdravého imunokompetentního jedince nepředstavují reálné nebezpečí. Napadají pouze pacienty se silně narušenou imunitou. Níže uvedená **Tab. 1** poukazuje na hlavní okolnosti napomáhající k jejich vzniku. Nejčastěji se s nimi setkáváme jako s nozokomiálními nákazami, které jsou obtížně diagnostikovatelné, nezřídka vyžadují empirickou antimykotickou léčbu a vyznačují se vysokou mortalitou. V našich podmínkách jsou oportunní mykózy vyvolávány zejména kandidami, aspergily, kryptokoky a zygomycetami. [2, 23, 24]

▪ imunodeficit v oblasti buněčné imunity (zejména stavy po protinádorové terapii, po transplantaci orgánu nebo kostní dřeně, infekce HIV apod.)
▪ neutropenie
▪ terapie glukokortikoidy
▪ diabetes mellitus
▪ antibiotická terapie
▪ intenzivní péče
▪ parenterální výživa
▪ závažní chronické onemocnění
▪ intravenózní toxikomanie

Tab. 1 Nejvýznamnější okolnosti, které disponují ke vzniku systémové mykózy [24]

1.4.2 Mykoalergie

Mykoalergie (mykoalergózy) jsou hypersenzitivní reakce imunitního systému hostitele na alergeny mykotického původu. Nejčastěji se jedná o alergeny přítomné na sporách. Bylo popsáno více než 80 rodů hub, které mohou vyvolávat alergické reakce. K nejvýznamnějším a nejfrekventovanějším alergenním vláknitým mikroskopickým houbám náleží mitosporické houby rodů *Cladosporium*, *Alternaria*, *Aspergillus*, *Helminthosporium*, *Epicoccum*, *Fusarium*, *Penicillium* a zygomycety rodu *Mucor* a *Rhizopus* (**Tab. 2**). Výskyt mykoalergií je vázán jak na podmínky prostředí, tak na citlivého jedince náchylného k neadekvátní reakci na přítomnost mykoalergenů.

Pro vznik alergie je rozhodující množství, původ a velikost spor. Četnost spor kolísá v závislosti na klimatických podmínkách, dostupnosti živin v substrátu a na lokalitě (venkovní nebo uzavřený prostor). Co do velikosti jsou houbové spory značně variabilní. Velikost má zásadní význam při jejich inhalaci a depozici. Přitom platí, že závažnost alergického onemocnění se zvyšuje s klesající velikostí spor.

Mykoalergie se projevují hlavně v oblasti respiračního traktu. Po inhalaci spor dochází u vnímavých osob k podráždění dýchacích cest, chrapotu, kašli, případně ke vzniku bronchitidy a dále ke zhoršování již vzniklých respiračních onemocnění. [2, 3, 23]

Druh houby	Rod houby
Mitosporické houby (<i>Deuteromycota</i>)	<i>Cladosporium, Alternaria, Aspergillus, Helminthosporium, Epicoccum, Fusarium, Penicillium</i>
<i>Zygomycota</i>	<i>Mucor, Rhizopus</i>

Tab. 2 Vlákenné mikroskopické houby podléjící se na vzniku alergické reakce [2] (upraveno)

1.4.3 Mykotoxikózy

Jako mykotoxikózy se označují chorobné stavy vyvolávané sekundárními toxickými metabolity vláknitých mikromycet – mykotoxiny. Ne všechny vláknité mikroskopické houby jsou toxinogenní. V současné době je známo více jak 350 druhů plísní, jež jsou schopny produkovat jeden nebo více mykotoxinů. Bohužel mezi ně patří řada běžných druhů, vyskytujících se v prostředí, na potravinách či krmivech. Nejvýznamnějšími producenty mykotoxinů jsou zástupci rodů *Aspergillus*, *Fusarium* a *Penicillium*. K intoxikaci dochází nejčastěji zprostředkovaně kontaminovanou potravou, vzácněji též kontaktem nebo inhalací. [2, 16, 21, 22, 23]

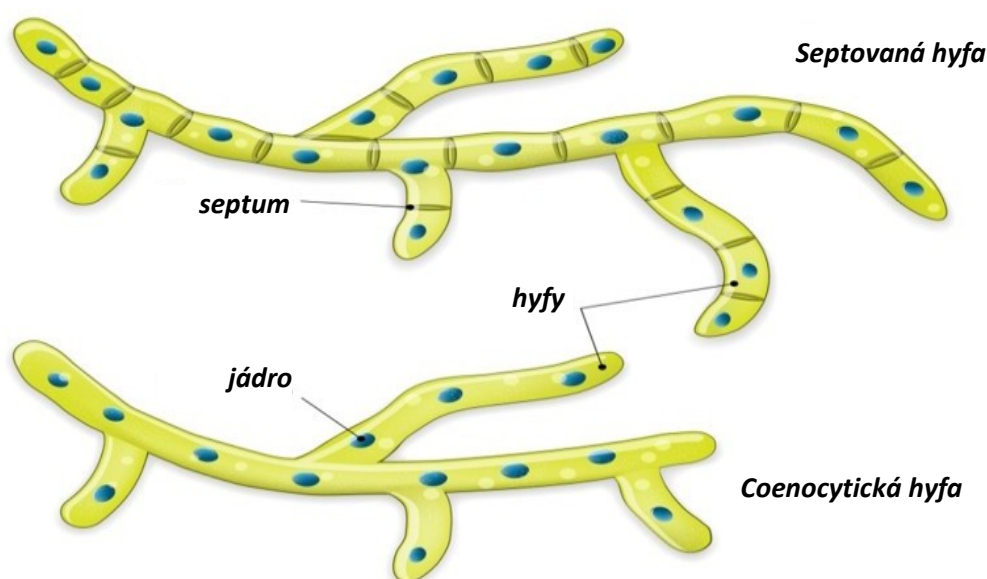
Mykotoxiny můžeme definovat jako nízkomolekulární látky nebílkovinné povahy, toxické vůči člověku a (nebo) hospodářským zvířatům, k jejichž dietární či profesionální expozici dochází nezávisle na vůli a zájmům člověka. Celkový počet mykotoxinů není přesně znám. Odhaduje se asi 500 látek patřících do této skupiny, z nichž přibližně 50 je dáváno do příčinné souvislosti s mykotoxikózami u lidí a zvířat. Klasifikovat lze mykotoxiny podle celé řady kritérií – dle chemické struktury, toxicity (kvantitativní a kvalitativní) či dle způsobu jejich biosyntézy. Mykotoxiny mohou vyvolávat jak akutní, tak především chronické otravy. Významné je riziko pozdních toxických účinků (zejména karcinogenní riziko a vývojová toxicita). [2, 3, 16, 21]

Toxický účinek	Příklady mykotoxinů
Hepatotoxický	aflatoxiny, luteoskyrin, sterigmatocystin
Nefrotoxický	ochratoxin A, citrinin
Toxický pro gastrointestinální trakt	trichothecey
Neurotoxický	penitrem A, fumonisiny
Dermatotoxický	trichothecey, psoraleny, verrucariny
Estrogenní	zearalenon
Hematotoxický	aflatoxiny, ochratoxin A, zearalenon, trichothecey
Imunotoxický	aflatoxiny, ochratoxin A, trichothecey, patulin
Genotoxický	aflatoxiny, sterigmatocystin, ochratoxin A, patulin, trichothecey, fumonisiny, zearalenon, citrinin

Tab. 3 Dělení mykotoxinů podle toxických účinků k cílovým orgánům [2, 16]

1.5 Morfologie plísni

Základem těla plísni je vegetativní vláknitý útvar zvaný stélka (thallus). Stélka je tvořena dutými vlákny (hyfy), která jsou buď rozdělena předhrádkami (septy), nebo jsou coenocytické (bez přehrádek) (**Obr. 4**). Tím že jsou septované hyfy rozčleněny pomocí přehrádek, tak je lze klasifikovat jako vícebuněčné. Oproti tomu coenocytické hyfy nemají žádné přehrádky, takže vlastně představují jedinou buňku s mnoha jádry. Hyfy plísni se větví, rozrůstají a splétají do útvaru označovaného jako podhoubí neboli mycelium. [2, 3, 7, 23, 25]



Obr. 4 Hyfy mikromycet – septovaná a coenocytická [26]
(upraveno)

Část mycelia roste na povrchu substrátu (vzdušné mycelium) a část do něj prorůstá (substrátové mycelium). Na specializovaných hyfách vzdušného mycelia zvaných sporofory se vytvářejí rozmnožovací útvary – spory (výtrusy), které slouží k reprodukci plísně. Proto se někdy označuje jako reprodukční mycelium. Substrátové (nebo též vegetativní) mycelium získává živiny ze substrátu a slouží tak k výživě plísně.

Při kultivaci na agarových půdách v laboratoři lze po určité době pozorovat nárůst masy plísně – kolonii. Makroskopický vzhled kolonií je pro určité druhy nebo skupiny plísni charakteristické a slouží jako kritérium pro jejich určování. [7, 23, 25]

1.6 Rozmnožování plísní

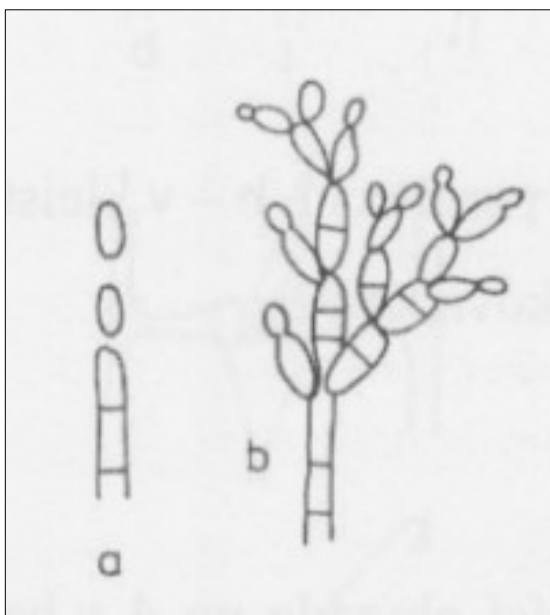
Vláknité mikromycety se rozmnožují rozrůstáním hyf, nebo pomocí spor. Ty mohou vznikat buď nepohlavním způsobem (nepohlavní spory – mitospory), nebo po spájení dvou buněk (pohlavní spory – meiospory). Plísně se tedy mohou rozmnožovat pohlavně i nepohlavně. Způsob rozmnožování, tvar, velikost, uspořádání i další vlastnosti reprodukčních struktur patří ke klíčovým identifikačním znakům u většiny vláknitých mikromycet. Pro sexuální rozmnožovací částice se doporučuje používat termín spora, zatímco pro ty asexuální by mělo být užíváno označení konidie. [1, 2, 10, 13, 23]

1.6.1 Nepohlavní rozmnožování

Nejčastější způsob reprodukce plísní je asexuálním způsobem. Jak již bylo uvedeno výše, děje se tak buď rozrůstáním hyf, nebo nepohlavními spory. Stádium hub, které se rozmnožuje pouze nepohlavně, se označuje jako anamorfa (imperfektní, asexuální stádium). Nepohlavní spory se tvoří buď na vegetativních hyfách, nebo ve speciálních fruktifikačních orgánech. Jejich tvorbě předchází pouze mitotické dělení. Proto jsou také plísně reprodukcí se nepohlavním rozmnožováním označovány jako mitosporické houby. Podle místa vzniku dělíme asexuální spory na exospory a endospory. [1, 2, 7, 25]

Exospory se nacházející vně fruktifikačních orgánů a vznikají buď přímo nebo nepřímo (z konidiogenních buněk) na specializovaných hyfách – konidioforech. Konidie mohou být jednobuněčné (někdy označovány jako mikrokonidie) nebo vícebuněčné (tj. makrokonidie). Dle způsobu tvorby pak rozeznáváme thalické konidie (artrokonidie), které vznikají fragmentací již existující hyfy na jednotlivé buňky, a blastické konidie (blastokonidie), tvořící se *de novo* na principu pučení (**Obr. 5**). U některých rodů plísní se mohou tvořit ještě chlamydokonidie, silnostěnné útvary, jež jsou odolné vůči nepříznivým podmínkám. [1, 2, 13, 25]

Exospory různých rodů jsou tvarově značně rozmanité, mohou být kulovité, elipsoidní, válcovité, vřetenovité, srpkovité, spirálově stočené apod. Mohou být umístěny jak jednotlivě, tak v řetízích nebo kulovitých útvarech. Tvar, velikost a uspořádání konidií hrají podstatnou roli v taxonomii mitosporických hub, u kterých nejsou známa sexuální stádia. [1, 2, 25]



Obr. 5 Vznik exospor u plísni [1]
 a – artrokonidie, b – blastokonidie
 (upraveno)

Druhým typem nepohlavních spor jsou endospory, které vznikají uvnitř fruktifikačních orgánů. Konkrétním příkladem jsou pak sporangiokonidie, které se nacházejí uvnitř vakovitého útvaru nazývaném sporangium (výtrusnice). Tento způsob asexuální reprodukce je typický pro zygomycety. [1, 2, 23, 25]

1.6.2 Pohlavní rozmnožování

Méně často se u vláknitých mikroskopických hub uplatňuje rozmnožování pohlavní, které je charakteristické tvorbou pohlavních spor – zygospor nebo askospor. Životní stádium hub, charakteristické tvorbou pohlavních spor se nazývá teleomorfa (perfektní, sexuální stádium). Tvorbě pohlavně vzniklých spor předchází meiotické dělení, a tak plísně, které se vyznačují asexuální reprodukcí můžeme nazvat i jako houby meiosporické. [2, 19]

Při tomto způsobu reprodukce vznikají pohlavní spory spájením dvou buněk. Mezi plísněmi jsou sice známy homothalické rody, které nejsou pohlavně diferencované, tak že dochází ke spájení buněk vyrůstajících z téže hyfy. Nicméně většina plísní je tzv. heterothalická, což znamená, že každý druh obsahuje kmeny s odlišným pohlavním typem (+ kmeny a – kmeny) mezi nimiž dochází ke konjugaci. [1, 20, 25]

2 ROD *FUSARIUM*

2.1 Úvod

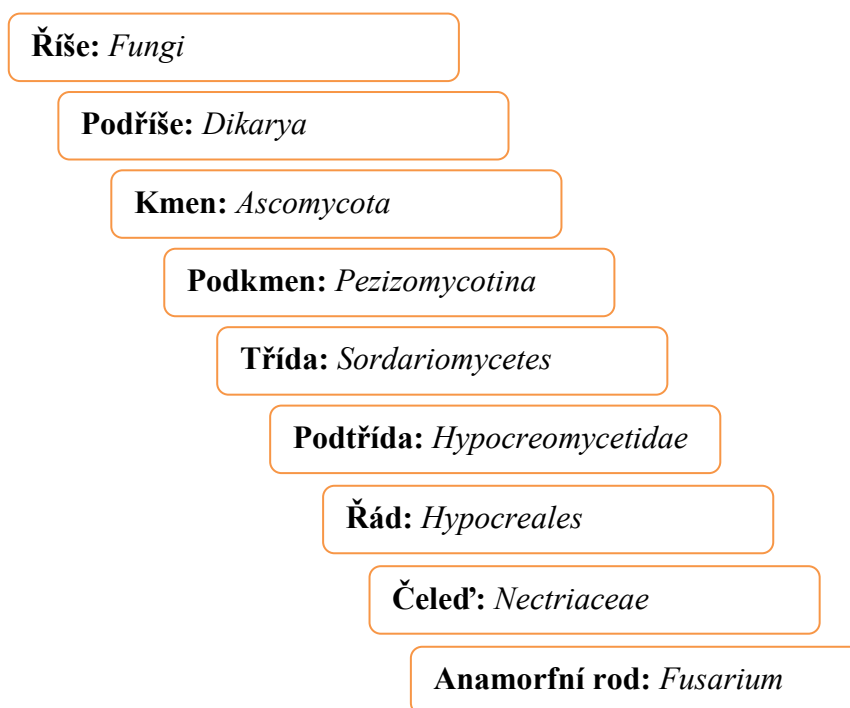
Rod *Fusarium* je rozsáhlý a v přírodě hojně rozšířený. Jeho příslušníci byly izolovány i v tak extrémních prostředích, jako je arktický permafrost a písek na Sahaře. Jako součást půdního ekosystému se fuzária podílí na rozkladu organické hmoty. Řada druhů se během evoluce přizpůsobila k parazitismu rostlin – tyto fytopatogenní druhy pak napadají především obilniny, brambory a cukrovou řepu. Některé druhy mohou být příležitostně patogenní i pro živočichy, včetně člověka. Fuzária uvolňují velké množství konidií, které se šíří vzduchem a snadno kontaminují potraviny či klinický materiál. Určité druhy našly uplatnění v biotechnologiích jako kulturní kmeny k výrobě mykoproteinu – quornu. Rod *Fusarium* poprvé popsal a pojmenoval německý botanik Johann H. F. Link v roce 1809. Plísň rodu *Fusarium* byly v minulosti známy také u nás, o čemž svědčí český název „srpovnička“ pro jejich makrokonidie. [2, 7, 13, 21, 27]



Obr. 6 Portrét Johanna Heinricha Friedricha Linka (1761-1851) [28]

2.2 Taxonomické zařazení

Taxonomie rodu *Fusarium* spp. je komplikovaná. V průběhu let odborníci z různých pracovišť navrhovali k určování fuzárií nové a nové taxonomické systémy. Jednotlivé systémy se od sebe značně lišili, což dokazuje i výrazný rozptyl mezi počtem identifikovaných druhů – od 9 až do 1000 druhů. Určování druhů rodu *Fusarium* se v minulosti omezovalo pouze na hodnocení morfologických znaků. Dnes se však v systematice hub uplatňují i moderní molekulárně biologické metody, které přispěly k řadě nových poznatků a změn v řadě systémů. Leslie a Summerell (2006) na základě morfologických, biologických a fylogenetických kritérií popsali ve svém laboratorním manuálu 70 druhů fuzárií, avšak taxonomie fuzárií stále prochází změnami. Taxonomické schéma rodu *Fusarium* je uvedeno v následujícím obrázku (**Obr. 7**). U některých druhů je známo i pohlavní stádium (teleomorfa) – *Giberella*, *Abonectria* a *Haematonectria*. [2, 29, 30, 31]



Obr. 7 Taxonomické schéma rodu *Fusarium* [32]

2.3 Morfologie

Plísňe rodu *Fusarium* vytvářejí na umělých půdách bohaté plstnaté nebo vatovité mycelium světlých barev, rostoucí ve snopcích od půdy k víčku misky. Spodní strana narostlé kultury bývá pestře zbarvena. Fuzária nejčastěji vytváří nepohlavní (konidiální) stádium, některé druhy vytváří za určitých podmínek i pohlavní stádium. [2, 8, 16, 30]



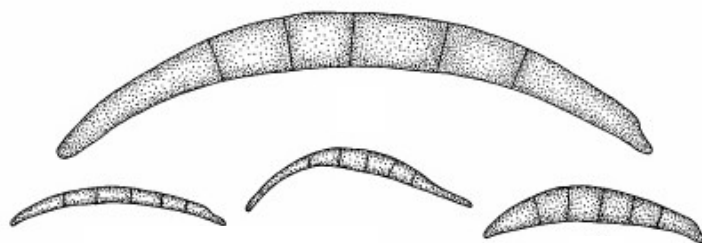
Obr. 8 Makrohabitus *Fusarium solani* [33]

Konidiální stádium vytváří buď volné jednotlivé konidiofory, na nichž se odštěpují konidie, nebo se konidiofory seskupují do makroskopicky viditelných, drobných polštářovitých útvarů, zvaných sporodochia. V některých případech se vytvářejí i souvislé konidionosné porosty tzv. pionoty. K typickému vytváření sporodochií a pionotů však dochází spíše na přirozeném substrátu. V kulturách se obvykle setkáváme pouze s volně rozmístěnými konidiofory ve vzdušném myceliu, které jsou buď málo nebo hojněji větvené. [2, 8]

Na ose konidioforu se vytváří speciální konidiogenní buňky lahvovitého tvaru – fialidy. Rozlišujeme dva základní typy: monofialidy a polyfialidy. Na monofialidách se konidie tvoří pouze na jednom místě, zatímco na polyfialidách je konidiogenních míst rovnou několik. Plísňe rodu *Fusarium* mohou produkovat tři typy konidií: makrokonidie, mikrokonidie a chlamydokonidie. Některé druhy produkují všechny druhy konidií, zatímco jiné druhy nikoliv. [1, 2, 8, 29, 34]

2.3.1 Makrokonidie

Makrokonidie se vytvářejí ve sporodiích a pionotech, ale mohou být produkovány i na monofialidách a polyfialidách na vzdušném myceliu. Jsou dvou až vícebuněčné a mají charakteristický srpovitý či rohlíčkovitý tvar. Makrokonidie jsou typickým morfologickým znakem pro druhovou determinaci fuzárií. Sledujeme u nich počet buněk, velikost, tvar a zahnutí, dále se hodnotí tvar a zahnutí apikální buňky a zahnutí bazální buňky (může být vyvinuta tzv. nožka). Všímáme si i tloušťky buněčné stěny a zřetelnosti přepážek. Velmi často se po delší kultivaci přestávají tvořit. [2, 8, 16, 29, 30, 31]



Obr. 9 Morfologie makrokonidií *Fusarium* spp. [30]
(upraveno)

2.3.2 Mikrokonidie

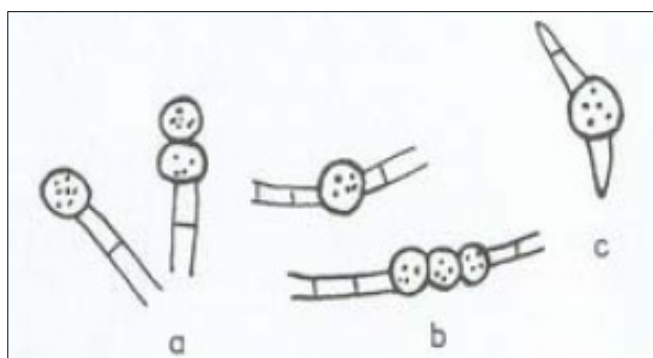
Tento druh konidií není produkován všemi druhy fuzárií. Pokud jsou přítomny, všímáme si u nich tvaru, velikosti i způsobu vzniku. Mikrokonidie jsou zpravidla jednobuněčné a tvaru velmi různorodého (**Obr. 10**). Tvar mikrokonidií může být významný při identifikaci fuzárií. Tvoří se ve vzdušném myceliu, nikoliv ve sporodochiu. Na fialidách se mohou tvořit jednotlivě, v řetízcích nebo ve shlucích. [8, 29, 30]



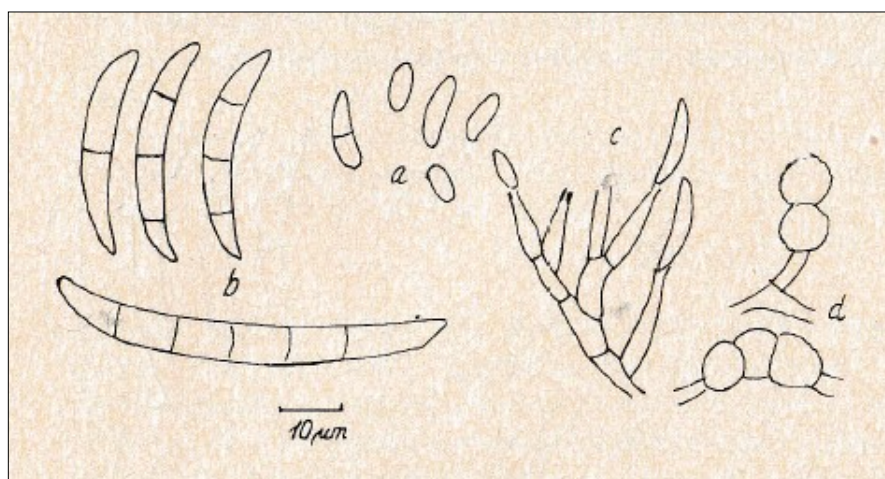
Obr. 10 Morfologie mikrokonidií *Fusarium* spp. [30]
(upraveno)

2.3.3 Chlamydokonidie

Třetím typem konidií, které mohou některé druhy rodu *Fusarium* produkovat jsou chlamydokonidie, které se vyznačují silnou, často zbarvenou stěnou, jež může být hladká nebo drsná. Chlamydokonidie mají různý tvar, velikost i počet buněk. Mohou být produkovány jednotlivě, ve dvojicích, shlucích nebo řetězcích. Umístěny jsou buď na konci vláken (terminálně) nebo mezi buňkami vlákna (interkalárně). U některých kmenů dochází ve starších kulturách ke vzniku chlamydokonidií i z jednotlivých buněk konidioforu, nebo z jednotlivých buněk makrokonidií. [2, 8, 29, 30]



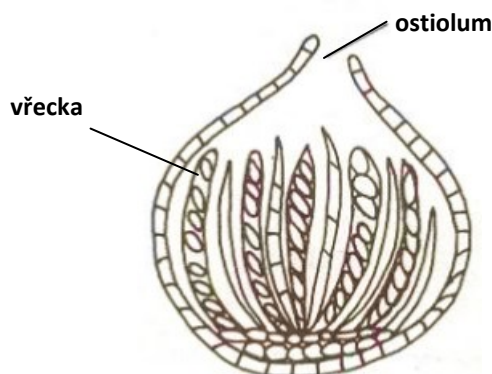
Obr. 11 Umístění chlamydokonidií u *Fusarium* spp. [1]
a – koncové (terminální); b – interkalární; c – v makrokonidiích



Obr. 12 Mikrohabitus *Fusarium solani* [7]
a – mikrokonidie; b – makrokonidie; c – konidiofory s konidii;
d – chlamydokonidie

2.3.4 Morfologie teleomorfních stádií

Některé druhy fuzárií jsou schopny sexuální reprodukce, která je charakteristická tvorbou askospor. Askospory se tvoří většinou po osmi ve vřeckách (ascích), které jsou pravidelně uspořádány uvnitř fruktifikačního orgánu – perithecia (**Obr. 13**). Perithecium je typ plodnice, obvykle lahvicovitého tvaru s malým otvorem (ostiolem), kterým se askospory dostávají ven. [1, 8, 15, 34]



Obr. 13 Perithecium s pravidelně uspořádanými vřecky a ostiolem [1]
(upraveno)

2.4 Patogenita a patogeneze

Plísně rodu *Fusarium* jsou řazeny mezi tzv. hyalinní mikromycety vyznačující se hyalinními (tj. nepigmentovanými) hyfami se septy. Hyalinní mikromycety způsobují skupinu onemocnění souhrnně zvaných jako hyalohyfomykózy. Přičemž fuzária jsou považována za jejich druhou nejčastější příčinu (hned po aspergilech).

Infekce způsobené zástupci rodu *Fusarium* se obecně označují jako fuzariózy. Fuzária vyvolávají široké spektrum infekcí od infekcí povrchových, lokálně invazivních až po diseminované. Klinická manifestace do značné míry závisí na způsobu vstupu infekce a na imunitním stavu hostitele. Postižen může být téměř jakýkoliv orgán, do kterého se infekce rozšíří hematogenní cestou. Ze dvanácti antropopatogenních druhů, se nejvíce jako původce infekcí uplatňuje *Fusarium solani* (přibližně 50 %), následováno *Fusarium oxysporum* a *Fusarium verticillioides* (dříve nazývané *Fusarium moniliforme*). Jako klasické oportunní patogeny napadají pouze jedince s oslabenou imunitou, a pro zdravé osoby nepředstavují hrozbu. [13, 35, 36, 37, 38, 39]

U relativně zdravých, imunokompetentních lidí mohou vzácně způsobovat povrchové infekce, většinou po porušení povrchových obranných bariér těla. Nejčastěji se jedná o mykotickou keratitidu (vznikající po traumatické inokulaci či v důsledku kontaminovaných kontaktních čoček) a onychomykózu. Méně často mohou též infikovat rány a popáleniny. Mimoto byly popsány také případy lokalizovaných hlubokých infekcí jako je sinusitida, pneumonie, tromboflebitidy, endoftalmitidy, mozkové abscesy, septické artritidy a osteomyelitidy. [2, 13, 35, 37, 38]



Obr. 14 Kožní léze u pacienta s akutní lymfoblastickou leukémií [41]

U osob s vážně oslabeným imunitním systémem má fuzarióza obvykle charakter invazivní a diseminované. Lokální postižení přechází v diseminovanou formu až v 70 % případů. Branou vstupu je obvykle dýchací trakt nebo poškozená kůže. Rizikovými faktory pro vznik infekce jsou u této skupiny pacientů probíhající imunosuprese, granulocytopenie, lymfocytopenie, reakce štěpu proti hostiteli (Graft versus Host Disease, GvHD), kolonizace, poškození tkáně atd.

Klinické příznaky invazivních fuzariových infekcí jsou podobné jako u infekcí způsobených rodem *Aspergillus*. Avšak na rozdíl od invazivních aspergilóz jsou pro invazivní fuzariové infekce charakteristické kožní či podkožní léze a pozitivní hemokultury, na jejichž základě může být fuzarióza diagnostikována.

Diseminovaná fuzarióza je život ohrožující onemocnění, jehož výsledek je nadměrně ovlivněn imunitním stavem pacienta. Celková mortalita fuzariových infekcí u

imunokompromitovaných pacientů se pohybuje v rozmezí od 50 do 80 %. Ještě vyšší úmrtnost je spojena s perzistující granulocytopenií a léčbou kortikosteroidy. [13, 35, 37, 38, 39, 40]

A jak již bylo několikrát zmíněno, fuzária mohou kromě přímého napadení v podobě mykóz, poškozovat lidské zdraví i alergizací či produkcí toxinů do kontaminovaných potravin.

2.5 Fuzáriové mykotoxiny

Rod *Fusarium* je jedním ze tří hlavních houbových rodů produkujících mykotoxiny. Přísluší mezi tzv. „polní plísně“, jež kontaminují plodiny ještě před sklizní nebo bezprostředně po ní. Mezi nejvýznamnější mykotoxiny produkované plísněmi tohoto rodu patří trichotheceny, fumonisiny a zearalenony. [2, 42, 43]

2.5.1 Trichotheceny

Trichotheceny jsou chemicky velmi rozmanitá skupina. Podle charakteru funkční skupiny se rozlišují 4 skupiny těchto toxinů (A-D). Ze skupiny A je nejvýznamnějším mykotoxinem T-2 toxin, u skupiny B je to pak vůbec nejběžněji se vyskytující trichothecen, deoxynivalenol. Jejich výskyt je spojen s celou řadou fuzáriových druhů, kupříkladu *Fusarium sporotrichioides*, *Fusarium acuminatum*, *Fusarium graminearum*, *Fusarium culmorum* nebo *Fusarium poae*. Trichotheceny se nacházejí nejčastěji v zrnech pšenice, kukuřice, ječmene anebo ovsu.

„Vzhledem k poměrně častému výskytu onemocnění způsobených trichotheceny u lidí a zvířat, jsou ve světě pokládány za nejvýznamnější skupinu mykotoxinů.“

Trichotheceny inhibují syntézu bílkovin. Akutní toxicita je charakterizována střevními potížemi a zvracením. Prokázány byly kožní změny či poruchy krevetvorby, způsobené destrukcí kostní dřevě. Z pozdních toxických účinků jsou popsány účinky imunosupresivní a genotoxické a údajně i karcinogenní. Nicméně důkazy karcinogenity T-2 toxinu i deoxynivalenol nejsou dostatečné – dle Mezinárodní agentury pro výzkum rakoviny (*The International Agency for Research on Cancer, IARC*) klasifikovány do 3. skupiny. [2, 42, 43, 44, 45]

2.5.2 Fumonisin

Dosud byla izolována celá řada fumonisinů a jejich metabolitů. Za nejhojnější a zároveň nejtoxičtější je pokládán fumonisin B₁. Zdrojem těchto mykotoxinů je především kukuřice a výrobky z ní. Nejvýznamnějším producentem je *Fusarium verticillioides*. Fumonisin vyvolávají několik druhů onemocnění zvířat. U člověka je popisována epidemiologická souvislost s výskytem karcinomu jícnu a vrozených vad. Podle IARC se fumonisin řadí do skupiny 2B – látky potenciálně karcinogenní pro člověka. [2, 16, 30, 42, 45]

2.5.3 Zearalenon

Zearalenon (dříve označovaný jako F-2 toxin) je produkován různými druhy fuzárií, v některých případech i těmi, které jsou schopny produkovat trichotheceny. Hlavním producentem tohoto mykotoxinu je *Fusarium graminearum*. Kontaminována je především kukuřice, ale zearalenon nalézáme i u ječmene, pšenice či ovsa.

Zearalenon a jeho deriváty vykazují především estrogenní účinky. Mohou se kompetitivně vázat na estrogenní receptory (namísto estradiolu) a ovlivňovat tak reprodukční schopnost živočichu, velmi citlivá jsou především prasata. „Pro člověka může být zdrojem mléko, do kterého se zearalenon vylučuje asi 0,01 % přijaté denní dávky. V odborné literatuře existují práce popisující korelaci mezi výskytem zearalenonu a dalších trichothecenů v potravě matek v průběhu těhotenství a výskytem některých poruch nervového systému u potomstva, včetně schizofrenie [42].“ Zearalenon je dle IARC zařazován do kategorie 3, a tak pravděpodobně není karcinogenní pro člověka. [2, 16, 42, 43, 45]

3 METODY LABORATORNÍ DIAGNOSTIKY V LÉKAŘSKÉ MYKOLOGII

Mykologická diagnostika je v mnoha ohledech podobná diagnostice bakteriologické. Základem je přímé mikroskopické vyšetření klinického materiálu, kultivace vedoucí k izolaci mikromycety a její následná identifikace. V diagnostice invazivních mykóz se uplatňují sérologické metody přímého průkazu, detekující specifické komponenty buněčné stěny hub. Nepřímý průkaz má v mykologii jen omezené využití. Jako doplněk ke konvenčním testům se v poslední době stále častěji využívají molekulárně-biologické metody. [13, 46]

Nezbytnou součástí správného mykologického vyšetření je i celkové zhodnocení a interpretace nálezu, ideálně po konzultaci s ošetřujícím lékařem. Vzhledem k všudypřítomnosti spor a konidií mikromycet, jež mohou snadno klinický vzorek kontaminovat a oportunními charakteru mykotických infekcí je potřeba výsledky mykologického vyšetření hodnotit a interpretovat velmi opatrně. Spolupracující klinik poskytne potřebné informace o zdravotním stavu pacienta, čímž umožní posoudit eventuální příčinnou souvislost mikromycety s patologickým procesem. [13]

V prvotní fázi diagnostiky klinik nepotřebuje znát přesnou identifikaci zachycené houby, avšak potřebuje vědět, zda se jedná skutečně o invazivní mykózu, zda je vyvolána kvasinkou nebo vláknitou mikromycetou a zda je nutné zahájit léčbu, případně jakou. U invazivních mykotických infekcí se stává klíčovým požadavkem rychlost a přesnost diagnózy, která zejména u imunoalterovaných pacientů je rozhodujícím faktorem úspěšnosti terapie. Každá mykologická laboratoř by měla být schopna provést identifikaci na druhové (*Aspergillus*) nebo alespoň na rodové (např. *Mucor*, *Rhizopus*, *Fusarium*) úrovni. [46, 47]

3.1 Odběr a zpracování materiálu

O kvalitě mykologického vyšetření a validitě výsledků rozhoduje správně provedený odběr klinického materiálu. Aby nedošlo ke znehodnocení vzorku či ke zkreslení výsledků, je nezbytné dodržet při odběru několik zásad. Důležité je, aby byl klinický materiál odebírán z aktivního místa infekce, v dostatečném množství, a pokud možno bez kontaminace doprovodnou mikroflórou. Dále je potřeba zajistit odběr ještě před zahájením antimykotické léčby, která by mohla životaschopnost mykotického

agens ovlivnit. Zároveň je nutno při odběru materiálu postupovat tak, aby nedošlo ke vzdušné sekundární kontaminaci vzorku. Samozřejmě by měl být odběr za aseptických podmínek, do sterilních nádob, používání transportních médií a co nejrychlejší transport do laboratoře. Při zpracování materiálu je nutno vždy pamatovat na souběžné zhotovení alespoň dvou mikroskopických preparátů – jeden se obvykle barví dle Grama, další mykologickými nebo histologickými barvicími technikami. [2, 9, 13]

Při podezření na povrchové mykózy bývají k mykologickému vyšetření zasílány nejčastěji kožní šupiny, vlasy a nehty. Stěry tamponem se využívají u slizničních mykóz a také ran, u kterých je možno použít rovněž otiskovou metodu na vhodné médium. Při orgánových či invazivních mykózách se odebírají vzorky tkání, krev, moč, likvor, sputum, bronchoalveolární laváž, punktáty, exsudáty, hnis aj. [13]

3.2 Mikroskopické vyšetření

Přímé mikroskopické vyšetření klinického materiálu bývá zpravidla prvním krokem v laboratorní diagnostice mykotických onemocnění. Mikroskopie představuje v mykologii nepostradatelnou techniku, která slouží nejen k rychlé diagnostice, ale rovněž k ověření validity vzorku a přítomnosti zánětu. Umožňuje velmi rychle zjistit přítomnost mykotických elementů v klinickém materiálu a na základě jejich morfologie a uspořádání orientačně posoudit, zda se jedná o mykózu, případně stanovit předběžnou diagnózu. Přesnější identifikace však není z takových preparátů obvykle možná. Takovýto předběžný výsledek je však pro klinika velmi cenný. Na jeho základě může být okamžitě zahájena antimykotická terapie, a to bez ztráty drahocenného času při čekání na výsledek kultivace. [13, 46]

3.2.1 Používané techniky

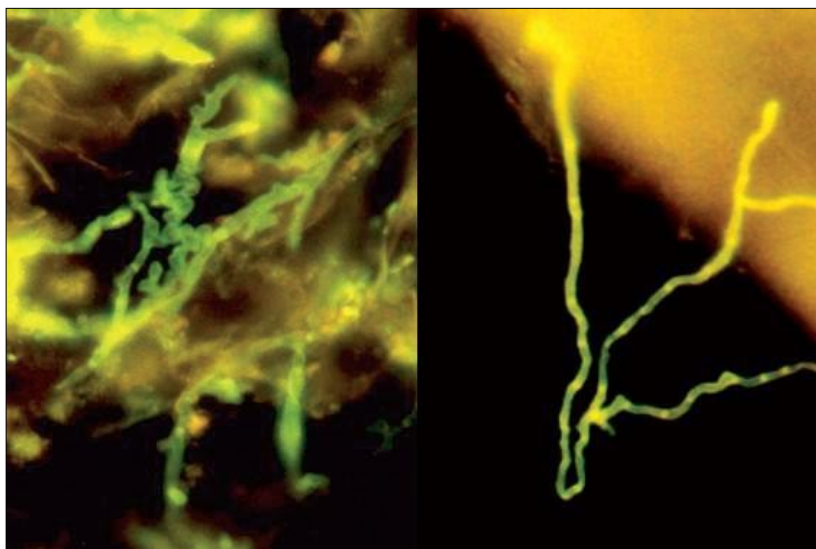
Mezi nejčastější typy preparátů používané v lékařské mykologii patří louhový preparát. Využívá se zde schopnosti KOH projasnit tkáň tak, aby bylo možno pozorovat mykotické elementy ve vyšetřovaném vzorku. Tato technika se využívá k vyšetření vzorků kůže a kožních adnex či vaginální sekretu. [13, 46]

Nativní či louhový preparát lze dále dobarvit nescificky Lugolovým roztokem či barvivem Myco-Ink, které se specificky váže na chitin v buněčné stěně hub. K průkazu mikromycet lze využít klasické bakteriologické barvení, podle Grama, jež umožňuje detekovat kvasinky, barvící se podobně jako grampozitivní bakterie. Stejně lze v preparátu znázornit i hyfy, které se však barví nespolehlivě. K zobrazení vláken plísni lze využít i techniku barvení podle Gram-Weigerta, původně určenou k diagnostice cyst *Pneumocystis jiroveci*. [2, 13, 46, 47, 48]



Obr. 15 *Fusarium spp.* – nativní preparát [40]

Citlivost mikroskopického vyšetření lze zvýšit používáním fluorescenčních barvicích technik. Podstatou je specifická vazba fluorescenčních barviv (Calcofluor, Blancophor, Rylux BSU), na struktury buněčné stěny hub. Ve fluorescenčním mikroskopu pak takto obarvené elementy barevně září (**Obr. 16**). Fluorescenční techniky se využívají pro rychlou diagnostiku přítomnosti vláknitých mikromycet. [13, 46, 47]

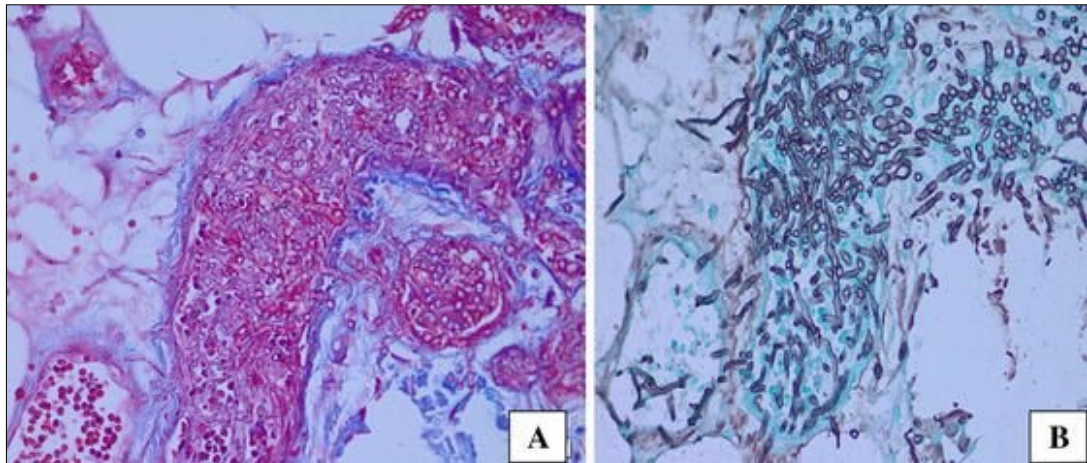


Obr. 16 Hyfy při fluorescenčním vyšetření pomocí Rylux BSU v KOH [47]

3.3 Histologické vyšetření

Vizualizace mykotických elementů ve tkáních je základním kamenem diagnostiky invazivních mykóz. Pro přesnou diagnózu je však nutná izolace a identifikace infikující houby. Pozitivita v bioptických vzorcích je obvykle spojena s pokročilým stupněm mykotické infekce. Vzhledem k invazivním postupům získávání vzorku je vyšetření u kritických pancytopenických pacientů jen velmi obtížně proveditelné. Základní histologické barvení hematoxylin-eosin (HE) nemá pro průkaz fungálních patogenů ve tkáni valný význam. Pro zvýšení možnosti zachytu i malého množství mykotických elementů se používají speciální barvení, jako je metoda stříbření podle Grocotta či barvení PAS (*Periodic Acid Schiff*). [49, 50, 51]

Fuzária lze obvykle izolovat z biopsie kožních lézí. Na základě mikroskopického vzhledu je však nelze odlišit od ostatních původců hyalohyfomykóz. Pro definitivní diagnózu fuzáriové infekce je potřeba kultivační nález *Fusarium* spp. v klinickém vzorku (krev, kůže, dutiny, plíce a jiné). [35, 50]



Obr. 17 Hyalohyfomykóza (*Fusarium* spp.) - histologické vyšetření biopsie kožní léze [52]

A – barvení PAS; B – barvení podle Grocotta

3.4 Kultivační vyšetření

Základní kultivační vyšetření je povětšinou poměrně jednoduchou záležitostí, neboť mikroskopické houby jsou nenáročnými organismy a jsou schopny růstu prakticky na všech běžných kultivačních půdách. Nejčastěji používaným médiem v lékařské mykologii je Sabouraudův glukózový agar (SGA). Kvůli bakteriální kontaminaci se přímo do média přidává chloramfenikol či gentamycin, v případě selektivní kultivace dermatofytů navíc selektivní antimykotikum cykloheximid. [2, 13, 47]

Vyjma SGA lze v mykologické laboratoři využít i jiná média, vhodná pro kultivaci vláknitých mikromycet. Charakter růstu a vzhled kolonií aspergilů a dalších vláknitých hub se kupříkladu studuje na Czapek-Doxově, bramborovém nebo sladinkovém agaru. [2, 13]

Optimální kultivační teplota pro většinu mikromycet je 25 – 28 °C. Pokud očekáváme původce oportunní mykózy (kandidy, aspergily, zygomycety) probíhá kultivace při 36 ± 1 °C. Dermatofyty dobře rostou při pokojové teplotě (25 °C). A při podezření na dimorfní houbu je nutná paralelní kultivace při 25 °C i 37 °C. [2, 46, 53]

Mykologická kultivace je většinou dlouhodobá (často i několik týdnů), a proto hrozí nebezpečí vysychání kultur. Tomu zabráňujeme tím, že primokultivaci zakládáme ve zkumavkách s šikmo nalitým agarem, který vysychá pomaleji než agar v Petriho miskách. Dále pomáhá uzavření zkumavek sterilními gumovými zátkami. Kultury

denně vizuálně kontrolujeme, aniž bychom však zkumavky otevírali. Objeví-li se kolonie do 4 až 10 dní, považuje se růst za rychlý, v případě 3 a více týdnů (dermatofyty, dimorfní houby) mluvíme o pomalém růstu. [13, 53]

3.4.1 Hemokultivace

Specifickým laboratorním vyšetřením jsou při invazivních mykózách hemokultivace. Podstatou tohoto vyšetření je odběr krve od pacienta a inokulace do hemokultivačního média v lahvičkách. Ty jsou pak dále inkubovány a sledovány v automatickém systému. Systém monitoruje tvorbu CO₂ množících se mikroorganismů. V současné době jsou u nás za zlatý standard považovány dva automatické detekční systémy: kolorimetrický systém BacT/Alert (bioMérieux, Francie) a fluorimetrický systém Bactec (Becton Dickinson, USA). V případě positivity je lahvička vyjmuta z automatu a její obsah je vyočkován na SGA, popřípadě jiné médium. Rovněž se zhotoví mikroskopický preparát. Pozitivní hemokultura ve spojení s mikroskopickým vyšetřením dává rychlý obraz o etiologickém agens. [47, 54, 55]

Aspergily a ostatní vláknité mikromycety jsou z krve izolovány jen zřídka, výjimkou je však rod *Fusarium*. U diseminované formy fuzariózy napomáhá při diagnostice přítomnost kožní léze, a právě pozitivní hemokultivační vyšetření. Na základě pozitivní hemokultury může být infekce *Fusarium* spp. diagnostikována u 40 % pacientů. Jestliže jsou u pacientů přítomny diseminované kožní léze, pak může být hemokultura pozitivní až v 60 % případů. Důvodem tohoto častého záchytu fuzárií v krvi je produkce velkého množství kvasinkovitých konidií, které napomáhají houbě v šíření a růstu v krevním oběhu. [13, 37, 38, 39, 56]

3.5 Stanovení citlivosti k antimykotikům

V posledních letech významně stoupá počet systémových mykóz, v důsledku narůstajícího počtu rizikových pacientů. Tato skutečnost s sebou přináší nejen potřebu nových antifungálních léků, ale i nárůst rezistencí v populaci mikromycet. S nástupem nových generací antimykotik došlo i k rozvoji a sjednocení metodik pro testování citlivosti kvasinek a později i vláknitých mikromycet. Stanovení citlivosti mikromycet k antifungálním látkám *in vitro* se provádí ze dvou důvodů, terapeutických a epidemiologických. U imunosuprimovaných pacientů by měla být kvantitativně

stanovena citlivost k antimykotikům při záchytu mikromycety z klinicky významných materiálů, u kolonizujících kmenů při opakované izolaci ve významné kvantitě nebo z více lokalit, neboť je velmi pravděpodobné, že tito pacienti budou léčeni. [57, 58]

Pro testování citlivosti vláknitých hub, včetně *Fusarium* spp. jsou k dispozici standardizované postupy, navržené CLSI (*Clinical and Laboratory Standards Institute*, Ústav pro klinické a laboratorní standardy) – toho času druhé vydání M-38A2 z roku 2008 a EUCAST (*The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*, Evropská komise pro testování antimikrobiální citlivost) – aktuálně dostupný ve verzi EDef. 9.3.1. z roku 2017). Oba dokumenty popisují kvantitativní mikrodiluční techniku, poskytující možnost stanovit MIC (*Minimal Inhibitory Concentration*, minimální inhibiční koncentrace). V rutinní praxi je však obvykle používán komerční systém Etestů (bioMérieux, Francie) nebo Sensititre Yeast One (TREK Diagnostic, Ohio, USA), které jsou levnější i méně pracné. Získané výsledky tímto způsobem vykazují relativně vysokou shodu se standardní metodikou. [57, 58, 59, 60, 61]

Při interpretaci výsledků by měly být respektovány klinické break-pointy (BPs), jsou-li k dispozici. Pro *Fusarium* spp. však doposud nebyly oficiálně stanoveny u žádného antimykotika. V takovém případě je možné se orientovat podle tzv. epidemiologických cut-off hodnot (*Epidemiological Cut-off Value*, ECV), které byly nedávno navrženy pro některé druhy fuzárií. Tato hodnota slouží pro odlišení populace divokého typu (wild-type, bez mechanismu rezistence) od populace ne-divokého typu (non-wild type) s příslušným mechanismem rezistence k danému antimykotiku. ECV je matematicky stanovené číslo vycházející ze standardního rozložení MIC v populaci sledované mikromycety (Gaussova křivka) a nejlépe vystihující, kde v ní končí normální distribuce MIC. [57, 61, 62]

3.6 Identifikace izolovaných mikromycet

Izolované vláknité mikromycety se určují převážně na základě morfologických charakteristik, tj. detailním rozbořem makroskopické a mikroskopické morfologie. [2]

3.6.1 Makroskopická identifikace

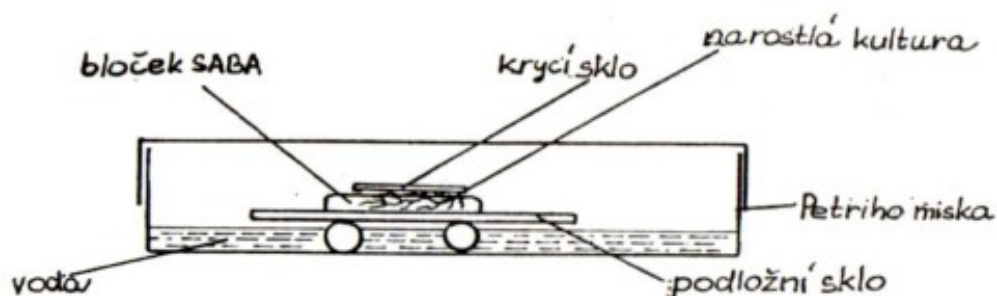
Při identifikaci vláknitých mikromycet je v první řadě hodnocen makrohabitus narostlé kultury (vzhled, charakter a barva kolonií). Velmi důležitým znakem je zbarvení spodní strany kultury, případně i produkce pigmentů do kultivačního média v okolí kolonie. Posuzována je také rychlost růstu.

Fusarium spp. patří mezi rychle rostoucí mikromycety, vytvářející mycelium zbarvené v odstínech růžové, červené, fialové nebo hnědé. [2, 13, 31, 38, 39]

3.6.2 Mikroskopická identifikace

Pro identifikaci je však nezbytné také zhotovení mikroskopického preparátu z čerstvě narostlé kultury, ve kterém se hodnotí přítomnost charakteristických reprodukčních struktur, jejich tvar, velikost a uspořádání. Kulturu lze sledovat v nativní preparátu. Nicméně vhodnější je znázornění mykotických struktur vhodným barvením (např. laktofenolová modř nebo dobarvený louhový preparát). [13]

Pokud se během přípravy preparátu z již narostlé kultury rozruší charakteristické struktury, podle kterých lze mikromycetu identifikovat, je potřeba založit tzv. sklíčkovou kulturu (mikrokulturu) (**Obr. 17**). Tato metoda umožňuje pozorování mikroskopických struktur zejména vláknitých hub, a to *in situ* v čase. [2, 13, 46]



Obr. 18 Mikrokultura (sklíčková kultura) [63]

SABA – Sabouradův agar

3.6.3 Biochemická identifikace

Biochemické testy se pro identifikaci vláknitých mikroskopických hub využívají podstatně méně než u kvasinek. Výjimku představují dermatofyty, u nichž mohou biochemické testy (např. vlasový perforační test, ureázový test) dopomoci k jejich identifikaci. [2, 13]

3.7 Sérologické metody

Průkaz mykotické infekce může urychlit použití sérologických metod, kterými se v klinickém materiálu detekují houbové antigeny či protilátky tvořené proti nim. V současné době se tyto techniky výrazně podílí jak na identifikaci mikromycet, tak na diferenciální diagnostice invazivních mykóz. Sérologická diagnostika však s sebou přináší řadu omezení. [13, 47]

Jak již bylo zmíněno, průkaz protilátek nachází v mykologické laboratoři jen omezené uplatnění. Nápomocen je pouze při diagnostice endemických mykóz a alergických forem mykotických infekcí, u kterých se obvykle setkáváme s velmi dobrou protilátkovou odezvou. U oportunních systémových infekcí je průkaz specifických protilátek nespolehlivý. Často se protilátky vyskytují i u relativně zdravých jedinců. Mikromycety se totiž v prostředí vyskytují v hojném množství a lidský organismus, jež s nimi přichází denně do kontaktu proti nim vytváří příslušné protilátky. Naopak je tomu u imunoalterovaných jedinců, u kterých mykóza nemusí vyvolat dostatečnou protilátkovou odpověď a vyšetření je tak falešně negativní. [2, 13, 46]

U invazivních mykotických infekcí má větší hodnotu detekce přítomnosti houbových antigenů. V klinické praxi se uplatňuje např. průkaz galaktomannanu při aspergilóze či mannanového antigenu u kandidových infekcí. Součástí buněčné stěny prakticky všech mykotických patogenů je 1,3- β -D-glukan. Tento tzv. panfungální antigen lze zařadit do diagnostiky většiny mykóz, s výjimkou infekcí způsobených kryptokoky a zygomycetami. [2, 13]

Pro časnou diagnostiku invazivní fuzariózy lze využít pozitivitu panfungálního antigenu 1,3- β -D-glukanu se současnou negativitou galaktomannanu. Bohužel je tato kombinace možná u většiny ne-aspergilových invazivních mykotických infekcí. Navíc kvůli zkřížené reaktivitě může být test na galaktomanan u pacientů s fuzariózou falešně

pozitivní. Bohužel žádný specificky vyráběný imunologický test pro *Fusarium* spp. zatím neexistuje. [13, 35, 40, 64]

3.8 Molekulárně-biologické metody

Molekulárně-biologické metody nabízí velice slibný přístup pro diagnostiku invazivních mykotických infekcí. Všechny tyto techniky lze využít pro přímou detekci mikromycet, monitorování terapie, ale především k identifikaci a typizaci fungálních kmenů. V praxi se nejčastěji využívají různé varianty polymerázové řetězové reakce (*Polymerase Chain Reaction*, PCR). Mezi molekulárně-biologické metody lze zařadit i techniku analyzující proteom – hmotnostní spektrometrii s laserovou desorpcí a ionizací za účasti matrice s průletovým analyzátozem (*Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time Of Flight*, MALDI-TOF). [46, 49]

Metody molekulární diagnostiky v současné době stále nepatří mezi rutinní postupy při diagnostice invazivních mykotických infekcí. Většímu rozšíření brání jejich poměrně vysoká cena, metodická náročnost, a hlavně neexistence mezilaboratorní standardizace. [13, 49, 65]

3.8.1 Hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF

Hmotnostní spektrometrii na principu MALDI-TOF jsem se intenzivně věnovala již ve své bakalářské práci (Vitáčková, 2014). Proto se zde o této metodě zmíním velmi stručně.

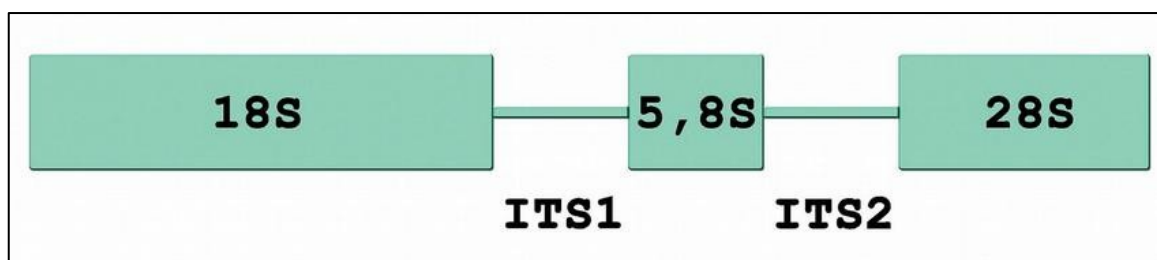
V současné době se jako perspektivní nástroj pro identifikaci vláknitých mikroskopických hub jeví hmotnostní spektrometrii MALDI-TOF, a to zejména u běžných druhů plísní. Nicméně její využití je zatím omezené, a to především kvůli neúplnosti komerčních databází a také nedostupnosti standardního extrakčního postupu. Předpokládá se, že lepší identifikační skóre lze získat při použití metody extrakce v ethanolu-kyselině mravenčí, která je ovšem časově náročnější. [46, 67, 68, 69]

Nadějně je využití hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF i pro identifikaci *Fusarium* spp. Metoda však není formálně standardizovaná a validovaná. Studie provedené u druhů *Fusarium* jsou velice slibné, s mírou úspěšnosti identifikace na úrovni druhů 82-99 %. [70, 71]

3.8.2 PCR metody

Metody založené na PCR jsou velmi citlivé techniky, umožňující detekovat i malá množství DNA. Reakci je možno cílit na univerzální sekvenci, nebo se lze zaměřit na rodově či druhově specifické oblasti DNA. V prvním případě se jedná o nespecifickou tzv. panfungální (širokospektrovou) PCR, při které se využívají konzervované, pomalu se měnící oblasti genomu. Amplifikován je úsek DNA, který je společný téměř pro všechny patogenní mikromycety. A pozitivní výsledek tak bude znamenat přítomnost jakéhokoliv z těchto patogenů. Pro přesnější určení je třeba využít specifickou metodu (specifickou PCR) zaměřenou na rychleji se měnící variabilní úseky. Zacílením primerů do těchto oblastí je pak možné vybrat druh (popřípadě rod), který bude daná PCR specificky detekovat. [13, 48, 49, 65]

K determinaci druhu houbového mykotického patogenu se využívají specifické PCR systémy nebo panfungální PCR s následnou specifikací amplifikovaného produktu pomocí sekvenace. Po sekvenaci je nutné zjistit, jakému druhu daná sekvence odpovídá, a to srovnáním s veřejnými databázemi. Nejznámější je databáze GenBank, avšak její použití při identifikaci houbových patogenů není příliš vhodné. Příhodnější je využití specializovaných mykologických databází – zejména nizozemská CBS a australská ISHAM Barcoding Database, které podléhají přísnější kontrole kvality a jednotlivé druhy či kmeny hub jsou určeny výhradně mykologickými specialisty. [65]



Obr. 19 Schéma jednotkového složení genu pro ribozomální DNA (rDNA) [67]

Jednotlivé PCR systémy mohou využívat různé cílové geny. V praxi je pro zvýšení citlivosti detekce výhodné používat tzv. multikopiové geny, které je snazší v klinickém materiálu zachytit. Nejčastěji používaným cílem jsou části genu pro ribozomální DNA (rDNA). Tento gen se skládá ze tří kódujících podjednotek – 18S, 5,8S a 28S, které jsou odděleny sekvencemi ITS (Internal Transcribed Spacer) – ITS1 a ITS2. (**Obr. 19**) Pro jeho vysokou konzervovanost jsou části genu pro rDNA často využívány jako cíl panfungálních metod. Pro identifikaci druhů mikromycet se

využívají sekvence ITS, které jsou dosti variabilní. U některých blízkých příbuzných druhů však nemusí být variabilita sekvencí ITS dostatečná. V takových případech je vhodné použít kombinaci více genů. [65, 72]

Klíčovým krokem při PCR je izolace fungální DNA. Zvolená izolační technika musí být natolik účinná, aby dokázala efektivně a rychle rozrušit vysoce odolnou buněčnou stěnu plísní. Nedostatečně účinná izolace DNA by vedla k falešně negativním výsledkům. Doporučovaným způsobem je mechanická disrupce, kdy je vzorek vortexován společně se skleněnými kuličkami. [48, 49, 65]

Vzhledem k všudypřítomnosti spor a konidií plísní jsou PCR techniky náchylné ke kontaminaci, která následně může být příčinou falešné pozitivivity. Proto je potřeba dodržovat protikontaminační opatření v průběhu celého procesu – při odběru vzorku, izolaci DNA i přípravě PCR reakce. Vyšetřovaný materiál lze rozdělit na primárně sterilní (krev, likvor či vzorky tkáně z biopsie) a nesterilní (tekutina z bronchoalveolární laváže, sputum či tkáň z pitvy). U primárně nesterilních materiálů, které mohou být kontaminovány různými druhy plísní volně se vyskytujících v prostředí lze využít specifické PCR metody. Panfungální PCR je zase vhodnější u primárně sterilních materiálů, kde se kontaminace z prostředí nepředpokládá. Případnou kontaminaci či kolonizaci od aktivní infekce může pomoci odlišit kvantifikace nálože fungální DNA ve vzorku pomocí real-time PCR. [48, 65]

Hlavními přednostmi metod založených na PCR je jejich vysoká senzitivita a rychlá dostupnost výsledků, což umožňuje včasné zahájení antimykotické terapie. Vysoká citlivost těchto technik však s sebou přináší i relativně vyšší frekvence falešně pozitivních výsledků (záchyt kontaminace). Výsledky jsou známy během několika málo hodin, ovšem je potřeba je interpretovat s ohledem na typ materiálu (primárně sterilní/nesterilní), klinický stav pacienta (imunoprese, léčba antimykotiky) a výsledky jiných diagnostických metod (sérologie, histologie, kultivace). [13, 48, 65]

V kombinaci s konvenčními metodami je pro identifikaci fuzárií možné použít panfungální PCR s dodatečným určením konkrétního druhu pomocí sekvence. *Kromě toho bylo publikováno také několik specifických PCR – kvalitativních pro Fusarium spp. a microarray souběžně detekující Fusarium oxysporum, F. solani, Scedosporium prolificans a Trichosporon asahii.* [70, 71]

4 ZÁVĚR

Vláknité mikroskopické houby rodu *Fusarium* patří mezi tzv. vzácné mykotické patogeny. V posledních letech se však stále častěji uplatňují jako původci invazivních mykóz. Diferenciální diagnostika fuzarióz od ostatních mykotických infekcí však není jednoduchá a identifikace *Fusarium* spp. je ještě obtížnější – nepřesná druhová identifikace nebo i identifikace na úrovni rodu není neobvyklá. Laboratorní diagnostika se opírá o konvenční techniky, zahrnující mikroskopii, kultivaci a histologické vyšetření. Perspektivní se zdá využití molekulárně-biologických metod.

POUŽITÉ ZKRATKY

SAR – *Stramenopila, Alveolata, Rhizaria*

GvHD – Graft versus Host Disease (reakce štěpu proti hostiteli)

IARC – The International Agency for Research on Cancer
(Mezinárodní agentura pro výzkum rakoviny)

PAS – Periodic Acid Schiff

SGA – Sabouraudův glukózový agar

CLSI – Clinical and Laboratory Standards Institute
(Ústav pro klinické a laboratorní standardy)

EUCAST – The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing
(Evropská komise pro testování antimikrobiální citlivosti)

MIC – Minimal Inhibitory Concentration (minimální inhibiční koncentrace)

BP – Break-point

ECV – Epidemiological Cut-off Value (epidemiologická cut-off hodnota)

PCR – Polymerase Chain Reaction (polymerázová řetězová reakce)

MALDI-TOF – Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time Of Flight
(hmotnostní spektrometrie s laserovou desorpcí a ionizací za účasti
matrice s průletovým analyzátozem)

ITS – Internal Transcribed Spacer

SEZNAM TABULEK

Tab. 1 Nejvýznamnější okolnosti, které disponují ke vzniku systémové mykózy	18
Tab. 2 Vlákňité mikroskopické houby podílející se na vzniku alergické reakce.	19
Tab. 3 Dělení mykotoxinů podle toxických účinků k cílovým orgánům.	20

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obr. 1 Potrét Jana Svatoplouka Presla (1791-1849)	12
Obr. 2 Schéma fylogeneze eukaryotních organismů s vyznačením říše hub (Fungi)	13
Obr. 3 Systém říše hub podle 9. vydání “Dictionary of fungi“ (Kirk <i>et al.</i> 2001), upravený podle učebnice “Sinice, řasy, houby, mechorosty a posobné organismy v současné biologii“)	14
Obr. 4 Hyfy mikromycet – septovaná a coenocytická.	21
Obr. 5 Vznim exospor u plísni	23
Obr. 6 Portrét Johanna Heinricha Friedricha Linka (1761-1851).	25
Obr. 7 Taxonomické schéma rod <i>Fusarium</i>	26
Obr. 8 Makrohabitus <i>Fusarium solani</i>	27
Obr. 9 Morfologie makrokonidií <i>Fusarium</i> spp.	28
Obr. 10 Morfologie mikrokonidií <i>Fusarium</i> spp.	28
Obr. 11 Umístění chlamydokonidií u <i>Fusarium</i> spp.	29
Obr. 12 Mikrohabitus <i>Fusarium solani</i>	29
Obr. 13 Perithecium s pravidelně uspořádanými vřecy a ostiolem.	30
Obr. 14 Kožní léze u pacienta s akutní lymfoblastickou leukémií.	31
Obr. 15 <i>Fusarium</i> spp. – nativní preparát	35
Obr. 16 Hyfy při fluorescenčním vyšetření pomocí Rylux BSU v KOH.	36
Obr. 17 Hyalohyfomykóza (<i>Fusarium</i> spp.) – histologické vyšetření biopsie kožní léze	36
Obr. 18 Mikrokultura (sklíčková kultura)	40
Obr. 19 Schéma jednotkového složení genu pro ribozomální DNA (rDNA)	43

POUŽITÁ LITERATURA

1. ŠILHÁNKOVÁ, Ludmila. *Mikrobiologie pro potravináře a biotechnology*. 3. oprav. a dopl. vyd. Praha: ACADEMIA, 2002, 363 s. ISBN 80-200-1024-6.
2. MALÍŘ, František a Vladimír OSTRÝ. *Vláknité mikromycety (plísně), mykotoxiny a zdraví člověka*. Vyd. 1. Brno: Národní centrum ošetrovatelství a nelékařských zdravotnických oborů, 2003. ISBN 80-701-3395-3.
3. OSTRÝ, Vladimír. *Vláknité mikroskopické houby (plísně), mykotoxiny a zdraví člověka*. 1. vyd. Praha: Státní zdravotní ústav, 1998. ISBN 80-707-1102-7.
4. PRESL, Jan Svatopluk. *Wšeobecný rostlinopis, čili: Popsání rostlin ve všelikém ohledu užitečných a škodlivých: Díl II*. Praha: Kronbergr a Řivnáč, 1846. Novočeská bibliothéka (Kronbergr a Řivnáč).
5. KOUKOL, Ondřej. Ach ty houby... Živa: Časopis pro popularizaci biologie. Praha: Academia, 2014, 62(2), XXXVIII. ISSN 0044-4812. Dostupné také z: <http://ziva.avcr.cz/files/ziva/pdf/ach-ty-houby.pdf>
6. Portréty osobností spjatých s muzeem: Jan Svatopluk Presl. In: *Mineralogické muzeum: Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy v Praze* [online]. [cit. 2018-04-29]. Dostupné z: <https://web.natur.cuni.cz/ugmnz/muzeum/muzeum/portrety/presl.html>
7. KLÁNOVÁ, Kateřina. *Plísně v domě a bytě: odstraňování a prevence*. Praha: Grada, 2013, 104 s. Profi. ISBN 978-80-247-4790-3.
8. FASSATIOVÁ, Olga. *Plísně a vláknité houby v technické mikrobiologii: (příručka k určování)*. 1. vyd. Praha: SNTL, 1979. Řada potravinářské literatury.
9. FRANC, Břetislav a Miroslav HEJZLAR. *Základy lékařské mikrobiologie: základy lékařské mykologie a laboratorní diagnostiky původců mykotických onemocnění*. Praha: Státní pedagogické nakladatelství, 1984, 62 s.
10. VOTAVA, Miroslav. *Lékařská mikrobiologie speciální*. Brno: Neptun, 2003, 495 s. ISBN 80-902-8966-5.
11. ADL, Sina M., Alastair G. B. SIMPSON, Christopher E. LANE, et al. The Revised Classification of Eukaryotes. *Journal of Eukaryotic Microbiology*. 2012, 59(5), 429-514. DOI: 10.1111/j.1550-7408.2012.00644.x. ISSN 10665234. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1550-7408.2012.00644.x>
12. Systém hub a "houbových organismů": poslední změna: 11. 3. 2008. In: HROUDA, Petr a Daniel DVOŘÁK. *Mykologie* [online]. Brno: Masarykova univerzita, Přírodovědecká fakulta, Ústav botaniky a zoologie [cit. 2017-10-01]. Dostupné z: <http://www.sci.muni.cz/botany/mycology/mykosyst.htm>
13. VOTAVA, Miroslav. *Lékařská mikrobiologie – vyšetřovací metody*. Brno: Neptun, 2010, 495 s. ISBN 978-80-86850-04-7.

14. HOLEC, Jan. Práce s typy v mykologii: 1. Základní pojmy a pravidla. *Mykologické listy: časopis České vědecké společnosti pro mykologii*. Praha: Česká vědecká společnost pro mykologii, 2014, (128), 36-49. ISSN 1213-5887. Dostupné také z: <http://types-nmp.cz/sites/types-nmp.cz/files/Holec.pdf>
15. KUBÁTOVÁ, Alena. *Mykologie (pro učitele): 5. přednáška Ascomycety (houby vřeckovýtrusné)* [online]. Praha: Přírodovědecká fakulta UK – Fakulta botaniky, 2016 [cit. 2017-09-16]. Dostupné z: <https://is.cuni.cz/studium/predmety/index.php?do=download&did=119156&kod=MB120P124>
16. ŠIMŮNEK, Jan. *Plísně a mykotoxiny* [online]. Brno, 2004 [cit. 2016-11-10]. Dostupné z: http://www.med.muni.cz/dokumenty/pdf/plisne_a_mykotoxiny.pdf
17. KUBÁTOVÁ, Alena. *Mikroskopické houby a jejich diagnostika. Význam v potravinářství, lékařství a průmyslu*. [online]. Přírodovědecká fakulta UK – Fakulta botaniky; Praha, 2018 [cit. 2018_4_27]. Dostupné z: https://botany.natur.cuni.cz/kubatova/U3V-Mykologie-2018/3_U3V_Mykologie_2018_Kubatova_Mikromycety.pdf
18. MCCARTHY, Charley G. P., David A. FITZPATRICK a Aaron P. MITCHELL. Phylogenomic Reconstruction of the Oomycete Phylogeny Derived from 37 Genomes. *MSphere*. 2017, 2(2), 1-17. DOI: 10.1128/mSphere.00095-17. ISSN 2379-5042. Dostupné také z: <http://msphere.asm.org/lookup/doi/10.1128/mSphere.00095-17>
19. CHUMCHALOVÁ, Jana, Miroslav NĚMEC, Ludmila KOTOUČKOVÁ, Zdena PÁČOVÁ, Dana SAVICKÁ, Alena KUBÁTOVÁ a Petra PATÁKOVÁ. *Miniatlas mikroorganismů*. 2001. Dostupné také z: <http://old.vscht.cz/main/soucasti/fakulty/fpbt/ostatni/miniatlas/uvod-h.htm>
20. VLKOVÁ, Eva, Vojtěch RADA a Jiří KILLER. *Potravinářská mikrobiologie*. 2. vyd. V Praze: Česká zemědělská univerzita, 2009, 168 s. ISBN 978-80-213-1988-2.
21. KALHOTKA, Libor. *Potravinářská mikrobiologie pro Zahradnickou fakultu: Díl 2. Speciální část*. Brno: Mendelova univerzita v Brně, 2014, 164 s. ISBN 978-80-7509-016-4.
22. BEDNÁŘ, Marek. *Lékařská mikrobiologie: bakteriologie, virologie, parazitologie*. Praha: Marvil, 1996, 558 s. ISBN 80-238-0297-6.
23. BUCHTA, Vladimír a kol. *Základy mikrobiologie a parazitologie pro farmaceuty*. 1. vyd. Praha: Karolinum, 1998. ISBN 80-718-4565-5.
24. BENEŠ, Jiří. *Infekční lékařství*. Praha: Galén, c2009. ISBN 978-80-7262-644-1.
25. KALHOTKA, Libor a Marta TESAŘOVÁ. *Potravinářská mikrobiologie pro Zahradnickou fakultu. Díl 1. Obecná část*. Brno: Mendelova univerzita v Brně, 2014, 117 s. ISBN 978-80-7509-017-1.

26. Fungi – Tissue and Cell Structure. In: *Tutorials Point: Simply Easy Learning* [online]. [cit. 2018-04-29]. Dostupné z: https://www.tutorialspoint.com/biological_classification/fungi_tissue_and_cell_structure.asp
27. BOOTH, C. *The genus Fusarium*. England: Commonwealth Mycological Institute, 1971, 237 s. ISBN 08-519-8046-5.
28. Heinrich Friedrich Link. In: *Wikipedia* [online]. [cit. 2018-04-29]. Dostupné z: https://de.wikipedia.org/wiki/Heinrich_Friedrich_Link
29. NELSON, Paul E., M. Cecilia DIGNANI a Elias J. ANAISSIE. Taxonomy, biology, and clinical aspects of *Fusarium* species. *Clinical Microbiology Reviews*. 1994, 7(4), 479-504. DOI: 10.1128/CMR.7.4.479. ISSN 0893-8512. Dostupné také z: <http://cmr.asm.org/lookup/doi/10.1128/CMR.7.4.479>
30. LESLIE, John F., Brett A. SUMMERELL. *The Fusarium Laboratory Manual*. Ames, Iowa: Blackwell Pub., 2006, 388 s. ISBN 08-138-1919-9.
31. PITT, John I. a Ailsa D. HOCKING. *Fungi and food spoilage*. 3rd ed. New York: Springer, 2009. ISBN 978-0387-92206-5.
32. Fusarium. In: *NCBI (National Center for Biotechnology Information)* [online]. [cit. 2018-04-29]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=Info&id=5506>
33. *Fytopatologie cvičení: Nejdůležitější rody Deuteromycetes* [online]. Brno: Agronomická fakulta – Mendelova univerzita [cit. 2018-04-29]. Dostupné z: http://web2.mendelu.cz/af_291_projekty2/vseo/print.php?page=1373&typ=html
34. KUBÁTOVÁ, Alena. Terminologický slovníček – mikroskopické houby. *Atlas mikroskopických saprotrofních hub (Ascomycota)* [online]. Praha: Katedra botaniky, Přírodovědecká fakulta UK, 2006. Dostupné z: <https://www.natur.cuni.cz/biologie/botanika/veda-a-vyzkum/atlas-mikroskopickyh-saprotrofnich-hub-ascomycota/5-terminol-slovnicek.pdf>
35. RICHARDSON, Malcolm D. a David W. WARNOCK. *Fungal infection: diagnosis and management*. 3rd ed. London: Blackwell Publishing, 2003, 366 s. ISBN 1-4051-15785-5.
36. EGBUTA, Mary, Mulunda MWANZA a Olubukola BABALOLA. Health Risks Associated with Exposure to Filamentous Fungi. *International Journal of Environmental Research and Public Health* [online]. 2017, 14(7). DOI: 10.3390/ijerph14070719. ISSN 1660-4601. Dostupné z: <http://www.mdpi.com/1660-4601/14/7/719>
37. CETKOVSKÝ, Petr a Michal KOUBA. *Diferenciální diagnostika plicních infiltrátů a pokroky v léčbě mykotických infekcí u imunokompromitovaných pacientů*. Praha: Triton, 2009. ISBN 978-80-7387-343-1.

38. NUCCI, M. a E. ANAISSIE. *Fusarium* Infections in Immunocompromised Patients. *Clinical Microbiology Reviews*. 2007, **20**(4), 695-704. DOI: 10.1128/CMR.00014-07. ISSN 0893-8512. Dostupné také z: <http://cmr.asm.org/cgi/doi/10.1128/CMR.00014-07>
39. DIGNANI, M.C. a E. ANAISSIE. Human fusariosis. *Clinical Microbiology and Infection* [online]. 2004, **10**, 67-75. DOI: 10.1111/j.1470-9465.2004.00845.x. ISSN 1198743x. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1198743X15300586>
40. KOCMANOVÁ, Iva a Zdeněk RÁČIL. Invazivní infekce způsobené vláknitými houbami a jejich mikrobiologická diagnostika. *Postgraduální medicína: Příloha 5 (Empirická a preemptivní antimykotická léčba u nemocných s hematologickými malignitami)*. Praha: Mladá fronta, 2010, **12**, 59-63. ISSN 1212-4184.
41. LIU, YI-SHENG, NING-CHI WANG, REN-HUA YE a WEI-YAO KAO. Disseminated *Fusarium* infection in a patient with acute lymphoblastic leukemia: A case report and review of the literature. *Oncology Letters*. 2014, **7**(2), 334-336. DOI: 10.3892/ol.2013.1738. ISSN 1792-1074. Dostupné také z: <https://www.spandidos-publications.com/10.3892/ol.2013.1738>
42. SUCHÝ, Pavel a Ivan HERZIG. *Plísňe a mykotoxiny: Prevence jejich vzniku a dekontaminace v krmivech*. Brno. Dostupné také z: http://www.bezpecnakrmiva.cz/soubory/2-studie_prof_suchoho.rtf
43. HAVRÁNKOVÁ, Hana a Jaroslava OVESNÁ. Geny biosyntézy trichothecenů u rodu *Fusarium*. *Chemické listy*. Praha, 2012, **106**(9), 818-825. ISSN 1213-7103. Dostupné také z: http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2012_09_818-825.pdf
44. PATOČKA, Jiří. *Vojenská toxikologie*. Praha: Grada, 2004, 178 s. ISBN 80-247-0608-3.
45. *IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans: List of Classifications* [online]. Lyon: IARC [cit. 2018-04-14]. Dostupné z: <http://monographs.iarc.fr/ENG/Classification/index.php>
46. BUCHTA, Vladimír, Petr HAMAL, Naděžda MALLÁTOVÁ, Iva KOCMANOVÁ, Vanda CHRENKOVÁ, Markéta ROUBALOVÁ a Petra OLÍŠAROVÁ. Nepodkročitelné minimum laboratorní diagnostiky invazivních mykotických infekcí – doporučení odborníků s podporou CELL a SLM JEP. *Postgraduální medicína: Příloha 5 (Empirická a preemptivní antimykotická léčba u nemocných s hematologickými malignitami)*. Praha: Mladá fronta, 2010, **12**, 76-81. ISSN 1212-4184.
47. MENCL, Karel. Praktické zkušenosti z mykologické laboratoře (názorný appendix). *Postgraduální medicína: Příloha 5 (Empirická a preemptivní antimykotická léčba u nemocných s hematologickými malignitami)*. Praha: Mladá fronta, 2010, **12**, 71-75. ISSN 1212-4184.

48. KOCMANOVÁ, Iva. *Lékařská mykologie: Diagnostika mykotických infekcí v mikrobiologické laboratoři* [online]. Brno: Masarykova univerzita, 2015 [cit. 2018-01-26]. Dostupné z: https://is.muni.cz/el/1411/jaro2015/BLKLM0422p/um/18_Mykologie.pdf
49. RÁČIL, Zdeněk, Iva KOCMANOVÁ, Leoš KŘEN, Lucie KŘIKAVOVÁ, Jiří MAYER a Barbora WEINBERGEROVÁ. Invazivní mykotické infekce u onkologických nemocných: změny v epidemiologii a diagnostice. *Postgraduální medicína*. Praha: Mladá fronta, 2007, 9(3), 240-251. ISSN 1212-4184.
50. ALEXANDER, Barbara D. a Michael A. PFALLER. Contemporary Tools for the Diagnosis and Management of Invasive Mycoses. *Clinical Infectious Diseases*. 2006, 43(Supplement 1), 15-27. DOI: 10.1086/504491. ISSN 1537-6591. Dostupné také z: https://academic.oup.com/cid/article/43/Supplement_1/S15/318380
51. GREENWOOD, David, Richard C. B. SLACK, John F. PEUTHERER a kolektiv. *Lékařská mikrobiologie: přehled infekčních onemocnění: patogeneze, imunita, laboratorní diagnostika a epidemiologie*. Praha: Grada, 1999, 686 s. ISBN 80-716-9365-0.
52. PEREIRA, Graziella Hanna, Derlene Attili DE ANGELIS, Roosecelis Araujo BRASIL, Marilena DOS ANJOS MARTINS, Dulcilena DE MATOS CASTRO E SILVA, Maria Walderez SZESZS a Marcia DE SOUZA CARVALHO MELHEM. Disseminated Amphotericin-Resistant Fusariosis in Acute Leukemia Patients: Report of Two Cases. *Mycopathologia*. 2013, 175(1-2), 107-114. DOI: 10.1007/s11046-012-9585-0. ISBN 10.1007/s11046-012-9585-0. ISSN 1573-0832. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/s11046-012-9585-0>
53. JÍLEK, Petr, Vladimír BUCHTA, Petra KUBANOVÁ a Miroslav FÖRSTL. *Úvod do mikrobiologických vyšetřovacích metod ve zdravotnictví*. Praha: Karolinum, 2002, 104 s. Učební texty Univerzity Karlovy v Praze. ISBN 80-246-0459-0.
54. MALLÁTOVÁ, Naděžda a Karel MENCL. Laboratorní diagnostika invazivní kandidózy. *Postgraduální medicína: Příloha 5 (Empirická a preemptivní antimykotická léčba u nemocných s hematologickými malignitami)*. Praha: Mladá fronta, 2010, 12, 51-58. ISSN 1212-4184.
55. NĚMCOVÁ, Dana. *SOP – Vyšetření pomocí automatického kultivačního systému BacT/Alert*. Oddělení klinické mikrobiologie (OKM), Institut klinické a experimentální medicíny (IKEM), Praha. Dostupné také z: https://www2.ikem.cz/plm_lp/HVEZDAXCWO.htm
56. BAŠKOVÁ, Lenka a Vladimír BUCHTA. Laboratory diagnostics of invasive fungal infections an overview with emphasis on molecular approach. *Folia Microbiologica*. 2012, 57(5), 421-430. DOI: 10.1007/s12223-012-0152-3. ISSN 0015-5632. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/s12223-012-0152-3>

57. MALLÁTOVÁ, Naděžda, Petr HAMAL, Iva KOČMANOVÁ a Vladimír BUCHTA. Testování citlivosti mikromycet k antimykotikům in vitro u imunosuprimovaných pacientů – doporučení odborníků s podporou CELL a SLM ČLS JEP. *Postgraduální medicína: Příloha 5 - Empirická a cílená antibiotická léčba u nemocných s hematologickými malignitami*. Praha: Mladá fronta, 2011, **13**(příloha 5), 51-65. ISSN 1212-4184.
58. MALLÁTOVÁ, Naděžda. Stanovení citlivosti mikromycet k antimykotikům a interpretace výsledků. *Klinická mikrobiologie a infekční lékařství*. Praha: Trios, 2007, **13**(4), 151-155. ISSN 1211-264X.
59. CLSI. *Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Filamentous Fungi; Approved standard – Second edition*. CLSI document M38-A2. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2008.
60. EUCAST Technical Note on the method for the determination of broth dilution minimum inhibitory concentrations of antifungal agents for conidia-forming moulds. *Clinical Microbiology and Infection*. 2008, **14**(10), 982-984. DOI: 10.1111/j.1469-0691.2008.02086.x. ISSN 1198743x. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1198743X14610119>
61. AL-HATMI, Abdullah M. S., Ilse CURFS-BREUKER, G. Sybren DE HOOG, Jacques F. MEIS a Paul E. VERWEIJ. Antifungal Susceptibility Testing of *Fusarium*: A Practical Approach. *Journal of Fungi*. 2017, **3**(4). DOI: 10.3390/jof3020019. ISSN 2309-608x. Dostupné také z: <http://www.mdpi.com/2309-608X/3/2/19>
62. *EUCAST definitions of clinical breakpoints and epidemiological cut off values*. European committee on antimicrobial susceptibility testing (EUCAST). Dostupné také z: http://www.eucast.org/clinical_breakpoints/
63. *MIKROSKOPICKÉ HOUBY cvičení laboratorní technologie kryptogamologie: Příprava mikrokultury (sklíčkové kultury)* [online]. 2017, s. 1-32 [cit. 2018-04-29]. Dostupné z: https://is.muni.cz/el/1431/jaro2017/Bi3390c/um/Lekarska_mykologie_cviceni_2_017.pdf
64. TORTORANO, A. M., M. C. ESPOSTO, A. PRIGITANO, A. GRANCINI, C. OSSI, C. CAVANNA a G. L. CASCIO. Cross-Reactivity of *Fusarium* spp. in the Aspergillus Galactomannan Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. *Journal of Clinical Microbiology*. 2012, **50**(3), 1051-1053. DOI: 10.1128/JCM.05946-11. ISSN 0095-1137. Dostupné také z: <http://jcm.asm.org/cgi/doi/10.1128/JCM.05946-11>
65. BEJDÁK, Petr, Martina LENGEROVÁ, Dita PALOUŠOVÁ, Pavlína VOLFOVÁ, Iva KOČMANOVÁ, Jiří MAYER a Zdeněk RÁČIL. Detekce a identifikace původců mykotických infekcí způsobených vláknitými houbami pomocí metod molekulární genetiky. *Klinická mikrobiologie a infekční lékařství*. Praha: TRIOS spol. s.r.o, 2012, **18**(4). ISSN 1211-264X.

66. VITÁČKOVÁ, Petra. *Průkaz rezistence na echinokandinová antimykotika u Candida sp., pomocí molekulárně biologických metod*. Praha: Univerzita Karlova, 2. lékařská fakulta, Ústav lékařské mikrobiologie, 2014. 51 s. Vedoucí diplomové práce MUDr. Vanda Chrenková.
67. SANGUINETTI, Maurizio, Brunella POSTERARO a Colleen Suzanne KRAFT. Identification of Molds by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry. *Journal of Clinical Microbiology*. 2017, **55**(2), 369-379. DOI: 10.1128/JCM.01640-16. ISSN 0095-1137. Dostupné také z: <http://jcm.asm.org/lookup/doi/10.1128/JCM.01640-16>
68. SCHARFEN, Josef. *MALDI-TOF v klinické mikrobiologii*. Pracovní skupina pro správnou laboratorní praxi Společnost pro lékařskou mikrobiologii ČLS JEP. 2016. Dostupné také z: http://www.splm.cz/dokumenty/prednaska_502.pdf
69. SCHULTHESS, B., R. LEDERMANN, F. MOUTTET, A. ZBINDEN, G. V. BLOEMBERG, E. C. BOTTGER a M. HOMBACH. Use of the Bruker MALDI Biotyper for Identification of Molds in the Clinical Mycology Laboratory. *Journal of Clinical Microbiology*. 2014, **52**(8), 2797-2803. DOI: 10.1128/JCM.00049-14. ISBN 10.1128/JCM.00049-14. Dostupné také z: <http://jcm.asm.org/cgi/doi/10.1128/JCM.00049-14>
70. TORTORANO, A.M., M. RICHARDSON, E. ROILIDES, et al. ESCMID and ECMM joint guidelines on diagnosis and management of hyalohyphomycosis: *Fusarium* spp., *Scedosporium* spp. and others. *Clinical Microbiology and Infection*. 2014, **20**(Suppl. 3), 27-46. DOI: 10.1111/1469-0691.12465. ISSN 1198743X. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1198743X14602299>
71. VAN DIEPENINGEN, Anne D., Balázs BRANKOVICS, Jearidienne ILTES, Theo A. J. VAN DER LEE a Cees WAALWIJK. Diagnosis of *Fusarium* Infections: Approaches to Identification by the Clinical Mycology Laboratory. *Current Fungal Infection Reports*. 2015, **9**(3), 135-143. DOI: 10.1007/s12281-015-0225-2. ISSN 1936-3761. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/s12281-015-0225-2>
72. HRNČÍŘOVÁ, Kristýna, Martina LENGEROVÁ, Zdeněk RÁČIL, Iva KOČMANOVÁ a Jiří MAYER. Molekulárněbiologická diagnostika invazivních mykotických infekcí vyvolaných vzácnými vláknitými houbami. *Postgraduální medicína: Mimořádná příloha 10/2 - Antimykotická profylaxe u nemocných s hematologickými malignitami a molekulárněbiologická diagnostika invazivních mykotických infekcí*. Praha: Mladá fronta, 2009, **11**, 53-59. ISSN 1212-4184.