
UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Lékařská fakulta

Ústav mikrobiologie



**Diferenciace lékařsky významných kvasinek druhu
*Candida pelliculosa, Candida utilis a Candida fabianii***

Doktorská dizertační práce

Prohlašuji, že jsem předloženou dizertační práci: Diferenciace lékařsky významných kvasinek druhu *Candida pelliculosa*, *Candida utilis* a *Candida fabianii* vypracovala samostatně v průběhu doktorského studia pod odborným vedením školitele doc. MUDr. Petra Hamala, Ph.D. s použitím uvedených literárních zdrojů.

V Olomouci dne:

MDDr. Lucie Svobodová

Poděkování:

Touto cestou bych chtěla poděkovat především svému školiteli doc. MUDr. Petru Hamalovi, Ph.D. za jeho odborné vedení v rámci mého doktorského studia a za cenné rady a připomínky při revizi textu této dizertační práce. Dále laborantce Ústavu mikrobiologie Fakultní nemocnice Olomouc paní I. Dosedělové za praktické zaučení v počátcích mé práce s biochemickou soupravou ID 32C a mykologickými kulturami, doc. MVDr. J. Bardoňovi, Ph.D. za umožnění identifikace kultur na hmotnostním spektrometru v laboratoři Státního veterinárního ústavu Olomouc, MVDr. V. Šefrané a MVDr. N. Štromerové za pomoc se zvládnutím techniky extrakční metody, RNDr. M. Dendisovi a RNDr. D. Bednářové z firmy GeneProof, a.s. Brno za zajištění sekvenční analýzy a v neposlední řadě i mykologickým kolegům za zaslání kvasinkových izolátů použitých v epidemiologické studii.

Práce byla finančně podporována granty IGA_LF_2014_021, IGA_LF_2015_035 a IGA_LF_2016_022.

MDDr. Lucie Svobodová

Obsah

1. Úvod	6
1.1. Etiologie kvasinkových infekcí	7
1.2. Nejčastější formy kvasinkových infekcí	8
1.3. Rizikové faktory mykóz	11
1.4. Zdroje a způsoby přenosu kvasinek, faktory virulence	12
1.5. Farmakoterapie mykóz se zaměřením na kvasinkové mikromycety	13
2. Možnosti identifikace kvasinek v mykologické laboratoři	17
2.1. Fenotypové metody	18
2.1.1. Mikroskopické techniky	18
2.1.2. Možnosti kultivace	20
2.1.3. Sérologické metody	21
2.1.4. Biochemické metody	22
2.1.5. Testování citlivosti k antimykotikům	23
2.2. Molekulární metody	26
2.2.1. Genetické metody k identifikaci kvasinek	26
2.2.2. Genetické metody k typizaci kvasinek	30
2.2.3. Hmotnostní spektrometrie	36
3. Cíle práce	39
4. Materiál a metody	40
4.1. Morfologická identifikace kvasinek	41
4.2. Biochemická identifikace kvasinek	41
4.3. Identifikace kvasinek hmotnostní spektrometrií	42
4.4. Sekvencování	43
4.5. Testování citlivosti k antimykotikům mikrodiluční metodou	43
4.6. Karyotypizace pulzní gelovou elektroforézou	45
4.6.1. Izolace DNA a vlastní provedení pulzní gelové elektroforézy	45
4.6.2. Analýza dat	46
5. Výsledky	48
5.1. Morfologická identifikace kvasinek	48
5.2. Biochemická identifikace kvasinek	50
5.3. Identifikace kvasinek hmotnostní spektrometrií	50
5.4. Sekvencování	53
5.5. Testování citlivosti k antimykotikům mikrodiluční metodou	56

5.5.1. Porovnání MIC antimykotik po inkubaci 24 a 48 h.....	56
5.5.2. Mezi druhové porovnání MIC antimykotik.....	60
5.5.3. Epidemiologické analýzy v souvislosti s testováním citlivosti <i>C. fabianii</i>	61
5.6. Karyotypizace PFGE	67
6. Diskuze.....	71
6.1. Mykotické infekce způsobené <i>C. fabianii</i>	71
6.2. Mykotické infekce způsobené <i>C. pelliculosa</i>	78
6.3. Mykotické infekce způsobené <i>C. utilis</i>	82
6.4. Klinický význam <i>O. polymorpha</i>	85
7. Závěr.....	86
8. Souhrn	88
9. Summary.....	90
10. Literatura	92
11. Publikační činnost v průběhu DSP.....	109
11.1. Publikace v časopisech s impakt faktorem.....	109
11.2. Publikace v recenzovaných časopisech bez impakt faktoru.....	109
11.3. Přednášky a postery s abstraktem	110
12. Seznam tabulek, grafů, obrázků a zkratk.....	113
12.1. Seznam tabulek	113
12.2. Seznam grafů	114
12.3. Seznam obrázků	114
12.4. Seznam zkratk.....	115

1. Úvod

Závažné infekce způsobené mikroskopickými houbami (mikromycetami), obecně označované jako mykózy, se stávají v posledních letech významným medicínským problémem. Nejběžnějšími etiologickými agens jsou kvasinkovité mikroorganismy rodu *Candida*, vláknité houby rodu *Aspergillus*, dále kvasinky *Cryptococcus neoformans*, resp. *Cryptococcus gattii* a sporadicky vláknité mikromycety z čeledi *Mucoraceae* (1,2). Kandidy se v posledních třiceti letech staly čtvrtou nejčastější příčinou hematogenních nákaz, u kriticky nemocných na jednotkách intenzivní péče (JIP) dokonce třetí (3,4). Tato onemocnění mají většinou endogenní původ a postihují zejména imunokompromitované nemocné. Invazivní formy mykóz jsou obecně spojeny s vysokou mírou mortality, která je srovnatelná snad jen se septickými stavy vyvolanými *Pseudomonas aeruginosa* (5). Vysvětlení této nepříznivé prognózy pravděpodobně souvisí s nespecifickými příznaky, imunodeficity pacientů a dále časově náročnými a ne vždy zcela spolehlivými laboratorními postupy, sloužícími k detekci etiologického agens. Na průběhu onemocnění se negativně odráží i časté podceňování či opomenutí rizikových faktorů pro vznik invazivní mykózy a s tím související opožděné zahájení cílené antifungální léčby. Laboratorní potvrzení houbové etiologie a účinnost následných opatření jsou do značné míry závislé na kvalitě odebraného materiálu a na spolupráci klinického lékaře a mykologa. Jak již bylo zmíněno, základním předpokladem úspěšnosti antifungální terapie je její včasné zahájení. Na druhé straně je nutno zdůraznit, že častým používáním antimykotik u pacientů s poměrně nízkým rizikem rozvoje invazivní houbové infekce dochází obvykle pouze ke zbytečnému zvyšování nákladů na léčbu, poškozování pacienta toxickými účinky léčiv, případně vyvolání selekčního tlaku pro vznik rezistentních kmenů. Z důvodu častého používání antifungálního preparátu flukonazolu (FLA) v klinické praxi, zejména v profylaxi, začíná narůstat incidence kvasinkových infekcí, způsobených druhy, resp. kmeny, vůči nimž ztrácí účinnost.

Většina lékařsky významných mikromycet je řazena mezi tzv. imperfektní (nedokonalé) houby, u nichž je zatím známa pouze schopnost nepohlavního způsobu množení (6). Taxonomická nomenklatura upřednostňuje název pohlavního stádia (teleomorfy) před nepohlavním (anamorfou). Naopak v diagnostické praxi laboratoří klinické mykologie se mnohem častěji používá název anamorf, protože teleomorfy byly většinou objeveny až později, v době, kdy byl již zdravotnický personál zvyklý na původně zavedený název

nepohlavního stádia. Jelikož je tato dizertační práce zaměřena na problematiku z pohledu klinické mykologie, budou v ní používány především názvy anamorf.

Předložená studie se zabývá laboratorními metodami průkazu kvasinkovitých mikromycet, možnostmi jejich druhové identifikace, testováním citlivosti k antimykotikům a klinickým významem v etiologii různých onemocnění. Je cíleně zaměřena na tři druhy - *Candida pelliculosa* (teleomorfa *Wickerhamomyces anomalus*), *Candida utilis* (*Cyberlindnera jadinii*) a *Candida fabianii* (*Cyberlindnera fabianii*), které jsou pomocí rutinně používaných diagnostických postupů včetně komerčních biochemických souprav špatně odlišitelné.

1.1. Etiologie kvasinkových infekcí

Nejčastějšími vyvolavateli kvasinkových infekcí jsou zástupci rodu *Candida*. Z hlediska četnosti zaujímá stále první místo *Candida albicans*, nicméně počet případů, vyvolaných non-*albicans* druhy neustále narůstá. Jak již bylo zmíněno, je tento trend, zvláště u některých z nich, zřejmě způsoben profylaktickým, resp. terapeutickým podáváním FLA imunokompromitovaným pacientům. Studie Hachema *et al.* dokumentuje zvýšený výskyt *Candida krusei* (teleomorfa *Pichia kudriavzevii*), kvasinky známé rezistencí k FLA, u jedinců s neutropenií, kteří jím byli léčeni (7). Sníženou citlivostí na zmíněné antimykotikum se vyznačuje i *Candida glabrata*, která se stává nejčastějším non-*albicans* druhem izolovaným z hemokultur. Zvýšený záchyt *Candida parapsilosis* u případů hematogenních infekcí bývá spojen s dlouhodobě zavedeným venózním katétrem. Vysvětlením může být skutečnost, že je tato kvasinka známá svou schopností osídlovat umělé povrchy, včetně venózních katétrů, a tvořit na nich biofilm (8). Vyskytuje se častěji na kůži než na epitelu sliznic a to rovněž u zdravých osob (9). Pokud kolonizuje ruce ošetřujícího personálu, může dojít k jejímu přenosu na imunokompromitované jedince a vzniku nozokomiální infekce. K ohroženým skupinám patří novorozenci a pacienti na JIP (10,11). Dalším druhem s častým výskytem v klinickém materiálu je *Candida tropicalis*, která bývá uváděna jako etiologické agens při fungémiích, a to hlavně u neutropeniků a pacientů s hematologickými malignitami (12). Z ostatních non-*albicans* kvasinek, účastnících se na vzniku mykotických onemocnění, jejichž incidence je v současné době celosvětově na vzestupu, lze uvést např. *Candida guilliermondii* (*Meyerozyma guilliermondii*), *Candida lusitanae* (*Clavispora lusitanae*), *Candida kefyr* (*Kluyveromyces marxianus*), *Candida rugosa*, *Candida inconspicua*, *Candida zeylanoides*, *Candida utilis* (*Cyberlindnera jadinii*) a *Candida famata* (*Debaryomyces hansenii*) (10,13).

Onkologická centra a oddělení s intenzivní péčí zaznamenaly v posledních letech nárůst závažných mykotických infekcí, způsobených kvasinkovými mikromycetami, spadajícími tradičně do jiných rodů. Příkladem je *Malassezia furfur*, která bývá, i když jen vzácně, uváděna jako etiologické agens kandidémie v souvislosti s parenterální hyperalimentací (14). Nejvíce ohroženou skupinou jsou proto nedonošení novorozenci, kterým je podávána nitrožilní výživa obsahující tukové emulze. Jinak tato lipofilní kvasinka nejčastěji způsobuje kožní onemocnění zvané pityriasis versicolor a podílí se na vzniku seboroické dermatitidy (14,15). V těchto případech se uvažuje o hereditárním vlivu a úloze opalovacích krémů a olejů, obsahujících látky tukového charakteru.

Nárůst případů invazivních mykóz způsobených kvasinkou *C. neoformans* byl v poslední době zaznamenán zejména u pacientů se syndromem získané imunodeficience (AIDS), u nichž je kryptokokóza třetím nejčastěji diagnostikovaným infekčním onemocněním (16). Klinicky se jedná zejména o postižení plic, mimořádně závažná je meningoencefalitida, která je ve střední a jižní Africe nejběžnější formou zánětlivého postižení CNS u dospělých (17,18,19).

Na vzniku invazivních mykóz se u imunokompromitovaných pacientů mohou podílet i zástupci anamorfních rodů *Trichosporon* a *Geotrichum*. Tyto kvasinkovité mikromycety jsou obecně považovány za méně virulentní, faktorem usnadňujícím jejich patogenní uplatnění je imunitní oslabení hostitelského organismu (20,21). V ojedinělých případech mohou vyvolat onemocnění respiračního a gastrointestinálního traktu (22,23).

1.2. Nejčastější formy kvasinkových infekcí

Nejběžnějšími onemocněními, se kterými se můžeme setkat u člověka, jsou mykózy, tj. invazivní formy infekce. Protože v případě kvasinek jsou obvykle způsobeny zástupci rodu *Candida*, nazývají se kandidózy. Podle míry průniku do tkání je lze rozdělit na povrchové, u nichž jsou zasaženy pouze sliznice, kůže, příp. kožní adnexa a hluboké, resp. systémové či invazivní (v užším smyslu slova), kde dochází k průniku do vnitřního prostředí a postižení jednotlivých orgánů nebo celých orgánových systémů (24).

Slizniční a kožní projevy se vyskytují nejen u těžce imunokompromitovaných nemocných, ale často také u relativně zdravých lidí, zejména jedinců s lokální dispozicí. Predilekční lokalitou pro rozvoj kožní kandidózy jsou místa vlhké zapáčky v kožních záhybech,

nejčastěji v intergluteální či inguinální oblasti, kde se vytváří optimální podmínky pro růst a množení kvasinek.

Kvasinkové onychomykózy lze z klinického hlediska dělit na několik typů. Chronická paronychia se sekundární dystrofií nehtů, příp. i s postižením meziprstních prostor jsou diagnostikovány jako profesionální infekce u lidí, jejichž ruce jsou dlouhodobě vystaveny vlhkosti nebo prostředí bohatému na sacharidy, což jsou nejčastěji cukráři nebo pekaři (25). Distální nehtová infekce bývá naproti tomu spojena s Raynaudovým fenoménem nebo jinou formou vaskulární insuficience. Kandidová onychomykóza může vznikat i sekundárně v souvislosti s jiným kožním onemocněním, např. psoriázou (26).

Kandidóza sliznic se nejčastěji vyskytuje v dutině ústní. Z klinického hlediska lze rozeznat několik forem orální kandidózy, které se od sebe navzájem liší svým průběhem, závažností, klinickým obrazem a terapií (27). U novorozenců a pacientů se závažným základním onemocněním (např. AIDS, leukémie, maligní lymfomy) se vyskytuje akutní pseudomembranózní kandidóza, při níž dochází na zarudlé sliznici ke tvorbě typických bělavých nebo žlutobílých povlaků zvaných soor (česky moučnivka). Akutní atrofická kandidóza se objevuje po léčbě antibiotiky, kdy jde v podstatě o přemnožení kvasinek v důsledku potlačení fyziologické bakteriální mikroflóry. Projevuje se rozsáhlou erytematózní stomatitidou doprovázenou atrofií papil jazyka (28). Největší počet případů orálních kvasinkových infekcí však zaujímá chronická atrofická kandidóza, kterou trpí až 65 % pacientů pokročilého věku. Predispozičním faktorem je nošení snímatelných zubních náhrad, pod nimiž vzniká specifické mikroprostředí s nižším pH a redukovanou koncentrací kyslíku. Při současně ztížené dentální hygieně se tak vytváří příznivé podmínky pro rozvoj zánětu (29). Mezi hlavní symptomy této formy patří erytém a bolestivost sliznice doprovázené sníženou salivací. Chronická hyperplastická kandidóza, neboli kandidová leukoplakie se často zjišťuje u kuřáků. Je charakteristická tuhými bílými ložisky, obvykle se vyskytujícími na jazyku a bukální sliznici. Ošetřující lékař by měl mít na paměti, že recidivující či jinak netypicky probíhající orální kandidóza může být prvním klinickým projevem infekce virem lidského imunodeficitu (HIV).

Druhou nejčastěji postiženou lokalitou je pochva. Vulvovaginální kandidózu prodělá během fertilního období až 75 % žen, přičemž 40-45 % z nich má zkušenosti s rekurencí (30). Z hlediska interpretace nálezu je však nutno zdůraznit, že, podobně jako v dutině ústní, jsou i zde kvasinky běžnou součástí fyziologické mikroflóry. Jejich bezpříznakové nosičství bylo

zjištěno v průměru u 20 % zdravých žen (31). Přesné údaje o incidenci vulvovaginální kandidózy však nejsou úplné, jelikož se nejedná o nemoc podléhající centrální evidenci. Sběr dat je ztížen absencí spolehlivých diagnostických metod a také tím, že se mnoho žen vyhýbá návštěvě gynekologické ambulance a své obtíže si léčí pomocí volně prodejných přípravků (30,32). K nejčastějším subjektivním projevům onemocnění patří pruritus, pálení a bolestivost pochvy, dyspareunie a dysurie. Při gynekologickém vyšetření bývá zjišťován erytém a edém v oblasti vulvy, který může přecházet až do tříselné a/nebo perianální oblasti. Děložní hrdlo je rudé a bolestivé, cervix však bývá beze změn (33,34). Při postižení perinea dochází v pokročilých případech až k tvorbě fisur a erozí, doprovázených inguinální lymfadenopatií. U některých žen se může objevit výtok, jehož intenzita a charakter bývá značně variabilní. V literatuře je obvykle popisován jako hojný s charakteristickou tvarohovitou konzistencí, ale někdy může být jen mírný a vodnatý (32,35). Epidemiologicky se v širším slova smyslu jedná o pohlavně přenosnou chorobu, u mužů jsou zánětlivé projevy lokalizované na glans penis a prepuciu, kde probíhají pod klinickým obrazem balanitidy nebo balanopostitidy.

Nejzávažnější formu povrchové slizniční infekce představuje chronická mukokutánní kandidóza, která vzniká jako důsledek vrozené poruchy aktivace T-lymfocytů nebo tvorby faktorů potřebných k aktivaci makrofágů (36). Zmíněné kvasinkové onemocnění může předcházet i diagnóze některých endokrinopatií, jako je např. autoimunitní polyglandulární syndrom typu I (Blizzardův syndrom) (37). Chronická mukokutánní kandidóza se projevuje těžkými perzistentními nebo rekurentními infekcemi kůže a sliznic, chronickými paronychií a dystrofickou kandidovou onychomykózou, která vede až k úplné destrukci nehtů (38).

Systémové infekce mají mnohem závažnější průběh a mnohdy končí smrtí pacienta. Většina případů vzniká jako důsledek šíření kvasinek krevním oběhem. Základním předpokladem jejich vzniku je kolonizace sliznic, resp. kůže kvasinkami. Významným predispozičním faktorem ze strany hostitele je poškozená integrita přirozených ochranných bariér, zejména sliznic, k níž dochází např. při mukozitidě vzniklé v důsledku radio- či chemoterapie, nebo při chirurgických zákrocích v abdominální oblasti. Klinické projevy systémové kandidózy jsou nespecifické, proto mohou být snadno zaměněny s infekcí bakteriální etiologie. V případě kandidémie jsou nejčastějším a obvykle i jediným projevem přetrvávající febrilie nereagující na podání širokospektrých antibiotik. Přibližně u 15 % pacientů s neutropenií se v jejím průběhu objeví na kůži makronodulární rash (39). Bývá

lokalizován na končetinách, ale může být i celotělový a často je zaměňován za polékovou alergickou reakci. Histologické vyšetření ale prokáže v hlubších vrstvách kůže přítomnost blastokonidií a pseudohyf (40).

Pokud je zasaženo více orgánů s nebo bez prokázané fungémie, jedná se o diseminovanou kandidózu (41). Nejčastěji jsou postiženy játra, slezina, plíce a ledviny (42). Hepatosplenická kandidóza na sebe upozorní kromě horečky (86 % nemocných), průjmu (32 %), ikteru (29 %), nevolnosti a zvracení (25 %), také bolestmi břicha (54 %), narůstající hepatosplenomegalii a vzestupem jaterních enzymů (43). Kandidóza plic a ledvin se svými projevy neliší od pneumonie, resp. nefritidy bakteriální etiologie. Z dalších, vzácněji se vyskytujících klinických forem systémové infekce lze uvést meningitidu, peritonitidu nebo osteomyelitidu. I přes zkvalitnění terapeutických možností zavedením nových systémových antifungálních přípravků se stále jedná o infekce se špatnou prognózou a vysokou mírou mortality, dosahující 40-70 % (5,44). Ekonomicky významným aspektem jsou vyšší náklady na léčbu nemocných v důsledku jejich podstatně delší hospitalizace (45,46).

1.3. Rizikové faktory mykóz

Základním předpokladem vzniku kandidémie, resp. invazivní kandidózy je již výše zmíněná kolonizace kůže a sliznic kandidami. K významným rizikovým faktorům těchto systémových mykotických infekcí patří porušení integrity přirozených obranných bariér. Celistvost kůže a sliznic může být oslabena v souvislosti s cytostatickou léčbou a radioterapií, při celkové parenterální výživě, hemodialýze, nebo v důsledku dlouhodobě zavedených venózních a močových katétrů (47). K dalším rizikovým faktorům invazivní kandidózy lze řadit dlouhodobý pobyt v nemocnici na odděleních s intenzivní péčí (>3 dny), kritický stav pacienta (APACHE II skóre >15), chirurgické zákroky především v abdominální oblasti, umělá plicní ventilace, léčba kortikoidy a imunosupresivy (48). V důsledku terapie širokospektrými antibiotiky dochází ke změnám v intestinální mikroflóře a následně k pomnožení kvasinek v trávicím traktu. Z něj se pak mohou kandidy dostat přes střevní sliznici do krevního oběhu. Důležitou roli hraje i charakter základního onemocnění včetně způsobu jeho léčby, což může zásadně ovlivnit imunitní stav hostitele (40). Incidenci navyšuje i vzrůstající počet pacientů s AIDS, který bývá doprovázen závažnými a často obtížně léčitelnými houbovými infekcemi.

Hlavní rizikové faktory systémových mykóz včetně kandidóz jsou shrnuty v tabulce 1. V širším kontextu k nim lze dále řadit např. rozvoj cestování a dopravy, v jejichž důsledku

dochází k zavlečení původců z endemických oblastí do nových lokalit a pobyt ve znečištěném prostředí, který obecně snižuje odolnost organismu vůči různým infekcím.

Tab. 1: Rizikové faktory systémové mykotické infekce - volně podle Yapara (49)

▪ hematologické a orgánové malignity	▪ zavedený venózní katétr
▪ neutropenie	▪ léčba imunosupresivy, cytostatiky, kortikoidy
▪ renální selhání	▪ radioterapie
▪ akutní pankreatitida	▪ chirurgická intervence
▪ diabetes mellitus	▪ terapie širokospektrými antibiotiky
▪ popáleniny	▪ prolongovaná hospitalizace na JIP
▪ infekce HIV	▪ hemodialýza
▪ slizniční kolonizace kvasinkami	▪ transplantace kostní dřeně a solidních orgánů
▪ nízká porodní hmotnost	▪ umělá plicní ventilace
▪ vrozené malformace	▪ celková parenterální výživa

Pro non-neutropenické pacienty hospitalizované na JIP byl na základě hodnocení nejzávažnějších rizikových faktorů vypracován algoritmus, tzv. "kandida skóre", který by měl napomoci v rozhodování o včasném zahájení antimykotické léčby. Princip spočívá v přiřazení určitého počtu bodů každému z vybraných rizikových faktorů uvedených v tabulce 2 a při podezření na kandidózu pak celkový součet těchto "rizikových bodů" pomáhá odlišit prostou kolonizaci od invazivní infekce. Hranice, při které pravděpodobnost vzniku systémového onemocnění významně vzrůstá, byla na základě výsledků studií stanovena na 2,5 (50).

Tab. 2: "Kandida skóre" u non-neutropenických pacientů podle Leon *et al.* (50)

Rizikový faktor	Body
parenterální výživa	1
chirurgický výkon	1
multifokální kolonizace	1
těžká seps	2

1.4. Zdroje a způsoby přenosu kvasinek, faktory virulence

Jelikož kandidy běžně kolonizují kůži a sliznice, je naprostá většina infekcí, způsobených těmito mikromycetami, endogenního charakteru. Nejčastěji jsou osídleny gastrointestinální a urogenitální trakt a sliznice orofaryngu. Změna asymptomatické kolonizace v zánětlivé

onemocnění zpravidla vzniká na základě souhry více různých faktorů. Při oslabení imunitních mechanismů hostitele nebo v důsledku terapie širokospektrými antibiotiky dojde k zvýšení množství kvasinek v poměru k průvodní mikroflóře. Dalším důležitým krokem vedoucím k rozvoji kandidózy je tvorba pseudohyf. K jejich formování může docházet vlivem některých exogenních faktorů, např. estrogenů (51). Poté, co je vytvořeno pseudomycelium, mohou kandidy snáze invadovat do přilehlých tkání. Z biochemického hlediska je proces invaze doprovázen produkcí hydrolytických enzymů, jako jsou sekreční aspartátová proteináza a fosfolipáza (35,52,53). Předpokládá se, že v patogenezi zánětu hraje významnou roli i tzv. fenotypový switching. Jedná se o schopnost spontánní transformace kvasinkových buněk, s níž jsou spojeny změny některých jejich vlastností a aktivity genů. Díky uvedenému fenoménu se kvasinky pravděpodobně mohou přizpůsobit rozdílným podmínkám v různých anatomických lokalitách lidského těla (54). Jako příklad zmíněné adaptace lze uvést expresi různých typů genů *C. albicans* v závislosti na pH prostředí, ve kterém se tato kvasinka nachází. Neutrální pH, které je např. v krevním řečišti a ve tkáních, vede k expresi genu *PHR1*, kódující tvorbu beta-(1,3)-glukanosyltransferázy, která má rozhodující úlohu při syntéze buněčné stěny. Na vaginální sliznici je však místo něj exprimován gen *PHR2*, kódující produkci stejného enzymu, avšak při nižších hodnotách pH (55,56).

Kvasinkové mikromycety se mohou šířit i exogenně, a to přímým kontaktem se zdrojem infekce, kterým bývá obvykle člověk (ruce ošetřujícího personálu, sliznice pohlavních orgánů), dále nepřímo kontaminovanými předměty (vyšetřovací nástroje, implantované protézy) či infúzními roztoky, příp. i potravinami (1,57). Respirační způsob nákazy, např. inhalací prachu z půdy, kontaminované vyschlým trusem ptáků, je známý u *C. neoformans*.

1.5. Farmakoterapie mykóz se zaměřením na kvasinkové mikromycety

K léčbě mykóz se používá specifická skupina antimikrobiálních látek označovaná jako antimykotika. Jsou dostupná v nejrůznějších lékových formách vhodných k lokálnímu i celkovému podávání. Léčebnou strategii je nutno volit s ohledem na závažnost mykotické infekce a klinický stav pacienta. Z dalších faktorů je rozhodující šíře druhového spektra antifungálního přípravku, jeho vedlejší účinky, interakce s jinými léky a náklady spojené s terapií.

Nejpočetněji zastoupené jsou azolové preparáty, zahrnující lokální i celkové přípravky. Podle chemické struktury se rozlišují vývojově starší *imidazolové* - ketokonazol (KET), mikonazol, klotrimazol, ekonazol - a novější *triazolové* deriváty - (FLA), itrakonazol (ITR), vorikonazol (VOR), posakonazol (POS), isavukonazol, terkonazol. Mechanismus jejich účinku spočívá v bloádě syntézy ergosterolu, který je nezbytnou součástí cytoplazmatické membrány hub prostřednictvím inhibice fungálního cytochromu P-450. Postupným vývojem od imidazolů k nejnovějším triazolům se zvyšuje antifungální specifita. Proto je u nedávno vyvinutých preparátů působení na lidský cytochrom P-450 v hepatocytu minimální. V případě FLA je další výhodnou vlastností vliv na membránové struktury kvasinkových buněk a zábrana jejich přechodu do myceliární formy. Omezuje také adhezní schopnosti kandid na endotel cév a povrchy fyziologických membrán, čímž je chrání před poškozením. Je účinný proti kandidám, kryptokokům a původcům některých endemických mykóz (2). Jeho spektrum však nezahrnuje *C. krusei*, která je k FLA rezistentní. Navíc zhruba 10 % kmenů *C. glabrata* má redukovanou citlivost, vyžadující vyšší dávkování, a přibližně u 10 % byla zaznamenána rezistence (58). Rovněž některé vzácněji izolované druhy kandid, jako *C. rugosa* nebo *C. inconspicua*, se vyznačují vyšším podílem *in vitro* rezistentních kultur (59,60). Při aplikaci je třeba brát v úvahu také funkci ledvin, kterými se uvedené antimykotikum vylučuje. VOR, POS a isavukonazol působí proti celému spektru kandid včetně FLA-rezistentních. Prvně zmíněné antimykotikum je na *C. krusei* účinné dokonce i při její rezistenci k amfotericinu B (61). U některých kmenů *C. glabrata* (5,5 %) lze pozorovat zkříženou rezistenci ke všem azolům, která se *in vitro* projeví vyššími hodnotami minimálních inhibičních koncentrací (MIC). Mezi nežádoucí účinky celé této skupiny patří alergie, elevace jaterních transamináz a nevolnost, případně zvracení u perorálně podávaných přípravků.

Nejstarší skupinou antifungálních látek jsou polyeny. Patří sem tři preparáty: amfotericin B (AMB), nystatin a natamycin. Mechanismem jejich účinku je vazba antimykotika na ergosterol obsažený v buněčné membráně houby s následnou poruchou semipermeability. Působení natamycinu a nystatinu je využíváno v topických přípravcích (masti, krémy, vaginální globule a kapsle). AMB je určen především pro systémové použití a více než 50 let představoval pro své mimořádně široké spektrum účinku a nízký výskyt rezistencí zlatý standard v léčbě invazivních mykotických onemocnění. Kromě celé řady kvasinek a vláknitých hub (včetně zygomycet) působí i na některá protozoa, např. leishmanie (62,63). U některých kmenů *C. lusitanae* byla údajně zaznamenána rezistence *in vitro* (64).

Tzv. konvenční AMB (chemicky AMB deoxycholát) není však již od roku 2009 v ČR registrován. Důvodem je jeho vysoká toxicita: akutní, provázená slabostí, horečkou, třesavkou a hypokalemií, ale zejména chronická, projevující se především kumulativní nefrotoxicitou. Významně nižší riziko posledně zmíněného nežádoucího účinku představuje AMB vázaný na tukové nosiče, tj. u nás registrovaný lipidový komplex a v zahraničí dostupná lipozomální forma a koloidní disperze (62).

Jediným zástupcem antimetabolitů je flucytozin (5-fluorocytozin, FCZ), který však v současné době není v ČR registrován. Původně byl vyvinut jako cytostatikum, jeho antimykotické účinky byly objeveny až později. FCZ je do buňky aktivně transportován prostřednictvím membránové cytozin-permeázy a v ní je kaskádou biochemických procesů přeměněn na aktivní metabolity, z nichž biologicky účinný je především 5-fluorouracil. Ten je po přeměně na 5-fluorouridin trifosfát vestavěn jako falešný pyrimidinový analog do ribozomální a transferové RNA, čímž dojde k blokadě proteosyntézy. Další jeho účinek spočívá v blokadě tvorby DNA inhibicí enzymu thymidylát syntetázy. Součástí antifungálního působení je i schopnost FCZ blokovat adhezi kandid na sliznice (2,65). Nejvyšší antimykotickou účinnost vykazuje proti kvasinkám rodů *Candida* a *Cryptococcus*, neboť obsahují ve své cytoplazmě cytozin-deaminázu, nezbytnou ke konverzi na jeho aktivní metabolity. Nevýhodou FCZ je relativně vysoké procento primární a rychlý vývoj sekundární rezistence, což znemožňuje jeho déleodobější podávání. Z tohoto důvodu je používán pouze v kombinovaných režimech (66). Významný je synergismus s AMB a azolovými antimykotiky, zejména FLA. Vzhledem k tomu, že výborně proniká do tkání, včetně CNS, používá se ve zmíněných kombinacích např. k léčbě kryptokokové meningitidy nebo infekcí CNS, způsobených relativně málo virulentní *M. furfur* (67,68,69). FCZ může vzácně vyvolat nežádoucí anafylaktické reakce, proto je nutné při zahájení léčby mít tuto skutečnost na paměti.

Nejnovější skupina echinokandinů je reprezentována kaspofunginem (KAS), anidulafunginem (AND) a mikafunginem (MIK). Cílovým místem působení echinokandinů je enzymatický komplex 1,3- β - a 1,6- β -D-glukan syntáza. Jeho specifickou nekompetitivní inhibicí zabrání echinokandiny polymeraci glukanu, hlavní složky buněčné stěny většiny patogenních hub. Při působení antimykotika v ní dojde k osmotické nestabilitě s následnou lýzou buňky, výsledný efekt je tedy fungicidní (70). Echinokandiny jsou obecně velmi dobře tolerovány, mají minimum nežádoucích účinků a široké antifungální spektrum, především na

kvasinky, nejsou však účinné proti kryptokokům (71,72). V současné době jsou konsenzuálně doporučovány jako lék volby při léčbě systémové kandidózy a kandidémie u středně těžkých a závažných infekcí (73).

Ostatní skupiny antimykotik jsou určeny k léčbě povrchových mykóz. K neznámějším patří alylaminy, inhibující syntézu ergosterolu v cytoplazmatické membráně hub. Účinné jsou především na dermatofyty, kde *in vitro* působí fungicidně (74). Nejčastěji používaným preparátem z této skupiny je terbinafin, který lze aplikovat nejen lokálně, ale v podobě kapslí i celkově. Skupina hydroxypyridonů je představována zejména ciklopiroxolaminem, jehož antifungální účinek spočívá ve změně permeability cytoplazmatické membrány. Tím je narušen transport bílkovin do nitra buněk (36). Působí na široké spektrum hub, ale také na některé bakterie a má dobrý průnik do hlubších vrstev kůže a nehtů (74).

Dá se předpokládat, že se nynější nabídka antimykotik v budoucnu rozšíří o další skupiny. V současnosti je studován účinek nových přípravků, jako jsou benanomycin A (pradimiciny), nikkomycin Z (nikkomyciny) či deriváty sordarinu, dobrých výsledků bylo údajně dosaženo i testováním lipozomálního nystatinu (61,75).

2. Možnosti identifikace kvasinek v mykologické laboratoři

Identifikace kvasinek na úroveň druhu hraje významnou roli z klinického i epidemiologického hlediska. Rychlé a přesné určení kultury je pro ošetřujícího lékaře mnohdy nezbytné vzhledem k nutnosti včasného zahájení cílené antimykotické terapie. Některé druhy mikromycet mohou být totiž rezistentní k určitým antifungálním preparátům, což může být důvodem selhání léčby. Jak již bylo uvedeno výše, může zmíněný problém nastat při podávání FLA u mykóz, způsobených *C. krusei*. Sekundární (získaná) odolnost se může vyvinout u *C. glabrata* v důsledku dlouhodobé perorální léčby imunokompromitovaných pacientů azolovými přípravky (76,77). Vazquez ve své studii zjistil, že 94 % izolátů *C. glabrata* rezistentních k FLA vykazovalo současně zkříženou rezistenci ke KET a 88 % ke klotrimazolu (78). Terapie AMB může selhat u infekcí způsobených některými kmeny *C. lusitanae*, v menší míře byl uvedený jev popsán také u *C. glabrata*, *C. krusei* a *Trichosporon asahii* (79,80). Rezistenci k echinokandinům mohou kvasinky získat v důsledku bodových mutací genů *FKS1* a *FKS2*, kódujících glukán syntázu, jež je cílovým enzymem působení těchto fungicidních látek (81,82,83). Nárůst takových kmenů byl v posledních letech zaznamenán zejména v rámci druhu *C. glabrata* (84). Za méně citlivé jsou považovány také *C. parapsilosis* a *C. guilliermondii*, u nichž byly *in vitro* zaznamenány 4-100násobně vyšší hodnoty MIC echinokandinů v porovnání s citlivými izoláty *C. albicans* (85,86). Klinický dopad uvedené skutečnosti však není dosud jasný, jelikož infekce způsobené těmito druhy zatím dobře odpovídají na dosavadní terapii zmíněnou skupinou antimykotik (87).

Výše uvedené skutečnosti přesvědčivě dokumentují nutnost exaktní druhové identifikace kvasinek, zejména u pacientů v neutropenii na hematologických odděleních, kde, jak již bylo zmíněno, dochází následkem profylaktického podávání FLA k selekci non-*albicans* druhů rezistentních k tomuto preparátu (88).

Z epidemiologického hlediska hraje určování kvasinek významnou roli při hledání možného zdroje nozokomiálních mykóz, např. v případě miniepidemií hematogenních infekcí u pacientů se zavedenými venózními katétry na JIP (89).

Běžně dostupné metody lze v zásadě rozdělit na fenotypové, založené na rozdílech v morfologii, biochemické aktivitě a antigenním složení kvasinek a molekulárně-biologické, jejichž principem je analýza nukleových kyselin nebo proteinů. Přehled nejčastěji používaných metod pro identifikaci kvasinkových mikromycet je sumarizován v tabulce 3.

Tab. 3: Přehled laboratorních metod používaných k identifikaci kvasinek

Charakter metod	Princip	Způsob identifikace	Kritérium hodnocení
fenotypové	mikromorfologie	nativní preparát	klíčící hyfy, chlamydospory, artrospory, pseudomycelium
		barvený preparát	askospory, pouzdra
	produkce pigmentů, aktivita enzymů	vzhled na selektivních a diagnostických půdách	fluorescence nebo barva kolonie
	sérologické reakce	sérologické testy	aglutinace
	analýza biochemických vlastností	asimilační testy	změna barvy, intenzita zákalu
fermentační testy		produkce CO ₂	
molekulárně-biologické	analýza DNA	FISH, PCR + PAT	rozdíly v DNA
	analýza RNA	NASBA	rozdíly v RNA
	analýza proteinů	MALDI-TOF MS	hmotnostní spektrum

DNA - deoxyribonukleová kyselina, **FISH** - fluorescenční hybridizace *in situ*, **PCR** - polymerázová řetězová reakce, **PAT** - postamplifikační testy, **RNA** - ribonukleová kyselina, **NASBA** - amplifikace založená na sekvencích nukleové kyseliny, **MALDI-TOF MS** - hmotnostní spektrometrie (matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight)

2.1. Fenotypové metody

2.1.1. Mikroskopické techniky

Na základě morfologie lze mikromycety rozdělit na vláknité houby a kvasinky. Pro prvně zmíněné je typická tvorba pravých vláken (hyf), které se splétají v podhoubí (mycelium). Hyfy jsou tvořeny větším počtem protáhlých buněk, jež jsou od sebe odděleny septy a rozrůstají se prodlužováním. Kvasinky se naproti tomu rozmnožují pučením a zůstanou-li mateřské buňky v kontaktu s dceřinými, dochází ke vzniku řetězkových útvarů, které vlákna, resp. podhoubí jen připomínají a nazývají se proto pseudohyfy, resp. pseudomycelium. Na rozdíl od vláknité formy se nevytváří septa a místo kontaktu dvou sousedních buněk je výrazně užší než jejich průměr. Zvláštní skupinu pak představují tzv. dimorfní houby (např. rody *Histoplasma*, *Coccidioides*, *Blastomyces*), které jsou schopny vlivem vnějších podmínek, zejména teploty, přecházet z jedné formy do druhé.

Hodnocení mikromorfologie je důležitým krokem v procesu identifikace. V případě kvasinek lze použít nativní i barvené preparáty.

Nativní preparát se využívá při tzv. testu klíčících vláken (germ tubes), který slouží k rychlé identifikaci *C. albicans*. Část kolonie z vyšetřované kultury se nejprve 2,5-3 h inkubuje v séru při 35° C a poté se na sklíčku hodnotí přítomnost klíčících hyf, tj. krátkých vláken, vyrůstajících z kvasinkových buněk. Jejich tvorba může být ovlivněna typem

použitého média, velikostí inokula a kultivační teplotou (90). Princip nativního preparátu je využíván i k posouzení mikroskopického vzhledu vyšetřované kultury po dvoudenní inkubaci při laboratorní teplotě na nutričně chudém rýžovém nebo kukuřičném agaru. Hodnotí se především schopnost tvorby silnostěnných, kulovitých útvarů, tzv. chlamydospor, typických pro *C. albicans* a *Candida dubliniensis*. Na základě přítomnosti, resp. absence pseudomycelárních vláken či pravého mycelia a charakteru blastospor lze předběžně určit některé další druhy kvasinkových mikromycet. U rodů *Geotrichum* a *Trichosporon* se na rýžovém agaru vyskytují obdélníkové artrospory (91). Hlavní mikromorfologické znaky nejčastěji vyskytujících se kvasinek jsou shrnuty v tabulce 4.

Tab. 4: Mikroskopický vzhled vybraných druhů kvasinek (92)

Druh kvasinky	Mikroskopický vzhled			
	pseudomycelium	pravé mycelium	chlamydospory	artrospory
<i>Candida albicans</i>	+	+	+	0
<i>Candida dubliniensis</i>	+	+	+	0
<i>Candida krusei</i>	+	0	0	0
<i>Candida glabrata</i>	0	0	0	0
<i>Candida tropicalis</i>	+	+	0	0
<i>Candida parapsilosis</i>	+	0	0	0
<i>Saccharomyces spp.</i>	±*	0	0	0
<i>Geotrichum spp.</i>	0	+	0	+
<i>Trichosporon spp.</i>	+	+	0	+

+ přítomny, 0 nepřítomny, * zřídka může tvořit krátké pseudohyfy

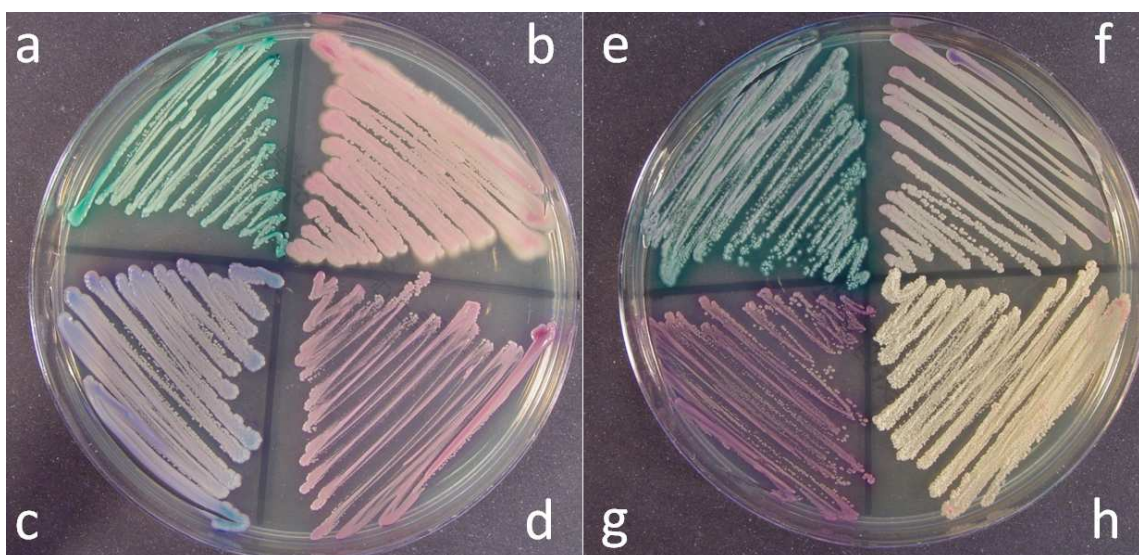
Nejznámější barvicí metodu v mikrobiologii, podle Grama, nelze v lékařské mykologii, na rozdíl od bakteriologie, při identifikaci využít, neboť všechny kvasinkové buňky jsou v podstatě grampozitivní. Užitečnější jsou k tomuto účelu jiná barvení, např. podle Burriho lze pomocí čínské tuše prokázat polysacharidová pouzdra kryptokoků, podle Wirtze a Conklina zase zhodnotit morfologii a počet askospor u teleomorfních druhů kvasinek.

2.1.2. Možnosti kultivace

Nejnámější půdou pro kultivaci mikromycet je selektivní Sabouraudův glukózový agar (SGA) s chloramfenikolem. Uvedené antibiotikum totiž potlačí růst většiny gram pozitivních a gram negativních bakterií a usnadní tak izolaci kvasinek a vláknitých hub z klinického materiálu. Naprostá většina kandid zde vyrůstá v podobě okrouhlých, polomatných, smetanově bílých kolonií, proto ji nelze využít při určování druhů. K tomuto účelu se naopak hodí některá ze selektivně-diagnostických půd. Tato média obsahují fluorogenní nebo chromogenní substráty, které umožňují detekovat druhově specifickou aktivitu enzymů. Používání prvně zmíněné skupiny půd v rutinní diagnostice je v současnosti na ústupu, neboť pomáhají identifikovat pouze *C. albicans*. Další nevýhodou je nutnost hodnocení fluorescence v ultrafialovém světle (93). Média obsahující chromogenní substráty jsou založena na rozdílech v barvě kolonií a jejich velkou předností v porovnání s tradičními diagnostickými postupy je rychlá, byť jen orientační druhová identifikace a poměrně snadná detekce směsných kultur. Zatímco nejstarší generace těchto půd byla vyvinuta pouze pro určování *C. albicans*, v současné době se pomocí nich dá předběžně diferencovat několik dalších kvasinkových druhů. V laboratořích Ústavu mikrobiologie LF UP v Olomouci se využívá chromogenní půda COLOREX Candida (Trios, Česká republika) vyráběná z dehydratovaného základu s komerčním názvem CHROMagar Candida (CHROMagar Microbiology, Francie). Zmíněné médium napomáhá k určení čtyř nejčastěji se vyskytujících kandid, které zde vyrůstají v morfologicky a barevně odlišných koloniích: *C. albicans* (zelenožluté, později až zelenomodré), *C. tropicalis* (tmavě modré, často s patrnou difúzí modrého zbarvení do okolí), *C. glabrata* (tmavě růžové až fialové s lesklým povrchem) a *C. krusei* (světle růžové, matné, s nepravidelnými okraji). Zkušené mykologové jsou schopni podle typického vzhledu a zbarvení rozeznat většinu kmenů dalších klinicky významných druhů kvasinek, např. *Saccharomyces cerevisiae*, která vyrůstá nejčastěji v podobě fialových drobnějších kolonií s vyvýšeným středem, *C. parapsilosis* mívá bílé se zprohýbaným povrchem, *C. lusitaniae* světle růžové či namodralé a *T. asahii* tmavě zelené s drsným povrchem. Rozdíly v barvě u výše jmenovaných druhů jsou demonstrovány na obrázku 1. Z dalších, často používaných chromogenních půd lze uvést např. CandiSelect 4 (Bio-Rad Laboratories, USA) nebo Brilliance Candida Agar (Oxoid, Velká Británie).

K selektivnímu záchytu patogenních kryptokoků lze použít Bird Seed Agar (BD Diagnostics, USA), který podporuje produkci tmavě hnědého melaninu (94).

Obr. 1: Morfologie kolonií na chromogenní půdě COLOREX Candida

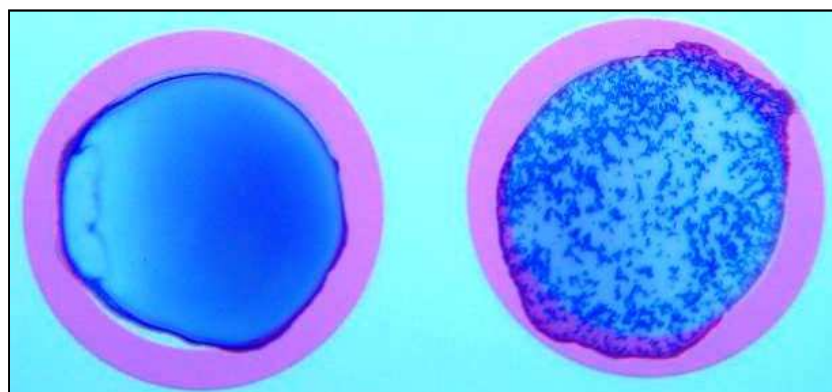


a - *Candida albicans*, **b** - *Candida krusei*, **c** - *Candida tropicalis*, **d** - *Candida glabrata*, **e** - *Trichosporon asahii*, **f** - *Candida lusitanae*, **g** - *Saccharomyces cerevisiae*, **h** - *Candida parapsilosis*

2.1.3. Sérologické metody

Sérologická identifikace kvasinkových kultur je založena na principu latexové aglutinace. Využívá reakce specifických antigenů buněčné stěny určitých druhů kvasinek s příslušnými monoklonálními protilátkami. Do této kategorie patří komerční soupravy, sloužící k vzájemnému odlišení *C. albicans* a *C. dubliniensis*, jako je ELITex Bicolor *dubliniensis* (ELITechGroup, Francie). Výsledky testu jsou demonstrovány na obrázku 2. Od stejného výrobce je k dispozici také produkt k identifikaci *C. krusei*, ELITex *krusei*.

Obr. 2: Vzájemné odlišení druhu *Candida albicans* (vlevo) a *Candida dubliniensis* (vpravo) pomocí diagnostické soupravy ELITex Bicolor *dubliniensis*



2.1.4. Biochemické metody

Biochemické metody se v laboratoři klinické mykologie využívají k definitivnímu druhovému určení. Jsou založeny na testování schopnosti kvasinek využít různé zdroje uhlíku a dusíku. Principiálně je lze rozdělit na auxanogramy a zymogramy. Prvně zmíněná skupina využívá při reakcích kyslík a štěpení uvedených živin probíhá formou asimilace. V případě zymogramů jsou substráty využívány za anaerobních podmínek, tedy fermentačními pochody.

Auxanogramy a zymogramy si lze připravit přímo v laboratoři. V práci Otčenáška *et al.* je publikován návod k jejich zhotovení, včetně složení použitých médií (95). Vyhodnocení lze provádět nejlépe podle klíče vytvořeného Fragnerem, kterým lze identifikovat až 50 kvasinkových druhů (89,96). Metodický postup je ale poměrně pracný, obtížně standardizovatelný a na rozdíl od firemních produktů, kdy jsou jednotlivé testy v jamkách mikrodestiček, vyžaduje podstatně více prostoru v termostatu. Proto je mnohem praktičtější použít některou z komerčních souprav, založených na testování schopnosti asimilace různých uhlíkatých sloučenin, nejčastěji sacharidů. Výsledek identifikace je znám za 24-72 h v závislosti na typu použitého testu a konkrétním druhu kvasinky. Některé soupravy jsou založeny na turbidimetrickém hodnocení výsledků, tj. porovnávání intenzity zákalu v jamkách s příslušnými substráty s pozitivní nebo negativní kontrolou. Denzitu lze posoudit prostým okem, nebo pomocí vhodného přístroje. Jako příklad lze uvést komerční produkty API 20C AUX a ID 32C (oba bioMérieux, Francie). U jiných souprav je hodnocení kolorimetrické, kdy v pozitivním případě dojde k barevné změně média. Kromě testovaných chemikálií je totiž v jamkách obsažen indikátor pH, např. bromkresolová červeň. Nejpoužívanějšími výrobky založenými na tomto principu jsou Auxacolor 2 (Bio-Rad Laboratories), RapID Yeast Plus (Thermo Fischer Scientific, USA) nebo VITEK 2 YST (bioMérieux). U některých souprav se k vyhodnocení biochemických reakcí využívá kombinace obou přístupů, jako je tomu v případě CANDIDAtest 21 (Erba Lachema, Česká republika) MICRONAUT-Candida (Merlin Diagnostika, Německo) nebo Biolog YT MicroPlate (Biolog, USA) (97).

Nejširší druhovou databází disponuje komerční turbidimetrická souprava ID 32C. Zmíněný produkt se skládá z 32 jamek, z nichž 31 obsahuje dehydratované substráty (sorbitol, D-xylóza, D-ribóza, glycerol, L-ramnóza, palatinóza, erytritol, D-melibióza, glukuronát sodný, D-melezitóza, glukonát draselný, levulinát, D-galaktóza, cykloheximid, D-sacharóza, N-acetylglukosamin, DL-laktát, L-arabinóza, D-celiobióza, D-rafinóza, D-maltóza,

D-trehalóza, 2-ketoglukonát draselný, α -metyl-D-glukopyranosid (MDG), N-acetyl-glukosamin, L-sorbóza, eskulin, D-manitol, D-laktóza, inositol a D-glukóza) a zbylá, která žádný neobsahuje, slouží jako negativní kontrola. Inokulaci jamek testovaným kmenem a hodnocení intenzity zákalu porovnáním s negativní kontrolou po 48-72 h inkubace je možno provádět automaticky nebo ručně. Ve výsledkovém protokolu jsou testy rozděleny do deseti skupin po třech, přičemž každé trojici jsou přiděleny hodnoty 1, 2 nebo 4 v případě utilizace substrátu, v opačném případě vždy 0. Poté se v každé skupině tato čísla sečtou. Získaný desetimístný číselný kód je identifikačním softwarem *apiweb* (bioMérieux) přiřazen k určitému druhu kvasinky, zahrnuté v databázi a následně je stanovena i procentuální míra shody. Na základě rozdílných biochemických aktivit, resp. různých numerických profilů lze pomocí zmíněné soupravy rozlišit až 61 druhů kvasinek.

2.1.5. Testování citlivosti k antimykotikům

Účelem testování citlivosti k antifungálním přípravkům *in vitro* je detekce rezistentních kmenů v populaci mikromycet nebo odhalení rezistence, vzniklé během terapie. Metody používané ke stanovení citlivosti kvasinek k antimykotikům lze principiálně rozdělit na difúzní a diluční. Difúzní testy jsou označovány jako kvalitativní, jelikož - s výjimkou diagnostických proužků E-test - poskytují informaci pouze o citlivosti nebo rezistenci mikromycety k dané látce. Pomocí kvantitativních dilučních metod je možno určit i její MIC, definovanou jako nejmenší množství antimykotika, schopné potlačit růst a množení příslušného houbového izolátu.

Difúzní metody

Principem difúzních testů je postupné uvolňování látek s antimykotickým účinkem ze zdroje (disky, tablety) do agarové půdy, která je předem inokulovaná vyšetřovaným kmenem. Během inkubace dochází k potlačení růstu citlivých izolátů v okolí disku a vytvoření tzv. zóny zábrany (inhibice) růstu kultury (98). Výhodou uvedených metod je jednoduchost a rychlost provedení a finanční nenáročnost. Standardizované postupy pro testování citlivosti k antimykotikům u kvasinek vycházejí z dokumentu M44, vytvořeného americkým Ústavem pro klinické a laboratorní standardy (CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute). Po jednodenní kultivaci kandid na SGA nebo krevním agaru se přenesou přibližně pět kolonií do zkumavky s fyziologickým roztokem a následně se upraví denzita suspenze na 0,5 podle

McFarlandovy zákalové stupnice. To odpovídá množství $1-5 \times 10^6$ CFU (colony forming units - jednotek tvořících kolonie) v 1 ml. Po 15 minutách je vyšetřovaná kultura pomocí vatového tampónu inokulována na Müller-Hintonův agar s přidavkem 2 % glukózy a 0,5 mg/l metylénové modři. Po uplynutí 2-5 minut jsou na půdu kladeny disky napuštěné standardním množstvím antimykotik. Následuje inkubace 24-72 h při 35 °C v závislosti na druhu kvasinky. Poté je měřen průměr vzniklých zón zábrany růstu pomocí posuvného měřidla nebo automatizovaných systémů a na základě porovnání výsledné hodnoty s interpretačními kritérii je kmen označen jako citlivý, citlivý v závislosti na dávce, intermediární nebo rezistentní. Kvalita výsledků závisí na správném provedení jednotlivých kroků metody a přesnosti při odečtu průměru inhibičních zón. Důležitou součástí je verifikace pomocí doporučených referenčních kmenů (99).

Z komerčních produktů, vycházejících z principu difúzní metody, se osvědčil zejména Neo-Sensitabs (Rosco Diagnostica, Dánsko). Místo disků jsou používány tablety, ze systémových antimykotik jsou k dispozici AMB, FCZ, KET, FLA, ITR, VOR, POS, KAS a terbinafin, k testování jsou nabízena i některá antifungální generika pro lokální použití. Studie srovnávající Neo-Sensitabs se standardní difúzní a diluční metodou CLSI dokládají do značné míry korelaci dosažených výsledků (100,101).

Kvantitativní modifikací difúzní agarové metody jsou diagnostické proužky E-test (bioMérieux), původně vyvinuté švédskou firmou AB Biodisk. V celé své délce jsou napuštěny exponenciálně rostoucími koncentracemi antimykotik, obvykle v rozsahu 15 ředění. Doporučovanou půdou pro testování citlivosti u kvasinek je médium RPMI 1640 (Sigma-Aldrich, USA) s přidavkem 2 % glukózy a 1,5 % agaru, pufované MOPS (3-(N-morfolino)propansulfonová kyselina, Sigma-Aldrich). Alternativou, zejména pro azolová antimykotika, je kasitonový agar, vyráběný některými firmami pod názvem Antimycotic Sensitivity Test Agar. Po inkubaci se kolem proužku vytvoří zóna zábrany růstu, která má tvar elipsy. V místě, kde se okraj inhibiční zóny dotýká proužku, je možno odečíst MIC. Na základě výsledků řady studií lze E-test považovat za spolehlivou alternativu standardizované diluční metody (např. 101,102,103), přičemž je možné tímto velmi jednoduchým způsobem testovat citlivost ke všem v současnosti používaným systémovým antimykotikům. Určitou nevýhodou je však poměrně vysoká cena. V podstatě stejný produkt nabízí pod názvem MIC Test Strip italská firma Liofilchem, avšak zatím existuje jen málo informací o korelaci výsledků se standardními metodami.

Diluční metody

Testování citlivosti kvasinek mikrodiluční metodou se provádí v jamkách mikrotitračních destiček, které obsahují odstupňované (exponenciálně ředěné) koncentrace antifungálních látek. Inokulace se provádí standardním množstvím čisté kultury testovaného kmene a po inkubaci se porovnává intenzita růstu v jednotlivých ředěních s kontrolní jamkou bez antimykotika. Následně se určí MIC, odpovídající nejnižší koncentraci antifungální látky, při níž dochází k 90% inhibici růstu populace kvasinek. Na základě porovnání těchto hodnot s klinickými limity (breakpointy) se kmen označí za citlivý nebo rezistentní k testovaným antimykotikům. Jako breakpoint se v tomto případě označuje koncentrace antifungální látky, kterou je možné dosáhnout v tělních tekutinách nebo jiných cílových místech v průběhu optimální léčby (104).

První standardizovaný postup pro testování citlivosti kvasinek k antimykotikům mikrodiluční bujónovou metodou byl publikován americkým CLSI (dříve NCCLS - National Committee on Clinical Laboratory Standards) v roce 1992 jako dokument M27-P, který byl poté několikrát zrevidován až na nynější verzi M27-A3 a její dodatek M27-S4 (105,106). V Evropě byl později vydán analogický návod, jehož autorem je Subkomise pro testování antifungální citlivosti, zřízená v rámci Evropské komise pro testování antimikrobiální citlivosti (EUCAST - European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing). Z původního návrhu nesoucího označení E.Dis. 7.1. byla postupně vytvořena současná definitivní metodika E.Def. 7.3. (107). Oba doporučené postupy (CLSI a EUCAST) jsou přes mírné odlišnosti, shrnuté v tabulce 5, v zásadě stejné. Mikrodiluční metoda je nyní standardizována pro AMB, FCZ, KET, FLA, ITR, VOR, POS a echinokandiny, v případě M27-A3 navíc pro ravukonazol a E.Def. 7.3. pro isavukonazol (105,107).

Tab. 5: Rozdíly v metodice mezi dokumenty M27-A3 a E.Def. 7.3

Metodický krok	M27-A3	E. Def.7.3
denzita inokula (CFU/ml)	$0,5-2,5 \times 10^3$	$0,5-2,5 \times 10^5$
glukóza v médiu (%)	0,2	2,0
dno jamek destičky	kulaté	rovné
inkubace (h)	24 a 48	24
hodnocení MIC	vizuálně	fotometricky

Z komerčně dostupných produktů, odvozených ze zmíněných standardizovaných postupů a vhodných pro běžnou laboratorní diagnostiku, je nejznámější kolorimetrická mikrodiluční souprava Sensititre YeastOne (Thermo Fischer Scientific) (108,109). Mikrotitrační destička obsahuje antimykotika ve vysušeném stavu a ředění odpovídajícím standardu CLSI M27-A2, navíc však barevný indikátor Alamar blue. Růst kandid se projeví po přidání suspenze kultury a inkubaci změnou jeho barvy v jamkách z původní modré na červenou. Produkt je vyráběn ve více variantách, přičemž nejvíce antimykotik umožňuje testovat YO10: AMB, FCZ, FLA, ITR, POS, VOR, KAS, AND a MIK. Velkou předností této metody je její snadné provedení, jednoduché hodnocení výsledků a dobrá mezilaboratorní reprodukovatelnost. Na stejném principu je založena i další kolorimetrická souprava MICRONAUT-AM (Merlin Diagnostika). Barevným činidlem je v tomto případě AST-indikátor (resazurin a methylenová modř). V závislosti na uspořádání a počtu vybraných antimykotik lze hodnotit citlivost jednoho, dvou nebo čtyř kmenů na jedné mikrotitrační destičce. Nejnovější varianta MHK 2 určená pro hodnocení jedné kvasinkové kultury obsahuje devět systémových antimykotik, stejných jako v případě YO10. Z dalších kolorimetrických mikrodilučních souprav lze uvést např. ASTY panely (Kyokuto Pharmaceutical Industrial Co., Japonsko) nebo SensiQuattro Candida EU (Liofilchem), ale ty nejsou v České republice v současné době dostupné.

2.2. Molekulární metody

Mezi molekulární lze v současné době řadit metody genetické a proteinové. První skupina analyzuje nukleové kyseliny, druhá detekuje odlišnosti v bílkovinných spektrech buněk. Tyto techniky lze využít k identifikaci kvasinek, tj. jejich určení na úroveň druhu, ale i k typizaci, kdy jsou zkoumány odlišnosti jednotlivých kmenů v rámci určitého druhu.

2.2.1. Genetické metody k identifikaci kvasinek

Genetické metody sloužící k identifikaci kvasinek jsou založeny na odlišnostech v sekvencích nukleotidů tvořících řetězce nukleových kyselin. Používají se často v kombinaci s jejich přímým průkazem v odebraném klinickém materiálu, lze je však využít i pro určování vypěstovaných kultur mikromycet (110). Hlavní problém jejich využití v běžné diagnostické praxi představuje především absence obecně uznávaného standardizovaného postupu.

Laboratoře mají proto zatím k dispozici vlastní vyzkoušené techniky, které, jsou-li delší dobu používány, lze v těchto místních podmínkách považovat za spolehlivé.

Pro identifikaci houbových patogenů je využívána především DNA. Některé genetické metody ji analyzují přímo, u jiných se v souvislosti s určením původce onemocnění nejdříve zvyšuje její kvantita pomocí amplifikace.

Přímá analýza DNA

Nejznámější technikou z této skupiny metod je tzv. fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH). Využívá přímé vazby (hybridizace) sondy značené fluorochromem na komplementární úseky ve vyšetřované DNA. Sondou je různě dlouhá jednovláknová molekula DNA nebo RNA se známou sekvencí nukleotidů. Zkoumaný materiál je nejprve fixován na podložní sklíčko. Po rozrušení buněk následuje denaturace DNA, čímž dojde k jejímu rozvolnění do podoby jednovláknových molekul, na něž se může sonda navázat. Ve fluorescenčním mikroskopu září místa hybridizace sondy a vyšetřované DNA barvou příslušného fluorochromu.

Klinické laboratoře mohou pro rychlou identifikaci kvasinek přítomných v hemokulturách využít komerční soupravy PNA FISH (Advandx A/S, Dánsko), zejména ve variantě Yeast Traffic Light. Limitujícím faktorem je omezené spektrum druhů a ne zcela přesná identifikace, neboť fluorescence barevně odlišuje kvasinky především v závislosti na citlivosti detekovaných druhů k systémovým antimykotikům: *C. albicans* a/nebo *Candida parapsilosis* (zelená - empiricky dobře citlivé), *C. tropicalis* (žlutá - méně citlivý) a *C. glabrata* a/nebo *C. krusei* (červená - nejvíce rezistentní). Další nevýhodou uvedeného produktu je poměrně vysoká cena (89).

Amplifikace DNA

Amplifikace DNA se provádí pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR). Principiálně při ní dochází k cyklickému zmnožování úseku DNA, který je vymezen dvojicí oligonukleotidů, tzv. primerů, schopných vazby na vybrané specifické sekvence na templátové DNA, kterou představuje jedno z vláken původní dvoušroubovice. Další důležitou součástí reakce jsou deoxynukleosidtrifosfáty (dNTPs), které představují stavební kameny nové DNA a termostabilní enzym DNA-polymeráza, který z nich vytváří komplementární úseky. Samotná reakce probíhá ve třech krocích: (1) zahřátí na 94-96 °C, čímž dojde k denuraci DNA, tedy k oddělení obou vláken dvoušroubovice (2) ochlazení na 50-65 °C, při níž dochází k nasedání primerů na odpovídající sekvence v řetězcích DNA a (3) zahřátí na 72 °C, což vede

k aktivaci DNA-polymerázy, která z dNTPs vytvoří komplementární úsek DNA. Uvedený cyklus kroků se obvykle 30-40krát opakuje. Výhodou PCR je jednoduchost provedení, jelikož řízení jednotlivých fází je automatizováno v termocykleru. Po několika opakovaných cyklech tak lze z nepatrného množství vstupní DNA získat velké množství délkově přesně definovaných produktů. Kvalita provedení musí být odpovídajícím způsobem dodržována a kontrolována, aby nedošlo ke kontaminaci a s ní spojené dezinterpretaci výsledků.

Variantou popsané jednokolové PCR, mající vyšší citlivost a specifitu, je tzv. nested PCR (vložená, uhnížděná). Její princip spočívá v použití dvou amplifikačních kol za sebou. V prvním dochází k namnožení úseku DNA vybraného tak, aby zahrnoval cílové sekvenční charakteristické pro širší spektrum patogenů. Poté je vzniklý produkt podroben druhé PCR s novým párem primerů, vymezujících kratší úsek DNA uvnitř úseku namnoženého v předchozí reakci, který je obvykle specifický pro určitý druh mikroorganismu. Kvasinky je možné tímto způsobem identifikovat ve druhém kole na základě odlišné délky produktu pomocí jedné dvojice primerů nebo nested PCR využít jako tzv. multiplex PCR, kdy se použije směs většího počtu párů primerů, schopných amplifikovat úseky DNA typické pro různé druhy. Podstatnou nevýhodou nested PCR proti jednokolové je vyšší riziko kontaminace a s tím spojený častý výskyt chybných výsledků (24,111).

V další variantě, kvantitativní PCR v reálném čase (qPCR), se používá k detekci produktu fluorescenčně značená sonda. Jak vyplývá z názvu, umožňuje zmíněná modifikace na rozdíl od běžné PCR přímou kvantifikaci vytvořených amplikonů v každém jednotlivém cyklu PCR (tedy v reálném čase), a to v důsledku zvyšující se intenzity fluorescence. Navíc lze odvodit i původní množství DNA ve vyšetřovaném materiálu. Praktický význam spočívá v porovnávání kvantity DNA v postupně odebíraných vzorcích během monitorování průběhu infekčního onemocnění a ke sledování účinnosti zvolené terapie. Pro identifikaci mikromycet lze qPCR využít opět v podobě multiplex PCR, neboť široké spektrum různých fluorescenčních barviv umožňuje použití více sond v jedné reakci současně (24).

Z komerčních produktů založených na tomto principu lze uvést LightCycler SeptiFast Test (Roche Diagnostics, USA). Pomocí uvedené soupravy je možné zachytit a identifikovat 25 nejdůležitějších mikrobiálních patogenů z hemokultur, včetně pěti nejčastějších druhů kvasinek: *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata* a *C. krusei* (89).

Postamplifikační analýzy DNA

Postamplifikační metody slouží k identifikaci agens na úroveň rodu nebo druhu, pokud to již nebylo provedeno přímo v rámci PCR (112).

Za nejpřesnější postamplifikační techniku je považováno sekvencování, kterým se stanoví pořadí nukleotidů ve vybraném úseku molekuly DNA. Nevýhodou je však časová, finanční a technická náročnost. K usnadnění procesu existují komerčně dostupné soupravy, např. MicroSeq D2 rDNA Fungal Sequencing Kit (Applied Biosystems, USA), zacílený na doménu D1/D2 velké podjednotky genu pro rRNA. Součástí produktu je i databáze obsahující 1072 záznamů sekvencí, které jsou rozděleny mezi 289 druhů kvasinek. V klinické laboratoři se může uplatnit zejména při izolaci vzácnějších kandid, které nelze určit běžně používanými diagnostickými postupy (113). Výsledky získané zmíněnou soupravou lze analyzovat i pomocí jiných databází, které jsou průběžně aktualizovány zařazováním nových druhů, což zvyšuje spolehlivost a rozšiřuje možnosti exaktní identifikace. Velmi dobrých výsledků za podstatného urychlení celého procesu a snížení finančních nákladů lze dosáhnout pomocí pyrosekvencování (114).

Často používanou postamplifikační technikou je hybridizace produktu se značenou sondou (115). Nejvyšší potenciál pro využití v běžné diagnostické praxi má pro svou jednoduchost a citlivost technika založená na principu enzymimunoanalýzy (PCR-ELISA). Reakce se účastní dvě sondy. První, značená digoxigeninem, se naváže na komplementární sekvenci DNA, druhá, s biotinem, vytvoří vazbu se streptavidinem, jímž je potažena jamka mikrotitrační destičky, v níž test probíhá. Hybridizace je prokázána, stejně jako v případě klasické ELISA, změnou barvy roztoku v jamce po přidání protilátky proti digoxigeninu (s navázanou křenovou peroxidázou) a příslušného substrátu. Jiný slibný přístup představuje využití teploty tání amplikonů. Princip spočívá v uvolnění fluorescenčního barviva při denaturaci obarveného dvouřetězcového produktu amplifikace. Výsledkem měření je křivka, jejíž průběh závisí na délce vytvořeného úseku DNA, ale také na jeho sekvenci, neboť části bohaté na adenin a thymin tají při nižších teplotách než ty, které obsahují převážně guanin a cytozin. Na principu postamplifikační hybridizace je založena i technologie DNA čipů, umožňující rychlou a přesnou identifikaci širokého spektra kandid, ale i jiných mikromycet. Jedná se o velkokapacitní mikroskopické soupravy oligonukleotidových sond navázaných na pevný povrch, se kterými hybridizuje fluorescenčně značený úsek vyšetřované DNA. Signály

jsou detekovány fluorescenčním snímačem a analyzovány speciálním počítačovým programem.

Tradiční a nejjednodušší metodu post-PCR identifikace představuje analýza délky amplifikovaných produktů (Amplified Product Length Polymorphism, APLP) v agarózovém gelu, odvozených často z dvou druhově, ale i kmenově specifických úseků, tzv. internal transcribed spacers (ITS1, ITS2) mezi podjednotkami genu pro rRNA. Rozlišovací schopnost zmíněné techniky lze dále zvýšit restrikcí endonukleázami a následnou analýzou délkového polymorfismu vzniklých fragmentů DNA (Restriction Fragment Length Polymorphism, RFLP). Další zajímavou metodou je hodnocení konformačního polymorfismu jednovláknové DNA (Single Strand Conformation Polymorphism, SSCP). Je založena na existenci menších rozdílů v sekvencích vysoce konzervovaných úseků DNA. Po denaturaci vznikají elektroforeticky prokazatelné rozdíly v jejich terciární struktuře. Limitujícím faktorem využití zmíněné techniky je pracnost a nutnost speciálních odborných znalostí.

Amplifikace RNA

Specifickou a velmi citlivou metodou, využívanou k amplifikaci RNA, je tzv. NASBA (Nucleic Acid Sequence Based Amplification). Cyklu podobného PCR se účastní tři enzymy - reverzní transkriptáza, RNáza H a T7 RNA polymeráza. Amplifikace je ve srovnání s PCR rychlejší, protože mohou být využity kopie genů již namnožené samotnými buňkami při transkripci. Navíc reakce probíhá za konstantní teploty, takže není potřebný termocykler. Hlavní nevýhodu zmíněné metody představuje samotná RNA, která je mimo buňku velmi rychle degradována všudypřítomnými RNázami. K minimalizaci uvedeného jevu je nutné přidání ochranného pufru a/nebo inhibitorů zmíněných enzymů. Širší využití v diagnostické praxi komplikují i poměrně vysoké náklady (110,115).

2.2.2. Genetické metody k typizaci kvasinek

Genetické typizační metody umožňují vzájemné porovnávání jednotlivých kmenů. Na rozdíl od druhové identifikace, využívající spíše konzervativní sekvence, se zaměřují na variabilní úseky. Nicméně používané techniky se do určité míry s postamplifikačními analýzami popsanými výše překrývají.

Nejdůležitějšími kritérii při hodnocení těchto metod jsou reprodukovatelnost výsledků a zejména rozlišovací schopnost, přímo úměrná nalezenému genetickému polymorfismu. Typizace se využívá při epidemiologických analýzách nozokomiálních nákaz, a to zejména při

vyhledávání zdrojů infekce a způsobů jejich šíření (116). Dále se uplatňují při analýze mechanismů vývoje rezistence, zkoumání příčin opakovaných infekcí u téhož pacienta, studiu faktorů virulence a patogenetických mechanismů infekce nebo mikroevoluce buněčných populací (117,118).

Sekvencování se v typizaci kvasinek využívá nejčastěji v podobě multilokusové sekvenční typizace (Multilocus Sequence Typing, MLST), jejíž podstatou je porovnávání sekvencí nukleotidů ve vybraných lokusech DNA. Nejprve jsou tyto krátké úseky amplifikovány PCR, následně sekvencovány a takto získané soubory sekvencí poté analyzovány. K hlavním přednostem zmíněného přístupu patří vysoká rozlišovací schopnost a prakticky absolutní mezilaboratorní reprodukovatelnost, umožňující tvorbu centrálních databází a provádění globálních epidemiologických studií (110,119). Určitou nevýhodou je ekonomická náročnost, která je však v poslední době kompenzována zaváděním levnějších alternativních technologií, např. pyrosequencování (114).

K typizaci lze dále použít RFLP, která je v porovnání s předchozí technikou rychlá a finančně nenáročná (24,120). Kvasinková DNA je podrobena restrikci řídce štěpícími endonukleázami např. *EcoRI*, *SfiI*, *BssHII* a vzniklé fragmenty jsou následně separovány pomocí elektroforézy na základě odlišné molekulové hmotnosti. Vzniklý soubor pruhů, tzv. fingerprint, je po obarvení ethidium bromidem zviditelněn pomocí transiluminátoru. V minulosti častěji používanou pracnější variantu, avšak s výrazně s vyšší rozlišovací schopností, představuje kombinace RFLP a hybridizace se značenou sondou po přebílení fingerprintu podle Southerna na nitrocelulózovou membránu (24,89).

K typizaci kvasinkových izolátů je často používána náhodná amplifikace polymorfni DNA (Random Amplified Polymorphic DNA, RAPD). Tato metoda, založená na PCR, byla vyvinuta nezávisle dvěma výzkumnými týmy (121,122). Její užitečnost při epidemiologických studiích kandidových infekcí je v literatuře přesvědčivě dokumentována (123,124,125,126). Rozdíl proti klasické PCR spočívá v použití pouze jednoho krátkého primeru, který se náhodně navazuje na více či méně komplementární sekvence na mnoha místech templátové DNA. To je umožněno tzv. režimem s nízkou stringencí, dosaženým zejména nižší reakční teplotou než u obvyklého cyklu PCR. Nachází-li se rozpoznané sekvence na obou vlákních DNA v protilehlých úsecích vzdálených maximálně 3 kilobáze (kb), jsou odpovídající řetězce syntetizovány proti sobě, dokud nepřesáhnou místo hybridizace primeru na druhém vlákně. Při další amplifikaci se k oběma vzniklým řetězcům vytvoří komplementární úseky, jež jsou

ohraňené místy navázání primerů. Takové fragmenty se v následujících amplifikacích syntetizují ve srovnání s ostatními v mnohem větším počtu. Uvedeným způsobem vzniká v průběhu reakce velké množství kmenově specifických produktů variabilní délky, které jsou následně separovány pomocí elektroforézy (120). Předností metody je především její rychlé a jednoduché provedení, ekonomická nenáročnost a vysoká rozlišovací schopnost. Mezi hlavní nedostatky patří nízká mezilaboratorní reprodukovatelnost a příliš velká komplexnost fingerprintu, která může vést k problematické interpretaci výsledků. Z posledně zmíněného důvodu byla navržena modifikace, tzv. analýza křivek tání RAPD (Melting Curve of Random Amplified Polymorphic DNA, McRAPD), založená na porovnávání odlišné teploty tání při denaturaci dvouvláknových ampliconů vytvořených v průběhu RAPD (127).

Svým principem je RAPD podobný délkový polymorfismus amplifikovaných fragmentů (Amplified Fragment Length Polymorphism, AFLP). Jsou při něm amplifikovány vybrané restriční fragmenty genomové DNA, k nimž jsou připojeny tzv. adaptory se známou sekvencí nukleotidů. Při PCR jsou použity primery komplementární k sekvencím adaptorů prodloužené o 1-3 náhodně zvolené nukleotidy. Tím dochází k amplifikaci pouze těch fragmentů, které mají na koncích (před připojením adaptorů) odpovídající zvolené krátké sekvence. Nevýhodou proti RAPD je však pracnost a nákladnost.

Z dalších typizačních metod využívajících PCR je třeba zmínit analýzy hypervariabilních sekvencí (115). Přitom se využívá primerů, nasedajících na specifické sekvence nukleotidů, které jsou v genomu přítomné ve velkém počtu kopií a lokalizované na různých místech. Tím dochází k amplifikaci produktů o různé délce. Za tímto účelem byly vyvinuty různé techniky (dédkový polymorfismus mikrosatelitů, inter-repeat PCR, PCR fingerprinting). Výhodou všech zmíněných postupů je jednoduchost provedení, vysoká rozlišovací schopnost a ve srovnání s RAPD i mezilaboratorní reprodukovatelnost výsledků. Podobné přednosti má i technologie DNA čipů, již zmíněná v souvislosti s identifikací.

2.2.2.1. Karyotypizace

Karyotypizace je genetická metoda analyzující délkový polymorfismus chromozomů. K jejich separaci na základě odlišné molekulové hmotnosti se využívá pulzní gelová elektroforéza (PFGE), při níž dochází k pravidelnému střídání orientace elektrického pole. Malé chromozomy nebo jejich části potřebují k přizpůsobení jinému směru pohybu v gelu méně času a procházejí jím proto rychleji než velké. Vytvořený fingerprint (karyotyp) má

v optimálním případě tolik pruhů, kolik je v buňce chromozomů nebo z nich vzniklých fragmentů, jsou-li před separací rozštěpeny restrikcčními enzymy.

Na míru rozlišení karyotypu mohou mít významný vliv následující faktory:

Pulzní čas. Jedná se o časový interval mezi reorientacemi elektrického pole. Pohyb DNA je u kratších chromozomů přímo úměrný logaritmu jejich molekulové hmotnosti, u delších je však obtížně definovatelný. U velkých molekul navíc dochází k jevu, který se nazývá trapping. Jedná se o zachytávání DNA v pórech gelu, což brání jejímu dalšímu putování a tím optimální separaci jednotlivých fragmentů. Nejlepšího rozlišení lze dosáhnout pomocí postupného prodlužování pulzního času až do maxima potřebného pro rozdělení nejdelších chromozomů (129).

Elektrické napětí je obvykle udáváno ve V/cm délky gelu. Jelikož gel ve většině horizontálních ponorných elektroforetických komor využije přibližně 80 % napětí zdroje, musí být výsledná hodnota stanovena vynásobením napětí na výstupu ze zdroje 0,8 a následným vydělením získané hodnoty délkou gelu. Zvyšování napětí v elektrickém poli umožňuje separaci větších molekul DNA, je-li však příliš vysoké, může docházet k trappingu.

Složení pufru. PFGE většinou probíhá v režimech používajících vyšší napětí než je tomu u běžné elektroforézy, a proto se při ní tvoří podstatně více tepla. K zabránění přehřívání gelu se doporučuje použití 0,5 x TBE (Tris-borát-EDTA) pufru, který je málo vodivý. DNA je sice pohyblivější v TAE (Tris-acetát-EDTA) pufru, ten však pro svoji vodivost gel zahřívá.

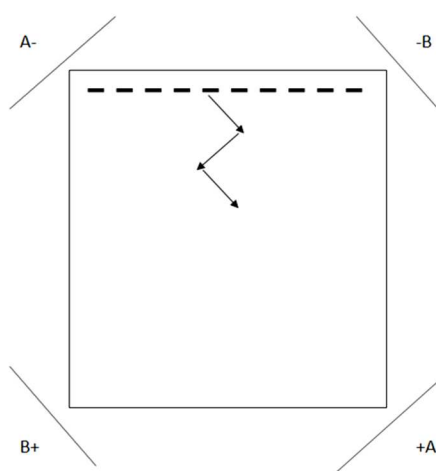
Teplota pufru se obvykle snižuje na 4-15 °C. Principiálně je možné provádět PFGE ve značně širokém teplotním rozmezí, u menších fragmentů DNA by ale za vyšších teplot mohlo dojít k trappingu a významnému rozšiřování pruhů. Důležitou podmínkou správného průběhu separace DNA je udržování stále stejné teploty ve všech místech gelu. Toho lze docílit cirkulací pufru s využitím peristaltické pumpy.

Úhel působení elektrického pole je obvykle nastaven na 110-120°, přičemž bylo zjištěno, že rozmezí 105-165° má na výsledek separace jen malý vliv (130). Obecně platí, že čím je úhel menší, tím rychleji se DNA pohybuje gelem. Proto se pro potřebu rozdělení velkých fragmentů DNA volí spíše malé úhly a naopak.

Druh a koncentrace agarózy. Nízké koncentrace umožňují snadnější rozdělení větších molekul DNA a zároveň urychlují migraci všech fragmentů gelem. Pro PFGE jsou nevhodnější speciální agarózy s většími póry, čímž je usnadněna separace dlouhých chromozomů (120).

PFGE je známá v řadě variant. Historicky nejstarším systémem je elektroforéza ve střídaném ortogonálním poli (Orthogonal Field Alternating Gel Electrophoresis, OFAGE), jejíž princip je schématicky znázorněn na obrázku 3. Pravidelné střídání aktivity párů elektrod A a B způsobuje hadovitý pohyb DNA v gelu. Hlavní nevýhodou OFAGE je, že v důsledku uspořádání elektrod se vytváří nehomogenní elektrické pole, což vede k rozdílům v rychlosti a směru pohybu fragmentů DNA v jednotlivých drahách. Následkem toho vznikají deformace, které brání objektivně vyhodnotit fingerprint.

Obr. 3: Schéma elektroforézy v ortogonálním poli

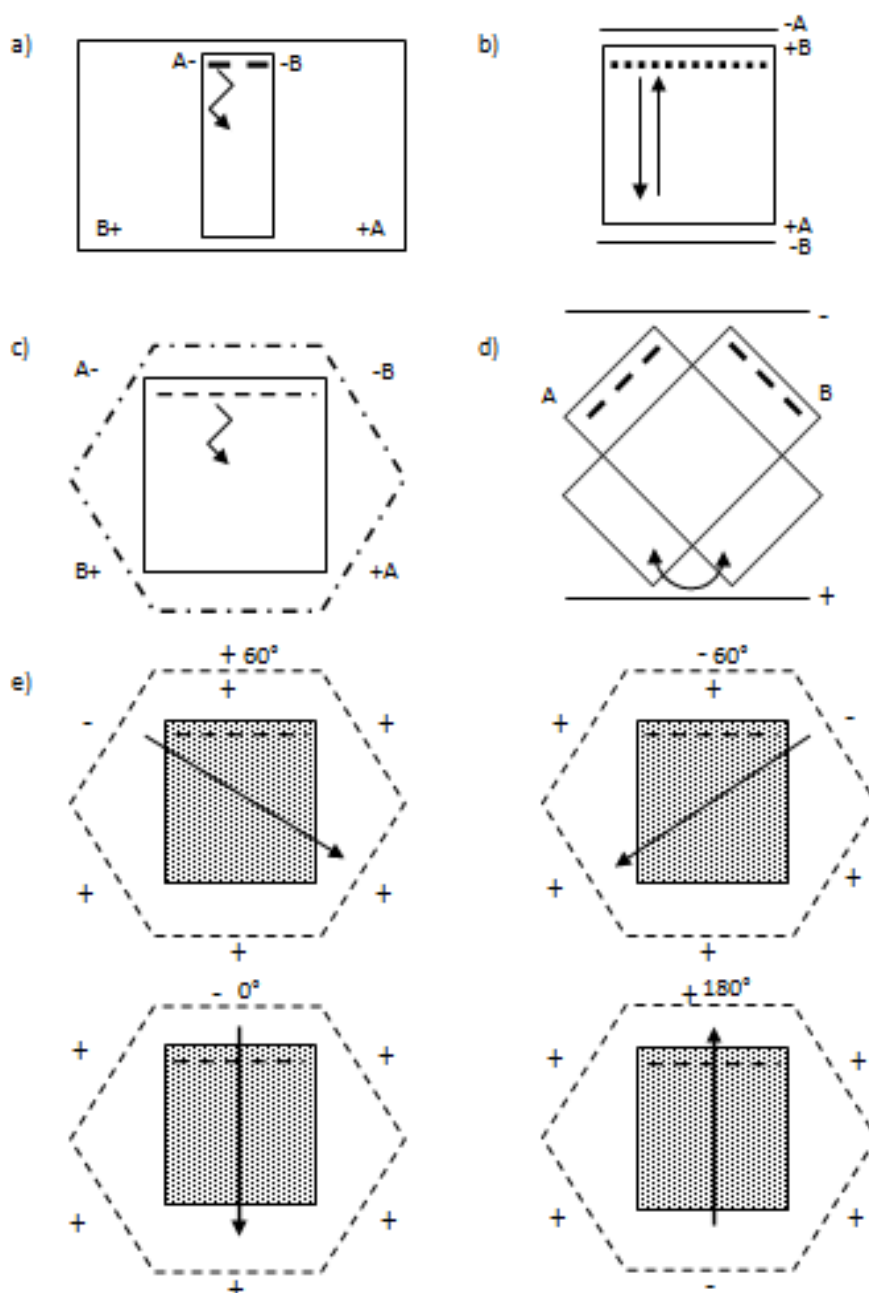


V souvislosti s tímto problémem bylo později vyvíjeno úsilí upravit systém tak, aby docházelo ke generování homogenního elektrického pole. Modifikace PFGE, vzniklé na tomto základě, se vzájemně liší druhem, počtem a uspořádáním elektrod. Nejčastěji používané varianty jsou schématicky znázorněny na obrázku 4.

Patří k nim elektroforéza v příčně alternujícím poli (Transverse Alternating Field Electrophoresis, TAFE), umožňující separaci velkých fragmentů DNA. Gel je ukotven do vertikální polohy pomocí plastových proužků a vztlaku pufry a situován mezi dva lineární páry elektrod, které jsou umístěny před a za rovinou gelu. Molekuly DNA jsou nuceny se pohybovat „cik-cak“ celou tloušťkou gelu. Úhel mezi alternujícími poli je v oblasti jamek 110°, směrem ke spodní straně gelu se postupně zvětšuje. Elektroforéza v inverzním poli (Field Inversion Gel Electrophoresis, FIGE) je nejjednodušším systémem, využívá pouze jeden pár elektrod (131). Je však vhodná k separaci molekul maximálně do velikosti 100 kb. Princip spočívá v pravidelném střídání elektrického pole, kdy DNA nejprve putuje ven z jamek a poté

zpět směrem k jamkám. Úhel mezi poli je proto 180° . Aby DNA v gelu putovala směrem dopředu, musí být pulzní čas nebo intenzita elektrického pole větší v přímém než ve zpětném směru. U elektroforézy v rotujícím poli (Rotating Field Gel Electrophoresis, RFGE) je střídání elektrického pole zajištěno pomocí speciální plošiny, která se pohybuje mezi dvěma homogenními elektrickými poli v úhlu 120° , což nahrazuje vypínání a zapínání polí v nepohyblivém systému (130,132).

Obr. 4: Princip jednotlivých variant pulzní gelové elektroforézy



a - v příčně alternujícím poli, **b** - v inverzním poli, **c** - v tzv. contour-clamped homogenním poli (CHEF), **d** - v rotujícím poli, **e** - CHEF s programovatelnými autonomně řízenými elektrodami

Pro karyotypizaci kvasinek se nejčastěji využívá elektroforéza v homogenním elektrickém poli specifického obrysu (Contour-clamped Homogeneous Electric Field, CHEF). Systém pracuje s větším počtem elektrod, uspořádaných do určitého tvaru. První model byl navržen Davisem *et al.* (133). Skládá se ze speciálně konstruované elektroforetické komory s 24 platinovými elektrodami seřazenými do tvaru šestiúhelníku se vzájemnou příčnou vzdáleností 33 cm. Ke změně orientace elektrického pole dochází pod fixním úhlem 120°, gel o velikosti 14 x 13 cm je umístěn ve středu komory. Clark *et al.* provedli později modifikaci tohoto systému navržením programovatelných autonomně řízených elektrod. Každá z nich pracuje nezávisle na ostatních, čímž je dosaženo široké variability ve směru elektrických polí působících na gel. Systém proto může být naprogramován do všech předchozích typů PFGE, lze ho tedy s výhodou využít i v případech obtížných separací dlouhých úseků DNA (130,134).

Izolaci chromozomů kvasinek nelze provádět způsoby, běžně užívanými v molekulární genetice pro izolaci nukleových kyselin, neboť by přitom došlo k narušení integrity jejich dlouhých řetězců DNA. Na gelu by pak nevznikly pruhy, ale pouze neostré skvrny tvořené velkým množstvím fragmentů. Proto je nutné zabudovat intaktní kvasinkové buňky do bločků nízkotající agarózy, která chrání chromozomy před rozlámáním a celý další postup izolace provádět v nich.

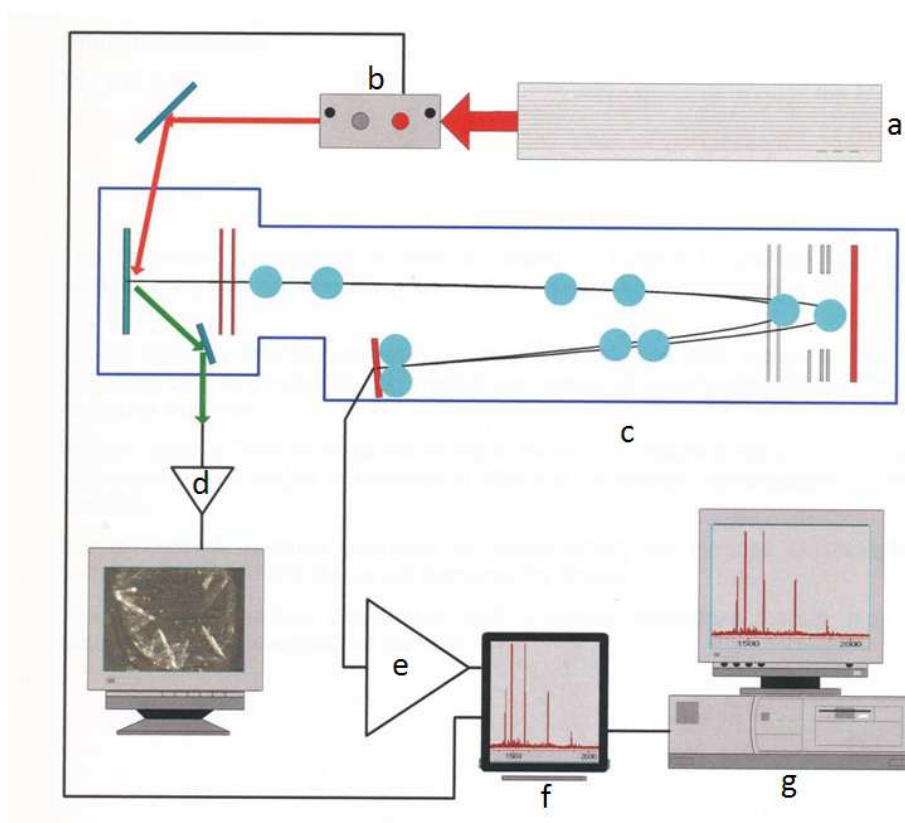
Karyotypizace pomocí PFGE je většinou autorů hodnocena jako spolehlivý, technicky nenáročný způsob typizace kandid se snadným vyhodnocením a vysokou rozlišovací schopností (135,136,137). Limitujícím faktorem pro interpretaci nálezů, zejména u větších souborů izolátů, je absence definovaných kritérií pro rozlišení kmenů. Dalšími nevýhodami je dlouhý časový interval nutný k získání výsledků a vysoká pořizovací cena přístrojů.

2.2.3. Hmotnostní spektrometrie

V posledních letech se při identifikaci mikrobů, tedy i patogenních hub včetně kvasinek, stále více využívá hmotnostní spektrometrie. Uvedenou molekulární metodou, patřící na rozdíl od předchozích mezi fenotypové, lze v principu třídít ionty na základě jejich molekulové hmotnosti. Přístroje, pomocí nichž se uvedený způsob určování mikroorganismů provádí, se obecně nazývají hmotnostní spektrometry. Skládají se ze tří modulů, z nichž prvním je zdroj iontů. V mikrobiologii se využívá technologie zvaná MALDI (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization - ionizace laserem za účasti matrice), umožňující analýzu velkých organických molekul, které, jsou-li ionizovány, mají tendenci k rozpadu. Druhým modulem je

analyzátor doby letu (Time of Flight, TOF), který využívá k urychlení letu iontů elektrické pole. Pokud mají částice stejný náboj, závisí naměřené časy výhradně na jejich molekulové hmotnosti, přičemž lehčí ionty putují průletovou trubicí analyzátoru rychleji než těžší. Poslední prvek přístroje, zvaný detektor, zaznamenává aktuální průchody iontů. Schematické uspořádání jednotlivých komponent hmotnostního spektrometru s technologií MALDI-TOF je znázorněno na obrázku 5.

Obr. 5: Schéma hmotnostního spektrometru s technologií MALDI-TOF



a - laser, b - atenuátor, fotodioda, c - průletová trubice, d - CCD kamera, e - předzesilovač, f - číslicový záznamník, g - počítač

Identifikace mikroorganismů pomocí MALDI-TOF je založena na analýze proteinů v jejich buňkách. Vyšetřovaný vzorek je nejprve umístěn na speciální kovovou destičku a překryt maticí. Tato směs je krátce ozářena laserem, což způsobí uvolnění iontů, které jsou v elektrickém poli urychleny a přes průletovou trubicí se dostávají k detektoru. Změřená rychlost částic je následně převedena na odpovídající molekulovou hmotnost. Získané hmotnostní spektrum v podobě křivek je následně porovnáváno s aktuálně dostupnými záznamy, uloženými v referenční počítačové databázi přístroje. Výsledek je pomocí

biostatistických metod interpretován numericky jako pravděpodobnost, že daný mikroorganismus patří k určitému druhu, přičemž nalezené skóre se pohybuje v rozmezí 0,0 až 3,0. Identifikaci lze pokládat za relevantní, jestliže je tato číselná hodnota rovna minimálně 2,0.

Hlavními výhodami identifikace pomocí MALDI-TOF ve srovnání s dosud běžně používanými způsoby určování mikroorganismů je širší referenční databáze, přesnost identifikace, dále rychlost (během několika minut lze identifikovat až 96 izolátů), jednoduchost interpretace výsledků, minimální chybovost a v neposlední řadě nízké provozní náklady, pomine-li se vysoká pořizovací cena spektrometru. U některých přístrojů má navíc uživatel možnost sám upravovat databázi hmotnostních spekter a tímto způsobem ji rozšiřovat o nové, dosud do ní nezařazené druhy, případně provádět typizaci kmenů. Recentně je MALDI-TOF používána také pro přímou identifikaci mikroorganismů v hemokulturách a k detekci mechanismů antibiotické rezistence (138).

3. Cíle práce

Hlavní cíle předložené dizertační práce byly:

- 1) Nalézt spolehlivý a jednoduchý způsob diferenciací kvasinek druhu *C. fabianii*, *C. pelliculosa* a *C. utilis*,
- 2) stanovit frekvenci jejich výskytu v klinických vzorcích,
- 3) porovnat výsledky MIC vybraných systémových antimykotik uvedených druhů kvasinek z různých aspektů a analyzovat případné rozdíly v citlivosti k jednotlivým antifungálním přípravkům,
- 4) provést vnitrodruhovou typizaci souboru kultur *C. fabianii* a zjistit míru příbuznosti mezi kmeny izolovanými z různých tělních i nemocničních lokalit.

K dosažení hlavních cílů práce byl zvolen následující postup:

- 1) Vzhled kolonií do studie zahrnutých kmenů byl hodnocen na SGA a chromogenní půdě, mikromorfologie byla posuzována na rýžovém agaru. Druhovú diferenciací byla prováděna biochemicky a hmotnostní spektrometrií. Identifikace izolátů, které nebyly přesvědčivě určeny dvěma výše uvedenými metodami, byla verifikována sekvencováním.
- 2) V rámci studovaného souboru kmenů byl vyhodnocen podíl jednotlivých druhů a frekvence jejich výskytu ve věkových skupinách, dále v závislosti na pohlaví, typu klinického materiálu a místě hospitalizace pacientů.
- 3) Pro testování citlivosti souboru izolátů k antimykotikům byla zvolena mikrodiluční kolorimetrická metoda. Získané hodnoty MIC byly následně porovnávány z hlediska druhu kvasinky, věku a pohlaví pacientů, typu klinického materiálu a zdravotnického zařízení, ze kterého byly kultury získány.
- 4) K posouzení vnitrodruhové variability kmenů byla využita karyotypizace metodou PFGE.

4. Materiál a metody

Studovaný soubor zahrnoval 256 klinických izolátů kvasinek, určených na základě morfologie a biochemických vlastností jako *C. pelliculosa* nebo *C. utilis*. Kultury pocházely od pacientů z deseti nemocnic v různých regionech České republiky. Sběr probíhal prospektivně od ledna 2011 do prosince 2014. Počet kmenů získaných z jednotlivých zdravotnických zařízení byl v uvedeném období následující: Fakultní nemocnice (FN) Olomouc 101 (63,7 %), FN u sv. Anny v Brně 27 (10,5 %), FN v Motole 15 (5,9 %), Zdravotní ústav se sídlem v Ostravě 13 (5,1 %), Nemocnice České Budějovice 10 (3,9 %), FN Hradec Králové 9 (3,5 %), FN Brno 7 (2,7 %), Všeobecná FN v Praze 5 (1,9 %), FN Plzeň 4 (1,6 %) a Krajská nemocnice Liberec 3 (1,2 %). Soubor kvasinek z FN Olomouc byl rozšířen o 62 kultur *C. pelliculosa*, resp. *C. utilis*, které byly izolovány v době před zahájením studie.

Kandidy byly získány od 256 pacientů, z nichž 146 byli muži (57,3 %) a 110 ženy (42,7 %). V případě, že došlo u některého jedince k opakovanému kultivačnímu záchytu téhož druhu kvasinky, byl do studie zařazen pouze prvně izolovaný kmen. Doplňující informace o pacientech (pohlaví, věk, diagnóza) byly vyhledávány v laboratorních informačních systémech jednotlivých nemocnic. Mikrobiologové ze spolupracujících zdravotnických zařízení předem obdrželi tabulky pro snadnější doplňování požadovaných údajů. S osobními daty pacientů bylo nakládáno tak, aby nedocházelo k porušování zásad stanovených zákonem č. 101/2000 Sb. U každého nemocného bylo zaznamenáno pouze počáteční písmeno křestního jména a příjmení, rok narození a pohlaví. Kromě toho byla u všech pacientů zjištěna základní diagnóza podle aktuální Mezinárodní statistické klasifikace nemocí a přidružených zdravotních problémů (MKN-10), dále specifikován klinický materiál, ve kterém byl izolát zachycen a uvedena nemocnice, příp. oddělení, kde byl pacient vyšetřen nebo hospitalizován. Získané údaje byly společně s vybranými klinickými daty zapisovány do přehledu vytvořeného v programu MS Excel, jak je demonstrováno v tabulce 6.

Počty izolovaných kandid v jednotlivých klinických vzorcích byly následující: 78 kultur pocházelo z dolních dýchacích cest (bronchoalveolární laváž, endosekret, sputum), 63 z výtěru z nosohltanu, nosu nebo dutiny ústní, 63 z moči, 15 z hemokultur, resp. centrálních žilních katétrů, 10 ze sekretu z drénu nebo punktátu, 10 ze stolice, resp. perianálního stěru, 10 z kůže nebo kožních adnex, po dvou ze stěru z poševní sliznice, rány a spojivek a jeden izolát byl získán ze zevního zvukovodu. Pro verifikaci identifikace byl vyšetřovaný soubor doplněn o typové kmeny *C. fabianii* (*Cyberlindnera fabianii* CBS 5481),

C. pelliculosa (*Wickerhamomyces anomalus* CBS 605) a *C. utilis* (*Cyberlindnera jadinii* CBS 841).

Všechny kandidy zahrnuté do studie byly uloženy do sbírky hub na Ústavu mikrobiologie Lékařské fakulty Univerzity Palackého v Olomouci a FN Olomouc v zamrazovacím médiu Difco Skim Milk (Becton, Dickinson and Company, USA), 100 g/l s přídavkem 33 % glycerinu (Carl Roth, Německo) při teplotě -78 °C.

Tab. 6: Demonstrace zpracované databáze kultur kvasinek

kmen (sbírka)	ID 32 C kód	ID 32 C	%	MALDI	MALDI	PFGE	číslo vzorku	pacient	pohlaví	rok narození	dg.	klin.materiál	nemocnice
CAPE 4-14	4275350711	CAUT	90,1	2,152	CAFB	ano	IDE 05 320	HS	ž	2003	Q622	moč	FN-OI
CAPE 4-15	4275350111	CAPE	57,3	2,337	CAFB	ano	IDE 05 671	PM	m	2004	B370	stěr/výtěr krk	FN-OI
CAPE 4-16	4277350111	CAPE	54,2	2,165	CAFB	ano	IDE 05 986	ŽP	m	2002	J189	kanyla	FN-OI
CAPE 4-19	4274350111	CAPE	71,5	2,257	CAFB	ano	IDE 98 827	ŠL	ž	1994	Q627	moč	FN-OI
CAPE 4-20	4274350311	CAUT	77,9	2,243	CAFB	ano	IDE 01 333	MA	ž	1999	R110	stěr/výtěr krk	FN-OI
CAPE 4-21	4274350111	CAPE	71,5	2,33	CAFB	ano	IDE 01 338	KV	m	1912	J180	sputum	FN-OI
CAPE 4-22	4274350111	CAPE	71,5	2,083	CAFB	ano	INE 01 3	TF	m	1942	I219	stěr/výtěr krk	FN-OI
CAPE 4-23	4274350111	CAPE	71,5	2,16	CAFB	ano	IDE 01 462	GM	m	1999	J042	stěr/výtěr krk	FN-OI
CAPE 4-24	4275350111	CAPE	57,3	2,178	CAFB	ano	IDE 01 665	FZ	ž	1944	C250	moč	FN-OI
CAPE 4-25	4274350111	CAPE	71,5	2,043	CAFB	ano	IDE 01 782	TM	m	1954	C719	stěr/výtěr krk	FN-OI
CAPE 4-26	4274350111	CAPE	71,5	2,188	CAFB	ano	INE 02 9	RM	ž	1904	S021	moč	FN-OI
CAPE 4-27	4274350111	CAPE	71,5	2,228	CAFB	ano	IDE 02 117	MM	m	1998	Q620	moč	FN-OI
CAPE 4-28	4274350111	CAPE	71,5	2,328	CAFB	ano	IDE 02 208	HJ	m	2002	P073	stolice	FN-OI
CAPE 4-29	4274750111	CAPE	99,5	2,418	CAFB	ano	IDE 02 219	SP	m	2001	H660	kanyla	FN-OI
CAUT 2-19	4275350311	CAUT	90,1	2,011	CAFB	ano	IDE 11 192	SF	m	1932	J961	moč	FN-OI
CAUT 2-20	4275350311	CAUT	90,1	2,095	CAFB	ano	IDE 11 279	BD	m	2010	J189	stěr/výtěr krk	FN-OI
CAUT 3-16	4275350311	CAUT	90,1	2,325	CAFB	ne	3790/KVA	KT	m	1947	C13	okolí kanyly	Ostrava
CAUT 3-17	4275350311	CAUT	90,1	2,325	CAFB	ne	178/KVA	HJ	m	1940	I21	sputum	Ostrava
CAUT 3-18	4275350311	CAUT	90,1	2,325	CAFB	ne	512/KVK	ME	ž	1930	E86	moč	Ostrava
CAUT 3-19	4275350111	CAPE	57,3	2,271	CAFB	ne	592/5VK	ZZ	m	1935	J18	moč	Ostrava
CAUT 3-20	4274350111	CAPE	71,5	2,216	CAFB	ne	5422/KVA	SM	ž	1961	A41	moč	Ostrava

4.1. Morfologická identifikace kvasinek

Kvasinky byly očkované na SGA s chloramfenikolem (Trios) a chromogenní půdu COLOREX Candida (Trios) a inkubovány 48 h při 37 °C. Mimoto byly všechny studované kultury inokulovány vpichem jehly na SGA a kultivovány 10 dní při teplotě 37 °C, aby bylo možné detailně popsat vzhled kolonií. Mikromorfologická struktura izolátů byla posuzována po sedmidenní inkubaci při laboratorní teplotě na rýžovém agaru (Trios) ve světelném mikroskopu Olympus CX41 (Olympus, Japonsko) při 100-200násobném zvětšení.

4.2. Biochemická identifikace kvasinek

K biochemické identifikaci byla použita komerční souprava ID 32C (bioMérieux). K ověření kvality jednotlivých šarží byl použit výrobcem doporučený kmen *C. glabrata* ATCC 90030. Kultury kvasinek byly očkované na SGA (Trios) a poté inkubovány 24-48 h při 37 °C.

Metodický postup vycházel z pokynů výrobce, přičemž pro úpravu zákalu suspenze kvasinek na hodnotu 2,0 stupnice podle McFarlanda byl použit turbidimetr DENSILAMETER-II (EMO, Česká republika). Testy byly hodnoceny vizuálně po 48 h. Získaný desetimístný kódový profil byl vyhodnocen pomocí identifikačního programu *apiweb* (bioMérieux).

4.3. Identifikace kvasinek hmotnostní spektrometrií

K identifikaci izolátů touto metodou byl použit hmotnostní spektrometr Microflex LT (Bruker Daltonics, USA). Kvasinky byly nejprve inokulovány na SGA a inkubovány 18-24 h při 37 °C.

Následovala proteinová extrakce pomocí etanolu a kyseliny mravenčí. Několik izolovaných kolonií bylo nejprve homogenizováno ve 300 µl destilované vody v mikrocentrifugační zkumavce o objemu 1,5 ml. Ke vzniklé suspenzi bylo přidáno 900 µl absolutního etanolu (≥ 99,8 %) a celá směs byla centrifugována na přístroji Hettich Mikro 185 (Hettich, Německo) 2 min při maximálních otáčkách. Po odstranění supernatantu byl sediment znovu centrifugován a po následném odsátí zbytkového etanolu se nechal několik minut schnout při laboratorní teplotě. V dalším kroku bylo v závislosti na množství peletu přidáno 5-50 µl 70% kyseliny mravenčí, směs byla promíchána, vortexována a poté doplněna stejným množstvím acetonitrilu. Nakonec byl roztok opět centrifugován 2 min při maximálních otáčkách.

Supernatant byl poté přenesen v množství 1 µl na terčík MALDI destičky. Zde byl po zaschnutí překryt 1 µl matrice, která obsahovala α-kyano-4-hydroxyskořicovou kyselinu v organickém rozpouštědle, připraveném smícháním kyseliny trifluoroctové, acetonitrilu a destilované vody. Poté byla destička vložena do přístroje a spuštěn proces stanovení hmotnostního spektra proteinů. K analýze výsledků byly využity programy MALDI Biotyper Flex Control (verze 3.4) a MALDI Biotyper RTC (verze 3.1, oba Bruker Daltonics). Měření bylo prováděno v rozmezí 2,000-20,137 Da. Jelikož při zahájení studie nebylo v počítačové databázi obsaženo hmotnostní spektrum *C. fabianii*, muselo do ní být aktivně vloženo opakovaným testováním typového kmene kmene *C. fabianii* CBS 5481. Každý izolát testovaného souboru kvasinek byl měřen minimálně třikrát ve třech nezávislých experimentech a pro vyhodnocení výsledků identifikace bylo vždy použito nejvyšší naměřené skóre.

4.4. Sekvencování

Identifikace kvasinek sekvenční metodou byla provedena ve spolupráci s firmou GeneProof, a.s. Brno. K sekvenaci bylo vybráno celkem 21 kmenů. Jednalo se především o kandidy, u nichž bylo na hmotnostním spektrometru opakovaně naměřeno skóre nižší než 2,0. Soubor zahrnoval 10 *C. fabianii*, 6 *C. pelliculosa*, 4 *C. utilis* a jeden neurčený izolát. Jako pozitivní kontrola byl použit typový kmen *C. fabianii* CBS 5481 (koncentrace 8 ng/μl).

Sekvence byla zahájena izolací kvasinkové DNA pomocí kolonkové metody s využitím soupravy GeneProof PathogenFree DNA Isolation Kit (GeneProof, Česká republika). V dalším kroku byla provedena amplifikace variabilního úseku ITS2 genu pro rRNA metodou PCR na přístroji GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems). K tomuto účelu byly použity univerzální primery UNFreverse/forward (139). Produkty PCR byly přečištěny pomocí soupravy QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen, Německo) a vizualizovány na 2% agarózovém gelu. Sekvenční reakce byla namíchána s využitím sady BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) a provedena na přístroji GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems). Produkty sekvenční reakce byly přečištěny pomocí kolonkové soupravy DyeEx 2.0 Spin Kit (Qiagen) a následně sekvenovány na analyzátoru ABI Genetic Analyzer 3130 (Applied Biosystems). Zjištěné sekvence DNA byly vyhodnoceny programem Sequencing Analysis 5.2 (Applied Biosystems) a MEGA 5.10 a porovnány s databází Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) amerického Národního centra pro biotechnologické informace (140).

4.5. Testování citlivosti k antimykotikům mikrodiluční metodou

Testování citlivosti k antimykotikům (AMB, FCZ, FLA, ITR, VOR, POS, KAS, AND, MIK) bylo provedeno kolorimetrickou mikrodiluční soupravou Sensititre YeastOne YO10 (Thermo Fischer Scientific). Rozložení jednotlivých antimykotik a jejich koncentrací je schématicky znázorněno v tabulce 7.

Z čisté kultury kvasinek inkubované 24 h při 37 °C byla ve sterilní vodě vytvořena homogenní suspenze, upravená pomocí turbidimetru DENSILAMETER-II (EMO) na denzitu 0,5 podle McFarlandovy zákalové stupnice. Přenesením 20 μl této směsi do zkumavky s 11 ml YeastOne bujónu byla získána požadovaná koncentrace $1,5-8 \times 10^3$ CFU/ml. Dále bylo postupováno podle pokynů výrobce. Ke kontrole kvality byly použity kmeny *C. krusei* ATCC 6258 a *C. parapsilosis* ATCC 22019. Schopnost růstu kultury v mikrotitrační destičce

soupravy byla zjišťována změnou barvy média z modrého na červené v jamce s pozitivní kontrolou, v níž nebylo obsaženo antimykotikum. Z této jamky bylo poté odebráno 10 µl suspenze a plošně rozočkováno na SGA (Trios), přičemž následným hodnocením počtu vyrostlých kolonií bylo kontrolováno správné nastavení denzity inokula.

Tab. 7: Schéma uspořádání mikrotitrační destičky Sensititre YeastOne YO10

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	PK	AND 0,015	AND 0,03	AND 0,06	AND 0,12	AND 0,25	AND 0,5	AND 1,0	AND 2,0	AND 4,0	AND 8,0	AMB 0,12
B	MIK 0,008	MIK 0,015	MIK 0,03	MIK 0,06	MIK 0,12	MIK 0,25	MIK 0,5	MIK 1,0	MIK 2,0	MIK 4,0	MIK 8,0	AMB 0,25
C	KAS 0,008	KAS 0,015	KAS 0,03	KAS 0,06	KAS 0,12	KAS 0,25	KAS 0,05	KAS 1,0	KAS 2,0	KAS 4,0	KAS 8,0	AMB 0,5
D	FCZ 0,06	FCZ 0,12	FCZ 0,25	FCZ 0,5	FCZ 1,0	FCZ 2,0	FCZ 4,0	FCZ 8,0	FCZ 16,0	FCZ 32,0	FCZ 64,0	AMB 1,0
E	POS 0,008	POS 0,015	POS 0,03	POS 0,06	POS 0,12	POS 0,25	POS 0,5	POS 1,0	POS 2,0	POS 4,0	POS 8,0	AMB 2,0
F	VOR 0,008	VOR 0,015	VOR 0,03	VOR 0,06	VOR 0,12	VOR 0,25	VOR 0,5	VOR 1,0	VOR 2,0	VOR 4,0	VOR 8,0	AMB 4,0
G	ITR 0,015	ITR 0,03	ITR 0,06	ITR 0,12	ITR 0,25	ITR 0,5	ITR 1,0	ITR 2,0	ITR 4,0	ITR 8,0	ITR 16,0	AMB 8,0
H	FLA 0,12	FLA 0,25	FLA 0,5	FLA 1,0	FLA 2,0	FLA 4,0	FLA 8,0	FLA 16,0	FLA 32,0	FLA 64,0	FLA 128,0	FLA 256,0

AMB - amfotericin B, **FCZ** - flucytozin, **FLA** - flukonazol, **ITR** - itrakonazol, **VOR** - vorikonazol, **POS** - posakonazol, **KAS** - kaspofungin, **AND** - anidulafungin, **MIK** - mikafungin, **PK** - pozitivní kontrola (kontrola růstu)
Koncentrace antimykotik jsou uvedeny v µg/ml.

Za hodnotu MIC bylo považováno nejvyšší ředění antimykotika, ve kterém nedošlo k žádné barevné změně nebo kde bylo původní modré zbarvení v porovnání s kontrolní jamkou jen minimálně změněno.

U celého souboru kvasinek byly MIC stanoveny po 24 a 48 h inkubace při 35 °C. Výsledky byly analyzovány a porovnány z různých hledisek (podle druhu kandid, pohlaví a věku pacientů, typu klinického materiálu a nemocnic, ve kterých byly izoláty získány).

Dále byl na základě doporučení výrobce soupravy, vycházejícího z interpretačních kritérií CLSI určen poměr citlivých, citlivých v závislosti na dávce, rezistentních, necitlivých, příp. intermediárních kmenů pro všechna antimykotika kromě POS, u něhož dosud nejsou definovány klinické breakpointy. Zmíněná kritéria jsou přehledně sumarizována v tabulce 8.

Tab. 8: Interpretační kritéria CLSI pro testování citlivosti kandid k antimykotikům (177,176)

Antimykotikum	C	CD	I	R	N
Amfotericin B	≤ 1			≥ 2	
Flucytozin	≤ 4		8-16	≥ 32	
Flukonazol	≤ 8	16-32		≥ 64	
Itrakonazol	≤ 0,125	0,25-0,5		≥ 1	
Vorikonazol	≤ 1	2		≥ 4	
Echinokandiny	≤ 2				> 2

C - citlivý, CD - citlivý v závislosti na dávce, I - intermediární, R - rezistentní, N - necitlivý

4.6. Karyotypizace pulzní gelovou elektroforézou

4.6.1. Izolace DNA a vlastní provedení pulzní gelové elektroforézy

Testovaný soubor tvořilo 131 náhodně vybraných izolátů kvasinek, z nichž 124 představoval druh *C. fabianii*, 5 *C. pelliculosa* a 2 *C. utilis*. Kultury byly očkované na SGA s chloramfenikolem (Trios) a COLOREX Candida (Trios) a následně inkubovány 24-48 h při 37 °C. Dvě až tři izolované kolonie byly přeneseny do kónických zkumavek (falkonek) s 10 ml Sabouraudova bujónu, umístěny na třepačku Sanyo Orbital Shaker (Sanyo, Japonsko) a inkubovány 16 h při 30 °C a 170 rpm. Druhý den byla suspenze kvasinek v bujónu centrifugována 10 min/2000 rpm, po odstranění supernatantu dvakrát promyta ve 2 ml SE pufru [75 mM NaCl (Duchefa Biochemie, Holandsko), 25 mM EDTA (Sigma-Aldrich); pH 8,0] a nakonec resuspendována v 1 ml tohoto pufru. Směs pro přípravu agarózových bločků byla vytvořena smícháním 150 µl kvasinkové suspenze, 12,5 µl roztoku zymolýázy (Sigma-Aldrich) a 300 µl LMP agarózy (Bio-Rad Laboratories) a do rozplnění udržována v termobloku TS-100 Thermo Shaker (Biosan, Lotyšsko) při teplotě 50-56 °C. Poté byla opatrně rozplněna sterilní skleněnou Pasteurovou pipetou do tvořítek agarózových bločků. Pro každý izolát bylo vytvořeno celkem 5 bločků, které byly umístěny přibližně na 30 min do chladničky. Poté byly přeneseny do zkumavek s 4,625 ml 0,5 M EDTA (pH 8) a 0,375 ml β-merkaptetoetanolu (Sigma-Aldrich). Roztoky byly inkubovány 16 h při teplotě 37 °C a 120 rpm ve vodní lázni s třepáním Julabo SW 20 (Julabo Labortechnik, Německo). Následující den byly bločky promyty roztokem 0,05 M EDTA a poté inkubovány ve zkumavkách s 5 ml ESP pufru [0,5 M EDTA (Sigma-Aldrich), 1 % N-lauroyl-sarkosin (Sigma-Aldrich)] a 250 µl proteinázy K (Serva Electrophoresis, Německo) po dobu 48 h při 50 °C a 120 rpm ve vodní lázni s třepáním Julabo

SW 20 (Julabo Labortechnik). Dále byly vzorky dvakrát promyty 5 ml 0,05 M EDTA a poté přeneseny do mikrocentrifugačních zkumavek s 1,5 ml 0,05 M EDTA. Zkumavky byly skladovány v chladničce do doby použití.

Gel pro elektroforetickou detekci chromozomů byl připraven smícháním 0,8 g LMP agarózy (Bio-Rad Laboratories) a 80 ml 0,5 × TBE pufru [44,5 mM Tris (Sigma-Aldrich), 44,5 mM kyselina boritá (Duchefa Biochemie), 1 mM EDTA (Sigma-Aldrich)]. Směs byla rozehráta do vyčeření a vylita do připravené elektroforetické formy o rozměrech 13 × 14 cm. Poté se nechala ztuhnout 15 min při laboratorní teplotě a následně 30 min v chladničce. Do jamek gelu byla vložena přibližně třetina bločku. Jako standard pro měření molekulové hmotnosti byla použita chromozomální DNA kmene *Hansenula wingei* YB-4662-VIA (Bio-Rad Laboratories), která byla umístěna vždy do obou okrajových jamek gelu. Genetická analýza byla provedena na elektroforetickém přístroji CHEF-DR II (Bio-Rad Laboratories). PFGE probíhala 48 h za následujících podmínek: elektrické napětí 3 V/cm, pulzní čas 500 s a teplota 14 °C. Po skončení elektroforézy byl gel umístěn na dobu 20 min do vodní lázně s 0,5 µl/ml ethidiumbromidu (Carl Roth, Německo) a následně promyt v destilované vodě. Ke zviditelnění chromozomů byl použit transiluminátor (Ultra-Lum, USA). Jako dokumentační zařízení byla použita kamera ovládaná programem Scion Image (Scion, Japonsko) s následnou úpravou souboru pomocí software Scion VisiCapture 1.3 (Scion).

4.6.2. Analýza dat

Rozdíly v karyotypech jednotlivých kmenů byly posuzovány vizuálně na základě vzájemného porovnání počtu a pozic separovaných chromozomů v elektrogramu. Kromě toho byly fingerprinty vyhodnoceny programem GelCompar II (Applied Maths, USA). Nejprve byly definovány dráhy, které byly normalizovány pomocí použitých standardů pro měření molekulové hmotnosti. Každá dráha byla následně spojena s příslušnou položkou předem vytvořené databáze testovaných kandid. Poté byly nejprve automaticky a následně manuálně stanoveny pozice pruhů odpovídající jednotlivým chromozomům. Normalizované fingerprinty byly porovnávány pomocí Jaccardova koeficientu podobnosti pro binární data (S_j). Jedná se o matematickou párovací funkci, která měří shodu mezi páry izolátů v rozmezí hodnot 0 a 1, přičemž 0 znamená nepřítomnost a 1 přítomnost příslušného karyotypu. Jak je patrné ze vzorce ($S_j = \frac{a}{a+b+c}$), S_j dává stejnou váhu pozitivnímu a a nesouhlasnému párování b a c . Hodnota $S = 1$ znamená identicky spárované karyotypy, $S = 0$ žádné párování

a S v rozmezí 0,01-0,99 zvyšující se poměr spárovaných znaků, tj. pruhů fingerprintu. Tolerance polohy pruhů fingerprintu byla stanovena na 1 %. Pro konstrukci dendrogramů byla vybrána metoda skupinového párování pomocí nevážených aritmetických průměrů (UPGMA), využívající postupný shlukovací algoritmus. Při něm je nejprve stanovena lokální homologie mezi fingerprinty a postupně, na základě klesající podobnosti, vytvářen dendrogram.

Získané karyotypy kvasinek byly dány do kontextu s výsledky identifikace hmotnostní spektrometrií, příp. sekvencováním s cílem porovnat mezidruhové rozdíly v počtu a uspořádání chromozomů.

Vnitrodruhová variabilita izolátů *C. fabianii* byla posuzována nejprve vizuálně, poté pomocí dendrogramu a hodnocena s ohledem na pohlaví a věk pacientů, biochemické profily získané soupravou ID 32C, typ klinického materiálu a nemocniční oddělení, ze kterých byly kultury získány. Mimoto byla matematicky definovaná rozlišovací schopnost, tj. pravděpodobnost, že dva kmeny, zvolené náhodně z nepříbuzných populací, budou příslušnou typizační technikou rozlišeny. K výpočtu byl použit tzv. Simpsonův index diverzity (D) (120,141).

$$D = 1 - \frac{1}{N - (N - 1)} \sum_{j=1}^s x_j(x_j - 1)$$

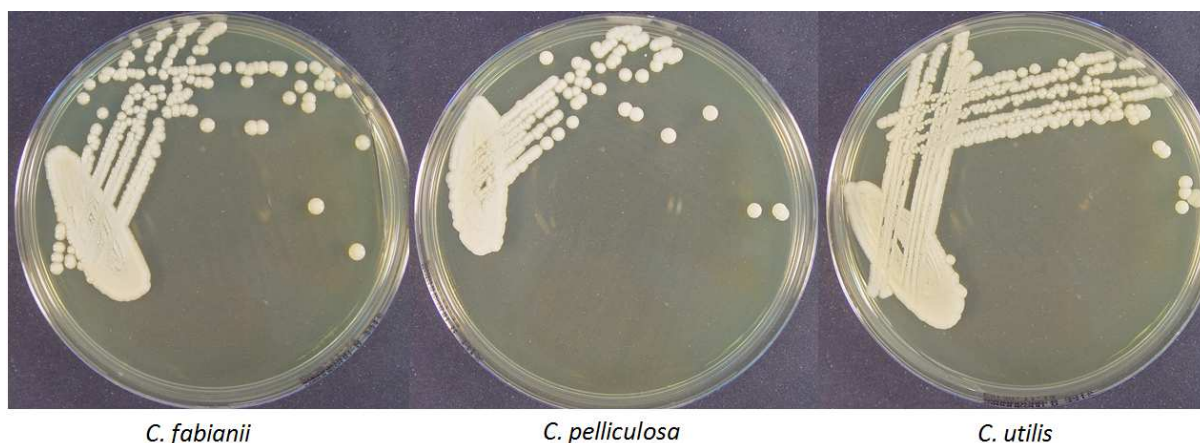
s - počet biotypů, x_j - počet kmenů souboru spadajících do j -tého biotypu, N - velikost souboru

5. Výsledky

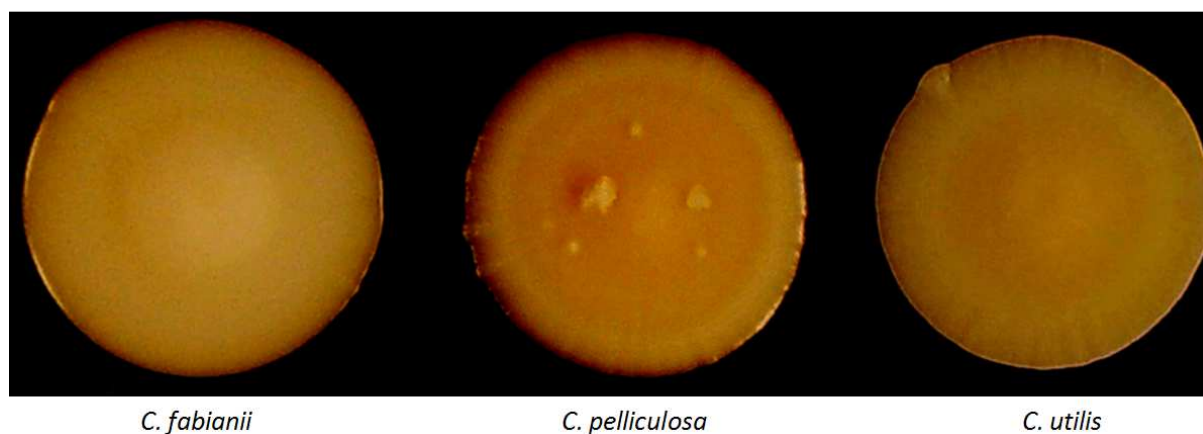
5.1. Morfologická identifikace kvasinek

Morfologie kultur *C. fabianii*, *C. pelliculosa* a *C. utilis* na SGA s chloramfenikolem po 48 h kultivace při 37 °C je demonstrována na obrázku 6. Všechny izoláty vyrůstaly v podobě okrouhlých, polokulovitých kolonií smetanově bílé barvy, s rovným okrajem, hladkým povrchem a charakteristickým kvasnicovým zápachem. U izolátů *C. pelliculosa* byl po 24 h pozorován v porovnání s oběma dalšími druhy pomalejší růst. Detailní struktura makrokolonií na SGA s chloramfenikolem po desetidenní inkubaci při 37 °C je demonstrována na obrázku 7. *C. fabianii* měla hladký povrch s lehce vyvýšeným středem a rovné okraje, *C. utilis* naopak vpadlé centrum a mírně laločnatou periferii. V případě *C. pelliculosa* byly u některých kmenů na povrchu kolonií pozorovány drobné bradavičnaté výrůstky.

Obr. 6: Kultury *Candida fabianii*, *Candida pelliculosa* a *Candida utilis* na Sabouraudově agaru po 48 h/37 °C



Obr. 7: Makrokolonie *Candida fabianii*, *Candida pelliculosa* a *Candida utilis* na Sabouraudově agaru po 10 dnech/37 °C



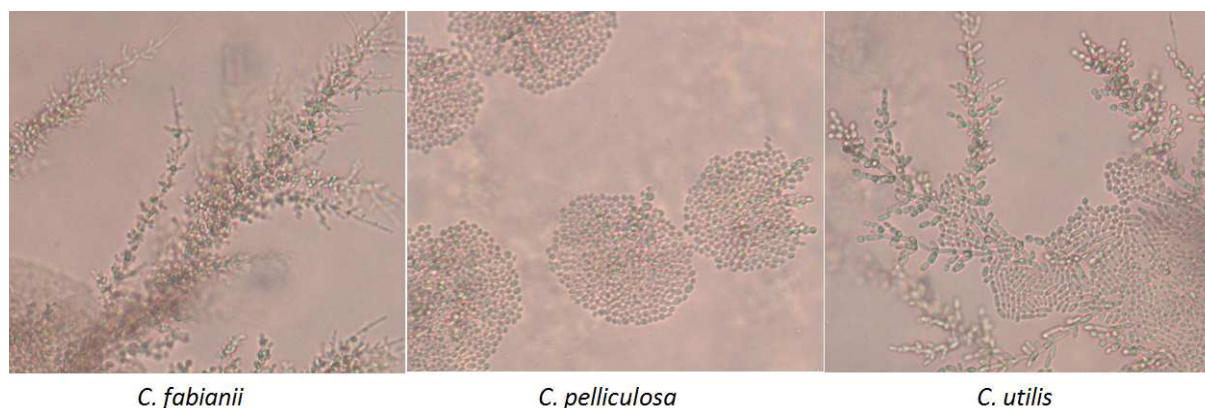
Při kultivaci na chromogenním agaru COLOREX Candida za teploty 37 °C byly po 48 h zjištěny mezi uvedenými druhy kvasinek určité rozdíly v barvě kolonií. *C. fabianii* měla růžové, obklopené světlejším dvorcem, *C. pelliculosa* drobnější, tmavě fialové se světlým lemem a *C. utilis* světle růžové. Mírně odlišný vzhled kultur je dokumentován na obrázku 8.

Obr. 8: Kultury *Candida fabianii*, *Candida pelliculosa* a *Candida utilis* na chromogenní půdě po 48 h/37 °C



Výsledky porovnání mikroskopického vzhledu jednotlivých druhů kvasinek na rýžovém agaru jsou dokumentovány na obrázku 9. Kmeny *C. fabianii* se vyznačovaly drobnými kulovitými až oválnými buňkami s poměrně dlouhým, hustě větveným pseudomyceliem. Izoláty *C. pelliculosa* vytvářely okrouhlé až ovoidní kvasinkové buňky. Přestože zmíněný druh má údajně schopnost tvorby pravých vláken, u našich kmenů byly nalezeny pouze velmi krátké pseudohyfy (96). Kultury *C. utilis* se vyznačovaly dlouze oválnými buňkami vzhledem připomínajícími *C. krusei* a bohatě větveným pseudomyceliem.

Obr. 9: Mikroskopický vzhled kultur *Candida fabianii*, *Candida pelliculosa* a *Candida utilis* na rýžovém agaru



5.2. Biochemická identifikace kvasinek

Z celkového počtu 256 izolátů kvasinek bylo pomocí biochemické soupravy ID 32C určeno 179 jako *C. pelliculosa* (69,9 %) a 77 jako *C. utilis* (30,1 %). Celkem bylo zaznamenáno 47 různých numerických profilů, z nichž 36 bylo přiřazeno ke druhu *C. pelliculosa* a 11 *C. utilis*. Nejpočetnější získané profily 4275350111 a 4274350111 zahrnovaly po 59 izolátech, následoval 4275350311 se 45 a 4274350311 s 11. Pravděpodobnost správného určení definovaná programem *apiweb* se pohybovala mezi 54,2-99,9 %. Přehled všech profilů, včetně počtu kmenů, procentuálního vyjádření pravděpodobnosti přesné identifikace a druhového zařazení je uveden v tabulce 9. Typové kmeny studovaných tří druhů kandid byly biochemicky identifikovány následovně: *W. anomalus* CBS 605 jako *C. pelliculosa* (numerický profil 5264351011, pravděpodobnost správného určení 99,9 %), *C. fabianii* CBS 5481 jako *C. pelliculosa* (4275350111, 57,3 %), a *C. jadinii* CBS 841 jako *C. utilis* (4275350311, 90,1 %). Typový kmen *C. fabianii* nemohl být soupravou ID 32C správně určen, neboť *C. fabianii* není zahrnuta v softwarové databázi *apiweb*. Výsledek druhové identifikace byl proto shodný jako u typového kmene *W. anomalus*, na rozdíl od něj však izolát asimiloval celiobiózu, trehalózu a melezitózu a naopak neštěpil galaktózu a erytritol.

5.3. Identifikace kvasinek hmotnostní spektrometrií

Na základě analýzy hmotnostních spekter vyšetřovaného souboru kvasinek bylo 229 kultur identifikováno jako *C. fabianii* (89,5 %), 20 *C. pelliculosa* (7,8 %), 6 *C. utilis* (2,3 %) a 1 nebyla určena (0,4 %). Skóre izolátů označených jako *C. fabianii* se nacházelo v rozmezí 2,003-2,521 (průměr 2,204), *C. pelliculosa* 1,815-2,329 (2,101), *C. utilis* 2,037-2,142 (2,081), u neurčeného kmene bylo 1,294.

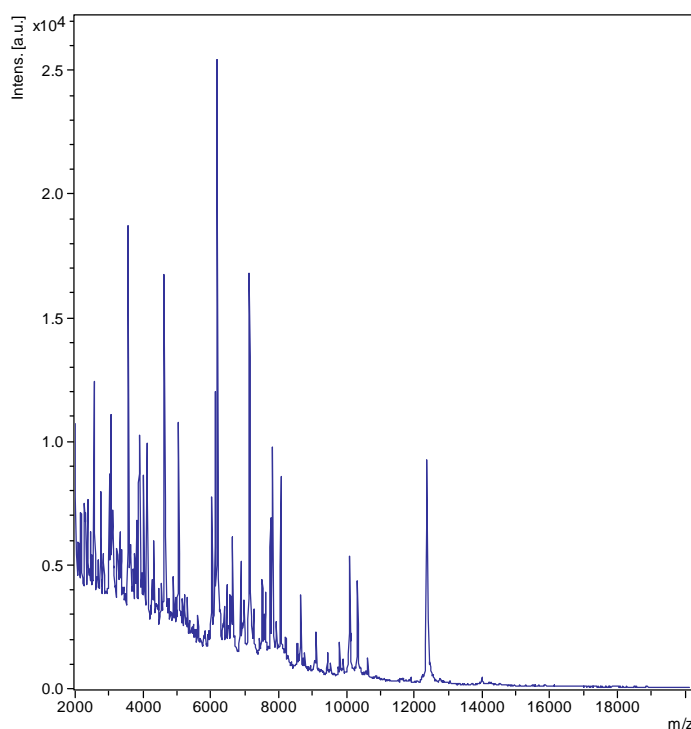
Identifikace typových kmenů, včetně dosaženého skóre, byla následující: *W. anomalus* CBS 605 byl určen jako *C. pelliculosa* (skóre 2,151) a *C. jadinii* CBS 841 jako *C. utilis* (skóre 2,084). Hmotnostní spektrum typového kmene *C. fabianii* CBS 5481, které bylo při zahájení studie do databáze aktivně vloženo, je znázorněno na obrázku 10.

Dále byly vzájemně porovnány výsledky získané oběma metodami. Rozdíly v poměrném zastoupení jednotlivých druhů identifikovaných biochemicky a hmotnostní spektrometrií jsou demonstrovány v grafech 1a a 1b.

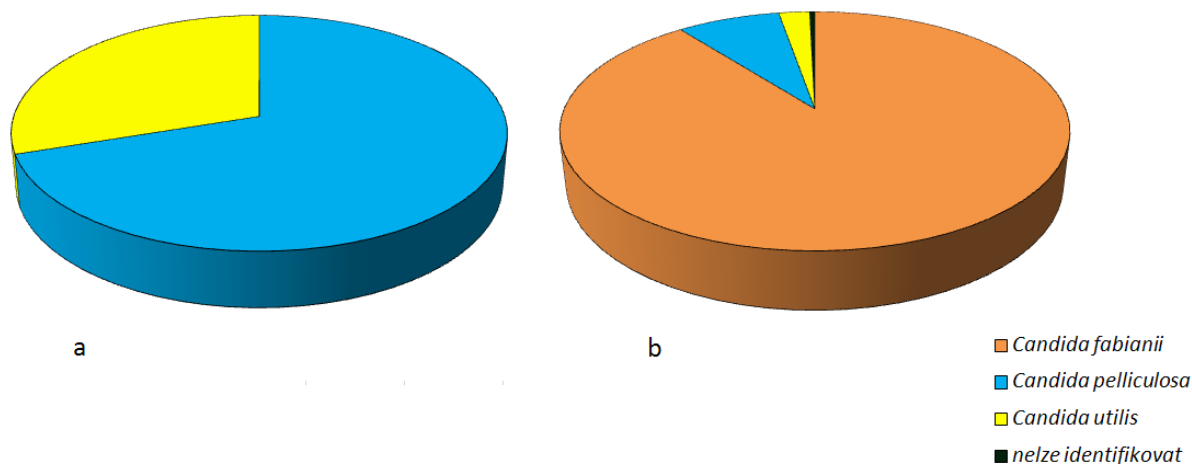
Izoláty kvasinek, identifikované hmotnostní spektrometrií jako *C. fabianii* (n=229), byly biochemicky určeny jako *C. pelliculosa* (n=154, 67,2 %) nebo *C. utilis* (n=75, 32,8 %).

Tab. 9: Přehled numerických profilů kvasinkových izolátů získaných soupravou ID 32C

Numerický kód ID 32C	Počet izolátů	Identifikovaný druh	Pravděpodobnost identifikace (%)
4275350111	59	<i>Candida pelliculosa</i>	57,3
4274350111	59	<i>Candida pelliculosa</i>	71,5
4275350311	45	<i>Candida utilis</i>	90,1
4274350311	11	<i>Candida utilis</i>	77,9
4271350111	7	<i>Candida utilis</i>	91,4
4375350111	5	<i>Candida pelliculosa</i>	56,8
5274350111	5	<i>Candida pelliculosa</i>	98,5
4270350111	4	<i>Candida utilis</i>	62,1
4275350711	4	<i>Candida utilis</i>	90,1
5275350311	4	<i>Candida pelliculosa</i>	98,7
4264351111	3	<i>Candida pelliculosa</i>	99,9
5264351111	3	<i>Candida pelliculosa</i>	99,9
5265351111	3	<i>Candida pelliculosa</i>	99,9
5271350111	3	<i>Candida pelliculosa</i>	96,5
5275350111	3	<i>Candida pelliculosa</i>	99,7
5375350111	3	<i>Candida pelliculosa</i>	77,4
4264350111	2	<i>Candida pelliculosa</i>	98,4
4265351111	2	<i>Candida pelliculosa</i>	99,9
5270350111	2	<i>Candida pelliculosa</i>	84,1
5270350311	2	<i>Candida pelliculosa</i>	81,6
4040751111	1	<i>Candida pelliculosa</i>	54,4
4055751111	1	<i>Candida pelliculosa</i>	99,5
4260350111	1	<i>Candida pelliculosa</i>	75,3
4264051111	1	<i>Candida pelliculosa</i>	99,9
4264351011	1	<i>Candida pelliculosa</i>	99,9
4265051111	1	<i>Candida pelliculosa</i>	99,9
4270250101	1	<i>Candida utilis</i>	72,8
4270350311	1	<i>Candida utilis</i>	74,5
4274750111	1	<i>Candida pelliculosa</i>	99,5
4275150111	1	<i>Candida pelliculosa</i>	62,7
4275250101	1	<i>Candida utilis</i>	99,9
4275250111	1	<i>Candida utilis</i>	98,1
4275350101	1	<i>Candida utilis</i>	98,5
4275350511	1	<i>Candida pelliculosa</i>	57,3
4275351111	1	<i>Candida pelliculosa</i>	99,9
4277350111	1	<i>Candida pelliculosa</i>	54,2
4375350311	1	<i>Candida utilis</i>	90,1
5260350111	1	<i>Candida pelliculosa</i>	69,2
5264151011	1	<i>Candida pelliculosa</i>	99,8
5265151111	1	<i>Candida pelliculosa</i>	99,9
5265351011	1	<i>Candida pelliculosa</i>	99,9
5265351115	1	<i>Candida pelliculosa</i>	99,9
5274751011	1	<i>Candida pelliculosa</i>	99,9
5275350511	1	<i>Candida pelliculosa</i>	99,6
5275350711	1	<i>Candida pelliculosa</i>	99,6
5275351111	1	<i>Candida pelliculosa</i>	99,9
5375750111	1	<i>Candida pelliculosa</i>	77,0

Obr. 10: Hmotnostní spektrum *Candida fabianii*

Graf 1: Druhové spektrum studovaného souboru kvasinek (n=256) získané pomocí (a) biochemické soupravy ID 32C a (b) hmotnostní spektrometrie



V případě všech kultur, identifikovaných pomocí MALDI-TOF jako *C. pelliculosa* (n=20), byly výsledky biochemického určení totožné. Kmeny, identifikované hmotnostní spektrometrií jako *C. utilis* (n=6), byly ve dvou případech biochemicky určené jako *C. utilis* (profily 4275350311 a 4270250101) a ve čtyřech jako *C. pelliculosa*, z nichž u dvou byly zaznamenány unikátní numerické kódy (4260350111 a 4275350511). Zbýlý, hmotnostní

spektrometrií neidentifikovaný izolát, byl biochemicky určen jako *C. pelliculosa* a měl rovněž specifický numerický kód (4040751111, pravděpodobnost identifikace 54,4 %).

5.4. Sekvencování

U všech 20 izolátů kvasinek, identifikovaných hmotnostní spektrometrií, byla sekvenační analýzou potvrzena správnost druhového určení, což je dokumentováno v tabulce 10. Zbýlý izolát CAPE 5-10, který nebylo možné pomocí MALDI-TOF identifikovat, byl určen jako *Ogataea polymorpha*. Shoda nukleotidových párů této kultury se sekvencemi uvedeného druhu v databázi BLAST byla 100%.

Tab. 10: Porovnání výsledků identifikace kvasinek hmotnostní spektrometrií a sekvenační analýzou

Označení vzorku	Identifikace hmotnostní spektrometrií	Identifikace sekvencováním	Délka produktu (pb)	Shoda s BLAST (pb/%)
CAFB 1-13	<i>Candida pelliculosa</i>	<i>Candida pelliculosa</i>	299	297/99
CAFB 1-26	<i>Candida fabianii</i>	<i>Candida fabianii</i>	208	206/99
CAFB 1-33	<i>Candida pelliculosa</i>	<i>Candida pelliculosa</i>	287	285/99
CAFB 1-39	<i>Candida fabianii</i>	<i>Candida fabianii</i>	232	232/100
CAPE 1-16	<i>Candida fabianii</i>	<i>Candida fabianii</i>	218	208/95
CAPE 1-28	<i>Candida fabianii</i>	<i>Candida fabianii</i>	233	231/99
CAPE 1-34	<i>Candida pelliculosa</i>	<i>Candida pelliculosa</i>	263	257/98
CAPE 2-13	<i>Candida pelliculosa</i>	<i>Candida pelliculosa</i>	240	235/98
CAPE 4-06	<i>Candida fabianii</i>	<i>Candida fabianii</i>	298	290/97
CAPE 4-09	<i>Candida fabianii</i>	<i>Candida fabianii</i>	236	232/98
CAPE 4-30	<i>Candida fabianii</i>	<i>Candida fabianii</i>	240	239/99
CAPE 4-39	<i>Candida fabianii</i>	<i>Candida fabianii</i>	226	223/99
CAPE 5-10	neidentifikováno	<i>Ogataea polymorpha</i>	239	239/100
CAPE 5-15	<i>Candida fabianii</i>	<i>Candida fabianii</i>	266	265/99
CAPE 5-27	<i>Candida pelliculosa</i>	<i>Candida pelliculosa</i>	280	280/100
CAPE 5-36	<i>Candida pelliculosa</i>	<i>Candida pelliculosa</i>	251	249/99
CAPE 5-39	<i>Candida utilis</i>	<i>Candida utilis</i>	236	235/99
CAUT 2-15	<i>Candida utilis</i>	<i>Candida utilis</i>	245	240/98
CAUT 2-21	<i>Candida utilis</i>	<i>Candida utilis</i>	224	217/97
CAUT 2-39	<i>Candida utilis</i>	<i>Candida utilis</i>	267	252/94
CAUT 3-12	<i>Candida fabianii</i>	<i>Candida fabianii</i>	268	264/99

pb - páry bází; BLAST - databáze Basic Local Alignment Search Tool

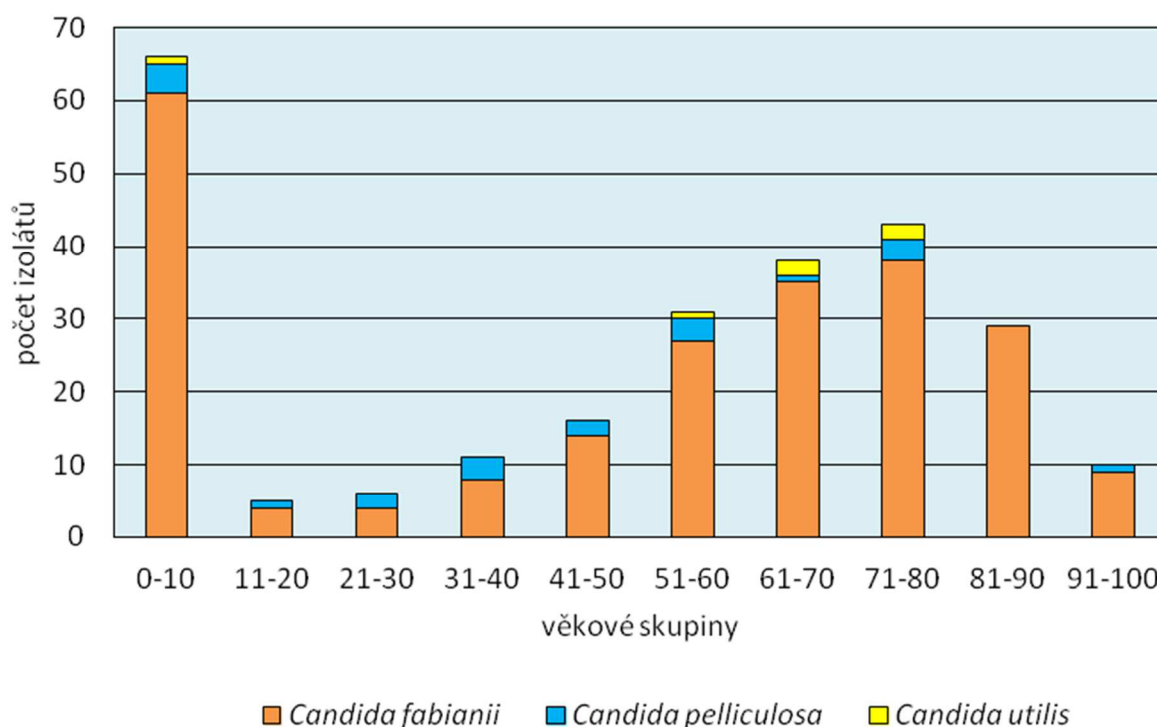
Epidemiologické analýzy související s výsledky identifikačních metod

Z celkového počtu 256 kmenů bylo hodnoceno 255. Zbýlý izolát byl na základě sekvencování určen jako *O. polymorpha*, a proto nebyl do epidemiologické analýzy zahrnut.

Frekvence druhů v závislosti na pohlaví a věku pacientů. Mezi izoláty zachycenými od mužů (n=146) bylo 127 identifikováno jako *C. fabianii*, 16 *C. pelliculosa* a 3 *C. utilis*. Analogický poměr u žen (n=109) činil 102 kmenů *C. fabianii*, 4 *C. pelliculosa* a 3 *C. utilis*.

Počty izolátů jednotlivých druhů kandid v závislosti na věku pacientů jsou sumarizovány v grafu 2. Nejvíce kultur kvasinek (n=66) bylo zachyceno ve věkové skupině 0-10 let, přičemž 61 izolátů představovala *C. fabianii* (92,4 %), 4 *C. pelliculosa* (6,1 %) a 1 *C. utilis* (1,5 %). Ve více než třetině případů (34,8 %) se přitom jednalo o děti do jednoho roku. Následovalo rozmezí 71-80 let (n=43) s 38 kmeny *C. fabianii* (88,4 %), 3 *C. pelliculosa* (7 %) a 2 *C. utilis* (4,6 %). Naopak nejméně sledovaných kandid (n=5) bylo zachyceno ve skupině 11-20 let; z nich čtyři byly určeny jako *C. fabianii* (80 %) a jedna *C. pelliculosa* (20 %). Průměrný věk všech pacientů činil 48,8 roků, přičemž průměrné stáří mužů bylo 46,9 a žen 50,8 let. Všechny tři druhy se vyskytovaly napříč věkovými skupinami nezávisle na stáří pacientů.

Graf 2: Počty izolovaných kvasinek včetně druhového zastoupení ve věkových skupinách pacientů



Frekvence druhů v klinických vzorcích. Počty izolátů *C. fabianii*, *C. pelliculosa* a *C. utilis* v jednotlivých typech klinického materiálu jsou přehledně uvedeny v tabulce 11. Z celkového počtu zachycených kmenů *C. fabianii* (n=229) bylo nejvíce izolováno z dolních cest dýchacích

(n=71; 31,0 %), následovala moč (n=62; 27,1 %), výtěry z orofaryngu (n=57; 24,9 %), hemokultury a centrální žilní katetry (n=13; 5,6 %), punktáty a sekrety z drénu (n=9; 3,9 %), rektální výtěry a perianální stěry (n=8; 3,5 %). Po dvou kulturách (0,9 %) bylo izolováno z kůže, resp. nehtů, dále stěrů z ran, pochvy a výtěrů ze spojivky, zbylý izolát (0,4 %) pocházel ze zevního zvukovodu. Kultury *C. pelliculosa* (n=20) byly zachyceny z kůže (n=7; 35 %), stěrů z nosohltanu (5; 25 %), vzorků z dolních dýchacích cest (3; 15 %), centrálních žilních katétrů, výtěrů z rekta (po 2; 10 %) a moči (1; 5 %). Kmeny *C. utilis* (n=6) byly izolovány z endosekretů (3; 50 %), stěrů z nosohltanu, kůže a punktátu (po 1; 16,7 %).

Tab. 11: Porovnání počtu izolátů *Candida fabianii*, *Candida pelliculosa* a *Candida utilis* v klinických vzorcích

Druh kvasinky	<i>Candida fabianii</i> (n=229)	<i>Candida pelliculosa</i> (n=20)	<i>Candida utilis</i> (n=6)
Typ klinického materiálu			
Dolní cesty dýchací (n=77)	71	3	3
Orofarynx (n=63)	57	5	1
Moč (n=63)	62	1	0
Hemokultura, CŽK (n=15)	13	2	0
Punktát, sekret z drénu (n=10)	9	0	1
Stolice, perianální stěr (n=10)	8	2	0
Kůže, nehty (n=10)	2	7	1
Pochva (n=2)	2	0	0
Rána (n=2)	2	0	0
Spojivky (n=2)	2	0	0
Zevní zvukovod (n=1)	1	0	0

BAL - bronchoalveolární laváž, ETS - endotracheální sekret, CŽK - centrální žilní katetr

Frekvence druhů v participujících zdravotnických zařízeních. Počty kmenů dodaných jednotlivými nemocnicemi včetně poměrného zastoupení všech tří studovaných druhů kandid jsou přehledně zpracovány v tabulce 12. Vyplývá z ní, že pouze ve VFN Praha převažoval druh *C. pelliculosa*, zatímco ve všech ostatních zdravotnických zařízeních byla nejčastěji zachycena *C. fabianii*. Relativně vysoké zastoupení *C. pelliculosa* s ohledem na celkový počet poskytnutých izolátů byl zaznamenán i ve Zdravotním ústavu v Ostravě (23,1 %), FN u sv. Anny v Brně (14,8 %) a FN v Motole (13,3 %). *C. utilis* byla zachycena pouze

ve třech nemocnicích, a to ve FN Olomouc, Zdravotním ústavu v Ostravě a v Nemocnici České Budějovice.

Tab. 12: Porovnání počtu izolátů *Candida fabianii*, *Candida pelliculosa* a *Candida utilis* ve zdravotnických zařízeních

Druh kvasinky	<i>Candida fabianii</i> (n=229)	<i>Candida pelliculosa</i> (n=20)	<i>Candida utilis</i> (n=6)
Nemocnice			
FN Olomouc (n=162)	152	6	4
FN u sv. Anny v Brně (n=27)	23	4	0
FN v Motole (n=15)	13	2	0
Zdravotní ústav v Ostravě (n=13)	9	3	1
Nemocnice České Budějovice (n=10)	8	1	1
FN Hradec Králové (n=9)	8	1	0
FN Brno (n=7)	7	0	0
Všeobecná FN v Praze (n=5)	2	3	0
FN Plzeň (n=4)	4	0	0
Krajská nemocnice Liberec (n=3)	3	0	0

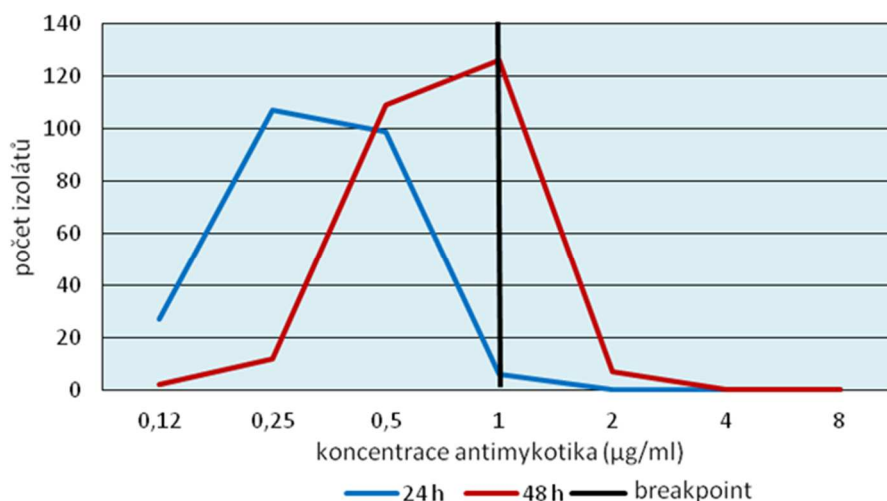
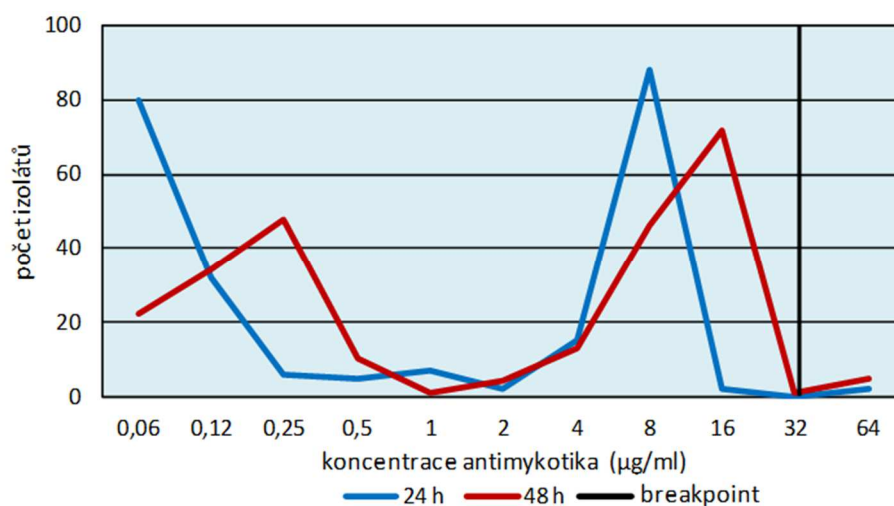
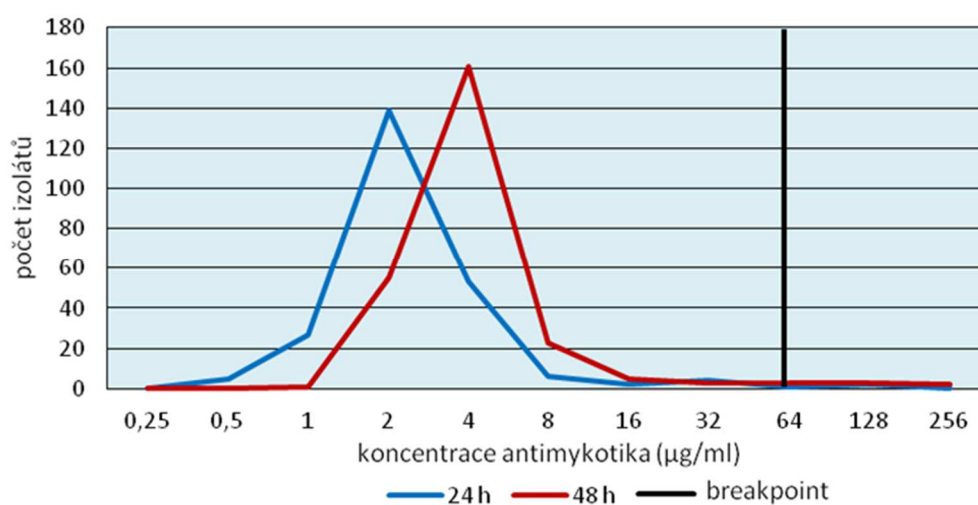
FN - Fakultní nemocnice

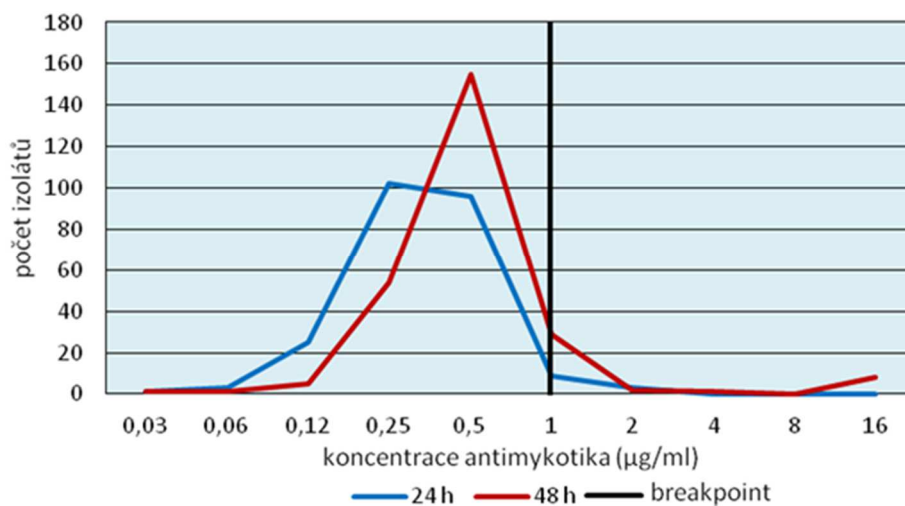
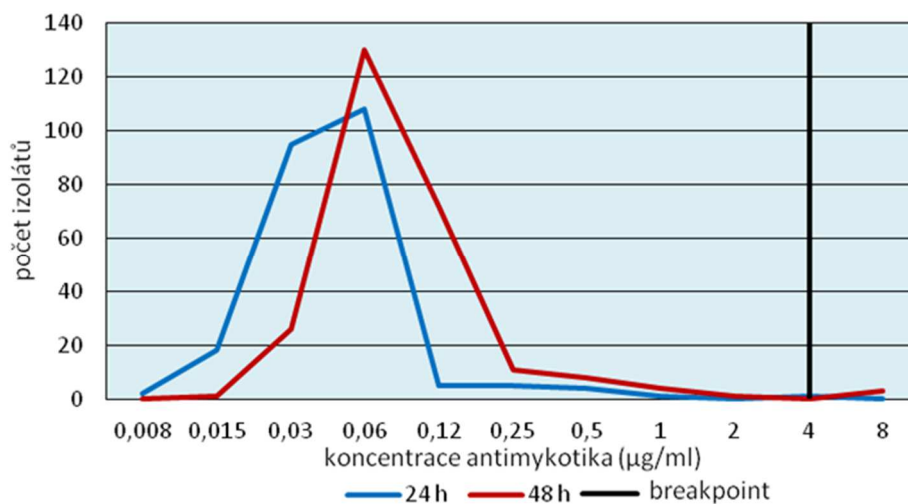
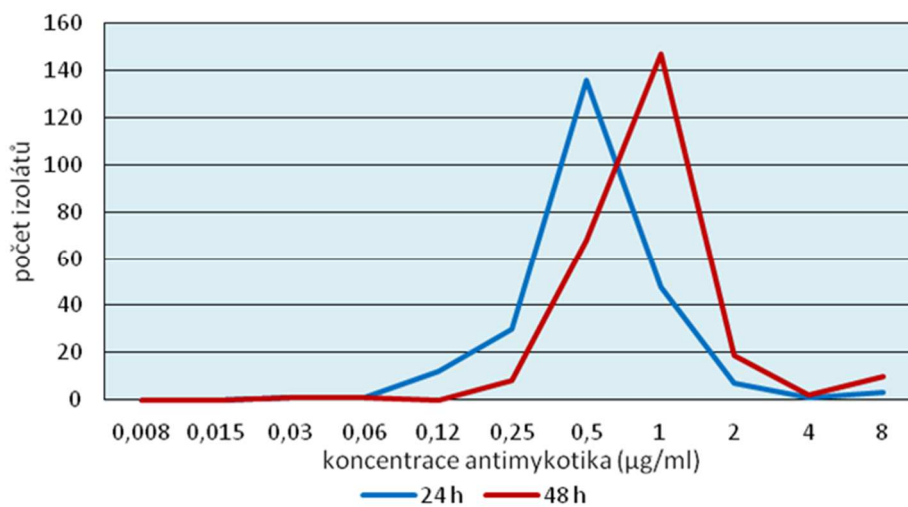
5.5. Testování citlivosti k antimykotikům mikrodiluční metodou

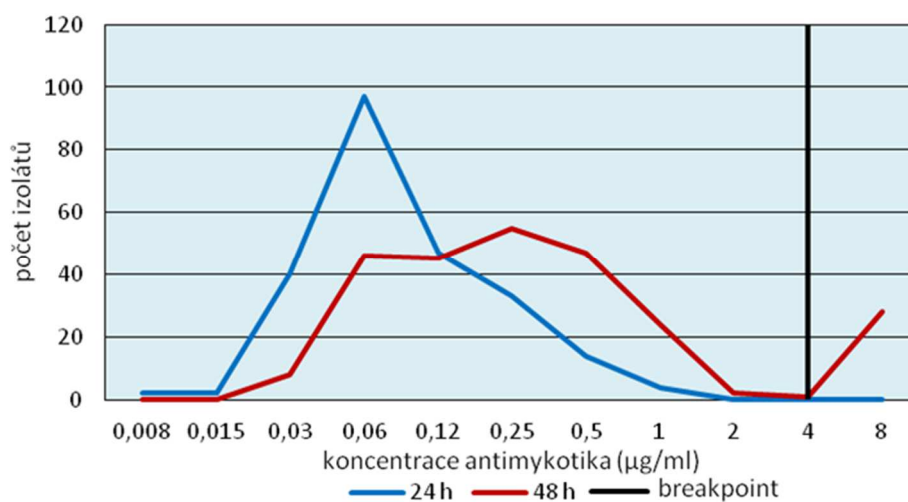
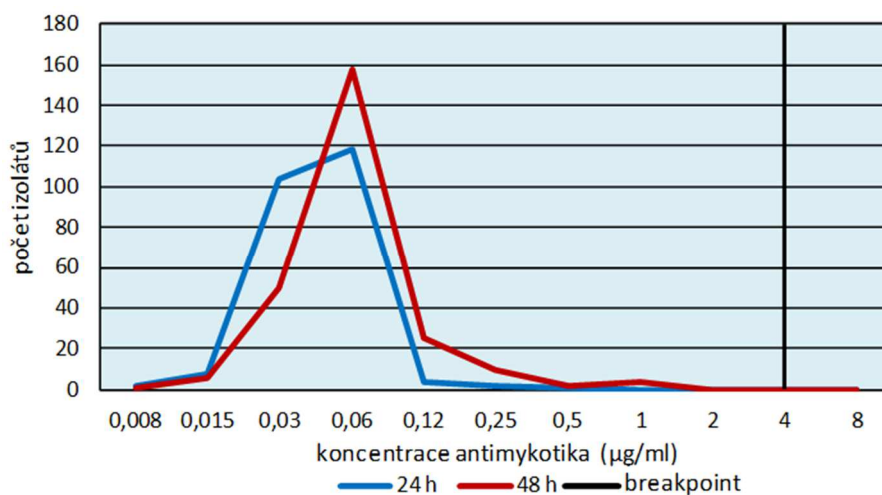
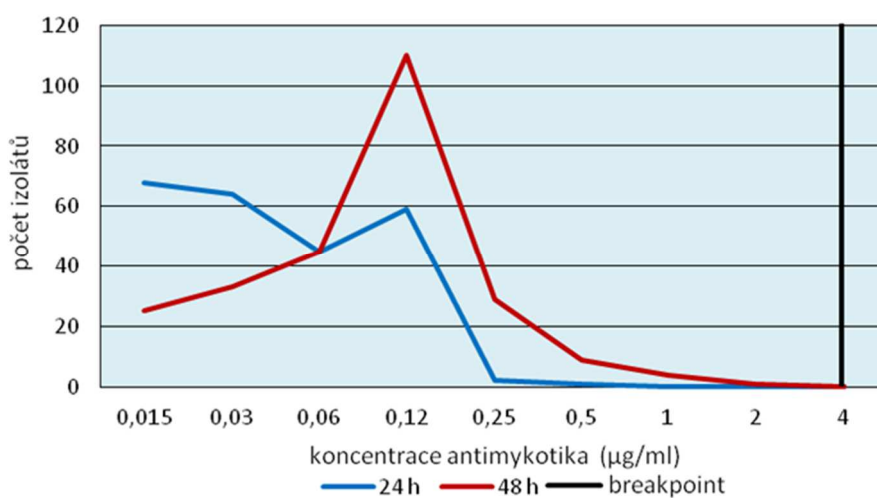
5.5.1. Porovnání MIC antimykotik po inkubaci 24 a 48 h

U všech antimykotik byly po 48 h při porovnání s 24 h inkubací zaznamenány vyšší MIC v průměru o jedno ředění, což je patrné z grafů 3-11. Uvedený trend je v korelaci s rozmezími MIC po 24, resp. 48 h kultivace pro kmeny *C. krusei* ATCC 6258 a *C. parapsilosis* ATCC 22019, doporučenými výrobcem soupravy Sensititre YeastOne pro kontrolu kvality. Z grafů je rovněž zřejmé, že některé izoláty měly po 24 h MIC pod breakpointy jednotlivých antimykotik, zatímco po 48 h u nich došlo k posunu nad zmíněné hraniční hodnoty.

U celkem 15 izolátů testovaného souboru (14 *C. pelliculosa* a 1 *C. fabianii*) nebylo možné kvůli pomalému růstu vyhodnotit výsledky po 24 h. Proto byly dále analyzovány MIC zaznamenané po inkubaci 48 h.

Graf 3: Rozložení MIC amfotericinu B u studovaného souboru kvasinek po 24 a 48 h**Graf 4: Rozložení MIC flucytosinu u studovaného souboru kvasinek po 24 a 48 h****Graf 5: Rozložení MIC flukonazolu u studovaného souboru kvasinek po 24 a 48 h**

Graf 6: Rozložení MIC itrakonazolu u studovaného souboru kvasinek po 24 a 48 h**Graf 7: Rozložení MIC vorikonazolu u studovaného souboru kvasinek po 24 a 48 h****Graf 8: Rozložení MIC posakonazolu u studovaného souboru kvasinek po 24 a 48 h**

Graf 9: Rozložení MIC kaspofunginu u studovaného souboru kvasinek po 24 a 48 h**Graf 10: Rozložení MIC mikafunginu u studovaného souboru kvasinek po 24 a 48 h****Graf 11: Rozložení MIC anidulafunginu u studovaného souboru kvasinek po 24 a 48 h**

5.5.2. Mezidruhové porovnání MIC antimykotik

Rozdíly v rozmezí a průměrných hodnotách MIC jednotlivých antimykotik po 48 h mezi testovanými druhy kandid jsou přehledně demonstrovány v tabulce 13. Z ní je patrné, že nejvyšší průměrné MIC byly u naprosté většiny antifungálních látek zjištěny u *C. fabianii*. Jedinou výjimku představoval FCZ, kde dominovala *C. utilis*. Zajímavým jevem přitom bylo, že u ní došlo k mimořádnému nárůstu při porovnání průměrných MIC po 24 (0,29 µg/ml) a 48 h (11,37 µg/ml), zatímco u zbylých dvou druhů byl vzestup výrazně nižší (4,16 vs. 7,91 µg/ml u *C. fabianii* a 0,22 vs. 2,86 µg/ml u *C. pelliculosa*).

Tab. 13: Porovnání rozmezí a průměrných MIC antimykotik po 48 h u izolátů *Candida fabianii*, *Candida pelliculosa* a *Candida utilis*

Druh kvasinky	<i>Candida fabianii</i>		<i>Candida pelliculosa</i>		<i>Candida utilis</i>	
Antimykotikum	MIC (µg/ml)		MIC (µg/ml)		MIC (µg/ml)	
	rozmezí	průměr	rozmezí	průměr	rozmezí	průměr
Amfotericin B	0,12-2,0	0,8	0,12-1,0	0,44	0,5-1,0	0,58
Flucytozin	0,06-64,0	7,91	0,06-32,0	2,86	0,06-64,0	11,37
Flukonazol	2,0-256,0	7,99	1,0-8,0	4,35	2,0-8,0	4,33
Itrakonazol	0,25-16,0	1,02	0,03-1,0	0,3	0,25-1,0	0,54
Vorikonazol	0,03-8,0	0,19	0,015-0,25	0,12	0,06-0,5	0,17
Posakonazol	0,25-8,0	1,25	0,03-1,0	0,59	0,5-1,0	0,67
Kaspofungin	0,03-8,0	1,3	0,03-0,5	0,16	0,03-0,25	0,11
Anidulafungin	0,015-2,0	0,15	0,015-0,12	0,04	0,015-0,12	0,04
Mikafungin	0,03-1,0	0,09	0,008-0,06	0,04	0,015-0,03	0,02

Interpretace. V tabulce 14 je demonstrován poměr počtu izolátů studovaných tří druhů kvasinek z hlediska interpretace hodnot MIC antimykotik. Z tabulky vyplývá, že z celkového pohledu se nejvyšší míra rezistence vyskytovala u izolátů *C. fabianii*. Navíc bylo zachyceno 21 kultur (9 %) zmíněného druhu, rezistentních ke dvěma a více antimykotikům. U *C. pelliculosa* a *C. utilis* bylo nalezeno pouze po jednom rezistentním izolátu, v obou případech k ITR.

Při hodnocení zaměřeném na jednotlivá antimykotika bylo zjištěno, že žádný z kmenů *C. fabianii* a *C. utilis* (na rozdíl od *C. pelliculosa*) nebyl citlivý k ITR, většina z nich (zhruba 83 %) k němu byla citlivá pouze v závislosti na dávce, ostatní byly rezistentní. Dále byl

zajímavý relativně velký počet (13 %) kmenů *C. fabianii* rezistentních ke KAS a to zejména v kontextu ostatních dvou echinokandinů, k nimž byly všechny testované izoláty citlivé.

Tab. 14: Porovnání interpretací citlivosti k antimykotikům u izolátů *Candida fabianii*, *Candida pelliculosa* a *Candida utilis*

Druh kvasinky	<i>Candida fabianii</i> (n=229)					<i>Candida pelliculosa</i> (n=20)					<i>Candida utilis</i> (n=6)				
	C	CD	I	R	N	C	CD	I	R	N	C	CD	I	R	N
Amfotericin B	222	-	-	7	-	20	-	-	0	-	6	-	-	0	-
Flucytozin	106	-	118	5	-	17	-	3	0	-	5	-	1	0	-
Flukonazol	191	-	26	12	-	17	-	3	0	-	5	-	1	0	-
Itrakonazol	0	190	-	39	-	7	12	-	1	-	0	5	-	1	-
Vorikonazol	225	1	-	3	-	20	0	-	-	0	6	0	-	-	0
Kaspofungin	199	-	-	-	30	20	-	-	-	0	6	-	-	-	0
Mikafungin	229	-	-	-	0	20	-	-	-	0	6	-	-	-	0
Anidulafungin	229	-	-	-	0	20	-	-	-	0	6	-	-	-	0

C - citlivý, CD - citlivý v závislosti na dávce, I - intermediární, R - rezistentní, N - necitlivý

5.5.3. Epidemiologické analýzy v souvislosti s testováním citlivosti *C. fabianii*

Vzhledem k nízkému počtu izolátů *C. pelliculosa* a *C. utilis* byly epidemiologické analýzy provedeny pouze pro druh *C. fabianii*.

Průměrné MIC antimykotik podle pohlaví a věkové struktury pacientů. Porovnání těchto hodnot podle pohlaví je demonstrováno v tabulce 15. Vyplývá z ní, že MIC izolátů získaných od mužů byly s výjimkou FCZ u všech antimykotik vyšší.

V tabulce 16 jsou uvedeny průměrné hodnoty MIC v jednotlivých věkových skupinách. Nejnížší MIC byly nalezeny u pacientů mezi 11 a 30 lety, naopak nejvyšší ve skupině 31-40 roků a dále u osob starších 50 let. Průměrné hodnoty azolových antimykotik (zejména FLA) u izolátů získaných od nemocných mezi 31 a 40 lety však byly výrazně ovlivněny malým počtem vyšetřených kmenů a záchytem dvou kultur s vysokými MIC.

Tab. 15: Porovnání průměrných MIC antimykotik (v µg/ml) *Candida fabianii* u mužů a žen

Pohlaví	Muži (n=127)	Ženy (n=102)
Antimykotikum		
Amfotericin B	0,86	0,73
Flucytozin	6,36	8,29
Flukonazol	9,62	6,60
Itrakonazol	1,25	0,77
Vorikonazol	0,25	0,17
Posakonazol	1,33	0,96
Kaspofungin	1,14	0,91
Anidulafungin	0,14	0,12
Mikafungin	0,09	0,08

Tab. 16: Porovnání průměrných MIC antimykotik (v µg/ml) *Candida fabianii* mezi věkovými skupinami pacientů

Antimykotikum	AMB	FCZ	FLA	ITR	VOR	POS	KAS	AND	MIK
Věková skupina									
0-10 (n=61)	0,83	7,07	5,05	0,77	0,10	1,08	0,96	0,18	0,11
11-20 (n=4)	0,71	4,50	4,16	0,50	0,05	0,88	0,22	0,14	0,11
21-30 (n=3)	0,50	5,50	2,67	0,45	0,05	0,83	0,16	0,11	0,07
31-40 (n=8)	0,75	3,75	59,0	6,47	2,16	3,63	0,41	0,16	0,10
41-50 (n=15)	0,83	13,38	5,47	0,72	0,10	1,17	1,46	0,16	0,08
51-60 (n=28)	0,91	12,49	7,41	1,67	0,11	1,54	2,14	0,13	0,07
61-70 (n=35)	0,76	8,47	7,09	0,59	0,10	1,08	1,84	0,13	0,07
71-80 (n=37)	0,80	7,00	12,92	0,94	0,35	1,34	1,24	0,23	0,08
81-90 (n=29)	0,78	5,68	8,07	1,00	0,14	1,24	1,36	0,13	0,10
91-100 (n=9)	0,81	6,89	3,80	0,56	0,16	0,90	0,51	0,11	0,20

AMB - amfotericin B, FCZ - flucytozin, FLA - flukonazol, ITR - itrakonazol, VOR - vorikonazol, POS - posakonazol, KAS - kaspofungin, AND - anidulafungin, MIK - mikafungin

Průměrné MIC antimykotik podle druhů klinického materiálu. V tabulce 17 jsou porovnány zmíněné hodnoty v klinických vzorcích, z nichž byl získán významnější počet izolátů. Vyplyvá z ní, že největší rozdíly v MIC byly zaznamenány u azolových antimykotik, zejména FLA, kde absolutně dominovaly kmeny získané z hemokultur a žilních katétrů. Vyšší

hodnoty, při porovnání s ostatními klinickými vzorky, vykazovaly také kultury zachycené z moči. Velmi nízké MIC byly zaznamenány u echinokandinů s výjimkou KAS.

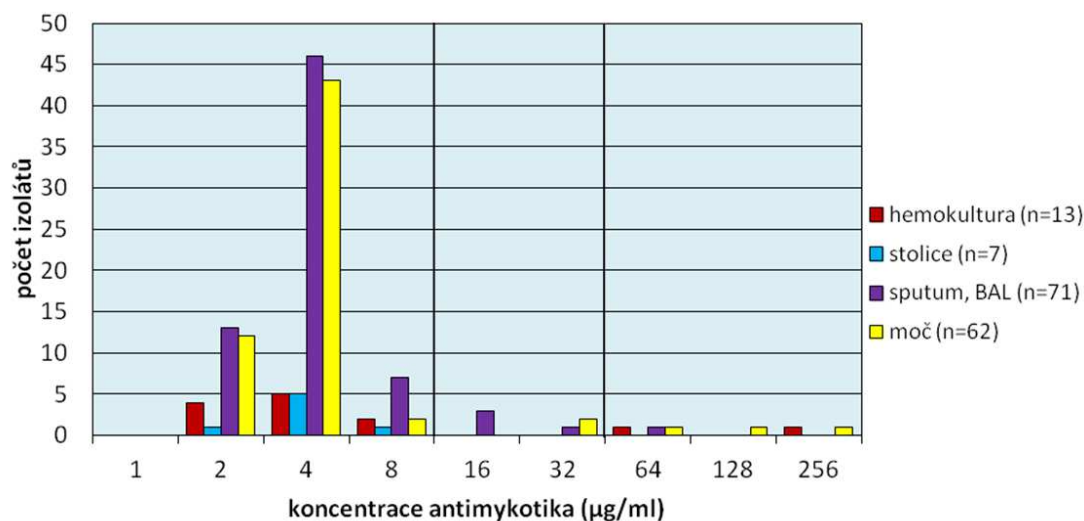
Tab. 17: Porovnání průměrných MIC antimykotik (v $\mu\text{g/ml}$) *Candida fabianii* mezi druhy klinického materiálu

Antimykotikum	AMB	FCZ	FLA	ITR	VOR	POS	KAS	AND	MIK
Klinický materiál									
Dolní cesty dýchací (n=71)	0,82	6,86	5,75	0,55	0,10	1,11	1,33	0,12	0,08
Orofarynx (n=57)	0,77	9,44	8,41	0,82	0,13	1,15	0,97	0,13	0,08
Moč (n=62)	0,78	8,57	11,68	1,81	0,37	1,63	1,53	0,17	0,09
Hemokultura, CŽK (n=13)	0,85	5,98	28,0	2,88	0,78	1,90	2,77	0,20	0,10
Punktát, sekret z drénu (n=9)	0,68	8,90	4,22	0,47	0,08	0,94	0,43	0,15	0,10
Stolice, perianální stěr (n=8)	1,00	7,46	4,29	0,45	0,10	0,86	0,26	0,24	0,20

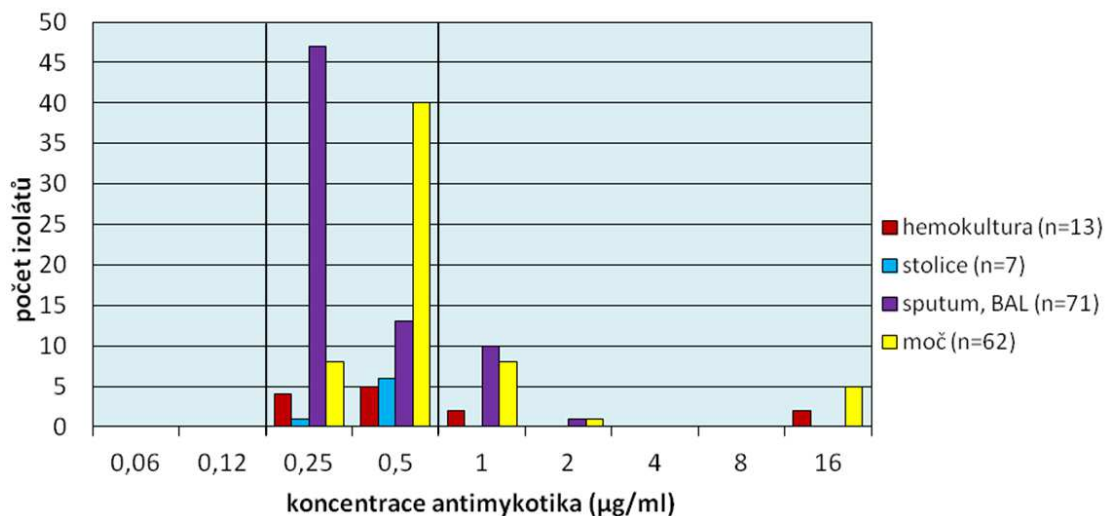
AMB - amfotericin B, FCZ - flucytozin, FLA - flukonazol, ITR - itrakonazol, VOR - vorikonazol, POS - posakonazol, KAS - kaspofungin, AND - anidulafungin, MIK - mikafungin, BAL - bronchoalveolární laváž, ETS - endosekret, CŽK - centrální žilní katetr

Pomocí grafů 12-15 je zobrazeno rozložení MIC azolových antimykotik u izolátů *C. fabianii* z klinických vzorků, v nichž byla zachycena nejčastěji. Vyplývá z nich, že nejvyšší počet rezistentních kmenů pochází z hemokultur, resp. cévních kanyl a moči. Na základě interpretačních kritérií CLSI byly detekovány dva izoláty, rezistentní ke čtyřem azolovým antimykotikům, přičemž jeden pocházel z hemokultury a druhý z moči.

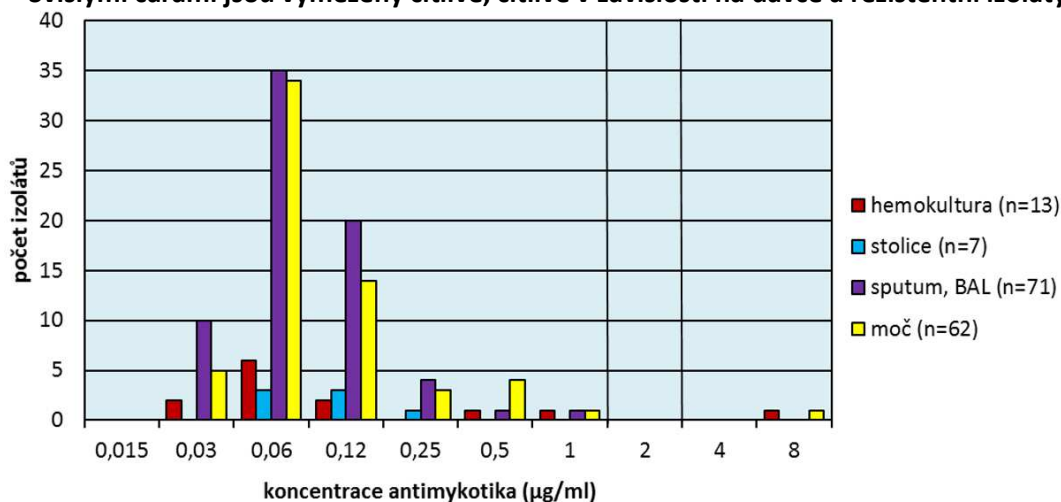
Graf 12: Rozložení MIC flukonazolu u izolátů *Candida fabianii* podle typu klinického materiálu. Svislými čarami jsou vymezeny citlivé, citlivé v závislosti na dávce a rezistentní izoláty



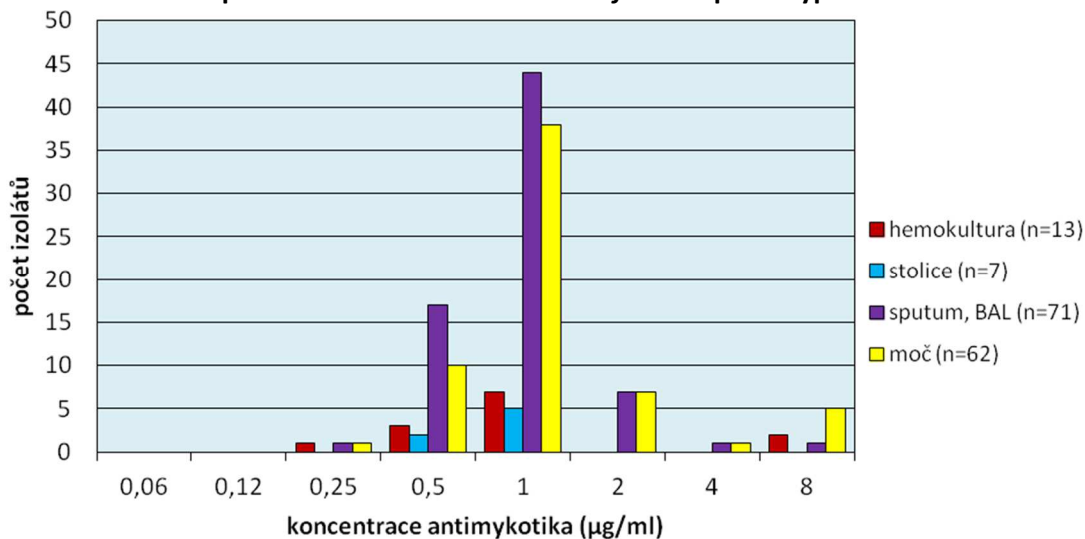
Graf 13: Rozložení MIC itraconazolu u izolátů *Candida fabianii* podle typu klinického materiálu. Svislími čarami jsou vymezeny citlivé, citlivé v závislosti na dávce a rezistentní izoláty



Graf 14: Rozložení MIC vorikonazolu u izolátů *Candida fabianii* podle typu klinického materiálu. Svislími čarami jsou vymezeny citlivé, citlivé v závislosti na dávce a rezistentní izoláty



Graf 15: Rozložení MIC posakonazolu u izolátů *Candida fabianii* podle typu klinického materiálu



Průměrné MIC antimykotik v participujících zdravotnických zařízeních. Příslušné hodnoty jsou sumarizovány v tabulce 18. U azolových antimykotik a AMB byly nejvyšší průměrné MIC zjištěny mezi kmeny z FN Plzeň, v případě skupiny azolů ji následovaly FN Hradec Králové a Nemocnice České Budějovice. Naproti tomu nejnižší hodnoty MIC těchto antimykotik byly nalezeny u kvasinek izolovaných ve FN Brno. V případě MIC FCZ a KAS dominovaly izoláty získané z KN Liberec. Z epidemiologického hlediska je zajímavé, že průměrné MIC v podstatě všech antimykotik zachycených od pacientů obou brněnských nemocnic si byly podstatně podobnější než v případě pražských zdravotnických zařízení.

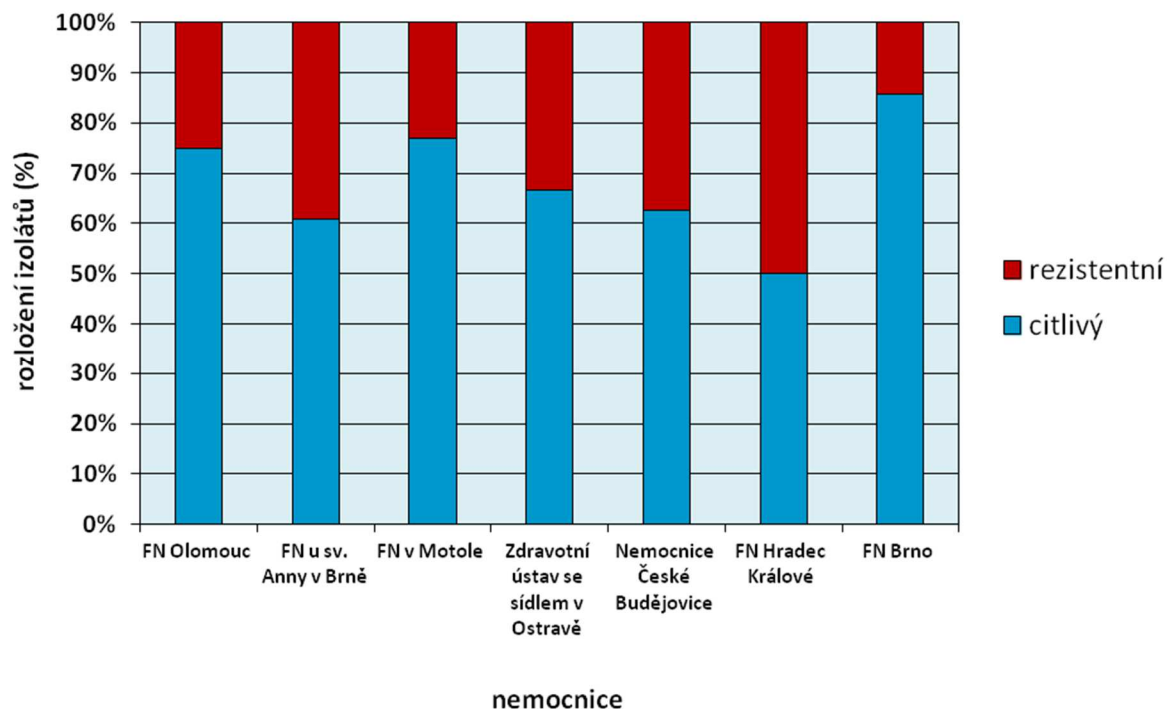
Tab. 18: Porovnání průměrných MIC antimykotik (v µg/ml) *Candida fabianii* mezi participujícími zdravotnickými zařízeními

Antimykotikum	AMB	FCZ	FLA	ITR	VOR	POS	KAS	AND	MIK
Nemocnice									
FN Olomouc (n=152)	0,81	8,09	7,78	1,03	0,17	1,31	1,16	0,13	0,07
FN u sv. Anny v Brně (n=23)	0,85	8,33	3,83	0,58	0,10	1,07	2,29	0,22	0,08
FN v Motole (n=13)	0,74	2,96	6,15	0,54	0,12	0,65	0,34	0,31	0,17
Zdravotní ústav v Ostravě (n=9)	0,50	8,48	4,89	0,69	0,09	0,94	2,14	0,12	0,07
Nemocnice České Budějovice (n=8)	0,72	0,21	17,78	2,36	1,00	1,67	0,35	0,14	0,07
FN Hradec Králové (n=8)	0,88	5,10	20,50	2,47	0,36	1,94	2,11	0,14	0,08
FN Brno (n=7)	0,86	9,23	3,43	0,50	0,07	1,00	1,58	0,11	0,09
FN Plzeň (n=4)	1,25	6,56	70,0	4,38	2,06	2,50	0,78	0,22	0,33
Krajská nemocnice Liberec (n=3)	1,00	26,67	5,33	0,50	0,08	1,00	3,33	0,16	0,14
Všeobecná FN v Praze (n=2)	0,75	0,38	4,00	0,50	0,14	0,75	0,25	0,12	0,52

AMB - amfotericin B, FCZ - flucytozin, FLA - flukonazol, ITR - itrakonazol, VOR - vorikonazol, POS - posakonazol, KAS - kaspofungin, AND - anidulafungin, MIK - mikafungin, FN – Fakultní nemocnice.

V grafu 16 jsou souborně porovnány výsledky interpretace MIC všech antimykotik izolátů *C. fabianii* z příslušného zdravotnického zařízení z hlediska interpretačních kritérií CLSI. Mezi citlivé byly započítány i citlivé v závislosti na dávce, resp. intermediární, za rezistentní byly naopak považovány také izoláty k echinokandinům takzvaně necitlivé. Procentuální vyjádření bylo zvoleno s ohledem na nerovnoměrný počet kultur poskytnutých jednotlivými nemocnicemi. Kvůli malým počtům zaslaných kmenů nebyly do grafu zařazeny FN Plzeň, Krajská nemocnice Liberec a Všeobecná FN v Praze.

Graf 16: Procentuální porovnání interpretace MIC izolátů *Candida fabianii* mezi participujícími zdravotnickými zařízeními



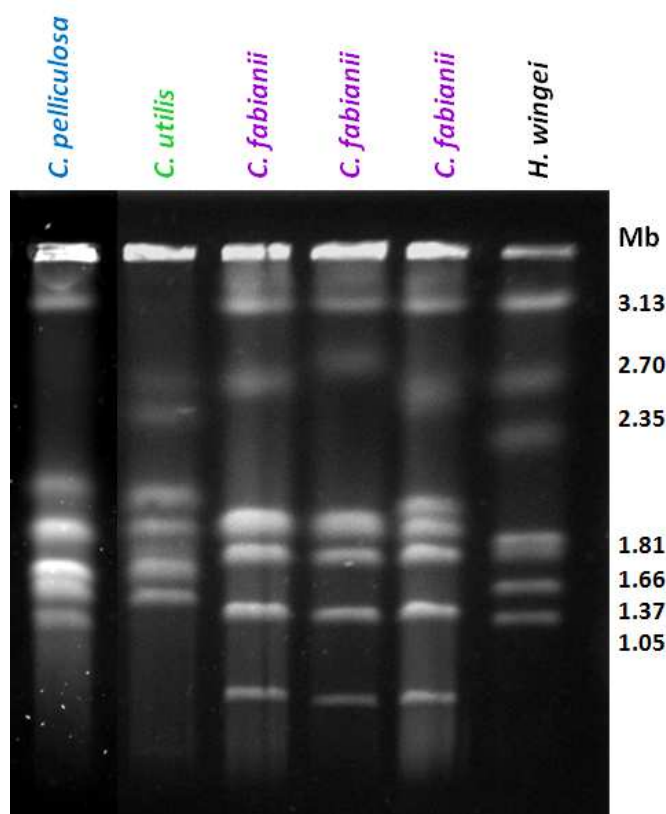
Z grafu vyplývá, že nejvyšší zastoupení rezistentních izolátů bylo zjištěno ve FN Hradec Králové (50 %) následovaly FN u sv. Anny v Brně (39,1 %), Nemocnice České Budějovice (37,5 %), Zdravotní ústav v Ostravě (33,3 %), FN Olomouc (25 %), FN v Motole (23,1 %) a FN Brno (14,3 %). Nejvíce kultur se sníženou citlivostí (citlivý v závislosti na dávce, resp. intermediární) alespoň k jednomu antimykotiku, bylo zachyceno ve FN v Motole, FN Brno a Zdravotním ústavu v Ostravě (všechny po 100 %), následovaly FN Olomouc (96,7 %), FN u sv. Anny v Brně (95,6 %), FN Hradec Králové (87,5 %) a Nemocnice České Budějovice (62,5 %). V některých zdravotnických zařízeních byly mimoto prokázány multirezistentní kmeny. Konkrétně se jednalo o FN Olomouc, kde bylo nalezeno celkem šest kmenů rezistentních ke dvěma antimykotikům (3,9 %), pět ke třem (3,3 %) a tři ke čtyřem (2,0 %), následovala FN u sv. Anny v Brně se dvěma izoláty rezistentními ke dvěma antimykotikům (8,7 %), FN Plzeň s nálezem jedné kvasinky rezistentní ke čtyřem antifungálním léčivům (25 %), FN Hradec Králové s jedním kmenem necitlivým ke třem (12,5 %) a Zdravotní ústav v Ostravě, Nemocnice České Budějovice a Krajská nemocnice Liberec, všechny s jedním izolátem rezistentním ke dvěma přípravkům. Naopak ve FN v Motole, Všeobecné FN v Praze a FN Brno nebyl zaznamenán ani jeden multirezistentní kmen.

Při analýze rezistence *C. fabianii* k jednotlivým antimykotikům bylo dále zjištěno, že k AMB byl největší počet takových izolátů ve FN Olomouc (n=5) a FN Plzeň (n=1), k FCZ ve FN Olomouc (n=3) a Krajské nemocnici Liberec (n=1), k azolům ve FN Olomouc (n=22) a FN u sv. Anny v Brně (n=5) a k echinokandinům, resp. KAS ve FN Olomouc (n=17) a FN u sv. Anny v Brně (n=6).

5.6. Karyotypizace PFGE

Mezidruhová diferenciace. U izolátů *C. fabianii* (n=124) se v nastaveném režimu podařilo separovat pět až osm chromozomů, přičemž nejvíce kultur jich mělo šest. U *C. pelliculosa* (n=5) jich bylo definováno šest, resp. sedm a u *C. utilis* (n=2) sedm a osm. Rozdíly v karyotypech *C. fabianii*, *C. pelliculosa* a *C. utilis*, jsou demonstrovány na obrázku 11.

Obr. 11: Reprezentativní karyotypy *Candida fabianii*, *Candida pelliculosa* a *Candida utilis*

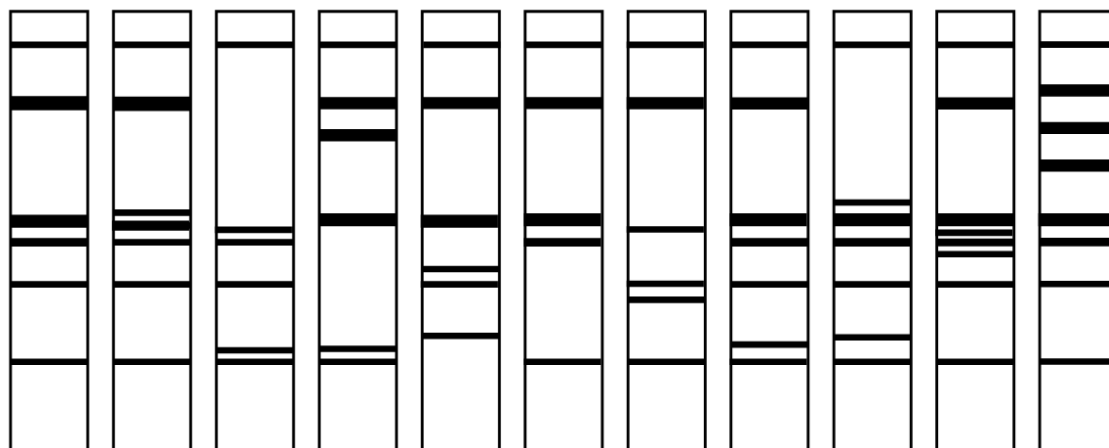


Mb - megabáze

Vnitrodruhová diferenciace. Vzhledem k nízkému počtu izolátů *C. pelliculosa* a *C. utilis* byly typizovány pouze kmeny *C. fabianii*. Vizuelně bylo v testovaném souboru 124 izolátů posledně zmíněného druhu kvasinky nalezeno celkem 23 karyotypů. Nejpočetnější zahrnoval

31 kmenů, další 26, třetí 20, čtvrtý 16, pátý 8 a šestý 3. Další tři karyotypy měly po dvou zástupcích, zbylých 14 po jednom ($D=0,85$). Různorodost v uspořádání a počtu chromozomů je schematicky znázorněna na obrázku 12.

Obr. 12: Příklady karyotypů *Candida fabianii*

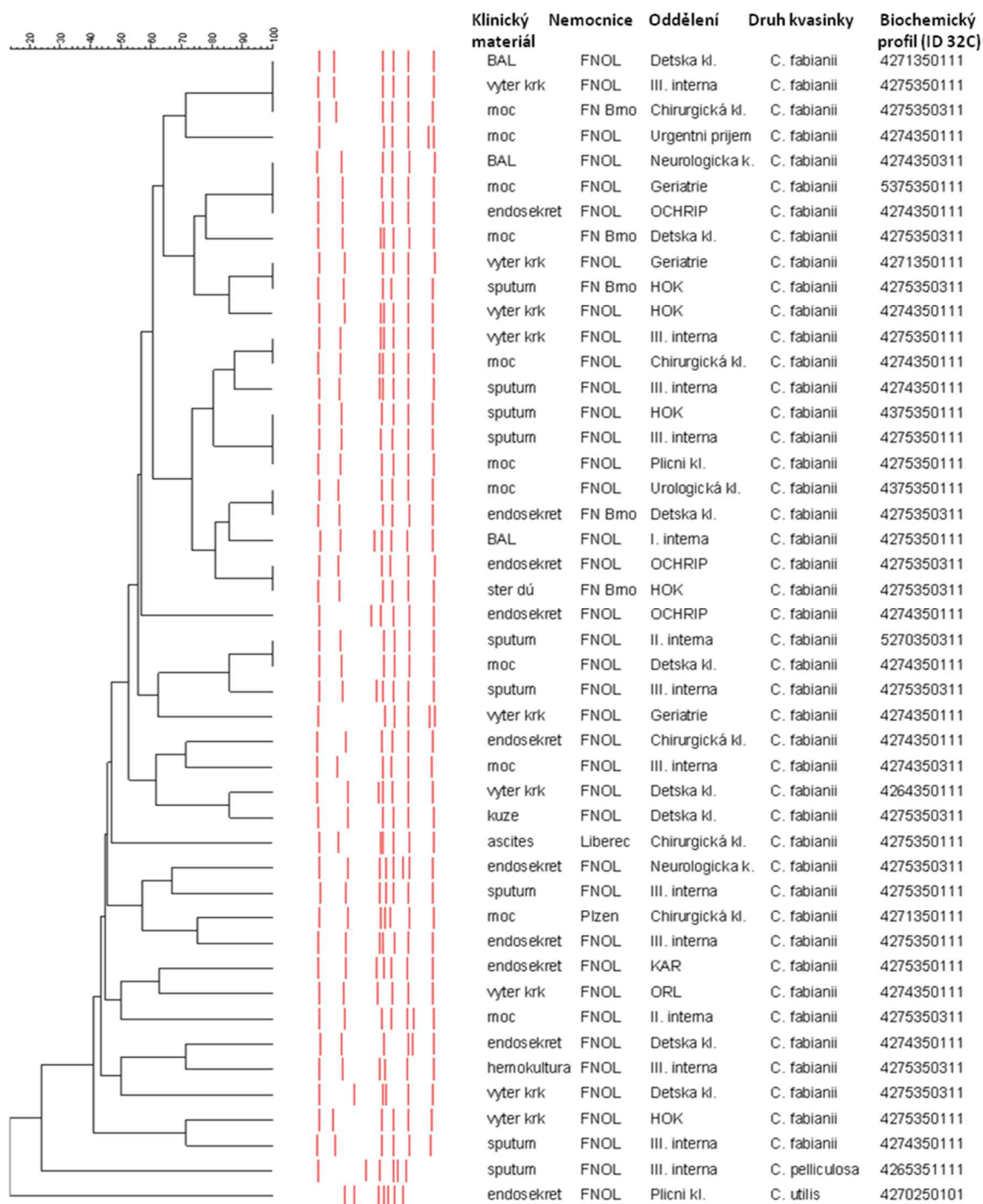


Počítačovou analýzou s využitím S_j bylo rozlišeno celkem 96 neidentických fingerprintů. Tři z nich obsahovaly po třech kmenech, dalších pět po dvou a zbylé byly jedinečné ($D=0,992$). Vzájemná příbuznost vybraných izolátů *C. fabianii* a současně míra jejich odlišnosti od zbylých dvou studovaných druhů kvasinek je graficky vyjádřena na obrázku 13.

Jak je z tohoto dendrogramu patrné, nebyly nalezeny žádné specifické skupiny karyotypů, které by se významně lišily při porovnávání druhů klinických vzorků nebo nemocničních oddělení, kde byly kvasinky zachyceny. Naopak byly nalezeny tři kultury, hodnocené podle S_j jako identické, z nichž dvě byly izolovány na různých klinikách FN Olomouc a jedna ve FN Brno. Rovněž další dvě trojice a pět dvojic izolátů, vyhodnocených programem GelCompar jako totožné, představovaly kmeny, zachycené vždy na jiných odděleních FN Olomouc. Dále bylo zjištěno, že míra příbuznosti karyotypů nemá vliv ani na shodu v biochemické aktivitě kvasinek.

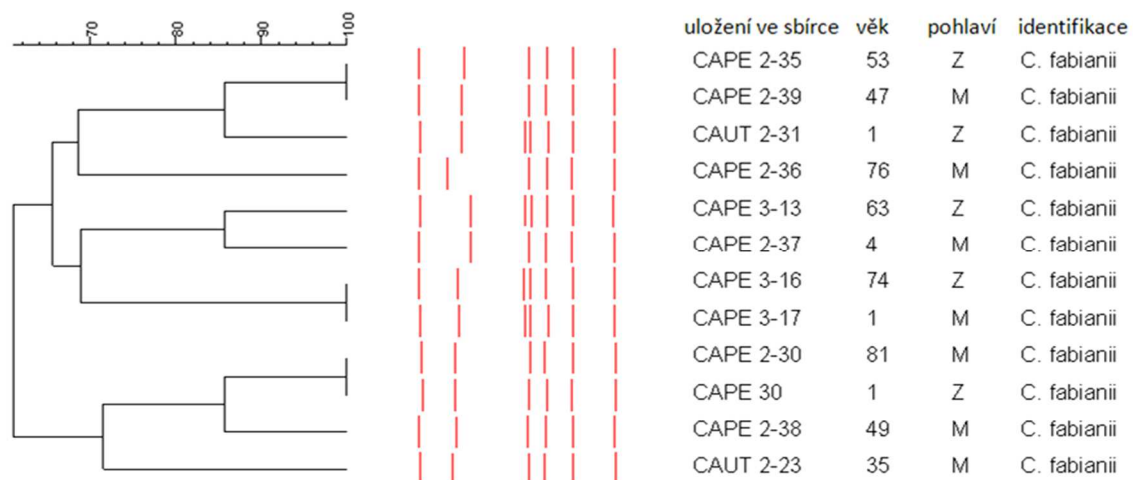
Z dendrogramu na obrázku 14 je dále patrné, že nebyly prokázány ani žádné specifické karyotypy z hlediska pohlaví nebo věku pacientů.

Obr. 13: Demonstrace příbuznosti karyotypů vybraných klinických izolátů kvasinek metodou pulzní gelové elektroforézy



HOK - Hematoonkologická klinika, **KAR** - Klinika anesteziologie a resuscitace, **ORL** - Otorinolaryngologická klinika, **OCHRIP** - Oddělení chronické resuscitační a intenzivní péče

Obr. 14: Reprezentativní dendrogram příbuznosti karyotypů *Candida fabianii* z hlediska pohlaví a věku pacientů



Ž - žena, **M** - muž

6. Diskuze

6.1. Mykotické infekce způsobené *C. fabianii*

C. fabianii je anamorfním stádiem kvasinky, původně nazývané *Hansenula fabianii*. Ta byla v roce 1984 Kurtzmanem přeřazena do rodu *Pichia* (142). O 24 let později byla na základě genetických analýz opět změněna její taxonomická pozice, tentokrát do rodu *Lindnera* (143). Další studium její DNA, provedené Mintnerem, vedlo k jejímu současnému začlenění do rodu *Cyberlindnera* (144). Zmíněná kvasinka byla kromě záchytu z různých lokalit lidského organismu izolována také z půdy, cukrové třtiny, oliv, nálevky brouka *Xylion adustus*, rýžového fermentátu získaného metabolickou činností vláknité houby *Aspergillus oryzae* a zařízení na výrobu butylglykolu za účasti bakterie *Enterobacter aerogenes* (92,145-148).

C. fabianii nebyla a dosud stále není součástí žádné z kvasinkových databází běžně používaných biochemických identifikačních souprav. Uvedená skutečnost je pravděpodobně hlavní příčinou toho, že v dostupných literárních zdrojích je zatím zařazeno pouze 14 případů lidských infekcí vyvolaných tímto druhem, přičemž šest z nich bylo publikováno až v posledních dvou letech. Dá se však předpokládat, že zavedením hmotnostní spektrometrie do běžné diagnostické praxe laboratoří lékařské mikrobiologie se tento počet velmi rychle zvýší. Většina aktuálních databází těchto přístrojů totiž profil *C. fabianii* obsahuje, čímž je umožněna její rychlá a snadná identifikace, aniž by bylo nutné používat technicky a časově náročné genetické metody (149).

Tabulka 19 přehledně sumarizuje všechny dosud zaznamenané případy systémových mykóz, způsobených tímto druhem. První z nich byl popsán v roce 1990 u 57letého muže s diagnózou chronické lymfocytární leukémie, recidivujícími uroinfekcemi a prostatitidou (150). Vyšetření moči prokázalo přítomnost leukocytů a kvasinek. Izolát byl nejprve identifikován soupravou API 20C AUX jako *C. pelliculosa*, avšak další biochemické testy, zahrnující mimo jiné neschopnost asimilace erytritolu, vedly k předpokladu, že se jedná o *C. fabianii*. Uvedená hypotéza byla potvrzena stanovením poměru guaninu a cytozinu v buňce a průkazem askospor kloboukovitého tvaru po párování s komplementárním typem NRRL Y-1873. Mykotickou infekci se podařilo vyléčit pomocí AMB.

Bhally *et al.* publikovali fungémii u předčasně narozené holčičky se syndromem dechové tísně a nekrotizující enterokolitidou (151). Soupravou API 20C AUX se kvasinku zachycenou z hemokultury nepodařilo určit, neboť zjištěný číselný kód nebyl v databázi

nalezen. Kmen byl identifikován sekvencováním na základě vysoké podobnosti s typovým kmenem *C. fabianii*. Pacientka byla úspěšně léčena výměnou centrálního žilního katétru a intravenózní aplikací AMB.

Tab 19: Přehled publikovaných systémových mykóz způsobených *Candida fabianii*

Věk	Pohlaví	Rizikový faktor	Klinická forma	Léčba	Výsledek léčby	Citace
57 let	M	chronická lymfocytární leukémie	močová infekce prostatitida	KET, poté AMB	vyléčen	(150)
5 týdnů	Ž	prematurita, nekrotizující enterokolitida, ATB	kandidémie	AMB	vyléčena	(151)
novorozenec	Ž	prematurita, ATB	kandidémie	AMB a FCZ	zemřela	(152)
46 let	M	ATB, hemodialýza, cholecystektomie	kandidémie	FLA, poté KAS	zemřel	(153)
40 let	M	vrozená srdeční vada, kraniektomie	endokarditida	FLA, následně VOR a poté AMB, chirurgický zákrok	vyléčen	(154)
53 let	Ž	ATB, hemodialýza, chirurgický zákrok,	kandidémie	KAS, poté FLA	vyléčena	(155)
47 let	Ž	neutropenie, ATB, VK	kandidémie	AMB, poté KAS	vyléčena	(156)
novorozenec	Ž	prematurita, umělá plicní ventilace, ATB, VK	kandidémie	FLA	vyléčena	(157)
49 let	Ž	chirurgický zákrok, shunt, intubace	infekce shuntu	AMB a FCZ	vyléčena	(158)
87 let	M	vysoký věk, ATB, umělá plicní ventilace	kandidémie	AND	zemřel	(159)
2 roky	M	ATB, chirurgický zákrok,	kandidémie	KAS	vyléčen	(160)
5 let	M	ATB, shunt, dlouhodobá hospitalizace, VK	močová infekce	KAS	zemřel	(161)
69 let	Ž	neutropenie, radioterapie, chemoterapie, ATB, VK	kandidémie	MIK, poté AMB	zemřela	(162)
3,5 roku	Ž	neutropenie, ATB	kandidémie	FLA, poté AMB	vyléčena	(163)
2 měsíce	M	hydronefróza, ATB, chirurgický zákrok	močová infekce	FLA	vyléčen	(163)
novorozenec	Ž	chirurgický zákrok, umělá plicní ventilace, ATB, parenterální výživa	močová infekce	FLA	vyléčena	(163)
novorozenec	M	hydronefróza, ATB, chirurgický zákrok, parenterální výživa	močová infekce	FLA, poté KAS	vyléčen	(163)
novorozenec	Ž	chirurgický zákrok, parenterální výživa, ATB	kandidémie	FLA	vyléčena	(163)
novorozenec	Ž	umělá plicní ventilace, ATB, prematurita, parenterální výživa	kandidémie	FLA, poté KAS	vyléčena	(163)

M - muž, **Ž** - žena, **ATB** - léčba antibiotiky, **VK** - venózní katétr, **AMB** - amfotericin B, **FCZ** - flucytozin, **FLA** - flukonazol, **KET** - ketokonazol, **VOR** - vorikonazol, **KAS** - kaspofungin, **AND** - anidulafungin, **MIK** - mikafungin

Další případ fungémie u nedonošeného novorozence publikovali Grenouillet *et al.* (152). Predisponujícími faktory byla nízká porodní hmotnost a terapie širokospektrými antibiotiky. Přes intenzivní léčbu kombinací lipozomálního AMB a FCZ však dítě zemřelo.

Valenza *et al.* popsali letální septikémii u 46letého muže přijatého do nemocnice se zánětem plic vyvolaným *Streptococcus pneumoniae* (153). Z hemokultury odebrané 30. den hospitalizace byly izolovány kvasinky, které byly soupravou ID 32C nejednoznačně určeny jako *C. utilis*. Protichůdný výsledek byl zaznamenán v jamkách obsahujících trehalózu, sorbózu a D-glukonát. Druhou nabízenou možností byla *C. pelliculosa* s neadekvátními výsledky asimilace trehalózy, methyl-D-glukosidu a erytritolu. Diagnostickým systémem VITEK 2 YST byl izolát identifikován jako *C. utilis* s pravděpodobností (P) 93,3 %. Sekvencováním však byla zjištěna >99% shoda s typovým kmenem *C. fabianii*. Pomocí soupravy YeastOne byla prokázána citlivost kmene k AMB, FLA, ITR, VOR a FCZ. Pacient byl proto nejprve léčen FLA, později byla terapie změněna na KAS. Po dvou měsících však muž zemřel na multiorgánové selhání.

První případ endokarditidy způsobené uvedeným kvasinkovým druhem publikovali Hamal *et al.* (154). Jednalo se o 40letého muže s vrozenou vadou mitrální chlopně. Do nemocnice byl přijat kvůli mozkové příhodě s levostrannou paralýzou končetin a parézou *n. facialis*. Jelikož došlo ke vzniku mozkového edému, byla provedena dekompresní kraniektomie. V dalším průběhu hospitalizace došlo k rozvoji sepse s opakovaným záchytem kvasinek v hemokultuře. Izoláty byly charakterizovány morfologicky na chromogenní půdě CHROMagar Candida, kde vyrůstaly v podobě světle růžových kolonií. Biochemická aktivita byla posuzována soupravou ID 32C, přičemž byl získán číselný profil 4275350111, vyhodnocený programem *apiweb* jako *C. pelliculosa* (P=57,3 %), resp. *C. utilis* (P=42,6 %). Poté bylo provedeno sekvencování ITS2 genu pro rRNA, na jehož podkladě byla zjištěna 100% homologie s typovým kmenem *C. fabianii*, přičemž shoda s *C. pelliculosa* byla pouze 56 %. Citlivost k šesti systémovým antimykotikům byla testována pomocí diagnostických proužků E-test na agaru s RPMI-1640. Všechny izoláty byly na počátku citlivé k AMB, FLA, KET, ITR, VOR a KAS. Pacient byl nejdříve léčen FLA, později VOR, což vedlo k postupnému rozvoji rezistence k oběma antimykotikům, potvrzené *in vitro* 48. den terapie FLA, resp. 21. den VOR. Endokarditida byla nakonec vyléčena AMB.

Gabriel *et al.* zaznamenali další případ infekce *C. fabianii* u 53leté pacientky, hospitalizované v důsledku mesenterické ischemie a akutního renálního selhání (155). Druhý

den musela podstoupit resekci nekrotické části střeva. Po jejím napojení na kontinuální hemodialýzu byla zahájena empirická terapie širokospektrými antibiotiky. Osmý den hospitalizace byly z orofaryngeálního výtěru izolovány kvasinky. Druhovú identifikace byla provedena biochemickou soupravou ID 32C, pomocí níž byl izolát určen jako *C. pelliculosa* (P=57,3 %) s numerickým kódem 4275350111, druhou možností byla *C. utilis* (P=42,6 %). Jelikož postupně došlo k záchytu kvasinek se stejným biochemickým profilem také ve stolici, moči a krvi, byla zahájena terapie KAS, následovaná podáváním FLA. U všech těchto kultur bylo v rámci identifikace provedeno sekvencování. Porovnání s databází BLAST ukázalo 99% shodu s typovým kmenem *C. fabianii*. Diagnostickými proužky E-test byla prokázána citlivost k AMB, FCZ, FLA, VOR a KAS.

Ve třech posledně zmíněných kazuistikách byly kultury *C. fabianii* popisovány na chromogenní půdě jako světle růžové kolonie, což odpovídá i námi zjištěné morfologii. Přestože byly mezi *C. fabianii*, *C. pelliculosa* a *C. utilis* nalezeny na agaru COLOREX Candida určité rozdíly v barevném odstínu, nejsou dostačující k tomu, aby bylo možné na jejich základě provádět předběžnou vzájemnou druhovou diferenciaci, jako je tomu v případě *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. glabrata* a *C. krusei*. Navíc mohou být takto zbarveny i jiné druhy kandid, např. *C. kefyr*, *C. lusitaniae* nebo *C. guilliermondii*.

Ve všech výše uvedených případech byla identifikace provedena biochemickými soupravami API 20C AUX a ID 32C. Pomocí první z nich nebyly kvasinky určeny vůbec nebo identifikovány nesprávně jako *C. pelliculosa*. Při použití ID 32C se v databázi *apiweb* s nejvyšší pravděpodobností objevovala *C. pelliculosa* nebo *C. utilis*. Autory opakovaně udávaný profil 4275350111 byl i v naší studii nejčastější, zaznamenaný u 59 izolátů. Společným znakem svědčícím proti *C. pelliculosa* byla neschopnost asimilace erytritolu. V době, kdy byly všechny výše zmíněné případy publikovány, ještě nebyla v laboratořích lékařské mikrobiologie k dispozici hmotnostní spektrometrie, proto musela být identifikace *C. fabianii* potvrzena sekvencováním.

Kazuistiku kandidémie s etiologickou rolí *C. fabianii* popsali Yun *et al.* u 47leté ženy s neutropenií, hospitalizované na JIP v souvislosti s respiračním selháním (156). Identifikace izolátu zachyceného z hemokultury byla provedena soupravou VITEK 2 YST, pomocí níž byl kmen určen jako *C. utilis* (P=93,3 %). Citlivost k antifungálním přípravkům byla testována bujónovou mikrodiluční metodou podle dokumentu CLSI M27-A3, přičemž MIC testovaných antimykotik byly následující: AMB 0,5 µg/ml; VOR 0,03 µg/ml; FLA 2,0 µg/ml; KAS

0,125 µg/ml a MIK 0,125 µg/ml. Selhání iniciální terapie AMB bylo podnětem k provedení molekulární identifikace etiologického agens. Sekvencováním oblastí ITS genu pro rRNA byla zjištěna 100% homologie s typovým kmenem *C. fabianii*. Kandidémie byla nakonec úspěšně vyléčena podáním KAS.

Wu *et al.* publikovali případ kandidémie u novorozence s nízkou porodní hmotností (157). Byl umístěn na JIP, kde mu byla zavedena umělá plicní ventilace a nitrožilní výživa. Po několika dnech se objevily febrilie, jež byly podnětem k mikrobiologickému vyšetření krve. Hemokultivací byly prokázány kvasinky, určené pomocí API 20C AUX jako *C. pelliculosa*. MIC antimykotik byly stanoveny soupravou ATB FUNGUS 3 (bioMérieux), přičemž byla zjištěna citlivost *in vitro* k AMB, FLA, ITR, VOR a FCZ. Léčba byla zahájena FLA. V kontrolní hemokultuře odebrané po deseti dnech této terapie již nebyly kvasinky prokázány. Sekvencováním izolátu byla údajně zjištěna vysoká podobnost s typovým kmenem *C. fabianii*.

Baghdadi *et al.* zaznamenali kvasinkovou infekci u 49leté ženy spojenou s akutním neurochirurgickým zákrokem v souvislosti s revizí zavedeného ventrikuloperitoneálního shuntu (158). V peroperačně odebraném likvoru byly mikroskopickým vyšetřením nalezeny kvasinkové buňky, proto byla pacientka empiricky léčena lipozomálním AMB v kombinaci s FCZ. Kultivačně byly zjištěny dvě morfologicky odlišné formy kvasinkových kolonií, které však byly pomocí hmotnostního spektrometru VITEK MS (bioMérieux) určeny shodně jako *Candida boidinii*. Soupravou API 20C AUX se identifikaci nepodařilo potvrdit, jelikož zjištěný číselný kód nebyl v databázi nalezen. Sekvenční analýzou byla kvasinka nakonec určena jako *C. fabianii*. Citlivost k antimykotikům byla testována podle dokumentu CLSI s následujícími výsledky: AMB 2,0 µg/ml; FCZ <0,120 µg/ml a FLA 2,0 µg/ml. Pacientka byla vyléčena zmíněnou kombinací antifungálních látek společně s výměnou větší části shuntu.

Lee *et al.* popsali kandidémii u 87letého pacienta, hospitalizovaného na JIP s pneumonií vyvolanou multirezistentním kmenem *Acinetobacter baumannii* a subakutním mozkovým infarktem (159). Muž byl napojen na umělou plicní ventilaci a současně léčen širokospektrými antibiotiky. Přesto došlo k vzestupu teploty, a proto byly odebrány hemokultury. V nich byly nalezeny kvasinky, určené soupravou VITEK 2 YST jako *C. utilis* (P=93 %). Sekvencováním však byla zjištěna 99,8% podobnost s typovým kmenem *C. fabianii*. Citlivost k antimykotikům byla testována pomocí soupravy VITEK 2 AST (bioMérieux). Kmen byl citlivý k AMB, FCZ, FLA, VOR, KAS, AND a MIK. Pacientovi byl odstraněn žilní katétr

a podán AND, což sice vedlo k vyléčení kvasinkové infekce, nicméně po několika dnech došlo k úmrtí v důsledku ventilátorové pneumonie způsobené *A. baumannii* s následným multiorgánovým selháním.

Případ hematogenní infekce u imunokompetentního dvouletého chlapce byl publikován Gonzálezem *et al.* (160). Pacient byl hospitalizován se zánětem dýchacích cest a podezřením na ileus. Byla mu nasazena širokospektrá antibiotika a proveden chirurgický zákrok v oblasti břišní dutiny. Poté se u něj objevily klinické příznaky sepse. V odebrané hemokultuře byly nalezeny kvasinky, určené pomocí hmotnostního spektrometru Microflex LT jako *C. fabianii*. Terapie KAS vedla ke zlepšení klinického stavu pacienta.

Jindal *et al.* zaznamenali uroinfekci u pětiletého chlapce přijatého na pohotovost s horečkami (161). Mikroskopické vyšetření moči prokázalo přítomnost vysokého počtu leukocytů a kvasinkových buněk, proto byla zahájena terapie AMB. Druhá identifikace zachyceného izolátu, společně s testováním citlivosti k antimykotikům byla provedena pomocí systému VITEK 2 Compact (bioMérieux). Kmen určený jako *C. utilis* (P=97 %) byl citlivý k FLA, VOR, KAS a FCZ, ale rezistentní k AMB. Pacientův stav se rychle horšil a druhý den hospitalizace zemřel. Kultura byla poté sekvencována, přičemž byla zjištěna 100 % homologie s typovým kmenem *C. fabianii*.

Další kazuistiku infekce *C. fabianii* s fatálním koncem popsali Katagiri *et al.* (162). Jednalo se o 69letou ženu s akutní leukémií, u níž se rozvinulo akutní respirační selhání, vyžadující hospitalizaci na JIP. Přestože byl pacientce profylakticky podáván MIK, v hemokulturách byly zachyceny kvasinky. Vyšetření na panfungální antigen β -D-glukan bylo pozitivní. Proto byla zahájena empirická léčba lipozomálním AMB, avšak přes veškerou péči pacientka zemřela na multiorgánové selhání. Získaný kmen kvasinky byl identifikován sekvencováním, které odhalilo 99,6% podobnost s typovým kmenem *C. fabianii*. Citlivost k antimykotikům byla testována podle dokumentu CLSI M27-A3, přičemž MIC testovaných antimykotik byly následující: AMB 1,0 $\mu\text{g/ml}$; FCZ 0,25 $\mu\text{g/ml}$; FLA 4,0 $\mu\text{g/ml}$; ITR 0,5 $\mu\text{g/ml}$; VOR 0,06 $\mu\text{g/ml}$ a MIK 1,0 $\mu\text{g/ml}$.

Poslední publikace nalezená v rámci literární rešerše dokumentuje celkem šest případů onemocnění *C. fabianii*, zaznamenaných během pěti let na dětské JIP v chorvatském Záhřebu (163). Základní klinické údaje včetně způsobu a výsledků léčby jsou shrnuty v tabulce 19. Všechny zachycené kvasinkové izoláty (n=44) byly pomocí ID 32C určeny shodně jako *C. utilis*. Za účelem potvrzení výsledku biochemické identifikace byly vybrány

izoláty sekvencovány, avšak touto metodou bylo prokázáno, že se jedná o *C. fabianii*. MIC antimykotik byly stanoveny soupravou ATB FUNGUS 3, přičemž byla zjištěna citlivost všech testovaných kultur k AMB, FCZ, FLA, ITR a VOR.

Ve výše zmíněných kazuistikách byly zjištěny celkem tři kmeny *C. fabianii* rezistentní k AMB a jeden k FLA a VOR. V našem souboru bylo nalezeno celkem šest izolátů tohoto druhu rezistentních *in vitro* k AMB a dalších 11 necitlivých ke dvěma, třem nebo čtyřem azolovým antimykotikům. Z hlediska významu přesné identifikace a strategie empirické léčby infekcí způsobených *C. fabianii* je důležité zjištění poměrně vysokého podílu rezistentních kmenů (29,3 %), z toho byla navíc téměř třetina necitlivá ke dvěma a více antifungálním preparátům. Uvedená skutečnost jen dokládá nutnost používání exaktní, spolehlivé a rychlé metody pro druhové určování kvasinek v laboratořích lékařské mykologie.

Na základě získaných hodnot MIC bylo prokázáno, že existují signifikantní rozdíly v citlivosti izolátů k systémovým antimykotikům v závislosti na věku nemocných a výskytu v určitých tělních lokalitách. Vyšší MIC izolátů získaných z hemokultur a venózních katétrů bývají pravděpodobně odrazem těžkého celkového zdravotního stavu pacientů a s tím související dlouhodobé hospitalizace včetně prolongované léčby antifungálními preparáty. Během pobytu ve zdravotnickém zařízení může dojít ke kolonizaci rezistentními kmeny z nemocničního prostředí nebo vývoji rezistence u dříve citlivých kmenů v průběhu léčby. Relativně vysoká míra mortality pacientů, dokumentovaná v prezentovaných kazuistikách, však nemusela nutně být důsledkem selhání antimykotické terapie. K úmrtí mohlo totiž dojít v souvislosti se základním onemocněním, neboť v řadě případů se jednalo o těžce nemocné pacienty. Poměrně široké rozpětí průměrných hodnot MIC u izolátů *C. fabianii*, získaných z jednotlivých zdravotnických zařízení, mohlo být způsobeno různým spektrem hospitalizovaných osob s větším či menším rizikem vzniku mykotických infekcí.

Největší část našeho souboru kvasinek tvořily kmeny „pouze“ kolonizující sliznice a kůži, které nebylo třeba eradikovat antimykotiky. Mohlo by se tedy zdát, že význam sledování citlivosti k antifungálním přípravkům je v takové skupině izolátů poněkud problematický. K tomu je však nutno podotknout, že i počet kmenů získaných z primárně sterilních lokalit, kam by při správné technice odběru měly být kromě hemokultur, venózních katétrů, sekretů z drénů a punktátů zařazeny i moč, bronchoalveolární laváž a výtěry z operačních ran, byl poměrně rozsáhlý. Navíc se mohou kmeny, osídlující sliznice nebo kůži u disponovaných, tedy zejména těžce imunokompromitovaných pacientů, rychle stát

invazivními. Dále jsou potenciálními původci povrchových mykóz, které svými projevy nemocné často značně obtěžují, a proto je v takových případech rovněž nutný cílený léčebný zásah.

Při globálním pohledu na incidenci kandidových infekcí po stránce jejich distribuce mezi oběma pohlavími je možné konstatovat, že se výsledky naší studie v zásadě shodují s údaji v literatuře. V naprosté většině publikovaných epidemiologických studií (např. 164-169) byli totiž postiženi častěji muži, od nichž i v našem souboru pocházel větší počet izolátů. Důvodem by mohla být jejich častější hospitalizace na JIP. Na druhé straně ve výše uvedených kazuistikách mírně převažovaly ženy.

6.2. Mykotické infekce způsobené *C. pelliculosa*

Současná taxonomická pozice *C. pelliculosa* je v rodu *Wickerhamomyces*, jako anamorfní stádium druhu *W. anomalus* (92). Po průkazu teleomorfy byla nejprve zařazena do rodu *Hansenula*, později byla označována jako *Pichia anomala*. Vyskytuje se ubikvitně, byla izolována z půdy, vzduchu, vody, ovoce, exudátů stromů i zvířecího materiálu. V lidském organismu byla prokázána jako součást normální či přechodné mikroflóry kůže, ústní dutiny a gastrointestinálního traktu (170).

První zmínka o její možné etiologické roli při vzniku závažných infekcí se objevila v roce 1958, kdy ji Wang a Schwarz izolovali z klinického materiálu od dětí s intersticiální pneumonií (171). Teleomorfu, tehdy nazývanou *H. anomala*, identifikovali na základě mikroskopického nálezu kloboukovitých askospor a průkazu asimilace a fermentace některých sacharidů. Od té doby lze v literárních databázích nalézt více než 40 publikací, popisujících infekce tímto druhem kvasinky. Jejich přehled včetně základních informací je uveden v tabulce 20.

Z hlediska obecné charakteristiky popisovaných případů je zajímavé, že na rozdíl od *C. fabianii* se často jednalo o postižení více pacientů současně, někdy až o miniepidemie.

Thuler *et al.* sledovali fungémie způsobené *C. pelliculosa* v nemocnici pro onkologické pacienty v Rio de Janeiru v letech 1994-1996, přičemž zmíněnou etiologii zjistili u 24 nemocných. Naprostá většina z nich byla hospitalizována na hematologickém oddělení. Identifikace izolátů byla provedena na základě morfologických znaků a biochemicky soupravou Rapid Yeast Identification (Dade MicroScan, USA). Přestože autoři vyhodnotili uvedené infekce jako miniepidemii, neprovedli k potvrzení této skutečnosti žádnou typizační analýzu, navíc přes veškerou snahu neobjevili žádný zdroj infekce.

Tab. 20: Přehled publikovaných kazuistik s etiologickou rolí *Candida pelliculosa*

Věk	Počet pacientů	Forma infekce	Terapie	Výsledek	Způsob identifikace	Citace
novorozenci	8	kandidémie ventrikulitida	AMB, FCZ	vyléčení	morfologie biochemie (auxanogram, zymogram)	(172)
n.d.	1	kandidémie	n.d.	n.d.	n.d.	(173)
40 let	1	endokarditida	n.d.	n.d.	biochemie (API 20C AUX)	(174)
n.d.	2	kandidémie	AMB	vyléčení	n.d.	(175)
n.d.	1	kandidémie	AMB	vyléčen	n.d.	(176)
32 let	1	uroinfekce	neléčena	vyléčen	morfologie biochemie (auxanogram)	(177)
51 let	1	kandidémie	n.d.	n.d.	n.d.	(178)
n.d.	1	kandidémie	n.d.	n.d.	n.d.	(179)
n.d.	2	kandidémie	AMB	vyléčení	n.d.	(180)
n.d.	1	kandidémie	n.d.	n.d.	biochemie (API 20C AUX)	(181)
n.d.	1	kandidémie	n.d.	n.d.	n.d.	(182)
6 měsíců	1	kandidémie	AMB, FCZ	vyléčena	n.d.	(183)
63 let	1	kandidémie	FLA	vyléčen	morfologie biochemie (API 20C AUX)	(184)
n.d.	1	kandidémie	n.d.	n.d.	n.d.	(185)
22 let	1	kandidémie	AMB, FLA	vyléčen	n.d.	(186)
n.d.	4	kandidémie	FLA	n.d.	n.d.	(187)
61 let	1	kandidémie	FLA	n.d.	n.d.	(188)
n.d.	1	kandidémie	AMB	vyléčena	n.d.	(189)
2-76 let	24	kandidémie	AMB	vyléčení	morfologie biochemie (souprava RYI)	(190)
n.d.	1	kandidémie	AMB, KET	vyléčen	n.d.	(191)
novorozenec	1	kandidémie	FLA, AMB	vyléčen	n.d.	(192)
medián 3,2 let	379	kandidémie	FLA, AMB (ITR)	42,4% mortalita	morfologie	(193)
n.d.	4	kandidémie	n.d.	n.d.	n.d.	(194)
dospělí	8	kandidémie	n.d.	n.d.	n.d.	(195)
novorozenec	1	kandidémie	FLA, AMB	n.d.	n.d.	(196)
32 let	1	pneumonie	AMB	vyléčen	n.d.	(197)
4 dospělí 1 novorozenec	5	kandidémie	AMB	3 vyléčení 2 zemřeli	biochemie (ID 32C)	(198)
4 děti 1 novorozenec	5	kandidémie	AMB	4 vyléčení	biochemie (ID 32C)	(199)
medián 1,1 roku	17	kandidémie	AMB	41,2% mortalita	biochemie (ID 32C)	(200)
novorozenci	2	kandidémie	FLA, AMB, (FCZ)	zemřeli	morfologie biochemie (VITEK 2 YST)	(201)
50 let	1	keratitida	AMB, ITR	vyléčen	morfologie biochemie (VITEK 2 YST)	(202)
novorozenci	4	kandidémie	AMB, FLA	vyléčení	morfologie biochemie (ID 32C) sekvencování	(203)
1 dítě 1 dospělý	2	kandidémie	AMB, FLA	1 vyléčen 1 zemřel	morfologie biochemie (ID 32C)	(204)
35 let	1	meningitida	FLA, AMB, FCZ	zemřel	biochemie (API 20C AUX)	(205)
21 let	1	kandidémie	FLA	vyléčen	biochemie (VITEK 2 YST) hmotnostní spektrometrie (VITEK)	(206)
novorozenci	6	kandidémie	AMB (FLA)	5 vyléčeno 1 zemřel	biochemie (ID 32C)	(207)
novorozenci	5	kandidémie	FLA (AMB)	vyléčení	morfologie biochemie (auxanogram, zymogram)	(208)
novorozenci	17	kandidémie	AMB (FLA)	vyléčení	biochemie (VITEK 2 YST)	(209)
78 let	1	artritida	FLA (AMB)	vyléčen	biochemie (VITEK 2 YST)	(210)
57 let	1	endoftalmitida	AMB	vyléčen	n.d.	(211)
8 měsíců	1	kandidémie	FLA	vyléčen	n.d.	(212)
91 let	1	keratitida	MIK	vyléčena	morfologie sekvencování	(213)

AMB - amfotericin B, FCZ - flucytozin, FLA - flukonazol, ITR - itrakonazol, KET - ketokonazol, MIK - mikafungin, n.d. - údaj není k dispozici

Chakrabarti *et al.* popsali velký soubor případů hematogenních infekcí způsobených *C. pelliculosa* v dětské části velké Nehróovy nemocnice v severní Indii (192). Během 23 měsíců byl zmíněný druh kandidy izolován z krve 379 hospitalizovaných dětí a na celkovém počtu fungemií ve sledovaném období se podílel téměř 40 %. Zachycené kultury byly určeny pomocí asimilace sacharidů a na základě morfologie askospor. U 40 izolátů byla dále provedena genetická typizace multilokusovou enzymovou elektroforézou, která prokázala jejich naprostou identitu. Infekce se pravděpodobně rozšířila z ambulance na další oddělení prostřednictvím rukou ošetřujícího personálu.

Bakir *et al.* zaznamenali výskyt katéetrových fungemií vyvolaných *C. pelliculosa* u pěti pacientů dětského oddělení nemocnice v Istanbulu (199). Identifikace izolátů byla provedena soupravou ID 32C a potvrzena průkazem askospor. Vzhledem k tomu, že dvojice a trojice těchto nemocných zde byla hospitalizována ve stejnou dobu, naznačují autoři možnost nozokomiálního přenosu, avšak příslušná epidemiologická šetření ani typizace kmenů nebyly provedeny.

Pasqualotto *et al.* popsali soubor případů hematogenních infekcí způsobených *C. pelliculosa* na pediatrické JIP v brazilské nemocnici od října 2002 do ledna 2004 (200). V uvedeném období byla zmíněná kvasinka izolována z krve 17 dětí, přičemž celková mortalita pacientů činila 41,2 %. Kultury byly identifikovány na základě mikromorfologických znaků včetně hodnocení askospor a biochemicky pomocí soupravy ID 32C. Genetickou analýzou pomocí RAPD bylo zjištěno, že se vždy jednalo o identický kmen, všechny případy kandidémie by tak bylo možné považovat za miniepidemii. Kontrolní odběry vzorků z prostředí a rukou ošetřujícího personálu však neprokázaly zdroj infekce ani způsob jejího přenosu.

Kalkancı *et al.* zaznamenali čtyři případy infekcí krevního oběhu vyvolané *C. pelliculosa* na novorozenecké JIP univerzitní nemocnice v Turecku (203). Identifikace se opírala o mikroskopické znaky a biochemické testy obsažené v soupravě ID 32C. Podobně jako v předchozí kazuistice byla k typizaci použita RAPD, přičemž byla prokázána naprostá shoda fingerprintů. U této miniepidemie pravděpodobně došlo k horizontálnímu přenosu infekce, jelikož se všichni čtyři pacienti v době zachytu etiologického agens nacházeli na stejném pokoji a doby jejich hospitalizace se překrývaly. Ani důkladným vyšetřením zdravotnického personálu a prostředí však nebyl zdroj infekce nalezen.

V našem souboru nebylo racionální studovat izoláty *C. pelliculosa* z hlediska molekulární epidemiologie kvůli jejich malému počtu a záchytu z různých tělních i geografických lokalit. Při hodnocení kultur *C. fabianii* pomocí PFGE se významnější genetická příbuznost mezi testovanými kmeny neprokázala, většina z nich měla vlastní specifický karyotyp.

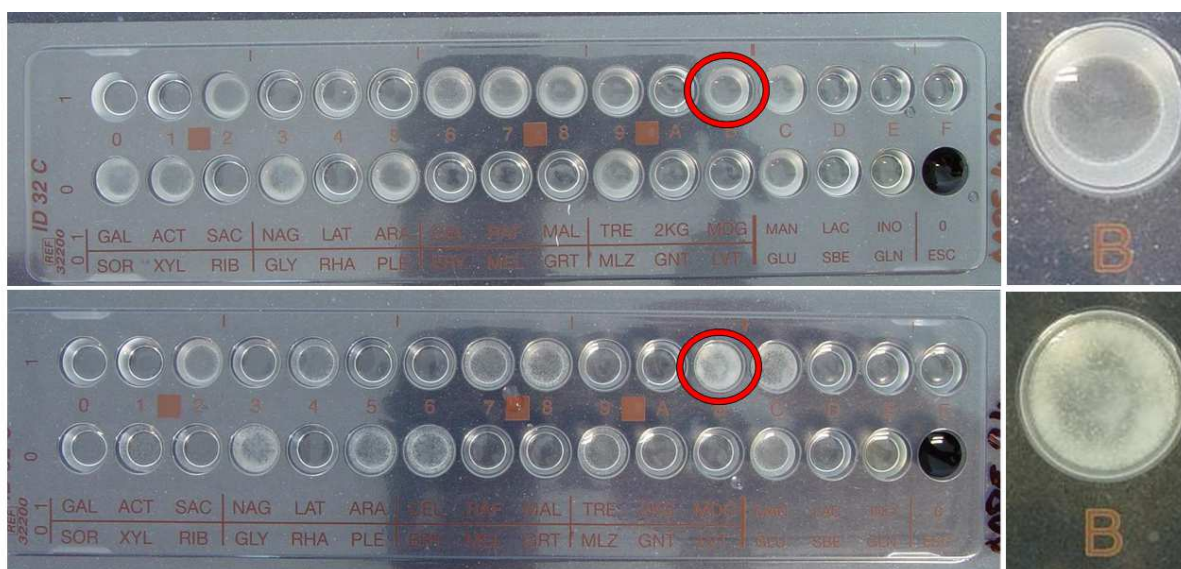
Jak vyplývá z předchozího textu i údajů v tabulce 20, určování *C. pelliculosa* v prezentovaných studiích se kromě více či méně specifikovaných morfologických znaků nejčastěji opíralo o výsledky biochemických testů. Uvedený fakt spolu se skutečností, že *C. fabianii* byla dlouho považována za medicínsky nepříliš významnou a zřejmě proto chyběla v databázích nejpoužívanějších diagnostických souprav tohoto typu, vede k domněnce, že alespoň některé případy byly *C. pelliculosa* připisovány omylem. Zmíněný předpoklad podpořily i výsledky prezentované v této práci, které vypovídají o mnohem vyšší frekvenci výskytu *C. fabianii* v porovnání s *C. pelliculosa*.

Nejspolehlivější způsob druhové identifikace kvasinek představuje v současné době MALDI-TOF MS. Ze tří námi testovaných druhů se touto metodou jeví jako nejkomplikovanější spolehlivé určování *C. pelliculosa*, u níž musel být v mnoha případech celý postup měření vícekrát zopakován, aby bylo dosaženo přijatelného skóre ($\geq 2,000$). V případě *C. fabianii* muselo být při zahájení studie její hmotnostní spektrum aktivně vloženo do databáze přístroje měřením typového kmene, jelikož v ní tehdy ještě nebylo zahrnuto. Následnou identifikací klinických izolátů *C. fabianii* ale bylo dosaženo v průměru vyššího skóre než u *C. pelliculosa* a *C. utilis*, což dokládá využitelnost hmotnostního spektrometru ke spolehlivé identifikaci uvedeného druhu v rutinní praxi mykologických laboratoří.

Při hodnocení biochemických vlastností soupravou ID 32C byl u 20 izolátů studovaného souboru identifikovaných jako *C. pelliculosa* pozorován nápadně intenzivní růst v jamce obsahující MDG. Všechny tyto kmeny byly určeny s pravděpodobností 99,9 %, zatímco kultury, u nichž byl růst v jamce s tímto substrátem méně výrazný, byly označeny jako *C. pelliculosa* s pravděpodobností spadající do rozmezí 54,2-99,7 %. Zajímavým zjištěním bylo, že kvasinky z prvně zmíněné skupiny byly ve všech případech identifikovány hmotnostním spektrometrem jako *C. pelliculosa*, kdežto izoláty s méně nápadným růstem v jamce s MDG byly stejnou metodou označeny jako *C. fabianii*. Rozdíl v charakteru růstu v jamce obsahující zmíněný substrát je demonstrován na obrázku 15.

Pokud by zjištěná skutečnost platila obecně, daly by se tímto způsobem definovat numerické profily, specifické pro druh *C. fabianii* i *C. pelliculosa*. Jejich přehled je demonstrován v tabulce 21. Vzhledem k tomu, že výsledky identifikace hmotnostním spektrometrem byly v některých případech ověřeny i sekvencováním, dá se předpokládat, že zejména tři nejčastější biochemické profily (4274350111, 4275350111 a 4275350311) patří skutečně *C. fabianii*.

Obr. 15: Charakter zákalu v jamce s methyl-D-glukopyranosidem u *Candida pelliculosa* s pravděpodobností identifikace 54,2-99,7 % (nahore), resp. 99,9 % (dole)



6.3. Mykotické infekce způsobené *C. utilis*

Teleomorfou uvedeného druhu je v současné době *Cyberlindnera jadinii* (142). Dříve byla taxonomicky řazena do rodů *Hansenula*, později *Pichia*. Fragner uvádí, že se tento druh, tehdy ještě známý pod anamorfním označením *Torula utilis*, využíval k výrobě nutriční moučky pro doplnění stravy obyvatelstva v tropech a u nás k obohacení krmiv hospodářských zvířat (96). Kromě toho byla zmíněná kvasinka zachycena na rostlinách a prokázána v trávicím ústrojí krav. Při pokusech prováděných na imunosuprimovaných myších vykazovala pouze nízkou virulenci (214). U lidí může příležitostně kolonizovat kůži, sliznice a zažívací trakt (215). Vznik závažných systémových onemocnění je vzácný, v literárních zdrojích bylo dosud publikováno pouze 6 případů infekcí způsobených *C. utilis*.

První z nich publikovali Alsina *et al.* v roce 1988 (216). Jednalo se o kandidémii u pětiletého hemofilika s AIDS. K eliminaci infekce vedla výměna venózního katétru spolu s léčbou AMB. Izolovaná kvasinka byla identifikována zhodnocením mikromorfologických

znaků na kukuřičném agaru a posouzením biochemických vlastností soupravou API 20C AUX. Jelikož však nebyl výsledný numerický kód v databázi nalezen, byl izolát určen pomocí RFLP. Na základě této studie byl uvedený druh zařazen mezi agens schopné vyvolat infekce u lidí.

Tab. 21: Přehled numerických profilů *Candida fabianii* a *Candida pelliculosa* získaných soupravou ID 32C

MALDI-TOF identifikace	ID 32C numerický profil	ID 32C identifikace	ID 32C pravděpodobnost (%)	Počet izolátů
<i>Candida fabianii</i>	4274350111	<i>Candida pelliculosa</i>	71,5	59
	4275350111	<i>Candida pelliculosa</i>	57,3	59
	4275350311	<i>Candida utilis</i>	90,1	45
	4274350311	<i>Candida utilis</i>	77,9	11
	4271350111	<i>Candida utilis</i>	91,4	7
	4375350111	<i>Candida pelliculosa</i>	56,8	5
	5274350111	<i>Candida pelliculosa</i>	98,5	5
	4270350111	<i>Candida utilis</i>	62,1	4
	4275350711	<i>Candida utilis</i>	90,1	4
	5275350311	<i>Candida pelliculosa</i>	98,7	4
	5271350111	<i>Candida pelliculosa</i>	96,5	3
	5275350111	<i>Candida pelliculosa</i>	99,7	3
	5375350111	<i>Candida pelliculosa</i>	77,4	3
	4264350111	<i>Candida pelliculosa</i>	98,4	2
	5270350111	<i>Candida pelliculosa</i>	84,1	2
	4270350311	<i>Candida utilis</i>	74,5	1
	4274750111	<i>Candida pelliculosa</i>	99,5	1
	4275150111	<i>Candida pelliculosa</i>	62,7	1
	4275250101	<i>Candida utilis</i>	99,9	1
	4275250111	<i>Candida utilis</i>	98,1	1
	4275350101	<i>Candida utilis</i>	98,5	1
	4277350111	<i>Candida pelliculosa</i>	54,2	1
	4375350311	<i>Candida utilis</i>	90,1	1
	5260350111	<i>Candida pelliculosa</i>	69,2	1
5270350311	<i>Candida pelliculosa</i>	81,6	1	
5275350711	<i>Candida pelliculosa</i>	99,6	1	
5275350511	<i>Candida pelliculosa</i>	99,6	1	
5375750111	<i>Candida pelliculosa</i>	77,0	1	
<i>Candida pelliculosa</i>	4264351111	<i>Candida pelliculosa</i>	99,9	3
	5264351111	<i>Candida pelliculosa</i>	99,9	3
	5265351111	<i>Candida pelliculosa</i>	99,9	3
	4265351111	<i>Candida pelliculosa</i>	99,9	2
	4264051111	<i>Candida pelliculosa</i>	99,9	1
	4264351011	<i>Candida pelliculosa</i>	99,9	1
	4265051111	<i>Candida pelliculosa</i>	99,9	1
	4275351111	<i>Candida pelliculosa</i>	99,9	1
	5265151111	<i>Candida pelliculosa</i>	99,9	1
	5265351011	<i>Candida pelliculosa</i>	99,9	1
	5265351115	<i>Candida pelliculosa</i>	99,9	1
	5274751011	<i>Candida pelliculosa</i>	99,9	1
5275351111	<i>Candida pelliculosa</i>	99,9	1	

Druhý případ hematogenní infekce popsali Bougnoux *et al.* u 68letého muže trpícího Alzheimerovou chorobou (217). Druhá identifikace byla provedena na základě mikroskopického vzhledu izolátu na kukuřičném agaru a dále pomocí biochemických souprav API 20C AUX a ID 32C. Validita výsledku byla ověřena stanovením obsahu guaninu a cytosinu v buňce a DNA-DNA reasociačními experimenty s využitím sbírkových kmenů včetně typových. Pacient byl po počáteční neúspěšné terapii FLA, způsobené pravděpodobně současnou přítomností rezistentní *C. glabrata*, vyléčen AMB.

Hazen *et al.* prezentovali první případ, kdy byla *C. utilis* příčinou chronické uroinfekce (218). Pacientem byl 88letý muž, opakovaně vyšetřovaný pro nejméně tři roky trvající potíže s močením. Identifikace zachycených izolátů se opírala o mikromorfologické znaky a biochemické vlastnosti testované diagnostickými soupravami API 20C AUX a Rapid Yeast Plus. Onemocnění nebylo v žádném stádiu léčeno systémovými antimykotiky a jeho další vývoj byl od poslední návštěvy pacienta na urologické ambulanci neznámý.

Případ keratitidy vyvolané *C. utilis* zdokumentovali Shih *et al.* (219). Infekce 72leté ženy, která se projevovala infiltracemi a ulceracemi, byla úspěšně vyléčena lokální aplikací FLA a AMB. Informace o způsobu identifikace etiologického agens nebyly dostupné.

Kazuistika publikovaná chorvatskými autory se zabývala třemi případy kandidémie, vzniklými v období šesti měsíců na novorozenecké JIP Dětské nemocnice v Záhřebu (220). Kvasinky byly identifikovány soupravou ID 32C a hodnocením mikroskopického vzhledu na kukuřičném agaru. Přestože izoláty vykazovaly *in vitro* citlivost k FLA, k hematogenním infekcím došlo bez ohledu na jeho profylaktické a později terapeutické podávání. Proto byla u dvou pacientů léčba změněna na lipozomální AMB, u zbylého na KAS, což vedlo u všech nemocných k eliminaci infekce. Pomocí RAPD byla prokázána klonální příbuznost izolátů.

Poslední publikovaný případ kandidémie s etiologickou rolí *C. utilis* byl popsán Scoppettuolem *et al.* (221). Jednalo se o 66letého muže s metastazujícím karcinomem močového měchýře. Izoláty zachycené z hemokultur byly určeny pomocí hmotnostního spektrometru Microflex LT. Pacientovi byl podán AND, který společně s odstraněním dlouhodobě zavedeného venózního katétru vedl k eliminaci infekce.

Vzhledem k použitým metodám identifikace *C. utilis* ve většině popsaných kazuistik nelze vyloučit, že v některých případech mohlo dojít, stejně jako u *C. pelliculosa*, k chybnému druhovému určení izolátů. V našem souboru kvasinek bylo soupravou ID 32C identifikováno jako *C. utilis* 77 kultur, avšak hmotnostní spektrometrií byly potvrzeny jen dvě. Další čtyři

izoláty, určené pomocí MALDI-TOF MS jako *C. utilis*, byly původně biochemicky určeny jako *C. pelliculosa*.

6.4. Klinický význam *O. polymorpha*

V našem souboru byl zachycen jeden izolát *O. polymorpha*. Uvedený druh prošel několika zásadními taxonomickými revizemi, a proto je znám pod řadou synonym, např. *Pichia angusta*, *Hansenula angusta* nebo *Torulopsis methanotermo*. Na základě genetických analýz byla do tohoto druhu zařazena *Ogataea thermophila* s anamorfním stádiem *Candida thermophila*.

Mezi významné biochemické vlastnosti zmíněné kvasinky patří schopnost asimilovat metanol, fermentovat xylózu a růst při teplotě nad 40 °C. Kvůli uvedeným vlastnostem je předmětem zájmu v průmyslových oborech, studujících možnosti jejího využití při zpracování biomasy za účelem získávání pohonných hmot (222). Vzhledem k tomu, že se tento druh kvasinky nevyskytuje v databázích biochemických souprav a je proto možné ho identifikovat pouze hmotnostní spektrometrií, jsou jeho klinický význam a frekvence výskytu v lidském organismu zatím nejasné.

V literatuře je popsán jeden případ fungémie vyvolané *C. thermophila* u 13letého chlapce s meduloblastomem (223). Kvasinka byla po neúspěšné identifikaci soupravou API 20C AUX určena sekvencováním. Pacient byl vyléčen lipozomálním AMB a odstraněním venózního katétru.

7. Závěr

Na základě dosažených výsledků a souvisejících literárních rešerší lze učinit následující závěry:

Bylo potvrzeno, že spolehlivá diferenciací druhů *C. fabianii*, *C. pelliculosa* a *C. utilis* je pomocí klasických metod identifikace kvasinek problematická. Vzhled kultur na půdách je velmi podobný, ani mikromorfologie na rýžovém agaru nevykazuje zásadní odlišnosti. Průkaz askospór je v laboratořích klinické mikrobiologie obtížně proveditelný. V databázích běžně používaných biochemických souprav, včetně těch s nejširším spektrem druhů, stále chybí *C. fabianii*, navíc ani rozlišení mezi zbylými dvěma druhy není zcela jednoznačné. Spolehlivý způsob identifikace tak představují pouze molekulární techniky, tj. hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF a sekvencování, přičemž první z nich lze jednoznačně doporučit k využití v diagnostické praxi.

Bylo prokázáno, že v rámci biochemické identifikace kvasinek soupravou ID 32C existují číselné profily, korespondující s *C. fabianii*, které jsou v programu *apiweb* zatím spojeny s *C. pelliculosa*. Dále byla demonstrována nižší intenzita asimilace MDG a negativní utilizace erytritolu jako klíčové znaky upozorňující na *C. fabianii*. Uvedené skutečnosti byly publikovány v odborném mykologickém časopise s impakt faktorem a je tedy na výrobcu soupravy, zda tuto skutečnost zohlední úpravou databáze.

Testováním mimořádně širokého souboru klinických izolátů *C. fabianii* bylo zjištěno, že se zmíněná kvasinka vyskytuje v klinickém materiálu v porovnání s ostatními dvěma studovanými druhy mnohem častěji, s frekvencí srovnatelnou např. s *C. guilliermondii*, *C. kefyra* nebo *C. inconspicua*. Skutečnosti uvedené v předchozích dvou bodech pravděpodobně v minulosti vedly k chybným identifikacím a podhodnocení významu *C. fabianii* jako etiologického agens kandidóz.

Přestože ve shodě s publikovanými údaji nebyla prokázána přirozená rezistence studovaných druhů k žádnému ze systémových antifungálních přípravků, bylo zjištěno, že *C. fabianii* má při porovnání s *C. pelliculosa* i *C. utilis* celkově vyšší MIC většiny antimykotik, které byly v naší studii testovány. Navíc téměř třetina izolátů byla *in vitro* rezistentní k alespoň jednomu antifungálnímu preparátu a z nich zhruba 30 % ke dvěma a více. Dále byl poměrně velký počet (13 %) našich kultur tohoto druhu hodnocen jako necitlivý ke KAS,

i když signifikantní neúspěch léčby zmíněným antimykotikem nebyl dosud v literatuře zaznamenán.

Podle údajů v dostupných publikacích dominovala mezi klinickými projevy infekce všemi studovanými druhy kvasinek kandidémie, zbytek tvořily převážně onemocnění močového traktu. Pacienti byli nejčastěji léčeni AMB, běžně byl používán i FLA a KAS. Míra mortality byla srovnatelná s mykózami způsobenými jinými druhy kandid.

V rámci epidemiologické analýzy *C. fabianii* pomocí PFGE byla prokázána vysoká variabilita karyotypů, což odpovídá endogennímu charakteru výskytu této kvasinky. V souladu s uvedeným zjištěním nebyly prokázány žádné kmeny, které by měly specifický vztah k určitému druhu klinického materiálu, geografické lokalitě či nemocničnímu oddělení.

8. Souhrn

Kvasinky druhů *Candida pelliculosa* (teleomorfní stádium *Wickerhamomyces anomalus*), *Candida utilis* (*Cyberlindnera jadinii*) a *Candida fabianii* (*Cyberlindnera fabianii*) bývají příležitostně izolovány z různých klinických vzorků. Jejich vzájemné odlišení pomocí běžných mykologických vyšetřovacích postupů, zahrnujících hodnocení vzhledu kolonií, mikromorfologie kultur a biochemické testy, je značně obtížné. Proto může snadno dojít k chybné identifikaci. Cílem této studie bylo nalézt spolehlivou a jednoduchou metodu vhodnou k diferenciaci uvedených druhů v laboratořích lékařské mykologie, stanovit jejich frekvenci v klinickém materiálu a charakterizovat soubor vyšetřovaných kmenů z hlediska citlivosti k systémovým antimykotikům a míry vzájemné příbuznosti izolátů.

Do studie bylo zahrnuto 256 izolátů kvasinek pocházejících od stejného počtu pacientů hospitalizovaných v 10 velkých nemocnicích v České republice. Kultury byly získány z různých druhů klinického materiálu, přičemž původně byly biochemicky určeny jako *C. pelliculosa* nebo *C. utilis*. U jednotlivých kmenů byl nejprve hodnocen vzhled kolonií na kultivačních půdách včetně chromogenního média a dále mikromorfologie na rýžovém agaru. Charakterizace izolátů pokračovala testováním biochemických vlastností soupravou ID 32C (bioMérieux). Druhové určení kultur uvedenou metodou bylo porovnáno s výsledky dosaženými hmotnostní spektrometrií MALDI-TOF pomocí přístroje Microflex LT (Bruker Daltonics). Správnost identifikace kmenů s nižším skóre (<2,0) byla ověřena sekvencováním. Dále byla zjišťována míra rezistence izolátů k systémovým antimykotikům. Minimální inhibiční koncentrace (MIC) devíti antifungálních látek byly stanoveny kolorimetrickou mikrodiluční soupravou Sensititre YeastOne (Thermo Fischer Scientific). K posouzení vnitrodruhové variability kmenů za účelem hodnocení epidemiologických souvislostí byla využita pulzní gelová elektroforéza (PFGE).

Bylo zjištěno, že hodnocení morfologických znaků není dostačující pro spolehlivou druhovou diferenciaci. Hmotnostní spektrometrií bylo prokázáno, že se *C. fabianii* vyskytuje v klinickém materiálu v porovnání s ostatními dvěma druhy mnohem častěji, biochemicky však bývá velmi často určována jako *C. pelliculosa*, případně *C. utilis* z důvodu absence prvně zmíněného druhu v databázích všech běžně dostupných komerčních produktů. Na základě získaných zkušeností byl navržen způsob jeho odlišení soupravou ID 32C pomocí rozdílů v asimilaci metyl-D-glukopyranosidu a erytritolu. V rámci testování citlivosti k antimykotikům byly u *C. fabianii* zjištěny vyšší hodnoty MIC než u *C. pelliculosa* a *C. utilis*, navíc byla téměř

třetina izolátů tohoto druhu rezistentních alespoň k jednomu antimykotiku a zhruba 30 % z nich ke dvěma a více. Pomocí PFGE byla u *C. fabianii* zaznamenána vysoká variabilita karyotypů svědčící o endogenním původu kmenů.

Pokud je nám známo, dosud nebyla publikována studie, která by analyzovala tak rozsáhlý soubor kmenů *C. fabianii*. Na základě získaných výsledků lze pro identifikaci zmíněné kvasinky v laboratořích lékařské mykologie jednoznačně doporučit využití systému MALDI-TOF MS, v případě nutnosti biochemického určování izolátů pak soupravu ID 32C s modifikací hodnocení numerických profilů. Dále byl touto studií přesvědčivě dokumentován význam tohoto druhu z hlediska četnosti v klinických vzorcích a citlivosti k používaným systémovým antimykotikům.

9. Summary

The yeast species *C. pelliculosa* (teleomorph: *Wickerhamomyces anomalus*), *C. utilis* (*Cyberlindnera jadinii*) and *C. fabianii* (*Cyberlindnera fabianii*) are occasionally isolated from various clinical samples. It is rather difficult to distinguish them from one another using common mycology methods including assessment of colony appearance, culture micromorphology and biochemistry tests. Therefore, erroneous identification may occur. This study aimed at finding a reliable and simple method suitable for differentiation among the above species in medical mycology laboratories, determining their frequency in clinical samples and characterizing a group of strains with respect to their susceptibility to systemic antifungal agents and the level of relationship among isolates.

The study comprised 256 yeast isolates collected from the same number of patients staying in 10 large hospitals in the Czech Republic. The strains were obtained from various types of clinical material; originally, they were biochemically identified as *C. pelliculosa* or *C. utilis*. In individual cultures, the appearance of colonies on culture media including chromogenic media and micromorphology on rice agar were first assessed. The strain characterization continued with tests for biochemical properties using the ID 32C kit (bioMérieux). The results of species identification by the above method were compared with those obtained by MALDI-TOF mass spectrometry (MS) using the Microflex LT system (Bruker Daltonics). The accuracy of identification of strains with lower scores (<2.0) was verified by sequencing. Furthermore, the level of resistance of isolates to systemic antifungal agents was determined. Minimum inhibitory concentrations (MICs) of nine antifungal agents were determined with the Sensititre YeastOne colorimetric microdilution kit (Thermo Fischer Scientific). The intraspecies variability of strains was assessed by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) to determine epidemiological relationships.

The assessment of morphological characteristics was found to be inadequate for reliable species differentiation. Mass spectrometry showed that *C. fabianii* is much more frequent in clinical material compared with the other two species. However, it is very often biochemically identified as *C. pelliculosa* or *C. utilis* because the former is very often absent in databases of all common commercially available kits. Based on the experiences obtained, an approach to its differentiation was proposed. It uses the ID 32C kit and assimilation of methyl-D-glucopyranoside and erythritol. Test of susceptibility to antifungal agents showed higher MICs for *C. fabianii* than for *C. pelliculosa* and *C. utilis*. Moreover, almost one-

third of *C. fabianii* isolates were resistant to at least one antifungal agents and approximately 30% of them were resistant to two or more agents. Using PFGE, a high variability of karyotypes was noted in *C. fabianii*, suggesting an endogenous origin of the strains.

To the best of our knowledge, no study analyzing such a large sample of *C. fabianii* strains has been published. The results clearly show that this particular yeast is best identified with a MALDI-TOF MS system. If isolates need to be biochemically determined, the ID 32C kit with modified assessment of numerical profiles is recommended. Finally, the study clearly showed the importance of this species in terms of frequency in clinical samples and its susceptibility to systemic antifungal agents used.

10. Literatura

1. Perloth J, Choi B, Spellberg B. Nosocomial fungal infections: epidemiology, diagnosis, and treatment. *Med Mycol.* 2007;45(4):321-46.
2. Ráčil Z, Kocmanová I, Wagnerová B, *et al.* Invazivní mykotické infekce u onkologických nemocných: změny v epidemiologii a diagnostice. *Postgrad Med.* 2007;9(3):240-52.
3. Zazula R, Schindler I, Spálený A, *et al.* Současný pohled na mykotické plicní infekce. *Interní Med.* 2005;7-8:349-53.
4. Wisplinghoff H, Bischoff T, Tallent SM, *et al.* Nosocomial bloodstream infections in US hospitals: analysis of 24,179 cases from a prospective nationwide surveillance study. *Clin Infect Dis.* 2004;39(3):309-17.
5. Hamal P, Raclavský L, Svobodová L, *et al.* Současné možnosti antimykotické léčby invazivní kandidózy na jednotkách intenzivní péče. *Klin Mikrobiol Inf Lék.* 2010;16(5):164-70.
6. McGinnis MR. Basic terminology and classification. In: McGinnis MR. Laboratory handbook of medical mycology. 1. vyd. New York: Academic Press; 1980. s. 3-34.
7. Hachem R, Hanna H, Kontoyiannis D, *et al.* The changing epidemiology of invasive candidiasis: *Candida glabrata* and *Candida krusei* as the leading causes of candidemia in hematologic malignancy. *Cancer.* 2008;112(11):2493-9.
8. Trofa D, Gácsér A, Nosanchuk JD. *Candida parapsilosis*, an emerging fungal pathogen. *Clin Microbiol Rev.* 2008;21(4):606-25.
9. Bonassoli LA, Bertoli M, Svidzinski TI. High frequency of *Candida parapsilosis* on the hands of healthy hosts. *J Hosp Infect.* 2005;59(2):159-62.
10. Miceli MH, Díaz JA, Lee SA. Emerging opportunistic yeast infections. *Lancet Infect Dis.* 2011;11(2):142-51.
11. Saxen H, Virtanen M, Carlson P, *et al.* Neonatal *Candida parapsilosis* outbreak with high case fatality rate. *Pediatr Infect Dis J.* 1995;14(9):776-81.
12. Kontoyiannis DP, Vaziri I, Hanna HA, *et al.* Risk factors for *Candida tropicalis* fungemia in patients with cancer. *Clin Infect Dis.* 2001;33(10):1676-81.
13. Rodloff C, Koch D, Schaumann R. Epidemiology and antifungal resistance in invasive candidiasis. *Eur J Med Res.* 2011;16(4):187-95.
14. Tragiannidis A, Bisping G, Koehler G, *et al.* Minireview: *Malassezia* infections in immunocompromised patients. *Mycoses.* 2010;53(3):187-95.

15. Ashbee HR. Update on the genus *Malassezia*. *Med Mycol.* 2007;45(4):287-303.
16. Gullo FP, Rossi SA, Sardi JdeC, *et al.* Cryptococcosis: epidemiology, fungal resistance, and new alternatives for treatment. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2013;32(11):1377-91.
17. Koďoušek R. Cryptococcosis. In: Koďoušek R. *Mykózy - Lékařsky významná mykotická onemocnění člověka*. 1. vyd. Olomouc: Univerzita Palackého v Olomouci; 2003. s. 71-6.
18. Jarvis JN, Bouille A, Loyse A, *et al.* High ongoing burden of cryptococcal disease in Africa despite antiretroviral roll out. *AIDS.* 2009;23(9):1182-3.
19. Jarvis JN, Harrison TS. HIV-associated cryptococcal meningitis. *AIDS.* 2007;21(16):2119-29.
20. Girmenia C, Pagano L, Martino B, *et al.* Invasive infections caused by *Trichosporon* species and *Geotrichum capitatum* in patients with hematological malignancies: a retrospective multicenter study from Italy and review of the literature. *J Clin Microbiol.* 2005;43(4):1818-28.
21. Cox GM, Perfect JR. Infections due to *Trichosporon* species and *Blastoschizomyces capitatus*. *UpToDate*. Internetový odkaz: <http://www.uptodate.com/contents/infections-due-to-trichosporon-species-and-blastoschizomyces-capitatus>.
22. Ramya TG, Sabitha B, Geetha RK. Pulmonary infection by *Geotrichum candidum*. *Int J Adv Med.* 2014;1(2):171-2.
23. Vázquez-González D, Perusquía-Ortiz AM, Hundeiker M, *et al.* Opportunistic yeast infections: candidiasis, cryptococcosis, trichosporonosis and geotrichosis. *J Dtsch Dermatol Ges.* 2013;11(5):381-93.
24. Hamal P, Svobodová L. Mykotické infekce a jejich laboratorní diagnostika. *Infekční nemoci. Diagnostika a léčba infekčních nemocí v ambulantní praxi.* 2011;D5:D1-D32.
25. Skořepová M. Klinické obrazy dermatomykóz. *Interní Med.* 2003;5(10):11-4.
26. Kuklová I. Onychomykózy. *Med Pro Praxi.* 2011;8(2):73-6.
27. Ivančáková R, Slezák R. Infekce ústní sliznice. *Med Pro Praxi.* 2006;6:288-90.
28. Gajdziok J, Tajovská E, Bajerová M, *et al.* Choroby sliznice dutiny ústní. *Prakt Lékáren.* 2009;6(1):26-8.
29. Akpan A, Morgan R. Oral candidiasis. *Postgrad Med J.* 2002;78(922):455-9.

30. Sobel JD. Vulvovaginal candidosis. *Lancet*. 2007;369:1961-71.
31. Odds F. Candidosis of the genitalia. In: Odds T. *Candida* and candidosis, a review and bibliography. 2. vyd. London: Baillière Tindall; 1988. s. 124.
32. Svobodová L, Lysková P, Hamal P. Kandidová vulvovaginitida. *Klin Mikrobiol Inf Léč*. 2015;21(3):74-81.
33. Sobel JD. Genital candidiasis. *Medicine*. 2010;38(6):286-90.
34. Sobel JD, Faro S, Force RW. Vulvovaginal candidiasis: epidemiologic, diagnostic, and therapeutic considerations. *Am J Obstet Gynecol*. 1998;178(2):203-11.
35. Košťálová M. Vulvovaginální kandidóza. *Dermatol Praxi*. 2012;6:81-3.
36. Hamal P, Svobodová L. Mykózy a antimykotika. *Interní Med*. 2011;13(11):445-9.
37. Obermayer-Straub P, Strassburg CP, Manns MP. Autoimmune polyglandular syndrome type 1. *Clin Rev Allergy Immunol*. 2000;18(2):167-83.
38. Skořepová M. Mykózy u dětí, diagnostika a léčba. *Pediatr praxi*. 2013;14(3):170-2.
39. Rex JH, Walsh TJ, Anaissie EJ. Fungal infections in iatrogenically compromised hosts. *Adv Intern Med*. 1998;43:321-71.
40. Bodey GP, Luna M. Skin lesions associated with disseminated candidiasis. *JAMA*. 1974;229(11):1466-8.
41. Spellberg BJ, Filler SG, Edwards JE Jr. Current treatment strategies for disseminated candidiasis. *Clin Infect Dis*. 2006;42(2):244-51.
42. Hughes WT. Systemic candidiasis: a study of 109 fatal cases. *Pediatr Infect Dis*. 1982;1(1):11-8.
43. Pagano L, Mele L, Fianchi L, et al. Chronic disseminated candidiasis in patients with hematologic malignancies. Clinical features and outcome of 29 episodes. *Haematologica*. 2002;87(5):535-41.
44. Gudlaugsson O, Gillespie S, Lee K, et al. Attributable mortality of nosocomial candidemia, revisited. *Clin Infect Dis*. 2003;37(9):1172-7.
45. Lim CS, Rosli R, Seow HF, et al. *Candida* and invasive candidiasis: back to basis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2012;31(1):21-31.
46. Bouza E, Muñoz P. Epidemiology of candidemia in intensive care units. *Int J Antimicrob Agents*. 2008;32(Suppl2):S87-91.
47. Brown AE. Overview of fungal infections in cancer patients. *Semin Oncol*. 1990;17(Suppl6):S2-5.

48. Méan M, Marchetti O, Calandra T. Bench-to-bedside review: *Candida* infections in the intensive care unit. *Crit Care*. 2008;12(1):204.
49. Yapar N. Epidemiology and risk factors for invasive candidiasis. *Ther Clin Risk Manag*. 2014;10:95-105.
50. León C, Ruiz-Santana S, Saavedra P, et al. A bedside scoring system ("*Candida* score") for early antifungal treatment in nonneutropenic critically ill patients with *Candida* colonization. *Crit Care Med*. 2006;34(3):730-7.
51. Buchta V. Vaginální mikrobiom, interakce mikroorganismů a hostitele; biologie a patogenita hlavních mikroorganismů. In: Špaček J, Buchta V, Jílek P (eds). *Vulvovaginální dyskomfort a poruchy poševního prostředí*. 1. vyd. Praha: Grada Publishing; 2013. s. 31-70.
52. Ferrer J. Vaginal candidosis: epidemiological and etiological factors. *Int J Gynaecol Obstet*. 2000;71(Suppl1):S21-7.
53. Schaller M, Borelli C, Korting HC, et al. Hydrolytic enzymes as virulence factors of *Candida albicans*. *Mycoses*. 2005;48(6):365-77.
54. Calderone RA, Fonzi WA. Virulence factors of *Candida albicans*. *Trends Microbiol*. 2001;9(7):327-35.
55. Saporito-Irwin SM, Birse CE, Sypherd PS, et al. PHR1, a pH-regulated gene of *Candida albicans*, is required for morphogenesis. *Mol Cell Biol*. 1995;15(2):601-13.
56. Mühlischlegel FA, Fonzi WA. PHR2 of *Candida albicans* encodes a functional homolog of the pH-regulated gene PHR1 with an inverted pattern of pH-dependent expression. *Mol Cell Biol*. 1997;17(10):5960-7.
57. Reed BD, Zazove P, Pierson CL, et al. *Candida* transmission and sexual behaviors as risks for a repeat episode of *Candida* vulvovaginitis. *J Womens Health*. 2003;12(10):979-89.
58. Pfaller MA, Diekema DJ. Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. *Clin Microbiol Rev*. 2007;20(1):133-63.
59. Pfaller MA, Diekema DJ, Colombo AL, et al. *Candida rugosa*, an emerging fungal pathogen with resistance to azoles: geographic and temporal trends from the ARTEMIS DISK antifungal surveillance program. *J Clin Microbiol*. 2006;44(10):3578-82.

60. Majoros L, Kardos G, Feiszt P, *et al.* Efficacy of amphotericin B and flucytosine against fluconazole-resistant *Candida inconspicua* clinical isolates. *J Antimicrob Chemother.* 2005;56(1):253-4.
61. Haber J. Nová antimykotika - jaká jsou a co přinášejí. *Remedia.* 2005;15(3):247-58.
62. Haber J. Amfotericin B - konvenční versus lipidové formy z hlediska orgánové toxicity. *Farmakoterapie.* 2009;5(5):557-60.
63. Balasegaram M, Ritmeijer K, Lima MA, *et al.* Liposomal amphotericin B as a treatment for human leishmaniasis. *Expert Opin Emerg Drugs.* 2012;17(4):493-510.
64. Kanafani ZA, Perfect JR. Resistance to antifungal agents: mechanisms and clinical impact. *Clin Infect Dis.* 2008;46(1):120-8.
65. Macura AB, Dwernicka B. Effect of synthetic antifungal drugs on the adherence of *Candida albicans* to the mouth mucosa epithelium *in vitro*. *Med Dosw Mikrobiol.* 1989;41(1):67-70.
66. Polak A. Antifungal combination therapy in localized candidosis. *Mycoses.* 1990;33(7-8):353-8.
67. Chesney PJ, Teets KC, Mulvihill JJ, *et al.* Successful treatment of *Candida* meningitis with amphotericin B and 5-fluorocytosine in combination. *J Pediatr.* 1976;89(6):1017-9.
68. Pintado García V, Martín Dávila P, Muñoz Labián V, *et al.* The efficacy of sequential treatment with amphotericin B-fluorocytosine and fluconazole in cryptococcal meningitis not associated with AIDS. *Rev Clin Esp.* 1999;199(7):480.
69. Aoba S, Komiyama A, Hasegawa O. Fungal meningitis caused by a *Malassezia* species masquerading as painful ophthalmoplegia. *Rinsho Shinkeigaku.* 1993;33(4):462-4.
70. Denning DW. Echinocandin antifungal drugs. *Lancet.* 2003;362(9390):1142-51.
71. Feldmesser M, Kress Y, Mednick A, *et al.* The effect of the echinocandin analogue caspofungin on cell wall glucan synthesis by *Cryptococcus neoformans*. *J Infect Dis.* 2000;182(6):1791-5.
72. Eschenauer G, DePestel DD, Carver PL. Comparison of echinocandin antifungals. *Ther Clin Risk Manag.* 2007;3(1):71-97.
73. Pappas PG, Kauffman CA, Andes DR, *et al.* Clinical practice guideline for the management of candidiasis: 2016 update by the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis.* 2016;62(4):e1-50.

74. Skořepová M. Antimykotika z pohledu dermatologa. *Remedia*. 2002;12(1):51-4.
75. Kullberg BJ, Pappas P, Ruhnke M, et al. Voriconazole compared to a strategy of amphotericin B followed by fluconazole for treatment of candidaemia in non-neutropenic patients. *14th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID)*. 2014;Abstract:M1761.
76. Wingard JR, Merz WG, Rinaldi MG, et al. Association of *Torulopsis glabrata* infections with fluconazole prophylaxis in neutropenic bone marrow transplant patients. *Antimicrob Agents Chemother*. 1993;37(9):1847-9.
77. Wingard JR. Importance of *Candida* species other than *C. albicans* as pathogens in oncology patients. *Clin Infect Dis*. 1995;20(1):115-25.
78. Vazquez JA, Dembry LM, Sanchez V, et al. Nosocomial *Candida glabrata* colonization: an epidemiologic study. *J Clin Microbiol*. 1998;36(2):421-6.
79. Atkinson BJ, Lewis RE, Kontoyiannis DP. *Candida lusitanae* fungemia in cancer patients: risk factors for amphotericin B failure and outcome. *Med Mycol*. 2008;46(6):541-6.
80. Minari A, Hachem R, Raad I. *Candida lusitanae*: a cause of breakthrough fungemia in cancer patient. *Clin Infect Dis*. 2001;32(2):186-90.
81. Haber J. Echinokandiny - nová skupina antimykotik. *Remedia*. 2008;18(4):297-309.
82. Park S, Kelly R, Kahn JN, et al. Specific substitutions in the echinocandin target FKS1p account for reduced susceptibility of rare laboratory and clinical *Candida* sp. isolates. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005;49(8):3264-73.
83. Balashov SV, Park S, Perlin DS. Assessing resistance to the echinocandin antifungal drug caspofungin in *Candida albicans* by profiling mutations in FKS1. *Antimicrob Agents Chemother*. 2006;50(6):2058-63.
84. Alexander BD, Johnson MD, Pfeiffer CD, et al. Increasing echinocandin resistance in *Candida glabrata*: clinical failure correlates with presence of FKS mutations and elevated minimum inhibitory concentrations. *Clin Infect Dis*. 2013;56(12):1724-32.
85. Espinel-Ingroff A. *In vitro* antifungal activities of anidulafungin and micafungin, licensed agents and the investigational triazole posaconazole as determined by NCCLS methods for 12,052 fungal isolates: review of the literature. *Rev Iberoam Micol*. 2003;20(4):121-36.

86. Pfaller MA, Boyken L, Hollis RJ, *et al.* Global surveillance of in vitro activity of micafungin against *Candida*: a comparison with caspofungin by CLSI-recommended methods. *J Clin Microbiol.* 2006;44(10):3533-8.
87. Mora-Duarte J, Betts R, Rotstein C, *et al.* Comparison of caspofungin and amphotericin B for invasive candidiasis. *N Engl J Med.* 2002;347(25):2020-9.
88. Wingard JR, Merz WG, Rinaldi MG, *et al.* Increase in *Candida krusei* infection among patients with bone marrow transplantation and neutropenia treated prophylactically with fluconazole. *N Engl J Med.* 1991;325(18):1274-7.
89. Hamal P, Jandová B, Mencl K. Identifikace kvasinek z klinického materiálu. Přehled současných možností se zaměřením na fenotypové metody a komerční produkty. *Postgrad Med.* 2010;5:64-70.
90. Mackenzie DWR. Serum tube identification of *Candida albicans*. *J Clin Pathol.* 1962; 15(6):563-5.
91. Larone DH. Medically important fungi a guide to identification. 5. vyd. Washington: ASM Press; 2011.
92. Kurtzman CP, Fell JW, Boekhout T. In: The yeasts a taxonomic study, volume 2. 5. vyd. Burlington: Elsevier; 2011.
93. Freydière AM, Guinet R. Rapid methods for identification of the most frequent clinical yeasts. *Rev Iberoam Micol.* 1997;14(3):85-9.
94. Internetový odkaz: http://www.mycology.adelaide.edu.au/Laboratory_Methods/Culture_Techniques_and_Media/bird.html.
95. Otčenášek M, Hejtmánek M. Biochemické hodnocení subkultur. In: Otčenášek M, *et al.* Vyšetřovací metody při mykotických onemocněních. 1. vyd. Praha: Avicenum; 1990. s. 51-56 .
96. Fagner P. Klíče. In: Fagner P. Určování kvasinek izolovaných z lidského organismu. 1. vyd. Praha: Academia; 1992. s. 15-20.
97. Mallátová N., Mencl K. Laboratorní diagnostika invazivní kandidózy. *Postgrad Med.* 2010;5:51-58.
98. Kolář M. Určování citlivosti mikrobů na antibiotika. In: Koukalová D, Kolář M, Vágnerová I, *et al.* Praktická cvičení z lékařské mikrobiologie I. 2.vyd. Olomouc: Univerzita Palackého; 2009. s. 55-67.

99. Mallátová N, Hamal P, Kocmanová I, *et al.* Testování citlivosti mikromycet k antimykotikům *in vitro* u imunosuprimovaných pacientů - doporučení odborníků s podporou CELL a SLM ČLS JEP. *Postgrad Med.* 2011;13(5):51-65.
100. Espinel-Ingroff A, Canton E, Gibbs D, *et al.* Correlation of Neo-Sensitabs tablet diffusion assay results on three different agar media with CLSI broth microdilution M27-A2 and disk diffusion M44-A results for testing susceptibilities of *Candida* spp. and *Cryptococcus neoformans* to amphotericin B, caspofungin, fluconazole, itraconazole, and voriconazole. *J Clin Microbiol.* 2007; 45(3):858-64.
101. Vandebossche I, Vaneechoutte M, Vandevenne M, *et al.* Susceptibility testing of fluconazole by the NCCLS broth macrodilution method, E-test, and disk diffusion for application in the routine laboratory. *J Clin Microbiol.* 2002;40(3):918-21.
102. Chen SC, O'Donnell ML, Gordon S, *et al.* Antifungal susceptibility testing using the E-test: comparison with the broth macrodilution technique. *J Antimicrob Chemother.* 1996;37(2):265-73.
103. Matar MJ, Ostrosky-Zeichner L, Paetznick VL, *et al.* Correlation between E-test, disk diffusion, and microdilution methods for antifungal susceptibility testing of fluconazole and voriconazole. *Antimicrob Agents Chemother.* 2003;47(5):1647-51.
104. Internetový odkaz: <http://medical-dictionary.thefreedictionary.com/Breakpoint>.
105. Rex JH, Alexander BD, Andes D, *et al.* Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; approved standard - third edition. M27-A3. 2008;28(14):1-19.
106. M27-S4 Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. Fourth informational supplement. 2012;32(17):1-23.
107. Internetový odkaz: http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/AFST/Files/EUCAST_E_Def_7_3_Yeast_testing_definitive.pdf.
108. Espinel-Ingroff A, Pfaller M, Messer SA, *et al.* Multicenter comparison of the Sensititre YeastOne colorimetric antifungal panel with the NCCLS M27-A2 reference method for testing new antifungal agents against clinical isolates of *Candida* spp. *J Clin Microbiol.* 2004;42(2):718-21.
109. Alexander BD, Byrne TC, Smith KL, *et al.* Comparative evaluation of E-test and Sensititre YeastOne panels against the Clinical and Laboratory Standards Institute

- M27-A2 reference broth microdilution method for testing *Candida* susceptibility to seven antifungal agents. *J Clin Microbiol.* 2007;45(3):698-706.
110. Trtkova J, Raclavsky V. Molecular-genetic approaches to identification and typing of pathogenic *Candida* yeasts. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub.* 2006;150(1):51-61.
111. Raclavský V. Polymerázová řetězová reakce (PCR). In: Raclavský V. Úvod do základních metod molekulární genetiky. 1. vyd. Olomouc: Univerzita Palackého; 1999. s. 34-38.
112. Ráčil Z, Mayer J, et al. Invazivní aspergilóza: současné možnosti diagnostiky. Nekultivační diagnostické metody. *Vnitř Lék.* 2007;53(Suppl):S1-S34.
113. Hall L, Wohlfel S, Roberts GD. Experience with the MicroSeq D2 large-subunit ribosomal DNA Sequencing kit for identification of commonly encountered, clinically important yeast species. *J Clin Microbiol.* 2003;41(11):5099-102.
114. Borman AM, Linton CJ, Oliver D, et al. Rapid molecular identification of pathogenic yeasts by pyrosequencing analysis of 35 nucleotides of internal transcribed spacer 2'. *J Clin Microbiol.* 2010;48(10):3648-53.
115. Hamal P. Molekulárně genetické metody v lékařské mykologii: současný stav a perspektivy. *Klin Mikrobiol Inf Lék.* 2007;13(4):136-144.
116. Bougnoux ME, Morand S, d'Enfert C. Usefulness of multilocus sequence typing for characterization of clinical isolates of *Candida albicans*. *J Clin Microbiol.* 2002;40(4):1290-7.
117. Lockhart SR, Fritch JJ, Meier AS, et al. Colonizing populations of *Candida albicans* are clonal in origin but undergo microevolution through C1 fragment reorganization as demonstrated by DNA fingerprinting and C1 sequencing. *J Clin Microbiol.* 1995;33(6):1501-9.
118. Perea S, Lopéz-Ribot JL, Kirkpatrick WR, et al. Prevalence of molecular mechanisms of resistance to azole antifungal agents in *Candida albicans* strains displaying high-level fluconazole resistance isolated from human immunodeficiency virus-infected patients. *Antimicrob Agents Chemother.* 2001;45(10):2676-84.
119. Aanensen DM, Spratt BG. The multilocus sequence typing network: mlst.net. *Nucleic Acids Res.* 2005;33(Web Server issue):W728-33.

120. Hamal P. Vnitrodruhová typizace. In: Hamal P. Epidemiologické studie nozokomiálních kvasinkových infekcí. Habilitační práce. Olomouc: Univerzita Palackého; 2008. s. 11-25.
121. Welsh J, McClelland M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrarily primers. *Nucleic Acids Res.* 1990;18(24):7213-8.
122. Williams JG, Kubelik AR, Livak KJ, *et al.* DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.* 1990;18(22):6531-5.
123. Becker K, Badehorn D, Deiwick S, *et al.* Molecular genotyping of *Candida* species with special respect to *Candida (Torulopsis) glabrata* strains by arbitrarily primed PCR. *J Med Microbiol.* 2000;49(6):575-81.
124. Lin D, Lehmann PF. Random amplified polymorphic DNA for strain delineation within *Candida tropicalis*. *J Med Vet Mycol.* 1995;33(4):241-6.
125. Song X, Sun J, Store G, *et al.* Genotypic relatedness of yeasts in thrush and denture stomatitis. *Oral Microbiol Immunol.* 2006;21(5):301-8.
126. Andrade-Silva L, Ferreira-Paim K, Mora DJ, *et al.* RAPD analysis with the primer L15996 of Brazilian clinical and environmental *Cryptococcus neoformans* isolates. *Mycopathologia.* 2012;174(1):53-9.
127. Plachý R, Hamal P, Raclavský V. McRAPD as a new approach to rapid and accurate identification of pathogenic yeasts. *J Microbiol Methods.* 2005;60(1):107-13.
128. De Backer MD, Ilyina T, Ma XJ, *et al.* Genomic profiling of the response of *Candida albicans* to itraconazole treatment using a DNA microarray. *Antimicrob Agents Chemother.* 2001;45(6):1660-70.
129. Finney M. Pulsed-field gel electrophoresis. *Current protocols in molecular biology.* 2000;1(Suppl51):2.5B.1-2.5.B.9.
130. Birren BW, Lai E, Clark SM, *et al.* Optimized conditions for pulsed field electrophoretic separations of DNA. *Nucleic Acids Res.* 1988;16(15):7563-82.
131. Carle GF, Frank M, Olson MV. Electrophoretic separations of large DNA molecules by periodic inversion of the electric field. *Science.* 1986;232(4746):65-8.
132. Anand R. Pulsed field gel electrophoresis: a technique for fractionating large DNA molecules. *Trends in Genet.* 1986;2:278-83.
133. Chu G, Vollrath D, Davis RW. Separation of large DNA molecules by contour-clamped homogenous electric fields. *Science.* 1986;234(4783):1582-5.

134. Garfin DE. Electrophoretic methods. In: Glasel JA, Deutscher MO (eds.). Introduction to biophysical methods for protein and nucleic acid research. 1. vyd. San Diego: Academic Press; 2000. s. 53-109.
135. Carruba G, Pontieri E, De Bernardis F, *et al.* DNA fingerprinting and electrophoretic karyotype of environmental and clinical isolates of *Candida parapsilosis*. *J Clin Microbiol.* 1991;29(5):916-22.
136. Dib JC, Dube M, Kelly C, *et al.* Evaluation of pulsed-field electrophoresis as a typing system for *Candida rugosa*: comparison of karyotype and restriction fragment length polymorphism. *J Clin Microbiol.* 1996;34(6):1494-6.
137. Klemp-Selb B, Rimek D, Kappe R. Karyotyping of *Candida albicans* and *Candida glabrata* from patients with *Candida* sepsis. *Mycoses.* 2000;43(5):159-63.
138. Marinach-Patrice C, Fekkar A, Atanasova R, *et al.* Rapid species diagnosis for invasive candidiasis using mass spectrometry. *PLoS One.* 2010; 5(1):e8862.
139. Dendis M, Horváth R, Michálek J, *et al.* PCR-RFLP detection and species identification of fungal pathogens in patients with febrile neutropenia. *Clin Microbiol Infect.* 2003;9(12):1191-202.
140. Internetový odkaz: <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>.
141. Hunter PR, Gaston MA. Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's index of diversity. *J Clin Microbiol.* 1998;26(11):2465-6.
142. Kurtzman CP. Synonymy of the yeast genera *Hansenula* and *Pichia* demonstrated through comparisons of deoxyribonucleic acid relatedness. *Antonie van Leeuwenhoek.* 1984;50(3):209-17.
143. Kurtzman CP, Robnett CJ, Basehoar-Powers E. Phylogenetic relationships among species of *Pichia*, *Issatchenkia* and *Williopsis* determined from multigene sequence analysis, and the proposal of *Barnettozyma* gen. nov., *Lindnera* gen. nov. and *Wickerhamomyces* gen. nov. *FEMS Yeast Res.* 2008;8(6):939-54.
144. Mintner DW. *Cyberlindnera*, a replacement name for *Lindnera* Kurtzman *et al.*, nom. illegit. *Mycotaxon.* 2009;110(4):473-6.
145. Aidoo KE, Nout MJ, Sarkar PK. Occurrence and function of yeasts in Asian indigenous fermented foods. *FEMS Yeast Res.* 2006;6(1):30-9.

146. Limtong S, Kaewwichian R, Yongmanitchai W, *et al.* Diversity of culturable yeasts in phylloplane of sugarcane in Thailand and their capability to produce indole-3-acetic acid. *World J Microbiol Biotechnol.* 2014;30(6):1785-96.
147. Romo-Sánchez S, Alves-Baffi M, Arévalo-Villena M, *et al.* Yeast biodiversity from oleic ecosystems: study of their biotechnological properties. *Food Microbiol.* 2010;27(4):487-92.
148. Barnett JA, Payne RW, Yarrow D. In: *Yeasts: Characteristics and identification.* 3. vyd. Cambridge: Cambridge University Press; 2000. s. 215.
149. Svobodová L, Bednářová D, Hamal P. Prevalence *Candida pelliculosa*, *Candida utilis* a *Candida fabianii* ve Fakultní nemocnici Olomouc: epidemiologická studie. *Epidemiol Microbiol Imunol.* 2016;65(1):34-8.
150. Dooley DP, Beckius ML, McAllister CK, *et al.* Prostatitis caused by *Hansenula fabianii*. *J Infect Dis.* 1990;161(5):1040-1.
151. Bhally HS, Jain S, Shields C, *et al.* Infection in a neonate caused by *Pichia fabianii*: importance of molecular identification. *Med Mycol.* 2006;44(2):185-7.
152. Grenouillet F, Millon L, Chamouine A, *et al.* *Pichia fabianii* fungemia in a neonate. *Pediatr Infect Dis J.* 2010;29(2):191.
153. Valenza G, Valenza R, Brederlau J, *et al.* Identification of *Candida fabianii* as a cause of lethal septicaemia. *Mycoses.* 2006;49(4):331-4.
154. Hamal P, Ostransky J, Dendis M, *et al.* A case of endocarditis caused by the yeast *Pichia fabianii* with biofilm production and developed in vitro resistance to azoles in the course of antifungal treatment. *Med Mycol.* 2008;46(6):601-5.
155. Gabriel F, Noel T, Accoceberry I. *Lindnera (Pichia) fabianii* blood infection after mesenteric ischemia. *Med Mycol.* 2012;50(3):310-4.
156. Yun JW, Park KS, Ki CS, *et al.* Catheter-related bloodstream infection by *Lindnera fabianii* in a neutropenic patient. *J Med Microbiol.* 2013;62(6):922-5.
157. Wu Y, Wang J, Li W, *et al.* *Pichia fabianii* blood infection in a premature infant in China: case report. *BMC Res Notes.* 2013;6:77.
158. Baghdadi J, Hemarajata P, Humphries R, *et al.* First report of ventriculoperitoneal shunt infection due to *Cyberlindnera fabianii*. *Case Rep Infect Dis.* Dostupné online: https://www.researchgate.net/publication/283976675_First_Report_of_Ventriculoperitoneal_Shunt_Infection_due_to_Cyberlindnera_fabianii.

159. Lee JI, Shinae Y, Park JS, *et al.* Successful treatment of fungemia caused by *Cyberlindnera fabianii* with anidulafungin: A case report. *Ann Clin Microbiol.* 2015;18(3):94-7.
160. Flores-González JC, Guerrero-Lozano I, Pérez-Guerrero JJ, *et al.* First report of invasive fungal disease by *Candida fabianii* in a non-neonatal paediatric patient. *Rev Iberoam Micol.* 2016;33(1):48-50.
161. Jindal N, Arora S, Dhuria N, *et al.* *Cyberlindnera (Pichia) fabianii* infection in a neutropenic child: importance of molecular identification. *JMM Case Rep.* 2015;doi: 10.1099/jmmcr.0.000033.
162. Katagiri S, Gotoh M, Tone K, *et al.* Fatal *Cyberlindnera fabianii* fungemia in a patient with mixed phenotype acute leukemia after umbilical cord blood transplantation. *Int J Hematol.* 2016;103(5):592-5.
163. Mlinarić-Missoni E, Hatvani L, Kocsubé S, *et al.* *Cyberlindnera fabianii* in the neonatal and paediatric intensive care unit: case reports. *JMM Case Rep.* 2015; doi:10.1099/jmmcr.0.000032.
164. Poikonen E, Lytikäinen O, Anttila VJ. Candidemia in Finland, 1995-1999. *Emerg Infect Dis.* 2003;9(8):985-90.
165. Arendrup MC, Fursted K, Gahrn-Hansen B, *et al.* Seminal surveillance of fungemia in Denmark: notably high rates of fungemia and numbers of isolates with reduced azole susceptibility. *J Clin Microbiol.* 2005;43(9):4434-40.
166. Richet H, Roux P, Des Champs C, *et al.* Candidemia in French hospitals: incidence rates and characteristics. *Clin Microbiol Infect.* 2002;8(7):405-12.
167. Wu Z, Liu Y, Feng X, *et al.* Candidemia: incidence rates, type of species, and risk factors at a tertiary care academic hospital in China. *Int J Infect Dis.* 2014;22:4-8.
168. Wu JQ, Zhu LP, Ou XT, *et al.* Epidemiology and risk factors for non-*Candida albicans* candidemia in non-neutropenic patients at a Chinese teaching hospital. *Med Mycol.* 2011;49(5):522-5.
169. Martin GS, Mannino DM, Eaton S, *et al.* The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000. *N Engl J Med.* 2003;348(16):1546-54.
170. Walsh TJ, Pizzo TA. Nosocomial fungal infections: a classification for hospital-acquired fungal infections and mycoses arising from endogenous flora or reactivation. *Annu Rev Microbiol.* 1988;42:517-45.

171. Wang CJ, Schwarz J. The etiology of interstitial pneumonia identification as *Hansenula anomala* of a yeast isolated from lungs of infants. *Mycopathol Mycol Appl.* 1958;9(4):299-306.
172. Murphy N, Buchanan CR, Damjanovic V, et al. Infection and colonisation of neonates by *Hansenula anomala*. *Lancet.* 1986;1(8476):291-3.
173. Milstoc M, Siddiqui NA. Fungemia due to *Hansenula anomala*. *N Y State J Med.* 1986; 86(10):541-2.
174. Nohinek B, Zee-Cheng CS, Barnes WG, et al. Infective endocarditis of a bicuspid aortic valve caused by *Hansenula anomala*. *Am J Med.* 1987;82(1):165-8.
175. Klein AS, Tortora GT, Malowitz R, et al. *Hansenula anomala*: a new fungal pathogen. Two case reports and a review of the literature. *Arch Intern Med.* 1988;148(5):1210-3.
176. Haron E, Anaissie E, Dumphy F, et al. *Hansenula anomala* fungemia. *Rev Infect Dis.* 1988;10(6):1182-6.
177. Qadri SM, Al Dayel F, Strampfer MJ, et al. Urinary tract infection caused by *Hansenula anomala*. *Mycopathologia.* 1988;104(2):99-101.
178. Muñoz P, Garcia Leoni ME, Berenguer J, et al. Catheter-related fungemia by *Hansenula anomala*. *Arch Intern Med.* 1989;149(3):709-13.
179. Dickensheets DL. *Hansenula anomala* infection. *Rev Infect Dis.* 1989;11(3):507-8.
180. López F, Martín G, Paz ML, et al. *Hansenula anomala* infection in acute leukemia. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 1990;8(6):363-4.
181. Salesa R, Burgos A, Fernandez-Mazarrasa C, et al. Transient fungaemia due to *Candida pelliculosa* in a patient with AIDS. *Mycoses.* 1991;34(7-8):327-9.
182. Neumeister B, Rockemann M, Marre R. Fungemia due to *Candida pelliculosa* in a case of acute pancreatitis. *Mycoses.* 1992;35(11-12):309-10.
183. Sekhon AS, Kowalewska-Grochowska K, Garg AK, et al. *Hansenula anomala* fungemia in an infant with gastric and cardiac complications with a review of the literature. *Eur J Epidemiol.* 1992;8(2):305-8.
184. Hirasaki S, Ijichi T, Fujita N, et al. Fungemia caused by *Hansenula anomala*: successful treatment with fluconazole. *Intern Med.* 1992;31(5):622-4.
185. Alter SJ, Farley J. Development of *Hansenula anomala* infection in a child receiving fluconazole therapy. *Pediatr Infect Dis J.* 1994;13(2):158-9.

186. Goss G, Grigg A, Rathbone P, *et al.* *Hansenula anomala* infection after bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 1994;14(6):995-7.
187. Yamada S, Maruoka T, Nagai K, *et al.* Catheter-related infections by *Hansenula anomala* in children. *Scand J Infect Dis.* 1995;27(1):85-7.
188. Sumitomo M, Kawata K, Kaminaga Y, *et al.* *Hansenula anomala* fungemia in a patient undergoing IVH-treatment with ascending colon carcinoma. *Kansenshogaku Zasshi* 1996;70(2):198-205.
189. Kunova A, Spànik S, Kollàr T, *et al.* Breakthrough fungemia due to *Hansenula anomala* in a leukemia patient successfully treated with amphotericin B. *J Chemother.* 1996;8(1):85-6.
190. Thuler LC, Faivichenco S, Velasco E, *et al.* Fungaemia caused by *Hansenula anomala* - an outbreak in a cancer hospital. *Mycoses.* 1997;40(5-6):193-6.
191. Wong AR, Ibrahim H, Van Rostenberghe H, *et al.* *Hansenula anomala* infection in a neonate. *J Pediatric Child Health.* 2000;36(6):609-10.
192. Ma JS, Chen PY, Chen CH, *et al.* Neonatal fungemia caused by *Hansenula anomala*: a case report. *J Microbiol Immunol Infect.* 2000;33(4):267-70.
193. Chakrabarti A, Singh K, Narang A, *et al.* Outbreak of *Pichia anomala* infection in the pediatric service of a tertiary-care center in Northern India. *J Clin Microbiol.* 2001;39(5):1702-6.
194. Aragão PA, Oshiro IC, Manrique EI *et al.* *Pichia anomala* outbreak in a nursery: exogenous source? *Pediatr Infect Dis J.* 2001;20(9):843-8.
195. Kalenic S, Jandrljic M, Vegar V, *et al.* *Hansenula anomala* outbreak at a surgical intensive care unit: a search for risk factors. *Eur J Epidemiol.* 2001;17(5):491-6.
196. Hanzen J, Krcmery V. Polyfungal candidaemia due to *Candida rugosa* and *Candida pelliculosa* in a haemodialyzed neonate. *Scand J Infect Dis.* 2002;34(7):555.
197. Kane SL, Dasta JF, Cook CH. Amphotericin B lipid complex for *Hansenula anomala* pneumonia. *Ann Pharmacother.* 2002;36(1):59-62.
198. Mestroni SC, Bava AJ. *Hansenula anomala* fungemia. *Rev Argent Microbiol.* 2003;35(1):54-6.
199. Bakir M, Cerikcioğlu N, Tirtir A, *et al.* *Pichia anomala* fungaemia in immunocompromised children. *Mycoses.* 2004;47(5-6):231-5.

200. Pasqualotto AC, Sukiennik TC, Severo LC, *et al.* An outbreak of *Pichia anomala* fungemia in a Brazilian pediatric intensive care unit. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2005;26(6):553-8.
201. Paula CR, Krebs VL, Auler ME, *et al.* Nosocomial infection in newborns by *Pichia anomala* in a Brazilian intensive care unit. *Med Mycol.* 2006;44(5): 479-84.
202. Park KA, Ahn K, Chung ES, *et al.* *Pichia anomala* fungal keratitis. *Cornea.* 2008;27(5):619-20.
203. Kalkancı A, Dizbay M, Turan O, *et al.* Nosocomial transmission of *Candida pelliculosa* fungemia in a pediatric intensive care unit and review of the literature. *Turk J Pediatr.* 2010;52(1):42-9.
204. Yaacoub A, Saghrouni F, Romdhane MB, *et al.* Candidemia due to *Candida pelliculosa*: a report of two cases. *J Myc Med.* 2011;21:294-7.
205. Ratcliffe L, Davies J, Anson J, *et al.* *Candida pelliculosa* meningitis as an opportunistic infection in HIV: the first reported case. *Int J STD AIDS.* 2011;22(1):54-6.
206. Chan AW, Cartwright EJ, Reddy SC, *et al.* *Pichia anomala* (*Candida pelliculosa*) fungemia in a patient with sickle cell disease. *Mycopathologia.* 2013;176(3-4):273-7.
207. Lin HC, Lin HY, Su BH, *et al.* Reporting an outbreak of *Candida pelliculosa* fungemia in a neonatal intensive care unit. *J Microbiol Immunol Infect.* 2013;46(6):456-62.
208. da Silva CM, de Carvalho Parahym AM, Leão MP, *et al.* Fungemia by *Candida pelliculosa* (*Pichia anomala*) in a neonatal intensive care unit: a possible clonal origin. *Mycopathologia.* 2013;175(1-2):175-9.
209. Madhavan A, Jayalakshmi V, Sobha B. A case report of *Candida pelliculosa* sepsis in newborn nursery ICU. *J Acad Clin Microbiol.* 2013;15(1):32-3.
210. Kim HC, Ahn SH, Kim KY, *et al.* Arthroscopic treatment of fungous arthritis of knee joint by *Candida pelliculosa*: a case report. *J Korean Arthrosc Soc.* 2013;17(1):79-83.
211. Esgin H, Bulut E, Örum Ç. *Candida pelliculosa* endophthalmitis after cataract surgery: a case report. *BMC Res Notes.* 2014;7:169.
212. Vijayakumar S, Sahoo B, Singh LR, *et al.* Fungemia in an immunocompetent infant due to *Candida pelliculosa*: a case report. *IJSR.* 2015;4(1):1718-9.
213. Kamoshita M, Matsumoto Y, Nishimura K, *et al.* *Wickerhamomyces anomalus* fungal keratitis responds to topical treatment with antifungal micafungin. *J Infect Chemother.* 2015;21(2):141-3.

214. Holzschu DL, Chandler FW, Ajello L, *et al.* Evaluation of industrial yeasts for pathogenicity. *Sabouraudia*.1979;17(1):71-8.
215. Viviani MA, Tortorano AM, Piazza T, *et al.* Candidosis surveillance in intensive care unit patients. *Bull Soc Franç Mycol Mèd.* 1986;15:121-4.
216. Alsina A, Mason M, Uphoff RA, *et al.* Catheter associated *Candida utilis* fungemia in a patient with acquired immunodeficiency syndrome: species verification with a molecular probe. *J Clin Microbiol.* 1988;26(4):621-4.
217. Bougnoux M, Gueho E, Potocka AC. Resolutive *Candida utilis* fungemia in a nonneutropenic patient. *J Clin Microbiol.* 1993;31(6):1644-5.
218. Hazen KC, Theisz GW, Howell SA. Chronic urinary tract infection due to *Candida utilis*. *J Clin Microbiol.* 1999;37(3):824-7.
219. Shih MH, Sheu MM, Chen HY, *et al.* Fungal keratitis caused by *Candida utilis* - case report. *Kaohsiung J Med Sci.* 1999;15(3):171-4.
220. Lukić-Grić A, Mlinarić-Missoni E, Skarić I, *et al.* *Candida utilis* candidaemia in neonatal patients. *J Med Microbiol.* 2011;60(6):838-41.
221. Scoppettuolo G, Donato C, De Carolis E, *et al.* *Candida utilis* catheter-related bloodstream infection. *Med Mycol Case Rep.* 2014;6:70-2.
222. Ryabova OB, Chmil OM, Sibirny AA. Xylose and cellobiose fermentation to ethanol by the thermotolerant methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha*. *FEMS Yeast Res.* 2003;4(2):157-64.
223. Bar-Meir M, Sutton DA, Wickes B, *et al.* Catheter-related fungemia due to *Candida thermophila*. *J Clin Microbiol.* 2006;44(8):3035-6.

11. Publikační činnost v průběhu DSP

11.1. Publikace v časopisech s impakt faktorem

1. Thongsri Y, Wonglakorn L, Chaiprasert A, **Svobodova L**, Hamal P, Pakarasang M, Prariyachatigul Ch. Evaluation for the clinical diagnosis of *Pythium insidiosum* using a single-tube nested PCR. *Mycopathologia*. 2013;176(5-6):369-76.
2. Holý O, Matoušková I, Kubátová A, Hamal P, **Svobodová L**, Jurásková E, Raida L. Monitoring of microscopic filamentous fungi in indoor air of the transplant unit. *Cent Eur J Public Health*. 2015;23(4):331-4.
3. **Svobodova L**, Bednarova D, Ruzicka F, Chrenkova V, Dobias R, Mallatova N, Buchta V, Kocmanova I, Olisarova P, Stromerova N, Thongsri Y, Hamal P. High frequency of *Candida fabianii* among clinical isolates biochemically identified as *Candida pelliculosa* and *Candida utilis*. *Mycoses*. 2016;59(4):241-6.
4. **Svobodová L**, Bednářová D, Hamal P. Prevalence *Candida pelliculosa*, *Candida utilis* a *Candida fabianii* ve Fakultní nemocnici Olomouc - epidemiologická studie. *Epidemiol Mikrobiol Imunol*. 2016;65(1):34-8.

11.2. Publikace v recenzovaných časopisech bez impakt faktoru

1. Hamal P, Raclavský V, **Svobodová L**, Koukalová D. Současné možnosti antimykotické léčby invazivní kandidózy na jednotkách intenzivní péče. *Klin Mikrobiol Inf Léč*. 2010;16(5):164-70.
2. Hamal P, **Svobodová L**. Mykózy a antimykotika. *Interní Med*. 2011;13(11):445-9.
3. Hamal P, **Svobodová L**. Mykotické infekce a jejich laboratorní diagnostika. *Infekční nemoci. Diagnostika a léčba infekčních nemocí v ambulantní praxi*. 2011;D5:D1-32.
4. Hubka V, Větrovský T, Dobiášová S, Skořepová M, Lysková P, Mencl K, Mallátová N, Janouškovcová H, Hanzlíčková J, Dobiáš R, Čmoková A, Stará J, Hamal P, **Svobodová L**, Kolařík M. Molekulární epidemiologie dermatofytóz v České republice - výsledky dvouleté studie. *Čes-slov Derm*. 2014;89(4):167-74.
5. Čmoková A, Hamal P, **Svobodová L**, Hubka V. Detekce, identifikace a typizace dermatofytů molekulárně genetickými metodami. *Čes-slov Derm*. 2014;89(4):175-86.
6. **Svobodová L**, Lysková P, Hamal P. Kandidová vulvovaginitida. *Klin Mikrobiol Inf Léč*. 2015;21(3):74-81.

11.3. Přednášky a postery s abstraktem

1. Hamal P, **Svobodová L**, Raclavský V, Koukalová D. Epidemiologie nozokomiální kandidémie. *Sborník přednášek 15. pracovního setkání „Antibiotická politika“ – Epidemiologie nozokomiálních infekcí*. Soláň. 2011; s. 45-52.
2. **Svobodová L**, Stehlík D, Hamal P. Aspergilová infekce v defektu frontálních kostí po extirpaci ne-Hodgkinova lymfomu – kazuistika. *Sborník XX. konference mladých mikrobiologů - Tomáškovy dny*. Brno. 2011; s. 57-9.
3. **Svobodová L**, Hamal P. Kandidémie v České republice: analýza 2 387 epizod. *Sborník kongresu Klinické mikrobiologie a infekčních nemocí*. Plzeň. 2011; s. 101.
4. **Svobodová L**, Stehlík D, Hamal P. Case report: *Aspergillus* infection in a defect of frontal bones after extirpation of non-Hodgkin lymphoma. *Abstracts of the 5th Trends in Medical Mycology*. Valencie. *Mycoses*. 2011;54(Suppl 2):103.
5. **Svobodova L**, Stehlik D, Hamal P. Surgical wound aspergillosis in a patient with haematological malignancy. *Abstract book of the 2nd Workshop of ÖGMM, ÖGACH, ÖGIT & ÖGHMP: Medical Mycology – From Basic Science to Clinical Needs*. Vídeň. 2011; s. 57.
6. **Svobodová L**, Prášilová L, Šefraná V, Bardoň J, Raclavský V, Hamal P. Differentiation of clinical isolates of *Candida utilis*, *Candida pelliculosa* and *Candida fabianii* using RAPD, McRAPD and the MALDI-TOF MS. *Program and abstracts of the 40th Annual Conference on Yeasts*. Smolenice. 2012; s. 39.
7. **Svobodová L**, Šefraná V, Bardoň J, Hamal P. Differentiation of clinical isolates of *Candida utilis*, *Candida pelliculosa* and *Candida fabianii* using the MALDI-TOF MS. *Abstracts of the 18th Congress of the International Society for Human and Animal Mycology*. Berlín. *Mycoses*. 2012;55(Suppl. 4):280.
8. **Svobodová L**, Šefraná V, Bardoň J, Hamal P. Differentiation of clinical isolates of *Candida utilis*, *Candida pelliculosa* and *Candida fabianii* using the MALDI-TOF MS. *Abstract book of the 3rd Central European Summer Course: Biology of pathogenic fungi*. Szeged. 2012; s. 55.
9. Holý O, Kubátová A, Matoušková I, **Svobodová L**. Roční monitorování mikrobiální kontaminace vnitřního vzduchu na transplantační jednotce hematologické kliniky FN Olomouc. *Sborník abstrakt Prague ONCO Journal*. Praha. 2012; s. 96.

10. Dudová Z, Hubka V, **Svobodová L**, Hamal P, Nováková A, Matsuzawa T, Yaguchi T, Kubátová A, Kolařík M. *Aspergillus viridinutans* complex: polyphasic taxonomy, mating behaviour and antifungal susceptibility testing. *Abstracts of the 6th Trends in Medical Mycology*. Kodaň. *Mycoses*. 2013;56(Suppl 3):371.
11. Dudová Z, Hubka V, **Svobodová L**, Hamal P, Kubátová A, Nováková A, Matsuzawa T, Yaguchi T, Kolařík M. Multilocus phylogeny, antifungal susceptibilities and mating behaviour of opportunistic pathogen *Aspergillus viridinutans* (section *Fumigati*). *Abstracts of the 10th International Mycological Congress*. Bangkok. 2014; s. 699.
12. **Svobodová L**, Stromerová N, Bardon J, Lysková P, Hamal P. Prevalence and identification of *Candida pelliculosa*, *Candida utilis* and *Candida fabianii* in clinical samples. *Abstracts of the 48th Annual Meeting of the German-Speaking Mycological Society (DMyKG) together with Austrian Society of Medical Mycology (ÖGMM)*. Salzburg. *Mycoses*. 2014;57(Suppl 2):34.
13. Cmoková A, Hubka V, Kolarík M, Dobiášová S, Skorepová M, Lysková P, Mencl K, Mallátová N, Janouskovicová H, Hanzlíčková J, **Svobodová L**, Hamal P. Epidemiology of dermatophytosis caused by *Arthroderma benhamiae* in Czech Republic. *Abstracts of the 48th Annual Meeting of the German-Speaking Mycological Society (DMyKG) together with Austrian Society of Medical Mycology (ÖGMM)*. Salzburg. *Mycoses*. 2014;57(Suppl 2):41.
14. Lysková P, Tyll T, Hubka V, Muller M, Zelenka L, Curdova M, Kolarik M, **Svobodova L**, Hamal P. A case of cutaneous mucormycosis caused by *Lichtheimia corymbifera*. *Abstracts of the 7th Trends in Medical Mycology*. Lisabon. *Mycoses*. 2015;58(Suppl 4):119.
15. Lyskova P, Hubka V, Petricakova A, Dobias R, Kolarik M, **Svobodova L**, Hamal P. Equine dermatophytosis due to *Trichophyton bullosum* in the Czech Republic. *Abstracts of the 7th Trends in Medical Mycology*. Lisabon. *Mycoses*. 2015;58(Suppl 4):126.
16. **Svobodova L**, Lyskova P, Hamal P. Epidemiology of *Candida pelliculosa*, *Candida utilis* and *Candida fabianii* in the Czech Republic. *Abstracts of the 7th Trends in Medical Mycology*. Lisabon. *Mycoses*. 2015;58(Suppl 4):136.
17. Hubka V, Dudova Z, Yaguchi T, Horie Y, Matsuzawa T, Novakova A, **Svobodova L**, Hamal P, Kolarik M. Insight into the intricate taxonomy of *Aspergillus viridinutans*

- complex (section *Fumigati*) comprising opportunistic human and animal pathogens. *Abstracts of the 7th Trends in Medical Mycology*. Lisbon. *Mycoses*. 2015;58(Suppl 4):225.
18. Hamal P, Hubka V, Cmokova A, Vetrovsky T, **Svobodova L**, Dobiasova S, Skorepova M, Mallatova N, Lyskova P, Mencl K, Janouskovcova H, Hanzlickova J, Kolarik M. Molecular epidemiology of dermatophytosis: results of a three year multicentric survey in the Czech Republic. *Abstracts of the 4th European Confederation of Medical Mycology Educational Symposium*. Tel-Aviv. *Mycoses*. 2016;59(Suppl 1):14.
19. **Svobodova L**, Stehlik D, Hamal P. Surgical wound aspergillosis in a patient with non-Hodgkin lymphoma. *Abstracts of the 4th European Confederation of Medical Mycology Educational Symposium*. Tel-Aviv. *Mycoses*. 2016;59(Suppl 1):16.
20. **Svobodová L**, Hamal P. *Candida fabianii* – emergentní patogen v klinických vzorcích. *Sborník přednášek 20. pracovního setkání „Antibiotická politika“ – Infekce u onkologických a hemato-onkologických pacientů*. Soláň. 2016; s. 17-18.

12. Seznam tabulek, grafů, obrázků a zkratk

12.1. Seznam tabulek

- Tab. 1:** Rizikové faktory systémové mykotické infekce
- Tab. 2:** "Kandida skóre" u non-neutropenických pacientů
- Tab. 3:** Přehled laboratorních metod používaných k identifikaci kvasinek
- Tab. 4:** Mikroskopický vzhled vybraných druhů kvasinek
- Tab. 5:** Rozdíly v metodice mezi dokumenty M27-A3 a E.Def. 7.3
- Tab. 6:** Demonstrace zpracované databáze kultur kvasinek
- Tab. 7:** Schéma uspořádání mikrotitrační destičky Sensititre YeastOne YO10
- Tab. 8:** Interpretační kritéria CLSI pro testování citlivosti kandid k antimykotikům
- Tab. 9:** Přehled numerických profilů kvasinkových izolátů získaných soupravou ID 32C
- Tab. 10:** Porovnání výsledků identifikace kvasinek hmotnostní spektrometrií a sekvenační analýzou
- Tab. 11:** Porovnání počtu izolátů *Candida fabianii*, *Candida pelliculosa* a *Candida utilis* v klinických vzorcích
- Tab. 12:** Porovnání počtu izolátů *Candida fabianii*, *Candida pelliculosa* a *Candida utilis* ve zdravotnických zařízeních
- Tab. 13:** Porovnání rozmezí a průměrných MIC antimykotik po 48 h u izolátů *Candida fabianii*, *Candida pelliculosa* a *Candida utilis*
- Tab. 14:** Porovnání interpretací citlivosti k antimykotikům u izolátů *Candida fabianii*, *Candida pelliculosa* a *Candida utilis*
- Tab. 15:** Porovnání průměrných MIC antimykotik (v µg/ml) *Candida fabianii* u mužů a žen
- Tab. 16:** Porovnání průměrných MIC antimykotik (v µg/ml) *Candida fabianii* mezi věkovými skupinami pacientů
- Tab. 17:** Porovnání průměrných MIC antimykotik (v µg/ml) *Candida fabianii* mezi druhy klinického materiálu
- Tab. 18:** Porovnání průměrných MIC antimykotik (v µg/ml) *Candida fabianii* mezi participujícími zdravotnickými zařízeními
- Tab. 19:** Přehled publikovaných systémových mykóz způsobených *Candida fabianii*
- Tab. 20:** Přehled publikovaných kazuistik s etiologickou rolí *Candida pelliculosa*

Tab. 21: Přehled numerických profilů *Candida fabianii* a *Candida pelliculosa* získaných soupravou ID 32C

12.2. Seznam grafů

- Graf 1:** Druhové spektrum studovaného souboru kvasinek (n=256) získané pomocí (a) biochemické soupravy ID 32C a (b) hmotnostní spektrometrie
- Graf 2:** Počty izolovaných kvasinek včetně druhového zastoupení ve věkových skupinách pacientů
- Graf 3:** Rozložení MIC amfotericinu B u studovaného souboru kvasinek po 24 a 48 h
- Graf 4:** Rozložení MIC flucytosinu u studovaného souboru kvasinek po 24 a 48 h
- Graf 5:** Rozložení MIC flukonazolu u studovaného souboru kvasinek po 24 a 48 h
- Graf 6:** Rozložení MIC itrakonazolu u studovaného souboru kvasinek po 24 a 48 h
- Graf 7:** Rozložení MIC vorikonazolu u studovaného souboru kvasinek po 24 a 48 h
- Graf 8:** Rozložení MIC posakonazolu u studovaného souboru kvasinek po 24 a 48 h
- Graf 9:** Rozložení MIC kaspofunginu u studovaného souboru kvasinek po 24 a 48 h
- Graf 10:** Rozložení MIC mikafunginu u studovaného souboru kvasinek po 24 a 48 h
- Graf 11:** Rozložení MIC anidulafunginu u studovaného souboru kvasinek po 24 a 48 h
- Graf 12:** Rozložení MIC flukonazolu u izolátů *Candida fabianii* podle typu klinického materiálu.
- Graf 13:** Rozložení MIC itrakonazolu u izolátů *Candida fabianii* podle typu klinického materiálu
- Graf 14:** Rozložení MIC vorikonazolu u izolátů *Candida fabianii* podle typu klinického materiálu
- Graf 15:** Rozložení MIC posakonazolu u izolátů *Candida fabianii* podle typu klinického materiálu
- Graf 16:** Procentuální porovnání interpretace MIC izolátů *Candida fabianii* mezi participujícími zdravotnickými zařízeními

12.3. Seznam obrázků

- Obr. 1:** Morfologie kolonií na chromogenní půdě COLOREX *Candida*
- Obr. 2:** Vzájemné odlišení druhu *Candida albicans* (vlevo) a *Candida dubliniensis* (vpravo) pomocí diagnostické soupravy ELITex Bicolor *dubliniensis*
- Obr. 3:** Schéma elektroforézy v ortogonálním poli

- Obr. 4:** Princip jednotlivých variant pulzní gelové elektroforézy
- Obr. 5:** Schéma hmotnostního spektrometru s technologií MALDI-TOF
- Obr. 6:** Kultury *Candida fabianii*, *Candida pelliculosa* a *Candida utilis* na Sabouraudově agaru po 48 h/37 °C
- Obr. 7:** Makrokolonie *Candida fabianii*, *Candida pelliculosa* a *Candida utilis* na Sabouraudově agaru po 10 dnech/37 °C
- Obr. 8:** Kultury *Candida fabianii*, *Candida pelliculosa* a *Candida utilis* na chromogenní půdě po 48 h/37 °C
- Obr. 9:** Mikroskopický vzhled kultur *Candida fabianii*, *Candida pelliculosa* a *Candida utilis* na rýžovém agaru
- Obr. 10:** Hmotnostní spektrum *Candida fabianii*
- Obr. 11:** Reprezentativní karyotypy *Candida fabianii*, *Candida pelliculosa* a *Candida utilis*
- Obr. 12:** Příklady karyotypů *Candida fabianii*
- Obr. 13:** Demonstrace příbuznosti karyotypů vybraných klinických izolátů kvasinek metodou pulzní gelové elektroforézy
- Obr. 14:** Reprezentativní dendrogram příbuznosti karyotypů *Candida fabianii* z hlediska pohlaví a věku pacientů
- Obr. 15:** Charakter zákalu v jamce s methyl-D-glukopyranosidem u *Candida pelliculosa* s pravděpodobností identifikace 54,2-99,7 % (nahore), resp. 99,9 % (dole)

12.4. Seznam zkratk

AIDS	syndrom získané imunodeficience
AMB	amfotericin B
AND	anidulafungin
AST	kasitonový agar (Antimycotic Sensitivity Agar)
CFU	jednotky tvořící kolonie
CLSI	Ústav pro klinické a laboratorní standardy (Clinical and Laboratory Standard Institute)
DNA	deoxyribonukleová kyselina
dNTPs	deoxynukleosidtrifosfáty
HIV	virus lidského imunodeficitu

EUCAST	Evropské komise pro testování antimikrobiální citlivosti (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing)
FCZ	flucytozin
FLA	flukonazol
FN	fakultní nemocnice
ITR	itakonazol
JIP	jednotka intenzivní péče
KAS	kaspofungin
kb	kilobáze
KET	ketokonazol
MALDI	hmotnostní spektrometrie
MDG	α -metyl-D-glukopyranosid
MIC	minimální inhibiční koncentrace
MIK	mikafungin
NASBA	metoda amplifikace RNA pomocí 3 enzymů
OR	organické rozpouštědlo
PCR	polymerázová řetězová reakce
PFGE	pulzní gelová elektroforéza
POS	posakonazol
RAPD	náhodná amplifikace polymorfní DNA
RFLP	delkový polymorfismus restrikčních fragmentů
RNA	ribonukleová kyselina
SGA	Sabouraudův glukózový agar
VOR	vorikonazol