

ZÁPADOČESKÁ UNIVERZITA V PLZNI
FAKULTA ZDRAVOTNICKÝCH STUDIÍ

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

2022

Veronika Motejzíkova

FAKULTA ZDRAVOTNICKÝCH STUDIÍ

Studijní program: Specializace ve zdravotnictví B5345

Veronika Motežníková

Studijní obor: Laboratorní diagnostika ve zdravotnictví (B0914P30004)

**LABORATORNÍ DIAGNOSTIKA MIKROMYCET
VE FN PLZEŇ SE ZAMĚŘENÍM NA DERMATOFYTY**

Bakalářská práce

Vedoucí práce: RNDr. Karel Fajfrlík Ph.D.

PLZEŇ 2022

Na této straně se v tištěné verzi nachází zadání bakalářské práce.

Na této straně se v tištěné verzi nachází zadání bakalářské práce.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně a všechny použité prameny jsem uvedla v seznamu použitých zdrojů.

V Plzni dne 31. 3. 2022

.....

vlastnoruční podpis

Abstrakt

Příjmení a jméno: Motežčíková Veronika

Katedra: Katedra záchranářství, diagnostických oborů a veřejného zdravotnictví

Název práce: Laboratorní diagnostika mikromycet ve FN Plzeň se zaměřením na dermatofyty

Vedoucí práce: RNDr. Karel Fajfrlík, Ph.D.

Počet stran – číslované: 53

Počet stran – nečíslované: 12

Počet příloh: 1

Počet titulů použité literatury: 24

Klíčová slova: mikromycety, dermatofyty, laboratorní diagnostika

Souhrn:

Bakalářská práce se zabývá laboratorní diagnostikou a výskytem dermatofyt ve Fakultní nemocnici Plzeň. Práce je rozdělena na teoretickou a praktickou část. Teoretická část popisuje houby všeobecně, jejich rozmnožování a třídění, onemocnění a následně druhy dermatofyt, dermatofytózy a léčbu infekčního onemocnění kůže. Teoretická část také popisuje odběr materiálu a všeobecnou laboratorní diagnostiku. Praktická část je rozdělena na laboratorní diagnostiku dermatofyt na Ústavu mikrobiologie FN Plzeň a statistické zhodnocení výskytu. Sledovaný soubor pozitivně testovaných vzorků pacientů na dermatofyty za období 2019 až 2021 je statisticky zhodnocen. Výsledky jsou graficky znázorněny.

Abstract

Surname and name: MotejzíkOVá Veronika

Department: Department of Rescue Services, Diagnostic Fields and Public Health

Title of thesis: Laboratory diagnostics of micromycetes in the University Hospital Pilsen with the main focus on dermatophytes.

Consultant: RNDr. Karel Fajfrlík, Ph.D.

Number of pages – numbered: 53

Number of pages – unnumbered: 12

Number of appendices: 1

Number of literature items used: 24

Keywords: micromycetes, dermatophytes, laboratory diagnostics

Summary:

The bachelor's thesis deals with laboratory diagnostics and the occurrence of dermatophytes in the University Hospital Pilsen. The work is divided into theoretical and practical part. The theoretical part describes fungi in general, their reproduction and classification, diseases and subsequently types of dermatophytes, dermatophytosis and treatment of infectious skin diseases. The theoretical part also describes material collection and general laboratory diagnostics. The practical part is divided into laboratory diagnostics of dermatophytes at the Department of Microbiology, University Hospital Pilsen and statistical evaluation of the occurrence. The monitored set of positively tested patient samples for dermatophytes over the period 2019 to 2021 is statistically evaluated. The results are shown graphically.

Poděkování

Děkuji RNDr. Karlu Fajfrlíkovi, Ph.D. za odborné vedení práce, poskytování rad a materiálů. Dále děkuji Ústavu mikrobiologie FN Plzeň za poskytnutí údajů ke statistickému vyhodnocení, rad a materiálů.

OBSAH

SEZNAM ZKRATEK	12
ÚVOD.....	13
TEORETICKÁ ČÁST	14
1 VLASTNOSTI HUB	15
1.1 Morfologie	15
1.2 Rozmnožování	15
1.3 Patogenita.....	16
1.4 Třídění mikromycet	17
2 ONEMOCNĚNÍ VYVOLANÁ HOUBAMI.....	18
2.1 Mykózy	18
2.2 Mykotoxikózy	18
2.3 Mykoalergózy	19
3 DERMATOFYTA	20
3.1 Dermatofytóza	21
3.1.1 <i>Tinea pedis</i>	22
3.1.2 <i>Tinea inguinalis (Tinea cruris)</i>	22
3.1.3 <i>Tinea manus</i>	23
3.1.4 <i>Tinea barbae</i>	23
3.1.5 <i>Tinea capitis</i>	23
3.1.6 <i>Tinea unguium (onychomykóza)</i>	24
3.1.7 <i>Tinea corporis</i>	24
3.1.8 Mykid	24
3.2 Léčba dermatofytóz	25
3.2.1 Antimykotika.....	25
3.3 Nejčastější druhy dermatofyt.....	27
3.3.1 <i>Trichophyton rubrum</i>	27
3.3.2 <i>Microsporum canis</i>	29
3.3.3 <i>Trichophyton benhamiae</i> (dříve <i>Arthroderma benhamiae</i>).....	30
3.3.4 <i>Trichophyton interdigitale</i>	31
3.3.5 <i>Trichophyton tonsurans</i>	32
4 ODBĚR BIOLOGICKÉHO MATERIÁLU NA MYKOLOGICKÉ VYŠETŘENÍ	33
4.1 Nástroje a pomůcky	33
4.2 Techniky odběru	33
4.3 Chyby odběru.....	34
4.4 Odběr nejčastějšího materiálu při podezření na dermatofyty	34

4.5	Komerčně dodávané nádoby.....	35
5	OBECNÁ LABORATORNÍ DIAGNOSTIKA MIKROMYCET	36
5.1	Mikroskopické vyšetření.....	36
5.1.1	Louhový preparát.....	36
5.1.2	Barvicí metody	36
5.1.3	Fluorescenční mikroskopie.....	37
5.2	Kultivační vyšetření	37
5.3	Stanovení citlivosti k antimykotikům	38
5.4	Histopatologické vyšetření	38
5.5	Průkaz houbových antigenů a protilátek.....	38
5.6	Molekulárně-biologické metody	39
	PRAKTICKÁ ČÁST	40
6	HLAVNÍ A DÍLČÍ CÍL PRÁCE	41
6.1	Hlavní cíl.....	41
6.2	Dílčí cíl	41
7	CHARAKTERISTIKA SLEDOVANÉHO SOUBORU	42
8	VÝZKUMNÉ OTÁZKY	43
9	LABORATORNÍ DIAGNOSTIKA VE FN PLZEŇ	44
9.1	Mikroskopické vyšetření.....	44
9.2	Kultivace dermatofyt	44
9.3	Identifikace dermatofyt pomocí MALDI-TOF.....	45
9.3.1	Postup při diagnostice dermatofyt	46
9.4	Stanovení citlivosti k antimykotikům	46
10	ANALÝZA A INTERPRETACE VÝSLEDKŮ	47
10.1	VO 1.: Jak častý byl výskyt dermatofyt v letech 2019 až 2021 na Ústavu mikrobiologie FN Plzeň?.....	47
10.2	VO 2.: Hraje věk a pohlaví roli ve výskytu dermatofyt v populaci?	48
10.3	VO 3.: Jaké jsou nejčastější lokalizace výskytu dermatofyt na lidském těle? ..	49
10.4	VO 4.: Jaké druhy dermatofyt se vyskytují u jednotlivých pohlaví?	50
10.5	VO 5.: Jaký vztah s onemocněním má <i>Trichophyton benhamiae</i> (ADBE) po kontaktu s domácím zvířetem?	52
	DISKUZE.....	54
	ZÁVĚR.....	56
	SEZNAM LITERATURY.....	58
	SEZNAM GRAFŮ	61
	SEZNAM OBRÁZKŮ	62
	SEZNAM TABULEK	63
	SEZNAM PŘÍLOH	64

SEZNAM ZKRATEK

FN	Fakultní nemocnice
LIS	Laboratorní informační systém
SAB	Sabouraudův agar
KOH	Hydroxid draselný
PAS.....	Periodic Acid Schiff
ELISA.....	Enzyme-linked immuno sorbent assay (enzymová analýza za použití pevné fáze)
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
PCR.....	Polymerase chain reaction (polymerázová řetězová reakce)
MALDI-TOF	Matrix assisted laser desorption ionization – time of flight
TRRU	<i>Trichophyton rubrum</i>
ADBE	<i>Trichophyton benhamiae</i> (dříve <i>Arthroderma benhamiae</i>)
MCCA	<i>Microsporum canis</i>
TRMI	<i>Trichophyton interdigitale</i>
TRSC	<i>Trichophyton species</i>
TRTO.....	<i>Trichophyton tonsurans</i>

ÚVOD

Houby jsou eukaryotické organismy, které nejsou schopny fotosyntézy, díky nepřítomnosti chlorofylu. Mikromycety jsou houby mikroskopických rozměrů a jsou rozdělovány na vláknité houby a kvasinky. Vlákňité houby jsou tvořeny vlákny neboli hyfami a můžeme je rozdělit na rod *Aspergillus*, rod *Penicilium*, dále skupina zygomycet, dimorfní houby a dermatofyty. Mikromycety jsou schopné vyvolávat tři duhy onemocnění a to mykózy, mykotoxikózy a mykoalergózy.

Dermatofyty jsou houby, které mají afinitu ke keratinu a jsou označovány jako plísň. Vyvolávají nejčastější infekční onemocnění člověka nazývané dermatofytóza neboli tinea. Můžeme je rozdělit do tří hlavních skupin, a to na antropofilní, zoofilní a geofilní, kam jsou řazeny jednotlivé druhy. Nejčastěji zastoupeným druhem je *Trichophyton rubrum*, dále *Trichophyton benhamiae* a *Microsporum canis*.

Dermatofytóza je onemocnění vyskytující se na kůži, nehtech nebo ve vlasech. Na vývoj infekčního onemocnění má vliv věk, pohlaví, zdravotní stav a hygienické návyky pacienta. Příznakem je nejčastěji svědění nebo suchá olupující se kůže. K léčbě jsou využívána antimykotika ve formě krému, mastí, tablet, nebo dokonce podání pomocí injekční stříkačky.

Odběr materiálu na mykologické vyšetření dermatofyt se provádí z napadených míst pomocí skalpelu pro seškrab kožních šupin nebo pomocí navlhčené výtěrky z vlhkého ložiska.

Laboratorní diagnostika v dnešní době spočívá v provedení kultivačního a mikroskopického vyšetření. Na mikroskopické vyšetření se vytvoří tzv. louhový preparát, který se následně pozoruje pod světelným mikroskopem. Toto vyšetření slouží jako rychlé orientační vyšetření, které je prováděno první den po přijmutí vzorku do laboratoře. Kultivační vyšetření je prováděno na kultivačních půdách, přesněji na Sabouraudově agaru s přídavkem antibakteriálních látek jako je cykloheximid nebo chloramfenikol. Samotná kultivace trvá několik týdnů a následně probíhá identifikace narostlého dermatofyta, například za pomoci MALDI-TOF hmotnostní spektrometrie.

TEORETICKÁ ČÁST

1 VLASTNOSTI HUB

Houby patří mezi eukaryotické organismy. Dříve se řadily do říše rostlin, nyní je kvůli rozdílným vlastnostem vytvořena vlastní říše, a to říše *Fungi*. U hub rozdíl spočívá především v nepřítomnosti zeleného pigmentu chlorofylu, který zajišťuje fotosyntézu. Jsou tedy označovány jako organismy saprofytické, tzv. organismy, které získávají energii z organických látek odumřelých organismů nebo parazitické. Houby mikroskopických rozměrů jsou nazývány mikromycety. Mohou být patogeny rostlin, zvířat i člověka. [1]

Buněčná stěna hub, která chrání před osmotickou lýzou, tvoří vnější kostru a ochranný faktor je tvořen polysacharidem chininem. Dále obsahuje manany a glukany. Ty jsou významné pro laboratorní diagnostiku mikromycet, protože se na ně některá barviva dobře specificky vážou. Cytoplazmatická membrána obsahuje steroidní látky, především ergosterol, kterého se využívá pro antimykotickou léčbu při infekcích. [1, 2, 3]

1.1 Morfologie

Houby můžeme rozdělit do dvou skupin na blastokonidie a hyfy. Blastokonidie jsou buňky oválného nebo kulatého tvaru. Zatím co hyfy jsou tubulární, různě větvené nebo mohou obsahovat přepážku tzv. septa. Soubor vláken hyf je označováno jako mycelium (podhoubí), které může být vegetativní nebo vzdušné. Některé houby jsou schopné dimorfismu a nazýváme je dimorfní mikromycety. Existují jak ve formě blastokonidií, tak hyf a na základně vnějších podmínek mění svoji morfologii. [3]

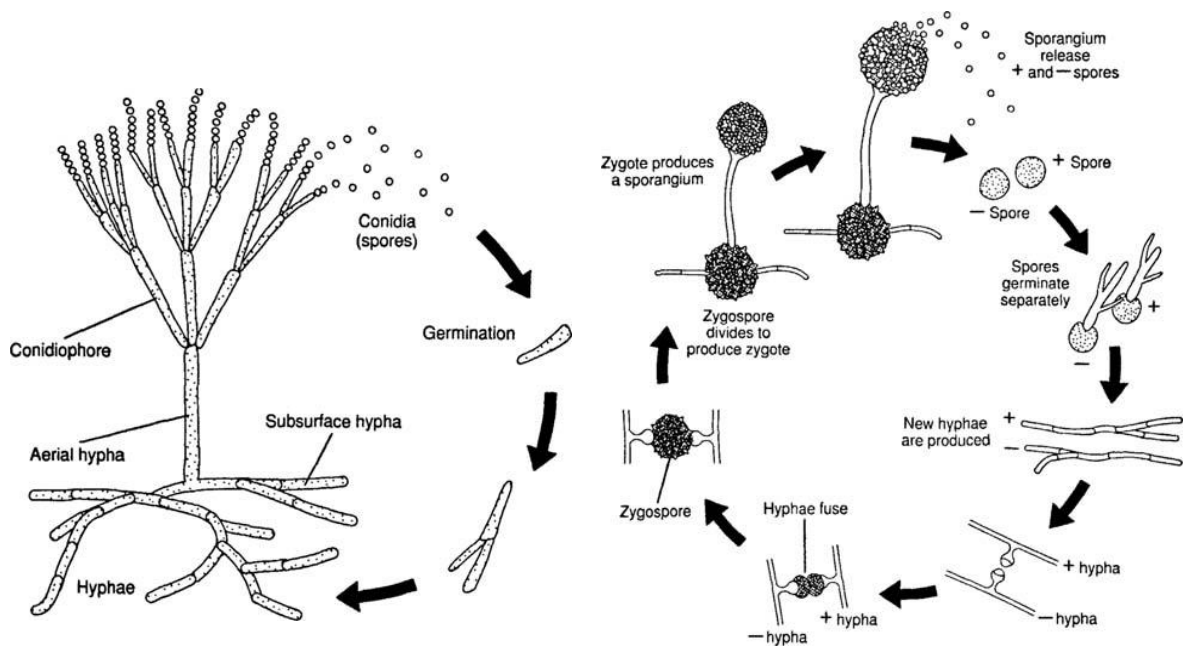
1.2 Rozmnožování

Mikromycety se mohou rozmnožovat pohlavním i nepohlavním způsobem, ale u velkého množství významných hub v lékařství nejsou pohlavní stádia zatím prokázána. [3]

Pohlavní rozmnožování probíhá jednou ročně a bývá to nejčastěji na podzim. Skládá se ze tří fází a to plazmogamie, karyogamie a meiózy stejně jako u ostatních organismů. [4]

Zejména u parazitických hub je častější nepohlavní způsob rozmnožování. Uskutečňuje se během vegetačního období několikrát. Nepohlavní rozmnožování můžeme rozdělit na několik forem. U vláknitých hub je to často fragmentace. Jedná se o jednoduchý způsob rozmnožování, kdy fragmenty vláken jsou odděleny od mycelia prorůstajícího daným substrátem. Pro kvasinky je charakteristické pučení, kdy se jádro mateřské buňky rozdělí

a jedno přestoupí do buňky dceřiné. Nejčtenějším způsobem nepohlavního rozmnožování je tvorba výtrusů tzv. konidií. [4]



Obrázek 1: Nepohlavní rozmnožování
(převzato z [22])

Obrázek 2: Pohlavní rozmnožování
(převzato z [22])

1.3 Patogenita

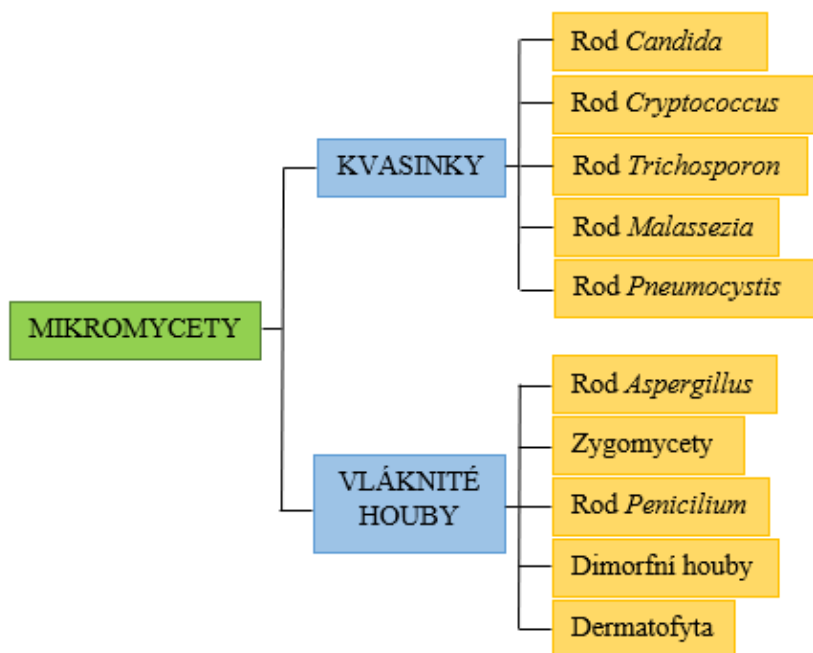
Rozvoj mykotické infekce nastává především u jedinců, kteří mají oslabený imunitní systém nebo poškozené obranné mechanismy. Mikromycety tedy patří mezi tzv. oportunní patogeny. Nejčastějšími oportunními mykotickými patogeny jsou rody *Aspergillus* a *Candida*. Zdravý jedinec (tzv. imunokompetentní jedinec) je díky kontaktu s endogenními či exogenními mikromycetami vysoce odolný k mykotickým infekcím. Pouze dermatofyty a čtyři druhy dimorfních mikromycet (*Blastomyces dermatitidis*, *Histoplasma capsulatum*, *Coccidioides immitis*) jsou schopné vyvolat infekci i u zdravého jedince a nazýváme je primárně patogenní mikromycety. [3]

1.4 Třídění mikromycet

Mikromycety rozdělujeme na dvě základní morfologické jednotky, a to vláknité houby a kvasinky. [5]

Kvasinky získaly název díky své fermentační aktivitě. Produkty jejich metabolismu jsou hojně využívány v potravinářském průmyslu při výrobě pečiva, piva, kysaných mléčných nápojů a dalších. Mají oválný nebo kulatý tvar buňky a rozmnožují se pučením. V malém množství nejsou pro lidský organismus škodlivé a jsou součástí normální mikroflóry. Mezi kvasinky řadíme rod *Candida*, *Cryptococcus*, *Trichosporon*, *Malassezia*, a *Pneumocystis*. [5]

Vláknité houby jsou tvořeny vlákny nazývané hyfy. Můžeme je rozdělit například do rodů jako je *Aspergillus*, *Penicilium*, dále skupina zygomycety, dimorfní houby a dermatofyta. [5]



Obrázek 3: Třídění mikromycet (vytvořeno dle [5])

2 ONEMOCNĚNÍ VYVOLANÁ HOUBAMI

2.1 Mykózy

Jedná se o infekce vyvolané mikromycetami. Vyskytují se nejčastěji u oslabených pacientů. Houby jsou schopné invaze do hlubších vrstev tkání. Mykózy rozdělujeme na povrchové, podkožní a systémové. [6]

Povrchové mykózy postihují kůži, její adnexa (vlasy, chlupy, nehty) a sliznice. Průběh onemocnění je většinou mírný. Snadno se diagnostikují a dobře reagují na léčbu. Podkožní infekce zasahují do škáry, podkoží a kosti. Tento typ infekce nalézáme především v tropických a subtropických oblastech. Systémové mykózy postihují vnitřní orgány a orgánové systémy. [5]

K nákaze může dojít endogenní cestou, přemnožením vlastních kolonizujících kvasinek v organismu, nebo exogenní cestou, nákazou z vnějšího prostředí. Nejčastěji po inhalaci spor, kdy jsou jako první zasaženy plíce nebo nosní dutiny. [5, 6]

2.2 Mykotoxikózy

Jedná se o onemocnění, které je způsobené mykotoxiny. Mykotoxiny jsou sekundárními metabolity některých vláknitých hub, často hub pro člověka nepatogenních. Zatím je zjištěno okolo 150 druhů hub, které mohou vytvářet 500 variant toxických metabolitů. Mezi producenty řadíme rod *Aspergillus*, *Penicilium* a *Fusarium*. K intoxikaci nejčastěji dochází alimentární cestou, tj. požitím napadené potraviny plísní (ovoce, ořechy, koření), nebo živočišných produktů jako například maso a mléko. Často jsou hospodářská zvířata krmena plesnivým krmivem. [5, 6]

V endemických oblastech u člověka mykotoxiny při požití vysoké dávky vyvolávají akutní stavy, které si můžeme představit jako otravy. V ČR se jedná spíše o chronické intoxikace, které vznikají při požívání menších dávek za delší časový úsek. [6]

Mezi nejvýznamnější mykotoxiny řadíme ergotamin, aflatoxin, ochratoxin, citricin a patulin. Ergotamin je alkaloid produkovaný paličkovicí nachovou (*Claviceps purpurea*), vyskytující se nejčastěji na obilovinách, jako tzv. námel. Vyvolává otoky, halucinace a gangrény. Aflatoxin je produkován plísní *Aspergillus flavus*, vyskytující se nejčastěji na obilovinách a burských oříšcích. Je hepatotoxický, může způsobit až maligní nádor jater. Ochratoxiny nalezneme nejčastěji u rodu *Aspergillus* a *Penicilium*. Působí nefrotoxicky

a karcinogenně. Citrinin je nefrotoxický a hepatotoxický. Patulin je mykotoxin z hnilých jablek, působí karcinogenně a imunosupresivně. [5]

2.3 Mykoalergózy

Jedná se o hypersenzitivní reakce, které jsou vyvolány vysokou koncentrací houbových spor například rodů *Alternaria*, *Cladosporium*, *Aspergillus*, *Penicillium* v prostředí. Spory jsou alergenem, na které je vnímavá osoba přecitlivělá. Přecitlivělost se projevuje jako alergická rýma, astma bronchiale až alergická bronchopulmonální aspergilóza. Kolonizace dýchacích cest sporami hub vyvolává permanentní imunopatologickou reakci, která vzniká v plicních alveolech a důsledkem může být až plicní fibróza. [6]

V dermatologii se vyskytují alergické nebo hyperalergické kožní reakce, které reagují na infekci nohou způsobenou dermatofyty, kdy v místech vzdálených od místa infekce vzniká vyrážka, která neobsahuje žádné mikromycety. [6]

3 DERMATOFYTA

Jedná se o vláknité houby, které mají afinitu ke keratinu a bývají označovány jako plísně. Taxonomie je velmi náročná a nepřehledná, díky jejich složitým životním cyklům, střídání nepohlavního a pohlavního stádia. V minulosti bylo navrženo mnoho jmen, která byla většinou upravena nebo úplně vypuštěna. Názvosloví bylo dříve duální, kdy pro rozmnožovací stádia jednoho organismu byly využívány dva názvy. Až po zavedení molekulárně genetických metod, byla taxonomie dermatofytů zcela pozmeněna. V dnešní době má význam přibližně 60 druhů dermatofyt, které řadíme do rodů *Trichophyton* (16), rod *Nannizzia* (9), rod *Arthroderma* (21), *Epidermophyton* (1), *Microsporum* (3), *Lophophyton* (1) a *Ctenomyces* (1). [7, 8]

Infekce (dermatofytóza) je nejčastějším infekčním onemocněním člověka. Část dermatofyt se vyskytuje celosvětově a část jen v určitých oblastech. Dermatofyty dělíme na antropofilní, zoofilní a geofilní. Antropofilní se přenášejí z člověka na člověka. Zoofilní houby se přenášejí především z domácích zvířat na člověka. Geofilní se vyskytují v půdě a přenos na člověka je velmi vzácný. [6, 9]

Je potvrzeno, že alespoň u 30 % obyvatelstva v ekonomicky vyspělých zemích se během života vyskytne onemocnění způsobené dermatofyty. V rozvojových zemích se udává 70 % obyvatelstva. [7]

Tabulka 1: Rozdělení dermatofyt, tučně vyznačeny druhy vyskytující se na našem území (převzato z [6])

ANTROPOFILNÍ	ZOOFILNÍ	GEOFILNÍ
<i>Epidermophytum floccosum</i>	<i>Microsporum canis</i>	<i>Arthroderma eboreum</i>
<i>Microsporum audouinii</i>	<i>Paraphyton mirabile</i>	<i>Arthroderma insingulare</i>
<i>Microsporum ferrugineum</i>	<i>Trichophyton benhamiae</i>	<i>Arthroderma melis</i>
<i>Trichophyton concentricum</i>	<i>Trichophyton bullosum</i>	<i>Arthroderma onychocola</i>
<i>Trichophyton interdigitale</i>	<i>Trichophyton equinum</i>	<i>Arthroderma quadrifidum</i>
<i>Trichophyton rubrum</i>	<i>Trichophyton erinacei</i>	<i>Nannizzia aenigmatica</i>
<i>Trichophyton schoenleinii</i>	<i>Trichophyton eriotrephon</i>	<i>Nannizzia corniculata</i>
<i>Trichophyton soudanense</i>	<i>Trichophyton Interdigitale</i>	<i>Nannizzia duboisii</i>
<i>Trichophyton tonsurans</i>	<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	<i>Nannizzia fulva</i>
<i>Trichophyton violaceum</i>	<i>Trichophyton quinckeanum</i>	<i>Nannizzia gypsea</i>
	<i>Trichophyton simii</i>	<i>Nannizzia incurvata</i>
	<i>Trichophyton verrucosum</i>	<i>Nannizzia nana</i>
		<i>Nannizzia perplicata</i>
		<i>Nannizzia persicolor</i>
		<i>Nannizzia praecox</i>
		<i>Trichophyton terrestre</i>

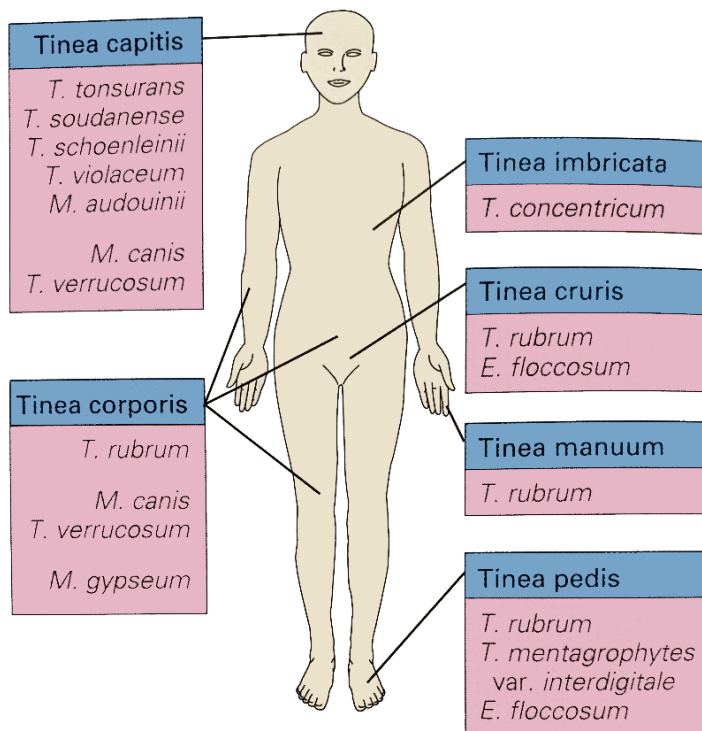
3.1 Dermatofytóza

Infekční onemocnění způsobené dermatofyty je nazýváno dermatofytóza neboli *tinea* (červ). Dříve se myslelo, že je onemocnění vyvoláváno červovitými parazity, protože měly kruhový tvar lézí. Nejčastěji se vyskytuje na povrchu kůže, na nehtech a ve vlasech. Infekce vzniká stykem s dlouho přežívajícími artrosporami. Jedná se o tlustostěnné buňky, které jsou tvořené hyfami dermatofytů. Pro vznik a rozvoj kožní infekce má význam věk, pohlaví, zdravotní stav pacienta, prostředí pro růst a vlastnosti hub. [10, 11]

Klinickým příznakem bývá svědění různé intenzity, suchá a olupující se kůže, vypadávání vlasů. [10]

Onemocnění se diagnostikuje mikroskopickým a kultivačním vyšetřením, podrobněji popsáno v praktické části bakalářské práce. [9]

K léčbě se používají antimykotika ve formě krémů, mastí, roztoků, kapslí, tablet nebo formou injekcí. Léčba může trvat několik týdnů až měsíců. Většina dermatofytóz se léčí lokálními antimykotiky. Těžší infekce však vyžadují systémovou léčbu. [9, 10]



Obrázek 4: *Tinea* vyskytující se na jednotlivých částech těla a příklady dermatofyt (převzato z [10])

3.1.1 *Tinea pedis*

Kožní infekční onemocnění chronického průběhu vyskytující se mezi prsty nohou především mužů. Vyvolávané nejčastěji dermatofyty *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton interdigitale*. Spory těchto vláknitých hub jsou velmi odolné. Nejčastěji obývají vlhké a teplé prostředí, jako například boty, koupelny, bazény. Zde mohou přežívat až několik let. Společně se špatnou hygienou, zvýšeným pocením a poruchou prokrvení končetin, mohou způsobovat závažná onemocnění. [9]

Ve většině případů jsou postihovány obě nohy, a to ve 3 klinických formách. První neboli forma interdigitální se projevuje zčervenáním a olupováním kůže. Postupně dochází k bělání, svědění a praskání kůže, nejčastěji ve 4. meziprstí. U této formy odlišujeme intertriginózní dermatitidu, která je komplikovaná nejčastěji gramnegativními bakteriemi. Druhá forma hyperkeratotická postihuje plosku nohy a probíhá bezpříznakově. Kůže bývá bělavá, ztlustělá a dochází k odlupování. Bývá přirovnávána k atopické dermatidě. Poslední třetí formu, která se vyskytuje zřídka, nazýváme akutní dyshidrotická. Typickým příznakem je opakující se tvoření puchýřků, které zaschnou a odloupnou se. Často probíhá současně s ekzémem, nebo polékovou reakcí. [9]

Onemocnění je léčeno především antimykotiky. Je nutné časté měnění bavlněných ponožek, dodržování hygieny nohou, vysušování a desinfekce obuvi. [9]

3.1.2 *Tinea inguinalis (Tinea cruris)*

Onemocnění třísel především u mužů, ale i u žen. Vyvolávané *Epidermophyton floccosum*, *Trichophyton rubrum* a *Trichophyton interdigitale* a způsobené přenosem kožní infekce nohou a nehtů. Ke vzniku onemocnění napomáhá nedostatečná hygiena, obezita, nošení málo prodyšného spodního prádla. [9]

Typickým příznakem je načervenalé, svědivé ložisko, které se rozšiřuje. Ložisko je ostře ohraničené červeným lemem a ten obsahuje puchýřky. Může se šířit na stehno, hráz, podbřišek i genitál. Toto onemocnění musíme odlišit od kandidové infekce a např. lupénky. [9]

K léčbě je využíváno lokálních antimykotik. Onemocnění ve většině případů ustoupí po krátké době. Opět musí být dodržována hygiena a dále redukce váhy a nošení správného oděvu. [9]

3.1.3 *Tinea manus*

Vzácně se vyskytující onemocnění ruky. Jedná se o sekundární onemocnění vznikající současně při infekci nohou. Ve většině případů má lehčí průběh, k recidivám dochází zřídka. Původci stejní jako u *tinea pedis*. Nemocný pacient má zarudlou dlaň, kůži suchou a svědivou. K léčbě jsou nasazována lokální antimykotika a pokud nezabírají, nasazují se celková. [9]

3.1.4 *Tinea barbae*

Onemocnění vousaté části tváře a krku dospělých mužů. Především mužů, kteří jsou ve styku se zvířaty, ať už veterináři, chovatelé nebo majitelé domácích zvířat. Původci jsou *Trichophyton interdigitale*, *Trichophyton verrucosum* a *Microsporum canis*. Zvíře je ve většině případů pouze přenašeč. Nemá žádné klinické příznaky. [9]

Na kůži ve vousích nalezneme červené, bolestivé papulopustuly a abscesy s hnisem. Vousy lze snadno vytrhnout. Tyto příznaky jsou velmi podobné stafylokokové folikulitidě. K ústupu dochází spontánně během několika týdnů. Nezůstávají žádné drobné jizvy a vousy mohou znovu narůst. [9]

3.1.5 *Tinea capitis*

Dermatologické onemocnění hlavy, především vlasaté části, obočí a řas. Nejčastěji tímto onemocněním trpí děti školního věku a může se v kolektivech vyskytovat jako epidemie. Je vyvolávána rody *Trichophyton* a *Microsporum*. Rod *Trichophyton* způsobují snadné lámání vlasů tím, že vyvolávají infekci uvnitř vlasu. *Microsporum* vytváří infekce na povrchu vlasu a šíří se podél vlasového folikulu až k vlasové papile. [9]

Rozlišujeme tři formy této dermatofytózy. První kerion celsi (včelí plástev), jedná se o zánětlivou formu, která je způsobena zoofilními a geofilními houbami. Na pokožce hlavy vznikne olupující, červené ložisko, tvořené hnisavými hrboly. Vlasy lze snadno tahem vytrhnout. Druhá mikrosporie je nezápětlivou formu *tinea capitis* a je způsobována *Microsporum audouinii* a *Microsporum canis*, která vyvolává epidemii v dětských kolektivech. Třetí chronickou formou je favus, která je způsobena dermatofytem *Trichophyton schoenleinii*. Nejčastěji se vyskytuje v oblasti Středozevního moře a na Blízkém východě. Je charakterizována skutulem (štit), neboli nažloutlým útvarem v okolí vlasových folikulů, páchnoucí po myšíně. Onemocnění je léčeno lokálními a celkovými antimykotiky. [9, 5]

3.1.6 *Tinea unguium* (onychomykóza)

Jedná se o mykotické onemocnění nehtové ploténky nohy, vyvolané především dermatofyty, ale i kvasinkami. Mezi původce je řazen *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton interdigitale*, *Epidermophyton floccosum*, také kvasinky rodu *Candida*. Nejčastěji bývá napaden nehet u pacientů s poruchou cirkulace krve, neuropatií, diabetem. Vyskytuje se také jako sekundární infekce z jiných infekčních ložisek. Méně často bývá napaden zdravý nehet. [9]

Postiženy jsou ve většině případů prsty na nohou, a to především malíček a palec. Opět máme tři formy a nejběžnější je distální subungvální onychomykóza, která začíná od distálního okraje. Okraj nehtové ploténky je žlutý a drolivý, dochází až k odloučení od nehtového lůžka. Další formou je proximální subungvální onychomykóza, kdy mykóza zasahuje přímo lůžko nehtu a dochází k poruše růstu nehtu. Začne být deformovaný, bez lesku a zbledlá. Třetí formou je totální dystrofická onychomykóza, způsobena kvasinkou *Candida albicans*. Nehet je tlustý, žlutý a drolivý. [9]

U distální formy se k léčbě užívají speciální laky na nehty obsahující antimykotika, ale pokud je postižen celý nehet i lůžko, musí být podána celková antimykotika. Léčení může trvat několik měsíců. Pokud je potřeba odstranit nehtovou ploténku, provádí se odstranění pomocí keratolytické masti. Opět jako u většiny mykotických infekcí je nutné dodržování správné hygieny a dezinfekce obuvi. [9]

3.1.7 *Tinea corporis*

Infekce trupu a končetin, která je vyvolávána všemi druhy dermatofytů. Nejčastěji se onemocnění přenáší z jiné infikované části těla nebo domácím zvířetem. [9]

Ve většině případů infekce začíná malým, kruhovitým, olupujícím se červeně zbarveným ložiskem. K léčbě jsou využívána lokální antimykotika a mývá lehký průběh. [9]

3.1.8 Mykid

Jedná se o zvýšenou reakci organismu na houbový antigen, nacházející se na místě vzdáleném od primární infekce. Najdeme ji především u infekce nohou. Kdy může být patrný výsev svědivých puchýřků. K léčbě mykidů se využívají symptomatická antimykotika. [9]

3.2 Léčba dermatofytóz

Mykotické infekce menšího rozsahu jsou léčeny lokálně neboli zevně, kdy jsou nejčastěji využívána antimykotika ve formě krémů, mastí, zásypů nebo roztoků. V některých případech, když jsou infekce velmi rozsáhlé je zapotřebí využít léčbu systémovou tzv. léčbu celkovou za pomoci perorálních nebo injekčních antimykotik. [9, 12]

Lokální léčba umožňuje působení léčiva přímo v místě infekce. Léky lokální se obvykle skládají z látek pomocných, látek účinných a lékového základu. Účinek léčby je ovlivněn lokalizací a funkcí kůže. Lékové základy se dělí na tekuté, pevné a masťové. Mezi tekuté řadíme roztoky, které se nejčastěji využívají na mokvavá ložiska. Jsou podávány ve formě zábalů nebo koupelí. Mechanismus účinku spočívá ve vysušování nebo zapařování rány. Masti nejsou vhodné na mokvavá místa, proto se využívají u chronických projevů. Nevýhodou masti je pomalé pronikání účinných látek do kůže, a proto se často využívají tzv. masťové obvazy. Základ masti může být živočišného, minerálního nebo rostlinného původu. Pevné jsou především pudry a zásypy, které jsou schopny vázat vodu a tím pádem kůži vysušují, snižují svědění. Nevhodná je však aplikace na mokvavá ložiska. [9]

Systémová léčba se často využívá u *tinea capitis*, hlubokých, především rozsáhlých infekčních ložisek. Účinnost je velmi vysoká a bezpečná. Ale musí se dbát na klinický obraz a profil účinku daného antimykotika. [13]

3.2.1 Antimykotika

Antimykotika můžeme dělit podle účinku, a to na fungistatické a fungicidní, kdy fungistatické jsou schopné zabránit růstu hub. Fungicidní ničí spory, popřípadě mycelium. Dále antimykotika dělíme dle chemické struktury na polyeny, azoly a echinokandiny. [5]

POLYENY

Tento druh antimykotik má fungistatický až fungicidní účinek. Jejich mechanismus účinku je založen na vazbě na steroly, které jsou obsaženy v cytoplazmatické membráně hub. Narušují její permeabilitu. Působí na široké spektrum mikroskopických hub. Mezi nejčastější antimykotikum využívané při léčbě je amphotericin B, nystatin a natamycin. Amphotericin B je využívaný především jako systémové antimykotikum. Při dlouhodobém užívání má mnoho nežádoucích účinků, jako jsou například křeče, zvracení, ale může vyvolat i anémii. [5, 13, 14]

AZOLY

Antimykotika s fungistatickým účinkem. Potlačují syntézu ergosterolu v buněčné membráně mikromycet. Mají široké spektrum účinku. Mezi nejčastější lokální antimykotikum patří ketokonazol, který se používá ve formě zásypů, roztoků a mastí. Především se aplikuje ráno a večer obvykle 2 až 4 týdny nebo do úplného vyléčení. Mezi systémové řadíme preparáty flukonazol, itrakonazol, vorikonazol, posakonazol a další. Mají široké spektrum účinku. Užívají se v perorální nebo injekční formě. [5, 13]

ECHINOKANDINY

Jedná se o nejnovější skupinu antimykotik, jejich mechanismus spočívá v poruše syntézy beta-glukanu. Jsou fungicidní. Mají minimum nežádoucích účinků. Používají se pouze v injekční formě. Patří sem caspofungin, anidulafungin a micafungin [5, 14]

Tabulka 2: Tři skupiny antimykotik a jejich nejčastější zástupci (vytvoreno dle [13])

ANTIMYKOTIKA		
POLYENY	amphotericin B	Systémové antimykotikum
	nystatin natamycin	Lokální antimykotika
AZOLY	flukonazol itrakonazol vorikonazol posakonazol	Celková antimykotika
	ketokonazol	Lokální antimykotikum
ECHINOKANDINY	caspofungin anidulafungin micafungin	Celková antimykotika

3.3 Nejčastější druhy dermatofyt

3.3.1 *Trichophyton rubrum*

Jedná se o nejčastěji vyskytovaný druh dermatofyta nacházející se u nás. Bývá původce *tinea pedis* a *tinea unguium*, ale i dalších infekčních mykóz lidského těla. [15]

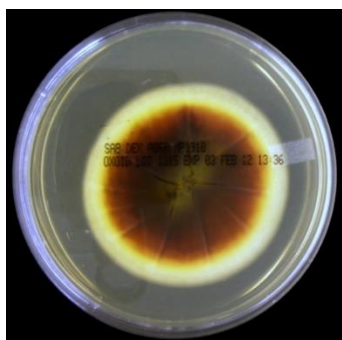
Na SAB agaru jsou patrné čistě bílé chmýřité kolonie, které mohou být doplněné prstýnkem narůžovělé barvy kolem okrajů. Spodní část kolonie může obsahovat tmavě červený nebo červenohnědý pigment, který není schopný pronikat do spodiny. [16]

V mikroskopickém preparátu nalézáme mikrokonidie hruškovitého tvaru v klasovitém uspořádání. Mikrokonidie jsou po stranách hyf. Také můžeme pozorovat makrokonidie doutníkovitého tvaru, které mohou být deformované nebo polámané. [13, 16]

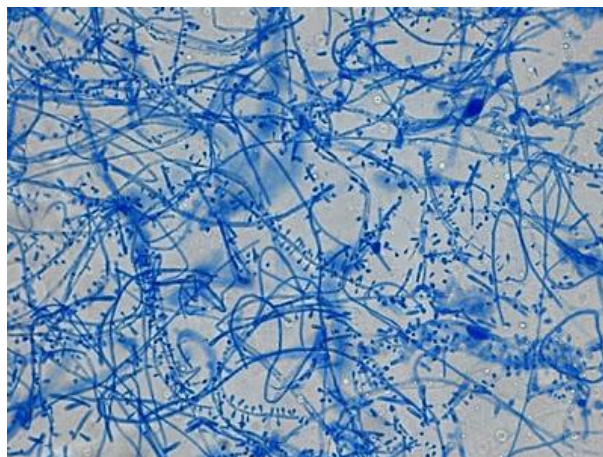
A



B



Obrázek 6: *Trichophyton rubrum* – SAB agar – (A) svrchní část, (B) spodní část (převzato z [23])



Obrázek 5: *Trichophyton rubrum* mikroskopický preparát (převzato z [23])

Variety

Trichophyton rubrum var. *nigricans*

Jedná se o varietu popsanou českým mykologem Petrem Frágnerem v roce 1966. Hlavní charakteristikou této variety je vysoké množství melanoidního pigmentu na spodině, který proniká do agaru a zbarvuje ho do tmavě hnědé barvy. Mycelium svrchní strany kolonie bývá béžové až světlé hnědé. [15]

Trichophyton rubrum – granulární varieta

Varieta objevena v jihovýchodní Asii, odkud se rozšířila do tropických zemí. Po roce 1975, kdy proběhla vietnamská válka, byla rozšířena do dalších zemí. Nejčastěji vyvolává *tinea inguinalis* a *tinea corporis*. Kolonie bývají béžové až hnědé barvy. Pigment červenohnědý, který nedifunduje do půdy. V mikroskopickém preparátu nacházíme záplavu doutníkových makrokonidií, které mají občas konec zakončený zobákovitým výběžkem. [16]

Histidin-dependentní varieta – dříve *Trichophyton megninii*

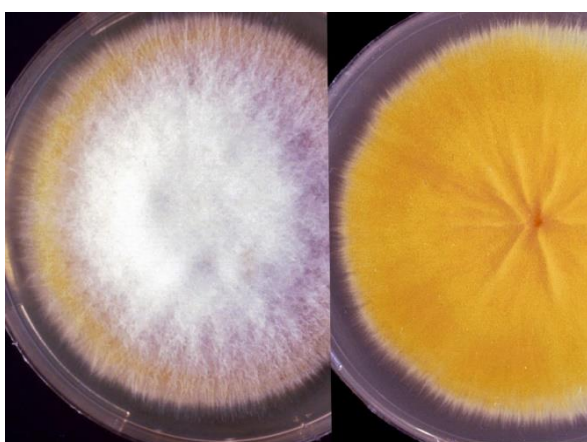
Sametové až granulární kolonie s vínově červenou spodní stranou. U starší kultury pigment difunduje a agar barví do růžové. Na půdách bez histidinu tato varieta neroste. Na počátku 20. století se hojně vyskytovala v Německu, nyní ve Španělsku a Portugalsku. [16]

3.3.2 *Microsporum canis*

Jedná se o druh dermatofyt, který je nejčastějším vyvolavatelem *tinea capitis* na celém světě. Jako nejčastější zdroj infekce bývají štěňata a koťata. První příznaky po kontaktu se zdrojem se projeví u člověka po 3 až 4 týdnech. [16]

Na agaru nalézáme bělavé, chmýřité kolonie s rozlézavými okraji. Spodní strana obsahuje žlutý pigment. [16]

V mikroskopickém preparátu mají typické makrokonidie zašpičatělý konec a vřetenovitý až citronový tvar. Mikrokonidie jsou klasovitě uspořádané, hruškovitého tvaru. [16]



Obrázek 7: *Microsporum canis* – SAB agar –
svrchní a spodní strana (převzato z [24])



Obrázek 8: *Microsporum canis* –
makrokonidie v mikroskopickém preparátu
(převzato z [24])

3.3.3 *Trichophyton benhamiae* (dříve *Arthroderma benhamiae*)

Jedná se o zoofilní dermatofyty, které se v poslední době na území Evropy hojně vyskytují. Způsobují především *tinea capitis* a *tinea corporis* zejména u dětí, ale i dospělých jedinců. Zdrojem infekčního onemocnění jsou domácí mazlíčci, především morčata, králíci a další hlodavci. [17, 18]

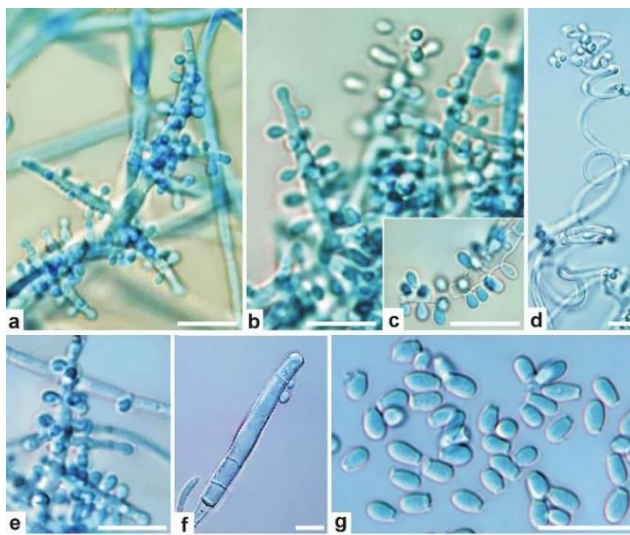
Po inkubaci na agaru jsou patrné dva odlišné fenotypy *T. benhamiae*. a fenotyp žlutého nebo červeného (někde i bílého) pigmentu. [19]

V mikroskopickém preparátu mají mikrokonidie tvar kulatý až hruškovitý, hroznovitě uspořádaný. Často bývají přítomná i spirální vlákna. Makrokonidie mohou být doutníkového tvaru. [19]

Často bývá tento druh v laboratořích zaměněn za rod *Microsporum canis*, ale po delší inkubaci je rozdíl velmi rozlišný. Kolonie *T. benhamiae* má následně na Sabouraudově glukózovém agaru s chloramfenikolem namodralou barvu. [19]



Obrázek 10: *Trichophyton benhamiae*
– SAB agar s chloramfenikolem
(převzato z [17])



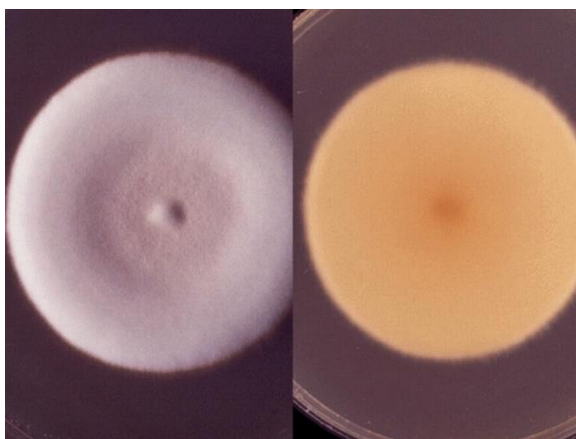
Obrázek 9: *Trichophyton benhamiae* –
mikroskopický preparát – (a, b, c, e) konidiofory,
(d) spirální vlákna, (f) makrokonidie, (g)
mikrokonidie (převzato z [19])

3.3.4 *Trichophyton interdigitale*

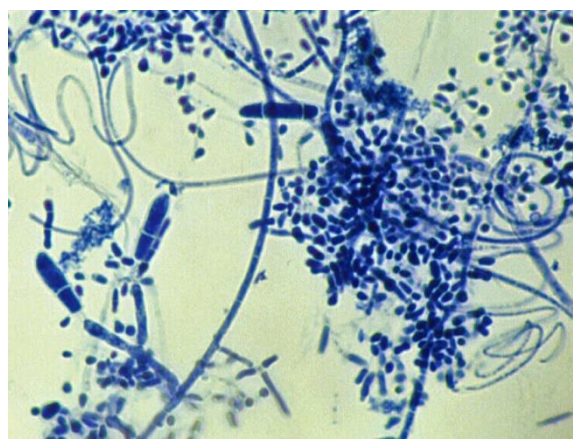
Původně se jednalo o varietu druhu *Trichophyton mentagrophytes*, ale v průběhu rozvoje molekulárně genetických metod došlo k odlišení a byl zařazen jako samostatný druh. [16]

Rychle rostoucí bílé kolonie s nažloutlým středem a krátkým chmýřím. Někdy se může objevit i červený pigment. [16]

V mikroskopickém preparátu mají mikrokonidie kulatý až hruškovitý tvar a jsou uspořádané v hroznech. Typická jsou spirální vlákna v mikrokultuře. [16]



Obrázek 11: *Trichophyton interdigitale* – SAB agar – svrchní a spodní část (převzato z [24])



Obrázek 12: *Trichophyton interdigitale* – mikrokonidie, makrokonidie a spirální vlákna (převzato z [24])

3.3.5 *Trichophyton tonsurans*

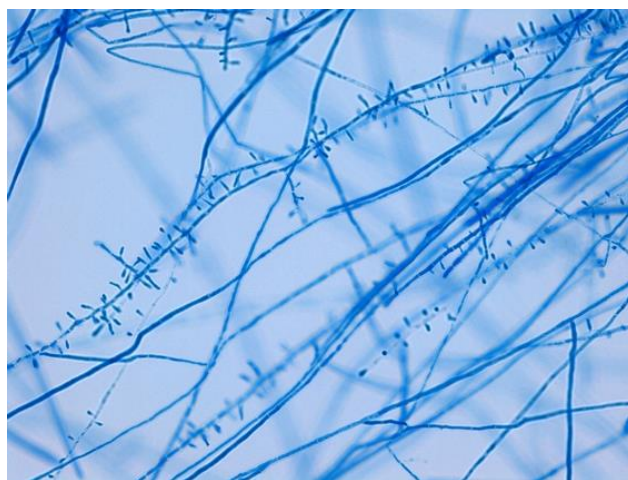
Antropofilní dermatofyt, který nejčastěji vyvolává *tinea capitis*. V 70. letech byl ve střední Evropě považován za vyhynulý druh, ale nyní se začíná vyskytovat sporadicky. [16]

Kolonie na agaru jsou semišové, tuhé a mohou mít více barev (bílou, šedou, růžovou a žlutou). Spodní strana kolonie bývá žlutá až hnědá. Na povrchu nejčastěji brázdy až praskliny. [16]

V mikroskopickém preparátu jsou konce hyf kyjovitě zakončené. Mikrokonidie mohou mít hruškovitý tvar a jsou umístěné podél vláken. [16]



Obrázek 14: *Trichophyton tonsurans* – SAB agar (převzato z [23])



Obrázek 13: *Trichophyton tonsurans* – mikroskopický preparát (převzato z [23])

4 ODBĚR BIOLOGICKÉHO MATERIÁLU NA MYKOLOGICKÉ VYŠETŘENÍ

Na mykologické vyšetření se odebírají vzorky stejné jako na bakteriologické vyšetření, například BAL, moč, krev, likvor, výtěry a další. Používají se i stejné odběrové soupravy – výtěrovky, zkumavky, sputničky, atd. Transport vzorků do laboratoře probíhá při pokojové teplotě. [15, 20]

Odlišný je odběr vzorků na dermatofyta. Probíhá na dermatovenerologické ambulanci kvalifikovanou osobou. Vyšetřované ložisko je důkladně vydesinfikováno 70% alkoholem k odclonění bakteriální flóry. Poté následuje vlastní odběr na dermatofyta do sterilních nádobek – malá Petriho miska. [5, 13, 15]

4.1 Nástroje a pomůcky

Ostré nástroje nejsou na odběr vhodné, proto se využívají tupé nebo zubaté skalpely pro odběr šupin z kůže. Dále k odběru jsou využívány pinzety, nůžky, tampony pro stěry ze sliznice, bakteriologické kličky a také lancety. [15]

4.2 Techniky odběru

Dermatofyty bývají umístěny hlouběji, proto je povrchovým seškrábnutím šupiny většinou neodstraníme. Šupiny odstraňujeme tupým skalpelem. V meziprstí bývají ložiska často napadena bakteriemi, tudíž k odběru vybíráme meziprstí se suchými šupinami. Šupiny a vlasy jsou nutné do agarů několika vpichy vsadit, nestačí pouze položit. [15]

Lopatková lanceta je využívána k odběru z pod nehtu. Pro vhodné množství vzorku je nutný odběr z rozhraní zdravé části nehtu a infikované. K vyšetření vlasů se využívají spodní části, tedy 1 cm nad povrchem kůže. Vlas napadený dermatofytem lze z folikulu z vlasu snadno pinzetou vytáhnout. Při odběru z vlhkých míst a sliznic využíváme sterilní suché nebo navlhčené tampony. [15]

Při systémových mykózách se využívají vzorky tkání, ale také krev, moč, likvor, punktát, hnis, atd. Odběr opět probíhá do sterilních nádob. Často se zároveň dělají dva nátěry na podložní sklo, které slouží k mikroskopickému vyšetření, kdy preparáty nejčastěji barvíme dle Grama a následně nějakým bakteriologickým nebo histologickým barvením. [21]

V některých případech, jak už bylo uvedeno výše, odebíráme materiál přímo na kultivační půdy. Tyto agary s různým složením si dermatologická ordinace může vyžádat přímo v dané laboratoři. Vždy obsahují Sabouraudův agar, vhodný k růstu mykotických organismů. [15]

4.3 Chyby odběru

Klasickou chybou bývá neočištěné ložisko nebo nesterilní nádoby a nástroje. Další z velkých chyb je malé množství odebraného materiálu. Tudíž nelze vyšetření správně provést. [13]

Jako další chybou je zasílání do laboratoře celých dlouhých vlasů, odstříhané kousky nehtů, nebo dokonce celé nehty. Ty nejsou schopné dobrého projasnění v louhovém preparátu a následně nejdou dobře rozočkovat na kultivační půdu. [13]

Další chyba také může nastat, pokud ložisko infekce je již léčeno. Proto se musí před odběrem dodržet určitý časový rozestup. Vyšetření jinak vykazuje falešnou negativitu, zkreslenou předchozí léčbou. Při lokální léčbě se u kožních infekcí vyčkává 1–2 týdny. U nehtů se musí vyčkat 6 týdnů a při léčbě systémové jsou časové odstupy v řádech několika měsíců. [15]

4.4 Odběr nejčastějšího materiálu při podezření na dermatofyty

Tabulka 3: Odběr nejčastějšího materiálu (převzato a upraveno z [15, 16])

MATERIÁL	ODBĚR
Kůže	<ul style="list-style-type: none"> - Dermatofyty zakotveny hlouběji - Povrchové otírání šupiny je neodstraní - Meziprstí vybrat se suchým olupováním
Nehty	<ul style="list-style-type: none"> - Odběr z pod nehtu lopatkovou lancetou - Rozhraní mezi zdravou a klinicky změněnou částí - Odběr nehtu, který není čerstvě ostříhaný a nenalakovaný
Vlasy (Kštice)	<ul style="list-style-type: none"> - Spodní část vlasu, do 1 cm nad povrchem kůže - Zbytek vlasu odstříhnout, v preparátu následně překáží - Lehce vytažitelné pinzetou - Do půdy 3–5 vypichů
Sliznice a vlhká místa	<ul style="list-style-type: none"> - Suchý nebo navlhčený sterilní tampon

4.5 Komerčně dodávané nádoby

V dermatovenerologických ambulancích se také mohou využívat komerčně vyráběné nádoby, které na jedné straně obsahují čistý Sabouraudův agar a na druhé Sabouraudův agar s cykloheximidem. U těchto půd se šroubovacím víkem se musí dávat pozor, aby se alespoň první týden nechalo víčko lehce nasazené. Dermatofyty jsou aerobní a při úplném uzavření by nedošlo k vyklíčení. [16]

5 OBECNÁ LABORATORNÍ DIAGNOSTIKA

MIKROMYCET

Po doručení materiálu s žádankou od žádajícího lékaře do laboratoře se vzorek zkontroluje a zapíše pod správné laboratorní číslo. Pod tímto číslem je následně zadáván do laboratorního informačního systému. Dále následuje laboratorní vyšetření, které se velmi podobá bakteriologickému, protože obnáší vyšetření mikroskopické a kultivace. Dále se využívají metody pro stanovení citlivosti na antimykotika, které slouží k výběru správné léčby. [20]

Vzorek se v první řadě musí naočkovat na živné půdy, aby nedošlo k následné kontaminaci vzorku, ze zbytku se zhotoví mikroskopický preparát. [20]

5.1 Mikroskopické vyšetření

Toto vyšetření je oproti kultivaci velmi krátké, tudíž se využívá k rychlému zjištění přítomnosti mykotických elementů. Následně může být určena předběžná diagnóza, ale přesná diagnóza se z toho vyšetření obvykle neudává. I předběžná diagnóza je pro dermatologa cennou zprávou. V mykologii se pomocí mikroskopu sleduje velikost a tvar buněk, větvení mycelia a septa. Snadno se může určit i negativní nález. [15, 21]

V mikroskopickém preparátu můžeme nalézt artefakty, což jsou například textilní vlákna, ta však musí být odlišena od houbového vlákna. Textilní vlákno má roztřepené konce, nerovné ohraničení a neobsahuje žádné organely. [15]

5.1.1 Louhový preparát

Jedná se o klasický nebarvený louhový mykologický preparát a patří k nejjednoduššímu způsobu vyšetření. Je založený na působení 20 % hydroxidu draselného (KOH) na šupiny, kůži, vlasy a nehty. KOH slouží k projasnění tkáně a následně usnadňuje určení daného mykotického druhu ve vzorku. KOH necháme působit 30–60 minut při pokojové teplotě, nebo 10–15 minut v termostatu při 37 °C. [15]

5.1.2 Barvicí metody

V mykologii se využívá klasické bakteriologické nebo histologické barvení. Nejčastěji barvení dle Grama, které umožňuje především identifikaci kvasinek ale i vláknitých hub. Histologická barvení se využívají při bioptických a sekčních materiálech, kdy se postupuje stejně jako na histologii. Vzorek je pomocí fixačních technik zafixován,

dále nakrájen a speciálním barvením obarven (např.: hematoxylinem-eosinem, stříbřením podle Gömöriho). Jsou ale vybírána barvení, která se vážou na buněčnou stěnu hub, ne na ostatní materiál. Výhodou je snadné odlišení mykotických elementů od ostatního materiálu při mikroskopickém vyhodnocení. [21]

5.1.3 Fluorescenční mikroskopie

Využívají se fluorescenční barvicí metody, kde se fluorescenční barvy specificky vážou na buněčnou stěnu mikromycet. K detekci je využíván fluorescenční mikroskop při vlnové délce 420 nm. Obarvené elementy se v zorném poli zeleně fluoreskují. Tyto preparáty se jeví jako přehlednější, ale technika provedení je náročnější. [21]

Postup u fluorescenční mikroskopie je následující. Vzorek se vloží na podložní sklo, kde je následně smíchán s 0,1% fluorescenčním barvivem a 20% KOH v poměru 1:1. Vzorek se překryje krycím sklíčkem a po 15 minutách může proběhnout vyhodnocení ve fluorescenčním mikroskopu. [21]

5.2 Kultivační vyšetření

Jak už bylo uvedeno výše, po přijetí materiálu do laboratoře se vzorek zapíše do systému a přiřadí se mu laboratorní číslo. Dále následuje naočkování vzorku na kultivační půdu ke kultivačnímu vyšetření. Vyšetření spočívá v pěstování makroorganismů na živných půdách v Petriho miskách nebo zkumavkách, při daných podmínkách v prostředí laboratoře. [5]

V mykologii se jako kultivační půda nejčastěji využívá Sabouraudův agar s 2-4 % glukosy. Dále Sabouraudův agar s přidavkem antibakteriální látky, která slouží k zabránění růstu bakterií, které často kontaminují vzorek. Po naočkování mohou mikromycety snadno přerůst a znehodnotit tak vzorek. Jako antibakteriální látky se nejčastěji využívá antibiotikum chloramfenikol. U dermatofyt využíváme cykloheximid, který potlačuje růst rychle rostoucích saprofytických hub, kam řadíme například *Penicilium*. [21]

Jako další kultivační půdy se k diagnostice mikromycet využívají například chromogenní půdy. Na těchto agarech jsou identifikovány především kvasinky, které na nich rostou v různých barevných koloniích. [21]

5.3 Stanovení citlivosti k antimykotikům

U hub je stanovení citlivosti k antimykotikům problémovější než při zjišťování citlivosti u bakterií. [21]

Využívají se dvě metody. Difúzní disková metoda a stanovení minimální inhibiční koncentrace. Pro stanovení citlivosti diskovým difúzním testem se využívá například agar Mueller-Hintonové s 2% glukózou a 0,5 µg/ml methylenové modří. Na agar se po celé ploše naočkuje daný kmen a pomocí jehly nebo speciálního aplikátoru vloží disky. Ty obsahují dané antimykotikum. Petriho miska s naočkovaným kmenem a disky se nechá inkubovat. Po inkubaci se stanovuje citlivost podle velikosti inhibice kolem disků. Jako druhá metoda se využívá stanovení minimální inhibiční koncentrace. Ta umožňuje kvantitativní posouzení citlivosti a také určuje optimální léčebnou dávku. Jsou využívány tzv. E-testy. Jedná se o plastové proužky s koncentračním gradientem antimykotik. Dále se užívají komerčně vyráběné mikrotitrační destičky s koncentračním gradientem různých antimykotik. [5, 21]

5.4 Histopatologické vyšetření

Toto vyšetření se při dermatofytózách využívá, pokud je málo šupin k odběru k mykologickému vyšetření. Proveďte se biopsie postižené tkáně, která se zpracuje. Po vytvoření histologického preparátu se nejčastěji pomocí základního histologického barvení hematoxylin-eosin preparát obarví a následně hodnotí. V polovině případů základní barvení nestačí a musí se využít speciální, a to barvení metodou PAS nebo barvení dle Grocotta-Gömöriho. [15]

Preparát obarvený hematoxylinem-eosinem pod mikroskopem vykazuje houbové struktury modře. Při použití speciálního barvení PAS mají barvu červenou a u metody dle Grocotta-Gömöriho mají černé zbarvení. [15]

5.5 Průkaz houbových antigenů a protilátek

Jedná se o sérologické metody, kterými lze detekovat v klinickém vzorku komponenty buněčné stěny (tedy mykotické antigeny) nebo protilátky. [5, 21]

Nejčastěji se provádí přímý průkaz antigenu pomocí metody ELISA nebo latexové aglutinace. Využívá se k průkazu galaktomannanu při aspergilových infekcích, glukuronoxylomananu při kryptokokových infekcích a k průkazu panfungálního β-D-glukanu. Tyto komponenty se zachycují v raných stádiích onemocnění, proto se může zahájit u pacienta včasná léčba. [5, 21]

Při nepřímém průkazu specifických protilátek proti antigenům mikromycet nastává velký problém, kdy se u zdravých osob vyskytuje daná protilátka. Jelikož některé mikromycety jsou velmi rozšířené a běžně kolonizují části lidského těla. Proto si na ně někteří jedinci po každodenním kontaktu vytvářejí protilátky. Z tohoto důvodu se rutinně průkaz protilátek u mykotických infekcí neprovádí. [21]

5.6 Molekulárně-biologické metody

Jedná se o stanovení specifických sekvencí mykotické DNA. Tato vyšetření zachytí mikromycety, ale dokonce je dokážou přesně identifikovat. Výhodou této metody je identifikace hub, které nevytváří typické morfologické struktury. Nevýhodou je vysoká citlivost, kdy výsledek často znehodnocuje kontaminace houbami z prostředí. Ty vykazují falešně pozitivní výsledky. Jako další nevýhodou je složité provedení a vysoká cena. Odběr vzorku na PCR musí být velmi sterilní. [21]

Nejčastěji se využívá polymerázová řetězová reakce (PCR), která je schopna namnožit specifický úsek DNA. [21]

Lze také využít metodu fluorescenční in situ hybridizace (FISH). Genové sondy se vážou na mykotický úsek DNA. Sondy, které jsou značené fluorescenčním barvivem, můžeme následně vyhodnocovat ve fluorescenčním mikroskopu. [21]

PRAKTICKÁ ČÁST

6 Hlavní a dílčí cíl práce

6.1 Hlavní cíl

Hlavním cílem praktické části bylo porovnat a zhodnotit výskyt pozitivně vyšetřených vzorků na dermatofyty ve FN Plzeň během let 2019 až 2021.

6.2 Dílčí cíl

Dílčím cílem praktické části je poukázat na identifikaci vláknitých hub, především dermatofyt na Ústavu Mikrobiologie ve FN Plzeň.

7 CHARAKTERISTIKA SLEDOVANÉHO SOUBORU

Soubor vzorků, který byl využit ke statistickému zhodnocení, byl od pacientů, u nichž bylo podezření na mykózy. Vzorky těchto pacientů byly přijaty na Ústav mikrobiologie Fakultní nemocnice Plzeň, kde byly zpracovány a následně vyhodnoceny.

Výsledky byly vypsány a zpracovány z laboratorního informačního systému se souhlasem Útvaru náměstkyně pro ošetrovatelskou péči Fakultní nemocnice Plzeň.

8 VÝZKUMNÉ OTÁZKY

Výzkumná otázka 1.: Jak častý byl výskyt dermatofyt v letech 2019 až 2021 na Ústavu mikrobiologie FN Plzeň?

Výzkumná otázka 2.: Hraje věk a pohlaví roli ve výskytu dermatofyt v populaci?

Výzkumná otázka 3.: Jaké jsou nejčastější lokalizace výskytu dermatofyt na lidském těle?

Výzkumná otázka 4.: Jaké druhy dermatofyt se vyskytují u jednotlivých pohlaví?

Výzkumná otázka 5.: Jaký vztah s onemocněním má *Trichophyton benhamiae* (ADBE) po kontaktu s domácím zvířetem?

9 LABORATORNÍ DIAGNOSTIKA VE FN PLZEŇ

V této kapitole se zaměříme na laboratorní diagnostiku dermatofyt na Ústavu mikrobiologie ve FN Plzeň. Jaké jsou postupy jednotlivých vyšetření a jejich vyhodnocení.

9.1 Mikroskopické vyšetření

Ve FN Plzeň se využívá louhový preparát. Jeho postup a vyhodnocení je následovné. Na podložní sklíčko kápneme kapku 20% hydroxidu draselného (KOH), pomocí očkovací jehly nabere materiál a vložíme do kapky. Následně překryjeme krycím sklíčkem a uložíme do předem vytvořené vlhké komůrky na 30–60 minut i déle. Ve vlhké komůrce musí zůstat až do odečtu. [20]

Preparát je prohlížený specializovanou osobou pro orientaci ve 160–200× zvětšení a pro přesnější hodnocení se využívá zvětšení 400–450×. Preparát se musí prohlédnout celý, protože mykotických struktur může být málo a mohou být nepravidelně rozmístěné. K lepšímu rozlišení lze využít dobarvení Parkerovým inkoustem, který má afinitu k houbové stěně. Při této metodě je potřeba vyčkat delší dobu. [15]

Výsledky jsou zapisované do laboratorního informačního systému následovně: mykotická vlákna přítomná, mykotická vlákna nenalezena, málo materiálu – nelze hodnotit. [20]

9.2 Kultivace dermatofyt

Vzorek se rozočkuje na šikmý Sabouraudův agar do třech zkumavek. První zkumavka obsahuje čistý SAB agar, druhá SAB agar s přidavkem chloramfenikolu a poslední obsahuje SAB agar s cykloheximidem. Zkumavky si musíme řádně popsat laboratorním číslem vzorku, aby nedošlo k záměně. Pomocí navlhčené jehly, se nabere šupiny a postupně se do každého agaru provedou tři vpichy. Zkumavky se uzavřou, spojí gumičkou a uzavřou do igelitového sáčku. Sáček se popíše dnem a datem naočkování a vloží se do termostatu. Inkubace probíhá při 26 +/-2 °C [20]

Kultivace mikromycet na šikmých agarech se může hodnotit až po třech týdnech. Pokud však vyjde pozitivní louhový preparát a kultivace negativní, musíme o týden kultivaci prodloužit. V pozitivním případě se narostlý kmen dále identifikuje. K identifikaci využíváme mikrokulturu a izolaci na Sabouraudově agaru. [20]

Mikrokultura se vytvoří pomocí korkovrtu a ze SAB půdy se vyříznou tři bločky, které se pomocí sterilní jehly přesunou do sterilní Petriho misky o průměru 6 cm. Vyrostlé plísňe se naberou sterilní jehlou a bloček se naočkuje z boku. Postupně se naočkují všechny tři bločky. Každý bloček se musí překrýt krycím sklíčkem. [20]

Izolace na SAB agar se provádí tak, že se sterilní očkovací jehlou naberou plísňe vyrostlé při kultivaci a třemi vpichy se naočkuje do SAB agaru. [20]

Mikrokultura i izolace se vloží do vlhké komůrky. Tedy do sáčku s navlhčenou vatou. Sáček se uzavře, popíše a vloží do termostatu. Inkubace pobíhá při teplotě 26 +/-2 °C po dobu třech týdnů. Poté může být vzorek vyhodnocen. [20]

9.3 Identifikace dermatofyt pomocí MALDI-TOF

MALDI-TOF je metoda, která je v poslední době často využívaná k diagnostice mikroorganismů. Principem této metody je hmotnostní spektrometrie, kdy laser hmotnostního spektrometru ozáří vzorek s matricí na kovovém terčíku. Matrice pohltí energii a uvolní protony, které jsou přeneseny na proteiny. Touto reakcí dojde k ionizaci desorpci a odpaření částic vzorku. Následně jsou ionizované molekuly poháněny k detektoru tubicí přístroje pomocí elektrostatiky. Tou proletí takovou rychlostí, která bude přímo úměrná hmotnosti a velikosti náboje molekuly. Detektor změří jejich rychlost a následně vypočítá molekulární hmotnost. Ta vytváří spektrum, které je specifické pro jednotlivé druhy. Toto spektrum je porovnáváno s databází spekter a dojde k identifikaci mikroorganismu. [7]

V bakteriologii se kultura nanese na kovový terčík a následně je zakápnuta kapkou roztoku matrice. Matrice je molekula organické kyseliny, která má silnou optickou absorbanci. Pokud se jedná o organismy s pevnou buněčnou stěnou, využívá se k extrakci organická kyselina například kyselina mravenčí. Tento způsob se buď nanáší stejně jako matrice na kulturu předem nanesenou na terčík, nebo se může provést ve zkumavce a následně nanést na kovový terčík. [7]

Diagnostika je u vláknitých hub náročná, jelikož mají velmi silnou buněčnou stěnu, která je z větší části tvořena polysacharidy a obtížně se rozruší. MALDI-TOF se v diagnostice vláknitých hub začala využívat kolem roku 2000. Odborníci ale při studii ve většině případů nedostávali spektra bílkovinná, ale sacharidová. Proto musela být vyvinuta metoda, jak extrahovat bílkoviny. Jedním z dalších problémů byl melanin, který

inhibuje ionizaci a některé vláknité houby ho obsahují a dále to bylo vytváření různých spekter při různých podmínkách, například při stáří houby. Díky těmto problémům, se začaly uplatňovat dva přístupy. První je srovnání standardních podmínek pro růst a správně dodržovat kroky preanalytické přípravy, aby byla spektra jednotlivých druhů jednotná. Druhý přístup je založený na srovnání databáze, aby pro jeden druh bylo co nejvíce spekter. [7]

9.3.1 Postup při diagnostice dermatofyt

Vzorky se klasicky nechají tři týdny kultivovat na SAB agarech při teplotě 27 °C. Dále se připraví kultivace v tekutém mediu, kdy se část kultury z pevné kultivační půdy pomocí sterilní očkovací jehly odebere a přenesse do zkumavky s tekutým mediem. Naočkovaná zkumavka se dále inkubuje za stálého pohybu v třepačce při teplotě 27 °C. Inkubace trvá opět tři týdny. Kultivace se ukončuje, pokud jsou v médiu patrné vločky hub. Zkumavku pak vyndáme z třepačky a necháme cca 10 minut stát, aby došlo k sedimentaci vloček. Následně se odsaje 1,5 ml a do čisté zkumavky a nechá se stočit v centrifuze při 14 000 otáčkách/minutu po dobu 2 minut. Po centrifugaci se odstraní supernatant a k sedimentu se přidá 300 µl deionizované vody a 900 µl etanolu. Opět se provede centrifugace a odstranění supernatantu. Sediment se následně nechá vysušit při pokojové teplotě, aby došlo k odstranění etanolu. Následně se k sedimentu přidá 25–50 µl kyseliny mravenčí (70%) a stejné množství acetonitrilu. Směs se opět promíchá a nechá centrifugovat. Dále se na kovový terčik nanese 1 µl supernatant a po následném zaschnutí přidáme 1 µl matrice. Nechá se zaschnout a následně může proběhnout měření. [7]

Výsledná hmotnostní spektra z přístroje MALDI-TOF se dále hodnotí pomocí speciálního softwaru a porovnává se s referenční databází. [7]

9.4 Stanovení citlivosti k antimykotikům

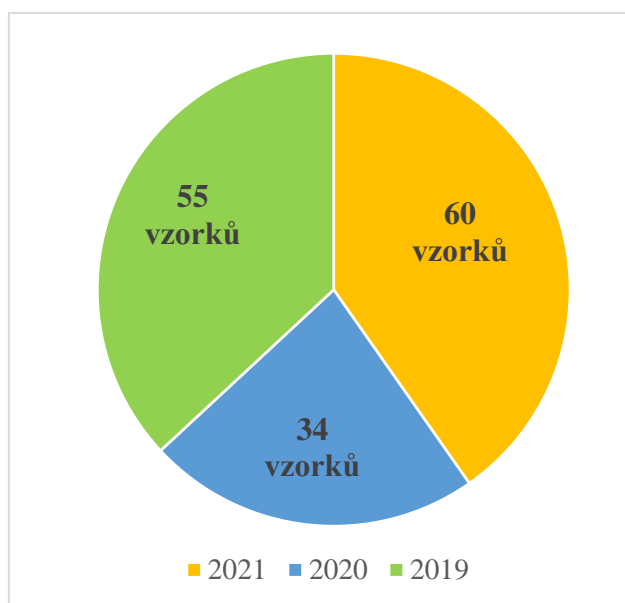
Ve FN Plzeň ani v jiných laboratořích se rutinně u dermatofytů citlivost k antimykotikům nestanovuje kvůli časově velmi náročnému růstu dermatofytů na kultivačních půdách.

10 ANALÝZA A INTERPRETACE VÝSLEDKŮ

Analýza vzorků byla provedena za roky 2019 až 2021, kdy pomocí laboratorního systému byl vyhledaný celkový počet laboratorních vyšetření. Celkem bylo přijato k mykologickému vyšetření na dermatofyty 1260 vzorků.

10.1 VO 1.: Jak častý byl výskyt dermatofyt v letech 2019 až 2021 na Ústavu mikrobiologie FN Plzeň?

Graf 1: Počet pozitivních vzorků na dermatofyty a rozdělení do jednotlivých let.



(zdroj: vlastní zpracování dle dat z LIS FN Plzeň)

Na ústavu mikrobiologie FN Plzeň bylo za roky 2019, 2020 a 2021 přijato celkem 1260 vzorků k mykologickému vyšetření na dermatofyty, kdy pouze 149 vzorků bylo pozitivních na dermatofyty.

V roce 2019 bylo pozitivně vyšetřeno 55 vzorků, v roce 2020 pozitivně vyšetřeno pouze 34 vzorků a v roce 2021 60 pozitivně vyšetřených vzorků.

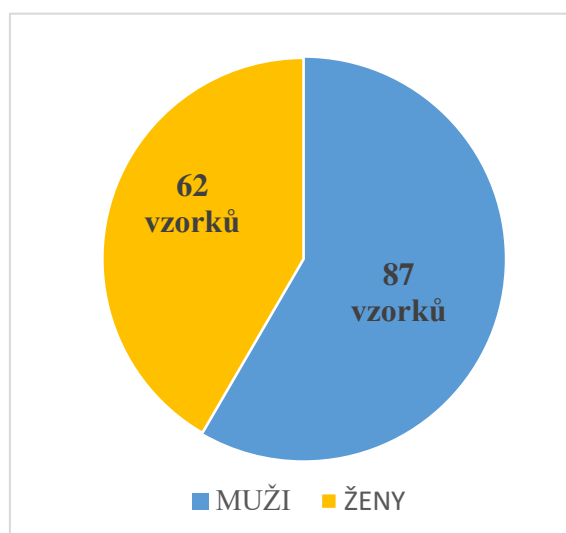
Myslím si, že díky probíhajícímu virovému onemocnění Covid-19 v těchto letech bylo vyšetřeno méně vzorků (v letech 2016 až 2018 bylo vyšetřeno 1521 vzorků). Důvodem byl v těchto letech velmi omezený provoz odborných ambulancí v nemocnicích.

10.2 VO 2.: Hraje věk a pohlaví roli ve výskytu dermatofyt v populaci?

Graf 2: Rozdělení pozitivních výsledků podle věku



Graf 3: Rozdělení pozitivních výsledků podle pohlaví



(zdroj: vlastní zpracování dle dat z LIS FN Plzeň)

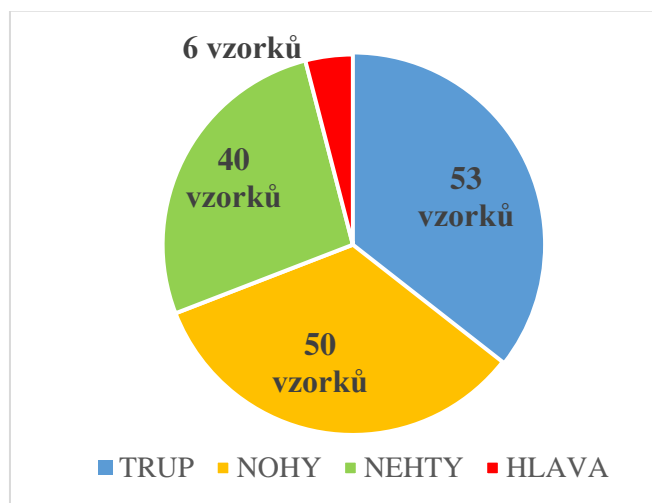
Všech 149 pozitivních vzorků je zde rozděleno a porovnáno podle věku a pohlaví.

Ze 149 vzorků pozitivních na dermatofyty bylo 35 vzorků od osob mladších 18 let a 114 vzorků od osob starších 18 let.

Z hlediska pohlaví se prokázal častější výskyt dermatofyt u mužů a to 87 vzorků. U žen byla pozitivita u 62 vzorků. [17]

10.3 VO 3.: Jaké jsou nejčastější lokalizace výskytu dermatofyt na lidském těle?

Graf 4: Lokalizace nejčastějšího výskytu dermatofyt

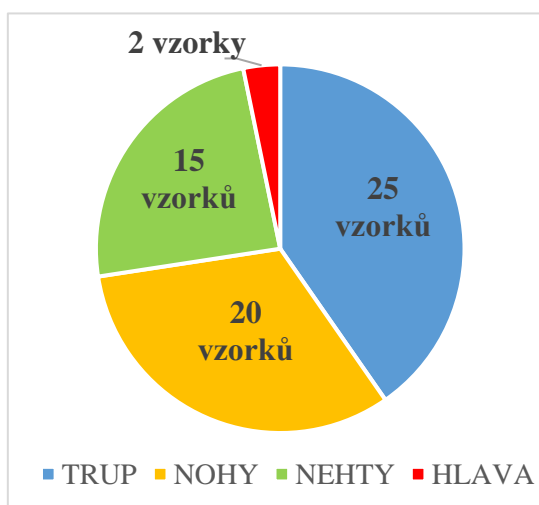


(zdroj: vlastní zpracování dle dat z LIS FN Plzeň)

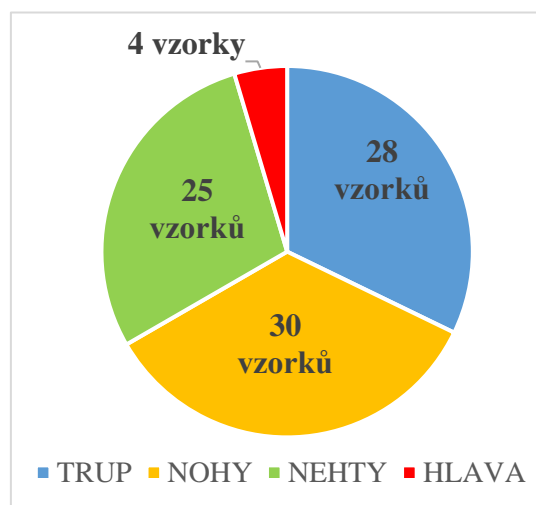
Na tomto grafu jsou znázorněny 4 sledované lokalizace (trup, nohy, nehty, hlava) a jejich zastoupení v pozitivně testovaném souboru vzorků.

Trup, nohy a nehty jsou nejčastěji postiženy dermatofyty. Hlava, především vlasy často postiženy nebývají. Výskyt dermatofyt na trupu byl za tři zkoumané roky zachycen u 53 vzorků, následovaly nohy (50x), nehty (40x) a nejméně napadená část je hlava (6x).

Graf 5: Lokalizace výskytu u žen



Graf 6: Lokalizace výskytu u mužů

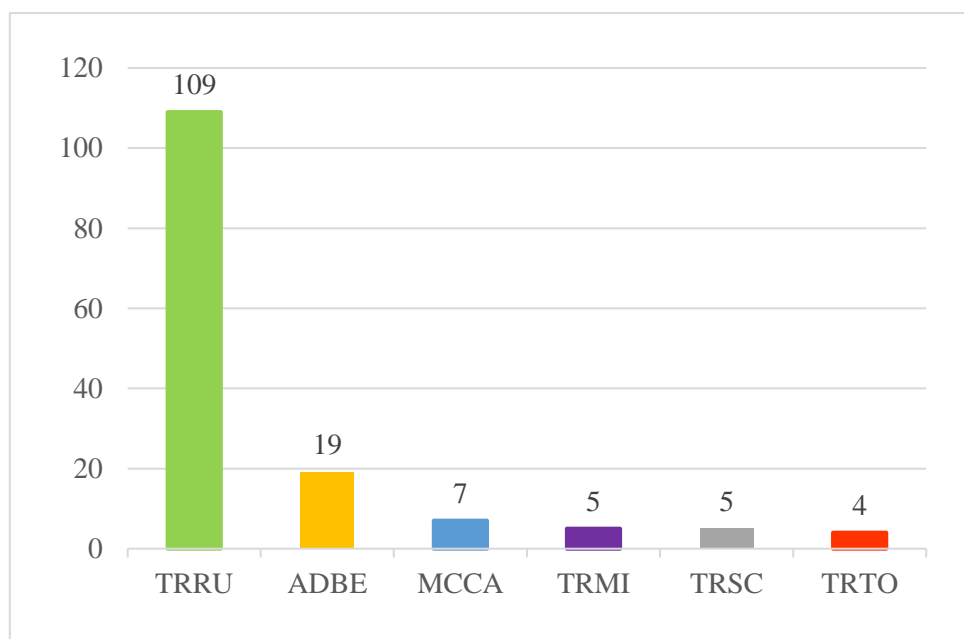


(zdroj: vlastní zpracování dle dat z LIS FN Plzeň)

Na těchto dvou grafech vidíme rozdělení lokalizací u mužů a žen. Výsledkem tohoto porovnání bylo zjištěno, že lokalizace dermatofyt u mužů a žen byla stejně rozložena.

10.4 VO 4.: Jaké druhy dermatofyt se vyskytují u jednotlivých pohlaví?

Graf 7: Nejčastější druhy dermatofyt prokázané ve FN Plzeň



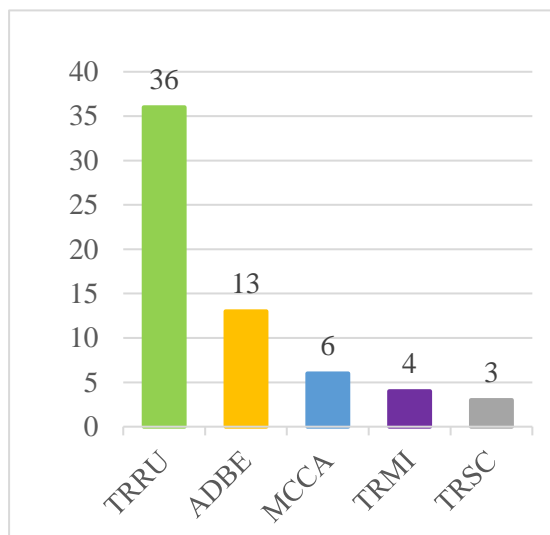
(zdroj: vlastní zpracování dle dat z LIS FN Plzeň)

Na tomto grafu jsou vyobrazeny nejčastější druhy dermatofyt prokázané z testovaného souboru na ústavu mikrobiologie FN Plzeň.

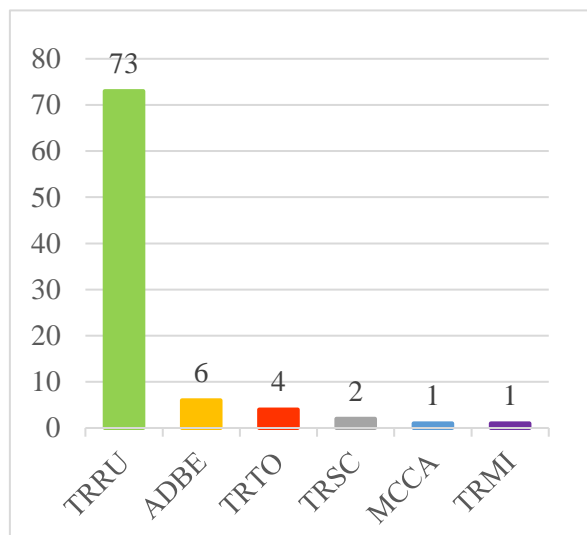
Jedná se o druh *Trichophyton rubrum* (TRRU), *Trichophyton benhamiae* (ADBE) – ve FN Plzeň se využívá starý název *Arthroderma benhamiae*, proto zkratka ADBE. Dále *Microsporum canis* (MCCA), *Trichophyton interdigitale* (TRMI), *Trichophyton species* (TRSC) a *Trichophyton tonsurans* (TRTO).

Ze 149 pozitivních vzorků se zjistilo, že více než 2/3 (přesně 109) vzorků bylo pozitivních na *Trichophyton rubrum*. Druhým nejčastěji zastoupeným druhem je *Trichophyton benhamiae* (*Arthroderma benhamiae*) (19 vzorků). Třetím druhem *Microsporum canis* (7 vzorků), následují se stejným počtem vzorků *Trichophyton interdigitale* (5 vzorků) a *Trichophyton species* (5 vzorků). Nejméně zastoupeným druhem byl *Trichophyton tonsurans* (4 vzorky).

Graf 8: Druhy dermatofyt prokázané u žen



Graf 9: Druhy dermatofyt prokázané u mužů



(zdroj: vlastní zpracování dle dat z LIS FN Plzeň)

Na těchto grafech lze porovnat zastoupení jednotlivých druhů dermatofyt u žen a u mužů. Ze 149 pozitivních vzorků bylo 62 vzorků odebraných od žen a 87 vzorků od mužů.

Nejčastěji zastoupeným druhem u obou pohlaví byl *Trichophyton rubrum* (TRRU). Tento druh byl celkově zastoupen 109, z toho 36 vzorků od žen a 73 vzorků od mužů. Z toho vyplívá, že tento druh se nejčastěji vyskytuje u mužů.

Druhým nejčastějším druhem byl *Trichophyton benhamiae* (ADBE), tento druh byl prokázán celkem 19×, z toho u žen 13× a u mužů pouze 6×.

Microsporum canis (MCCA) bylo u žen zastoupeno 6× a u mužů pouze 1×. Po porovnání je patrné, že MCCA je častěji vyskytovaným druhem u žen než u mužů. Můžeme ho zařadit jako třetí nejčastěji se vyskytující druh u žen.

Trichophyton interdigitale (TRMI) byl opět častější u žen (4×) než u mužů (1×)

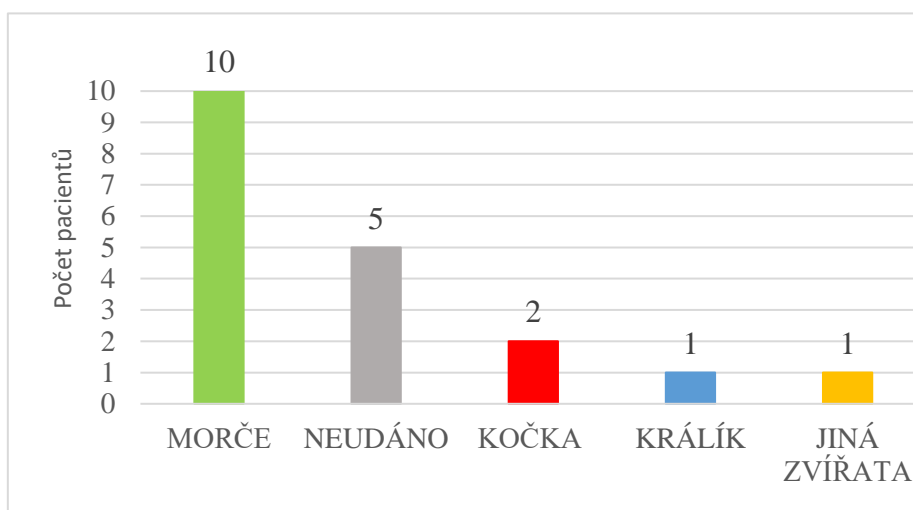
Trichophyton species (TRSC) byl zastoupen u obou pohlaví skoro stejně, kdy u žen se vyskytl 3× a u mužů 2×.

Posledním druhem je *Trichophyton tonsurans* (TRTO), tento druh se neprokázal ani u jednoho vzorku, pocházejícího od žen. U mužů je zastoupen hojně (4x) a můžeme ho zařadit jako třetí nejčastější druh vyskytující se u mužů.

10.5 VO 5.: Jaký vztah s onemocněním má *Trichophyton benhamiae* (ADBE) po kontaktu s domácím zvířetem?

V posledních letech došlo ke zvýšenému výskytu dermatofytóz způsobených *Trichophyton benhamiae*. Při pátrání po zdroji onemocnění bylo opakovaně zjišťováno morče nebo králík jako domácí mazlíček. Tato zvířata většinou pocházela z prodejen zverimex a často měla onemocnění kůže.

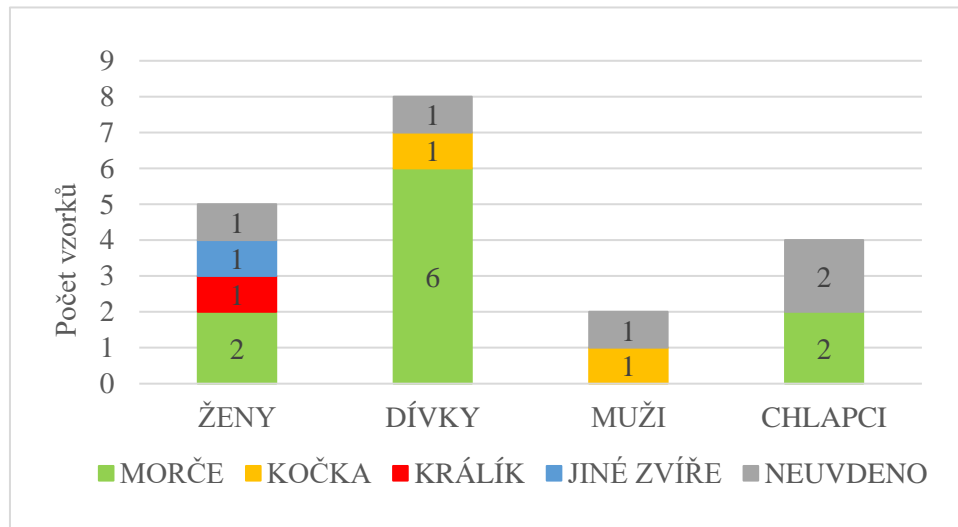
Graf 8: Počet pacientů s pozitivním výsledkem na ADBE po kontaktu s domácím zvířetem



(zdroj: vlastní zpracování dle dat z LIS FN Plzeň)

Na grafu 8 jsou vyznačena domácí zvířata, která byla udána v anamnéze pacientů s prokázaným druhem *Trichophyton benhamiae*. Nejčastějším mazlíčkem bylo morče, se kterým přišlo do styku před prokázáním infekce 10 pacientů z 19 pozitivních vzorků. Následovala kočka (2 pacienti) a u jednoho pacienta byl příčinou králík, popřípadě jiné zvíře. Pět pacientů nemělo uvedeného v anamnéze žádného domácího mazlíčka před vznikem infekce. Z výzkumu jednoznačně vyplynulo, že nejčastějším přenašečem bylo morče.

Graf 9: Graf rozdělení kontaktu pacientů s jednotlivými domácími zvířaty před prokázanou nákazou



(zdroj: vlastní zpracování dle dat z LIS FN Plzeň)

Graf 9 znázorňuje výskyt *Trichophyton benhamiae* mezi ženami a muži nad 18 let a mezi chlapci a dívkami pod 18 let.

U žen nad 18 let se výskyt ADBE prokázal u 5 pacientek. Z toho 2 pacientky přišly do kontaktu s morčetem a zbylé 2 pacientky uvedly kontakt s kočkou a jiným zvířetem, pouze 1 pacientka žádného mazlíčka nevedla.

Nejvíce pozitivních vzorků (8) se prokázalo u dívek pod 18 let. 6 dívek přišlo do kontaktu s morčetem, 1 dívka s kočkou a 1 domácího mazlíčka nevedla.

U mužského pohlaví se tento druh nevyskytuje tak často, celkem se prokázalo 6 vzorků.

Nejméně vzorků bylo prokázáno u mužů nad 18 let (2 vzorky). Z toho jeden uvedl kontakt s kočkou a jeden neměl žádný kontakt se zvířetem.

V kategorii chlapci pod 18 let se výskyt ADBE prokázal celkem u 4 pacientů, z toho 2 přišli do kontaktu s morčetem a 2 chlapci kontakt nevedli.

Z uvedeného grafu vyplývá, že ve výskytu ADBE dominují ženy nad muži a mezi ženami vedou dívky do 18 let věku.

DISKUZE

Cílem mé bakalářské práce byla studie dermatofyt diagnostikovaných na Ústavu mikrobiologie FN Plzeň za období 2019 až 2021. Celkem bylo k mykologickému vyšetření přijato 1260 vzorků. Ty se pomocí mikroskopického a kultivačního vyšetření zpracovaly a následně identifikovaly. Z celkového počtu 1260 vzorků bylo 146 pozitivních na dermatofyty. Ke statistickému zhodnocení, jsem si položila pět výzkumných otázek, které jsem graficky znázornila a popsala.

1. Jak častý byl výskyt dermatofyt v letech 2019 až 2021 na ústavu mikrobiologie FN Plzeň?

Za tyto tři roky bylo celkem přijato na mykologické vyšetření celkem 1260 vzorků, z toho bylo 149 pozitivních na dermatofyty. Nejvíce pozitivních vzorků se prokázalo v roce 2021, celkem u 60 pacientů. Nejméně se prokázalo o rok dříve tedy v roce 2020, kdy pozitivních pacientů bylo 34. V roce 2019 bylo pacientů s pozitivním výsledkem 55.

Myslím si, že díky probíhajícímu virovému onemocnění Covid-19 v těchto letech, bylo vyšetřeno méně vzorků (v letech 2016 až 2018 bylo mykologicky vyšetřeno 1521 vzorků). Důvodem byl v těchto letech velmi omezený provoz odborných ambulancí.

2. Hraje věk a pohlaví roli ve výskytu dermatofyt v populaci?

Na tuto otázku jsem byla velmi zvědavá a po porovnání dat jsem zjistila, že dermatofytózy se častěji vyskytují u pacientů starších 18 let, především u mužů.

3. Jaké jsou nejčastější lokalizace výskytu dermatofyt na lidském těle?

Nezaznamenala jsem významný rozdíl ve výskytu dermatofyt v různých lokalizacích na lidském těle.

4. Jaké druhy dermatofyt se vyskytují u jednotlivých pohlaví?

U mužů i u žen jednoznačně dominuje výskyt *Trichophyton rubrum* nad ostatními dermatofyty. Na druhém místě ve výskytu je *Trichophyton benhamiae*, který se vyskytuje především u žen mladších 18 let.

5. Jaký vztah s onemocněním má *Trichophyton benhamiae* (ADBE) po kontaktu s domácím zvířetem?

Z práce vyplynulo, že častější výskyt dermatofytóz způsobený *Trichophyton benhamiae* je spojen s chováním domácích zvířat – hlavně morčat zakoupených v prodejnách zverimex, která sama často trpěla onemocněním kůže.

Nejčastěji se onemocnění vyskytovalo u žen mladších 18 let, které doma chovaly nakažená morčata.

ZÁVĚR

Cílem této bakalářské práce bylo čtenáře seznámit se všeobecnými informacemi o vláknitých houbách, především o dermatofytech. Následně poukázat jak na diagnostiku obecnou, tak na postupy prováděné na Ústavu mikrobiologie FN Plzeň. Poslední částí bakalářské práce bylo statistické zhodnocení pozitivních vzorků na dermatofyty za období 2019 až 2021.

V teoretické části práce byly popsány mikromycety jako eukaryotické organismy, které nejsou schopné fotosyntézy, protože neobsahují zelené barvivo chlorofyl. Dále byl uveden jejich stručný popis pohlavního a nepohlavního rozmnožování a jednotlivé dělení na kvasinky a vláknité houby. V další kapitole byla popsána onemocnění vyvolávaná mikromycetami, jedná se o mykózy, mykotoxikózy a mykoalergózy.

Hlavním tématem teoretické části byly dermatofyty, které můžeme rozdělit do tří skupin (antropofilní, zoofilní a geofilní) a dále na jednotlivé druhy. Mezi nejčastější druhy můžeme zařadit *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton benhamiae*, *Microsporum canis*. Tyto a další druhy způsobují infekční onemocnění kůže nazývaná se dermatofytóza neboli *tinea*. *Tinea* se následně rozděluje podle lokalizace infekce (*tinea capitis*, *tinea pedis*, ...). Léčba dermatofytóz spočívá především v lokálním podávání léčiv u méně rozsáhlých infekcí, u rozšířených je využívána léčba systémová.

Odběr vzorků k mykologickému vyšetření je podobný jako na bakteriologii, jen u dermatofyt je odběr spíše z hlouběji uložených míst, pouhé seškrábnutí skalpelem často nestačí.

První část praktické části poukazuje na laboratorní diagnostiku kvasinek a vláknitých hub na Ústavu mikrobiologie FN Plzeň, kde nejčastěji využívají k orientačnímu zhodnocení mikroskopické vyšetření a následně kultivaci na Sabouraudově agaru. Přesná identifikace druhu probíhá pomocí metody MALDI-TOF. Jako další laboratorní diagnostické metody jsou využívány například barvicí metody, fluorescenční mikroskopie, biochemické testy, histopatologické vyšetření nebo molekulárně-biologické metody. Stanovení citlivosti k antimykotikům se provádí pomocí difúzní diskové metody, ale hlavně se stanovuje minimální inhibiční koncentrace jednotlivých antimykotik pomocí komerčně vyráběných souprav nebo pomocí tzv. E testů. Na Ústavu mikrobiologie FN Plzeň se citlivost k antimykotikům u dermatofyt neprovádí.

Druhá část praktické části obsahuje statistické zhodnocení zkoumaného souboru 1260 vzorků s podezřením na mykózy kůže a kožních adnex přijatých do laboratoře v letech 2019 až 2021. Pozitivních vzorků na dermatofyty se ve sledovaném souboru prokázalo pouze 149 a nejčastěji vyskytovaným druhem je *Trichophyton rubrum*, následuje *Trichophyton benhamiae* a *Microsporum canis*.

Závěrem lze říci, že i přes tato statistická zjištění stále platí, že dermatofytózy patří mezi nejčastější infekční onemocnění člověka, že jejich léčba je zdlouhavá a často svízelná.

Z tohoto důvodu by se mělo apelovat na přísnější dodržování desinfekce a osobní hygieny, hlavně při návštěvách veřejných prostor jako jsou sauny a bazény. Zároveň by se mělo apelovat na zlepšení péče o kožní onemocnění ve veterinární medicíně.

SEZNAM LITERATURY

- [1] VOTAVA, Miroslav. Lékařská mikrobiologie speciální. Brno: Neptun, 2003. ISBN 80-902896-6-5..
- [2] Kincl, L.; Kincl, M. a Jakrlová J.: Biologie rostlin pro 1. ročník gymnázií; 1993.
- [3] HURYCH, Jakub a Roman ŠTÍCHA. Lékařská mikrobiologie: repetitorium. Praha: Stanislav Juhaňák - Triton, 2020. ISBN 978-80-7553-844-4..
- [4] Rozmnožování hub. [online]. Dostupné z: https://ostrava.educanet.cz/www/biologie/index6f806f80.html?option=com_content&view=article&id=131&Itemid=131.
- [5] JANOUŠKOVCOVÁ, Helena. Klinická mykologie: přednáška. Ústav mikrobiologie FN Plzeň..
- [6] KOLÁŘOVÁ, Libuše. Obecná a klinická mikrobiologie. Praha: Galén, [2020]. ISBN 978-80-7492-477-4..
- [7] WALKOVÁ, Radka, Helena JANOUŠKOVCOVÁ a kolektiv. Identifikace dermatofytů pomocí MALDI-TOF hmotnostní spektrometrie. Česko-slovenská dermatologie [online]. 2018, (6). Dostupné z: <https://www.prolekare.cz/casopisy/cesko-slovenska-dermatologie/2018-6-12/ide>.
- [8] LARONE, Dvise H. Medically important fungi: A guide to identification. Third edition. Amer Society for Microbiology, 1995. ISBN 1555810918..
- [9] ŠTORK, Jiří. Dermatovenerologie. 2. vyd. Praha: Galén, c2013. ISBN 978-80-7262-898-8..

- [10] GOERING, Richard V., Hazel M. DOCKRELL, Mark A. ZUCKERMAN, Ivan M. ROITT a Peter L. CHIODINI, JULÁK, Jaroslav, ed. *Mimsova lékařská mikrobiologie*. 5. vydání. Přeložil Jan BOBEK, přeložil Renáta ČERMÁKOVÁ, přeložil Karel HOLADA, přeložil Zora MĚLKOVÁ, přeložil Tibor MOŠKO, přeložil Jan NOVÁK, přeložil Ludmila PROKEŠOVÁ, přeložil Jiřina SUCHANOVÁ. Praha: Stanislav Juhaňák - Triton, 2016. ISBN 978-80-7387-928-0.
- [11] KOCH, Yvonne, Herbert A. KOCH a Dietmar G. BRAUN. *Mykosen - Atlas*. Berlín: Grosse, 1988. ISBN 3880400726..
- [12] Diagnostika a léčba dermatofytóz | MT. MEDICAL TRIBUNE CZ [online]. Copyright © 2022 Medical Tribune [cit. 10.03.2022]. Dostupné z: <https://www.tribune.cz/archiv/diagnostika-a-lecba-dermatofytoz/>.
- [13] VOSMÍK, František a Magdalena SKOŘEPOVÁ. *Dermatomykózy: diagnostika a terapie dermatologických mykotických infekcí*. Praha: Galén, 1995. Folia practica. ISBN 80-85824-23-x..
- [14] VOTAVA, Miroslav. *Lékařská mikrobiologie obecná*. 2. přeprac. vyd. Brno: Neptun, 2005. ISBN 80-86850-00-5..
- [15] JEDLIČKOVÁ, Anna, Jaromír MAŠATA a Magdalena SKOŘEPOVÁ. *Lokální mykózy: průvodce ošetřujícího lékaře*. Praha: Maxdorf, c2008. Jessenius. ISBN 978-80-7345-150-9..
- [16] SKOŘEPOVÁ, Magdalena. *Dermatomykologie v obrazech: Dermatomycology in pictures*. Praha: Galén, c2008. ISBN 978-80-7262-465-2..
- [17] WERTZOVÁ, V, J BARTOŇOVÁ a B VOXOVÁ. *Mykotická infekce kůže způsobená *Arthroderma benhamiae* (Trichophyton sp.)*. *Česko-slovenská dermatologie* [online]. 2018, (2). Dostupné z: <https://www.prolekare.cz/casopisy/cesko-slovenska-dermatologie/2018-2-21/mykotick>.

- [18] Arthroderma Benhamiae: Původce zoonotické dermatofytózy v Evropě. Laboratorní listy [online]. 2017, (31). Dostupné z: http://labin.cz/wp-content/uploads/lab_listy_1731_Arthroderma_benhamiae.pdf..
- [19] SKOŘEPOVÁ, M a kolektiv. Naše první zkušenosti s infekcemi vyvolanými Arthroderma benhamiae (Trichophyton sp.). Česko-slovenská dermatologie [online]. 2014, (4). Dostupné z: <https://www.prolekare.cz/casopisy/cesko-slovenska-dermatologie/2014-4/nase-prvni-zkusenosti-s-infekcemi-vyvolanymi-arthroderma-benhamiae-trichophyton-sp-50051>.
- [20] JANOUŠKOVCOVÁ, Helena. SOP - Vyšetření mykologické kůže a kožních adnex mikroskopicky a klutivačně: Dermatofyta. Ústav mikrobiologie FN Plzeň: Účinnost od 30.6.2021, SOPV/MIKRO/BAK/035/00/06..
- [21] VOTAVA, Miroslav. Lékařská mikrobiologie - vyšetřovací metody. Brno: Neptun, c2010. ISBN 978-80-86850-04-8..
- [22] Classification of Fungi. [online]. Dostupné z: <https://www.cliffsnotes.com/study-guides/biology/microbiology/the-fungi/classification-of-fungi>.
- [23] Fun With Microbiology (What's Buggin' You?) [online]. Dostupné z: <http://thunderhouse4-yuri.blogspot.com>.
- [24] Dermatophytes | Mycology | University of Adelaide. The University of Adelaide [online]. Dostupné z: <https://www.adelaide.edu.au/mycology/fungal-descriptions-and-antifungal-susceptibility/dermatophytes>.

SEZNAM GRAFŮ

Graf 1: Počet pozitivních vzorků na dermatofyty a rozdělení do jednotlivých let.....	47
Graf 2: Rozdělení pozitivních výsledků podle věku	48
Graf 3: Rozdělení pozitivních výsledků podle pohlaví	48
Graf 4: Lokalizace nejčastějšího výskytu dermatofyt	49
Graf 5: Lokalizace výskytu u žen	49
Graf 6: Lokalizace výskytu u mužů.....	49
Graf 7: Nejčastější druhy dermatofyt prokázané ve FN Plzeň	50
Graf 8: Počet pacientů s pozitivním výsledkem na ADBE po kontaktu s domácím zvířetem	52
Graf 9: Graf rozdělení kontaktu pacientů s jednotlivými domácími zvířaty před prokázanou nákazou.....	53

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1: Nepohlavní rozmnožování	16
Obrázek 2. Pohlavní rozmnožování.....	16
Obrázek 3: Třídění mikromycet	17
Obrázek 4: <i>Tinea</i> vyskytující se na jednotlivých částech těla a příklady dermatofyt	21
Obrázek 5: <i>Trichophyton rubrum</i> mikroskopický preparát	27
Obrázek 6: <i>Trichophyton rubrum</i> – SAB agar – (A) svrchní část, (B) spodní část.....	27
Obrázek 7: <i>Microsporum canis</i> – SAB agar – svrchní a spodní strana	29
Obrázek 8: <i>Microsporum canis</i> – makrokonidie v mikroskopickém preparátu	29
Obrázek 10: <i>Trichophyton benhamiae</i> – mikroskopický preparát – (a, b, c, e) konidiofory, (d) spirální vlákna, (f) makrokonidie, (g) mikrokonidie	30
Obrázek 9: <i>Trichophyton benhamiae</i> – SAB agar s chloramfenikolem	30
Obrázek 11: <i>Trichophyton interdigitale</i> – SAB agar – svrchní a spodní část	31
Obrázek 12: <i>Trichophyton interdigitale</i> – mikrokonidie, makrokonidie a spirální vlákna	31
Obrázek 14: <i>Trichophyton tonsurans</i> – mikroskopický preparát	32
Obrázek 13: <i>Trichophyton tonsurans</i> – SAB agar.....	32

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1: Rozdělení dermatofyt, tučně vyznačeny druhy vyskytující se na našem území	20
Tabulka 2: Tři skupiny antimykotik a jejich nejčastější zástupci.....	26
Tabulka 3: Odběr nejčastějšího materiálu	34

SEZNAM PŘÍLOH

- Příloha A – Povolení sběru informací ve FN Plzeň

PŘÍLOHA – A



FAKULTNÍ NEMOCNICE PLZEŇ
Útvar náměstka pro ošetrovatelskou péči
Edvarda Beneše 13, 305 99 Plzeň - Bory
alej Svobody 80, 304 60 Plzeň - Lochotín
IČO 00669806 tel.: 377 401 111, 377 103 111

Vážená paní

Veronika Motejzíková

Studentka oboru Laboratorní diagnostika ve zdravotnictví

Fakulta zdravotnických studií - Katedra záchranářství, diagnostických oborů a veřejného zdravotnictví
Západočeská univerzita v Plzni

Povolení sběru informací ve FN Plzeň

Na základě Vaší žádosti Vám jménem Útvaru náměstkyně pro ošetrovatelskou péči FN Plzeň **uděluji souhlas** se sběrem informací o laboratorních metodách / analýzách a výsledcích těchto metod, používaných v Ústavu mikrobiologie (MIKRO) FN Plzeň. Tento souhlas je vydáván, při splnění níže uvedených podmínek, v souvislosti s vypracováním Vaší bakalářské práce s názvem „Laboratorní diagnostika mikromycet ve FN Plzeň se zaměřením na dermatofyty“.

Podmínky, za kterých Vám bude umožněna realizace Vašeho šetření ve FN Plzeň:

- Vrchní zdravotní laborantka MIKRO souhlasí s Vaším postupem.
- Osobně povedete svoje šetření.
- Vaše šetření nenaruší chod pracoviště ve smyslu provozního zajištění dle platných směrnic FN Plzeň, ochrany dat pacientů a dodržování Hygienického plánu FN Plzeň. **Vaše šetření bude provedeno za dodržení všech legislativních norem, zejména s ohledem na platnost zákona č. 372/2011 Sb.,** o zdravotních službách a podmínkách jejich poskytování, v platném znění.
- Údaje ze zdravotnické dokumentace pacientů, pokud budou uvedeny ve Vaší bakalářské práci, musí být anonymizovány.
- Sběr informací budete provádět v době Vaší, školou schválené, odborné praxe, pod přímým vedením oprávněného zdravotnického pracovníka, kterým je paní **MUDr. Helena Janouškovcová, vedoucí lékařka MIKRO FN Plzeň.**

Po zpracování Vámi zjištěných údajů poskytnete zdravotnickému oddělení / klinice či organizačnímu celku FN Plzeň závěry Vašeho šetření, pokud o ně projeví oprávněný pracovník ZOK / OC zájem a budete se aktivně podílet na případné prezentaci výsledků Vašeho šetření na vzdělávacích akcích pořádaných FN Plzeň.

Toto povolení nezakládá povinnost zdravotnických pracovníků s Vámi spolupracovat, pokud by spolupráce s Vámi narušovala plnění pracovních povinností zaměstnanců. Spolupráce zaměstnanců FN Plzeň na Vašem šetření je dobrovolná.

Přeji Vám hodně úspěchů při studiu.

Mgr. Bc. Světluše Chabrová

manažerka pro vzdělávání a výuku NELZP
zástupkyně náměstkyně pro oš. péči

Útvar náměstkyně pro oš. péči FN Plzeň
tel.. 377 103 204, 377 402 207
e-mail: chabrovass@fnplzen.cz

10. 11. 2021