

Univerzita Palackého v Olomouci

Lékařská fakulta

Ústav mikrobiologie

Testování citlivosti kryptických druhů aspergilů ze sekcí *Fumigati* a
Nidulantes mikrodilučními standardizovanými metodami

RNDr. Pavlína Lysková

Doktorská disertační práce

Olomouc 2019

Vedoucí práce: Doc. MUDr. Petr Hamal, PhD.

Prohlašuji, že jsem předloženou dizertační práci „Testování citlivosti kryptických druhů aspergilů ze sekcí *Fumigati* a *Nidulantes* mikrodilučními standardizovanými metodami“ vypracovala samostatně v průběhu doktorského studia pod odborným vedením školitele doc. MUDr. Petra Hamala. Ph.D. s použitím uvedených literárních zdrojů.

V Olomouci dne:

RNDr. Pavlína Lysková

Poděkování:

Za pomoc při zavádění metodiky EUCAST bych chtěla poděkovat pracovníkům Ústavu mikrobiologie Lékařské fakulty Univerzity Palackého v Olomouci, a to zejména svému školiteli, doc. MUDr. Petru Hamalovi, Ph.D, a dále MDDr. Lucii Svobodové, Ph.D, Jitce Tiché, Ing. Magdaleně Röderové, Ph.D, Janě Gottwaldové a všem ostatním, kteří se mnou měli trpělivost a byli mi nápomocní, pokud jsem potřebovala s něčím pomoci nebo poradit. Za umožnění studia a podporu při studiu bych chtěla poděkovat také svému zaměstnavateli – Zdravotnímu ústavu se sídlem v Ústí nad Labem. Za neocenitelnou pomoc při shánění „vzácných kmenů“ z celého světa pro testování citlivostí, za jejich molekulární identifikaci a spoustu cenných rad a trpělivost při psaní odborných článků bych ráda poděkovala MUDr. et Mgr. Vítu Hubkovi, Ph.D. Dále bych také ráda poděkovala za pomoc Mgr. Radimu Dobiášovi a Mgr. Mirkovi Kolaříkovi, Ph.D. V neposlední řadě také své rodině a přátelům za jejich trpělivost a podporu při studiu.

Práce byla finančně podporována granty IGA_LF_2015_021, IGA_LF_2016_022 a IGA_LF_2017_031.

Obsah

1. Přehled problematiky	7
1.1. Rod <i>Aspergillus</i> a jeho klinický význam	7
1.1.1. Onemocnění vyvolaná zástupci r. <i>Aspergillus</i>	7
1.1.2. Terapie aspergilových infekcí	10
1.1.3. Rezistence druhu <i>Aspergillus fumigatus</i> k antimykotikům	11
1.1.4. Kryptické druhy aspergilů	12
1.1.4.1. Zástupci kryptických kmenů komplexu <i>viridinutans</i> ze sekce <i>Fumigati</i>	14
1.1.4.2. Zástupci kryptických kmenů ze sekce <i>Nidulantes</i>	16
1.2. Metodiky testování citlivosti <i>in vitro</i>	19
1.2.1. Standardizované metodiky testování citlivosti k antimykotikům	19
1.2.2. Komerční metody pro testování citlivosti k antimykotikům	20
1.2.2.1. Kvalitativní metody	20
1.2.2.2. Kvantitativní metody	21
1.2.2.2.1. Etest	21
1.2.2.2.2. Sensititre YeastOne	22
1.2.2.3. Testování rezistence k azolovým antimykotikům	23
2. Cíle práce	24
3. Materiál a metody	26
3.1. Použité kmeny	26
3.2. Antimykotika	28
3.3. Metodika EUCAST-AFST E. Def 9.3.	28
3.3.1. Postup přípravy média	28

3.3.2. Příprava zásobního roztoku	29
3.3.3. Příprava pracovního roztoku	30
3.3.4. Příprava inokula	32
3.3.5. Inokulace mikrotitračních destiček	32
3.3.6. Inkubace mikrotitračních destiček a odečítání výsledků	33
3.3.7. Kontrola kvality – kontrolní kmeny	34
3.4. Sensitre YeastOne	34
3.5. Analýza dat	35
4. Výsledky	36
4.1. Výsledky testování citlivosti aspergilů sekce <i>Fumigati</i> komplexu <i>viridinutans</i>	36
4.1.1. Hodnocení MIC standardizovanou metodikou EUCAST	36
4.1.2. Porovnání MIC podle EUCAST s YO	36
4.2. Výsledky testování citlivosti aspergilů ze sekce <i>Nidulantes</i>	46
4.2.1. Hodnocení MIC standardizovanou metodikou EUCAST	46
4.2.2. Porovnání MIC podle EUCAST s YO	51
5. Diskuse	54
5.1. Prevalence kryptických zástupců v klinickém materiálu	54
5.2. BP a ECOFF	54
5.3. Zástupci kryptických kmenů komplexu <i>viridinutans</i> sekce <i>Fumigati</i>	55
5.4. Zástupci <i>A. nidulans sensu stricto</i> a kryptické kmeny ze sekce <i>Nidulantes</i>	57
5.5. Porovnání EUCAST a panelu YeastOne pro testování aspergilů	60

6. Závěr	62
7. Souhrn	63
8. Summary	65
9. Literatura	67
10. Publikační činnost v průběhu DSP	80
10.1. Publikace v časopisech s impakt faktorem	80
10.2. Publikace v recenzovaných časopisech bez impakt faktoru	81
10.3. Přednášky a postery s abstraktem	82
11. Seznam tabulek, grafů, obrázků a zkratk	86
11.1. Seznam tabulek	86
11.2. Seznam grafů	86
11.3. Seznam obrázků	88
11.4. Seznam zkratk	89
12. Přílohy	92

1. Přehled problematiky

1.1 Rod *Aspergillus* a jeho klinický význam

1.1.1. Onemocnění vyvolaná zástupci r. *Aspergillus*

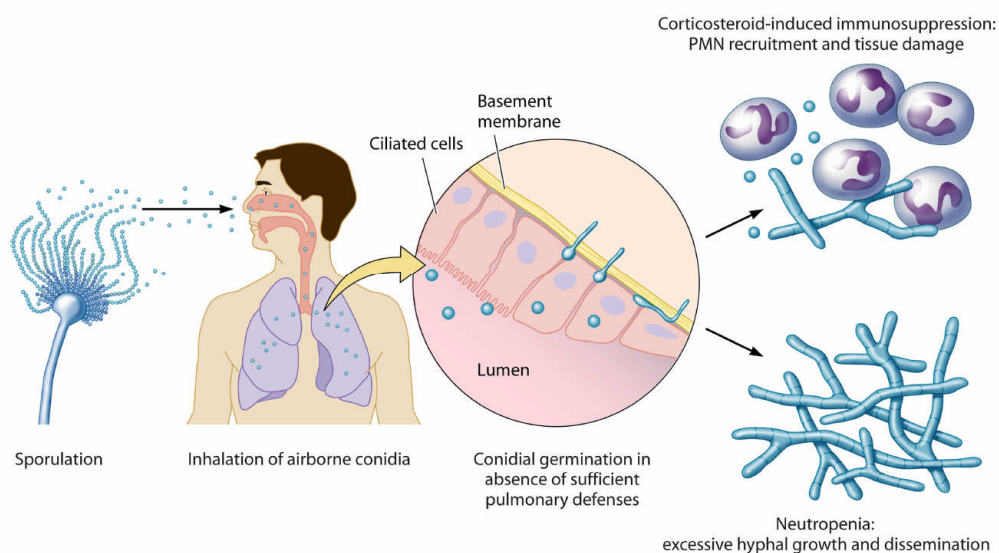
Rod *Aspergillus* zahrnuje převážně půdní saprotrofy, vyskytující na různých tlejících substrátech. Jedná se o oportunní patogeny, proto systémové infekce u relativně zdravých hostitelů (tj. u kterých nebyl zjištěn imunodeficit) jsou velmi vzácné (1). Aspergilóza je nejčastější systémovou infekcí vyvolanou vláknitými houbami. Hlavním etiologickým agens je *Aspergillus fumigatus sensu stricto* (2). Jeho schopnost vyvolat infekci souvisí s velikostí spór, které jsou schopny proniknout až do plicních alveolů (3). Nejčastější vstupní branou infekce jsou plíce (4).

V imunitní odpovědi hostitele na přítomnost aspergilových spor nebo hyf se uplatňují dva druhy fagocytujících buněk - plicní alveolární makrofágy a granulocyty (3). Vznik infekce v závislosti na interakci houba-hostitel je znázorněn na obrázku 1.

Spektrum klinických forem aspergilóz je velmi široké a závisí na imunitním stavu hostitele. Jedná se o lokální (např. otitis externa, onychomykózy, aspergilom), semiinvazivní (např. chronická plicní aspergilóza [CPA]) nebo závažné invazivní systémové mykózy s vysokou mírou mortality (4). Dalšími možnými zdravotními komplikacemi v souvislosti se zmíněnými vláknitými houbami jsou alergické formy onemocnění a mykotoxikózy. Alergická bronchopulmonární aspergilóza je komplexní reakce organismu na zvýšenou přítomnost houby v dýchacích cestách (5). Nejčastěji se vyskytuje jako komplikace u astmatu a cystické fibrózy. Dochází při ní ke zvýšení hustoty bronchiálního sekretu a permanentní alergická zánětlivá reakce ve stěně průdušek navozuje těžké projevy onemocnění (5). Mykotoxikózy jsou způsobeny přítomností mykotoxinů, což jsou sekundární metabolity aspergilů, které

mohou mít akutní nebo chronický nepříznivý vliv na zdraví nejen lidí, ale i zvířat a pěstovaných plodin. Mezi nejdůležitější mykotoxiny uvedených mikromycet se řadí aflatoxin, ochratoxin, trichoteceny, fumonisiny a další. Jedním z nejvýznamnějších producentů těchto látek je *Aspergillus flavus* (6).

Obr. 1. Patogeneze plicní infekce vyvolané *Aspergillus fumigatus* (převzato z Dagenais et Keller [3])



V zevním prostředí se na sporulujícím konidioforu vytváří velké množství konidií, které se šíří vzduchem, mohou být vdechnuty a dostat se až do dolních cest dýchacích. Spóry, které mají malou velikost, mohou proniknout až do alveolů. Pokud nejsou efektivně odstraněny, začnou klíčit a dochází ke vzniku invazivní infekce. Její forma se liší v závislosti na typu imunosuprese: buď dojde k zánětu navozenému terapií kortikosteroidy za účasti granulocytů nebo, při jejich chybění, k nekontrolovanému růstu hyf s rizikem následné diseminace.

Jak již bylo zmíněno, patogenní potenciál uvedených vláknitých hub je nízký, nejdůležitější pro vznik aspergilózy jsou proto rizikové faktory na straně pacienta. Mezi ně patří neutropenie, terapie kortikosteroidy, různá plicní onemocnění, např. tuberkulóza (TBC), nebo chronická obstrukční plicní nemoc (CHOPN), dále traumata či popáleniny (4,5,7).

U invazivních infekcí je nejčastější postižení plic, přičemž hlavním etiologickým agens je *A. fumigatus*. Dalšími druhy vyvolávajícími zmíněné mykózy u člověka jsou *Aspergillus flavus*, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus niger* a *Aspergillus terreus* (8). Vzhledem k tomu, že klinické spektrum plicních infekcí je velmi široké, hovoří se v současné době o tzv. plicních aspergilových syndromech. Jedná se o širokou škálu přechodových forem: od kolonizace hostitele, kdy nedochází k angioinvasi a postižení se vyvíjí měsíce až roky, přes chronické semiinvazivní formy, které mohou nebo nemusí být doprovázeny angioinvasí vláken a probíhají týdny až měsíce, až po těžké invazivní infekce plic u neutropenických pacientů, které je ohrožují již za dny až týdny (5).

Podle míry diagnostické jistoty je přítomnost invazivní aspergilózy rozdělena do tří stupňů – prokázaná, pravděpodobná a možná (viz tabulka 1). Aby byla infekce prokázaná, je nezbytný histopatologický nebo kulturační či mikroskopický průkaz houby v primárně sterilním materiálu. Pravděpodobná aspergilóza vyžaduje přítomnost alespoň jednoho kritéria z každé ze tří kategorií, kterými jsou rizikové faktory na straně hostitele, dále klinické a mykologické známky infekce (9).

Tab. 1. Definice míry diagnostické jistoty u invazivní aspergilózy (převzato z Haber *et al.* [5])

Diagnóza IPA	Kritéria
Prokázaná IPA	Histopatologický nebo mikrobiologický (kulturační či mikroskopický) průkaz aspergila v primárně sterilním materiálu (tkáň, mozkomíšní mok, apod.)
Pravděpodobná IPA	Přítomnost alespoň jednoho kritéria z každé ze tří kategorií: 1. Faktory na straně hostitele, např. těžká neutropenie ($<0,5 \times 10^9/l$) trvající déle než 10 dní, nebo dlouhodobá (>3 týdny) léčba kortikosteroidy 2. Klinická kritéria, tj. známky infekce dolních dýchacích cest

	<p>s přítomností jednoho ze tří nálezů na HRCT plic:</p> <p>a) „halo sign“</p> <p>b) air-crescent sign (rozpádová dutinka ve tvaru srpku) a</p> <p>c) kavitace</p> <p>3. mykologická kritéria, tj. kultivační pozitivita z nesterilních lokalit (BAT) anebo pozitivita některého z biologických markerů (GM, BDG, PCR)</p>
Možná IPA	Pacient s rizikovými faktory, u něhož jsou současně přítomny klinické příznaky, s velkou pravděpodobností zapříčiněné IPA (včetně nálezu při použití zobrazovacích metod), přičemž mikrobiologický průkaz IPA chybí.

HRCT – vysoce rozlišující počítačová tomografie, IPA - invazivní plicní aspergilóza; BAT – bronchoalveolární tekutina; GM – galaktomanan; BDG – beta-D-glukan; PCR – polymerázová řetězová reakce

1.1.2. Terapie aspergilových infekcí

Léčba aspergilózy závisí na jejich lokalizaci a typu. K terapii lokálních infekcí (např. otitis externa) je možno použít místní antimykotika (ATM), zatímco u pacientů s invazivními formami onemocnění a u pacientů imunokompromitovaných je nutné použít ATM systémová. U některých forem infekce se volí chirurgická léčba nebo se kombinuje s farmakoterapií (10,11).

Ze systémových ATM připadají v úvahu azolové antifungální látky, kam patří vorikonazol (VRC), isavukonazol (ISA), posakonazol (POS) a itrakonazol (ITC), ze skupiny polyenů amfotericin B (AMB) a dále echinokandinová ATM, tj. anidulafungin (AFG), mikafungin (MFG) a kaspofungin (CAS). Jako lék volby pro terapii invazivních aspergilových infekcí je doporučován VRC pro svůj fungicidní efekt a v současné době také novější preparát ISA, který má srovnatelnou účinnost a je pacienty lépe tolerován. V druhé linii se obvykle volí

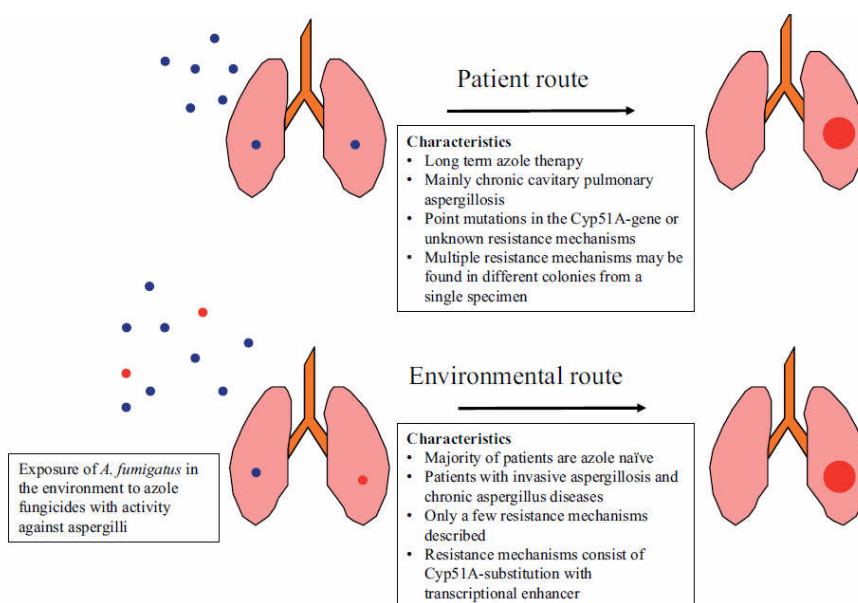
lipidové formy AMB (5,12-14). V profylaxi u vysoce rizikových hematoonkologických pacientů se používá zejména perorální forma POS (15).

1.1.3. Rezistence druhu *Aspergillus fumigatus* k antimykotikům

Aspergillus fumigatus obvykle bývá velmi dobře citlivý ke všem uvedeným ATM, doporučovaným k léčbě systémových infekcí (16). V posledních letech však byly v Evropě i jinde ve světě zjištěny kmeny, které mohou být rezistentní k azolovým ATM včetně VRC. V Evropě byla zjištěna rezistence zejména v souvislosti s používáním fungicidních preparátů v zemědělství (viz obrázek 2), a to v souvislosti s bodovou mutací genu pro 14- α -sterol demetylázu (CYP51A), která kóduje cíl azolů (mutace TR34/L98H) (17,18). Uvádí se, že azolová rezistence je v Evropě poměrně rozšířená, průměrná zjištěná míra necitlivých izolátů *A. fumigatus* je 3,2 % (19). Situaci v ČR bohužel neznáme, avšak první kmen *A. fumigatus* rezistentní k azolovým ATM s mutací TR34/L98H byl izolován autorkou této práce z klinického materiálu v loňském roce (26.10.2018).

Ke vzniku rezistence však nemusí dojít pouze v přírodě, mutace může nastat také v průběhu léčby pacienta jak je demonstrováno na obrázku 2 (20,21). V oblastech, kde environmentální rezistence *A. fumigatus* dosahuje 10 % a více, je jako první linie doporučena kombinovaná terapie VRC s echinokandiny nebo lipozomální AMB (20). Neblahým důsledkem infekce rezistentními kmeny je zvýšení mortality pacientů (22,23). Z tohoto důvodu je důležité vhodnými metodami testovat citlivost u klinicky významných izolátů, zejména v průběhu dlouhodobé terapie, a sledovat vývoj epidemiologické situace v ČR.

Obr. 2. Cesty vzniku infekce kmenem *Aspergillus fumigatus* rezistentním k azolovým antimykotikům (převzato z Verweij *et al.* [20])



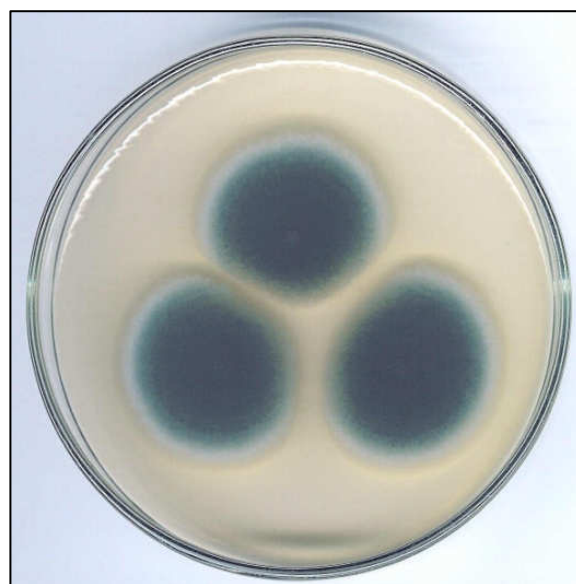
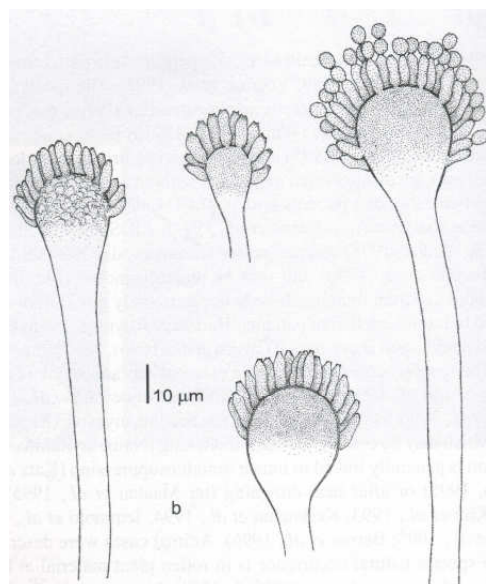
K infekci může dojít změnou původně citlivého kmene během dlouhodobé terapie azoly (patient route), nebo již rezistentním izolátem z prostředí (environmental route). Modře je znázorněn citlivý, červeně rezistentní kmen.

1.1.4. Kryptické druhy aspergilů

Rod *Aspergillus* se dělí do sedmi podrodů, které jsou dále rozděleny do několika sekcí, sdružujících převážně druhy s podobnými morfologickými znaky. Z nich jsou pro lékařskou mykologii nejvýznamnější sekce *Fumigati*, *Flavi*, *Nigri*, *Nidulantes* a *Terrei* (24-27). Invazivní aspergilózu (IA) mohou kromě *A. fumigatus* příležitostně vyvolat další druhy patřící do sekce *Fumigati*, přičemž podstatná většina z nich byla nově popsána až v posledních dvou dekáдах ve spojitosti s pokrokem v oblasti genetických metod (28-30). Tyto druhy jsou často nazývány jako kryptické, protože jsou si vzájemně morfologicky podobné a vypadají jako *A. fumigatus*, proto jsou často za použití běžných identifikačních technik založených na morfologických znacích nesprávně určovány (31-33). V principu ke stejné situaci dochází i

v ostatních zmíněných sekcích. Nesprávná identifikace může mít vážné důsledky, protože zejména druhy příbuzné *A. fumigatus* často vykazují zvýšené hodnoty minimálních inhibičních koncentrací (MIC), popř. rezistenci k azolům nebo jiným ATM. *Aspergillus lentulus*, *Aspergillus udagawae*, *Aspergillus viridinutans* a *Aspergillus thermomutatus* (*Neosartorya pseudofischeri*) ze sekce *Fumigati* byly nejčastěji spojeny s případy refrakterních IA (30). Vzhledem k tomu, že hodnoty MIC kryptických kmenů jsou u velkého počtu ATM vyšší než u druhu *A. fumigatus sensu stricto*, a také z důvodu možné zkřížené rezistence k azolům, je správná druhová identifikace a testování antifungální citlivosti nezbytné pro stanovení vhodné terapie (25,30,34). Doporučení pro léčbu infekcí způsobených těmito druhy však v literatuře zcela chybí.

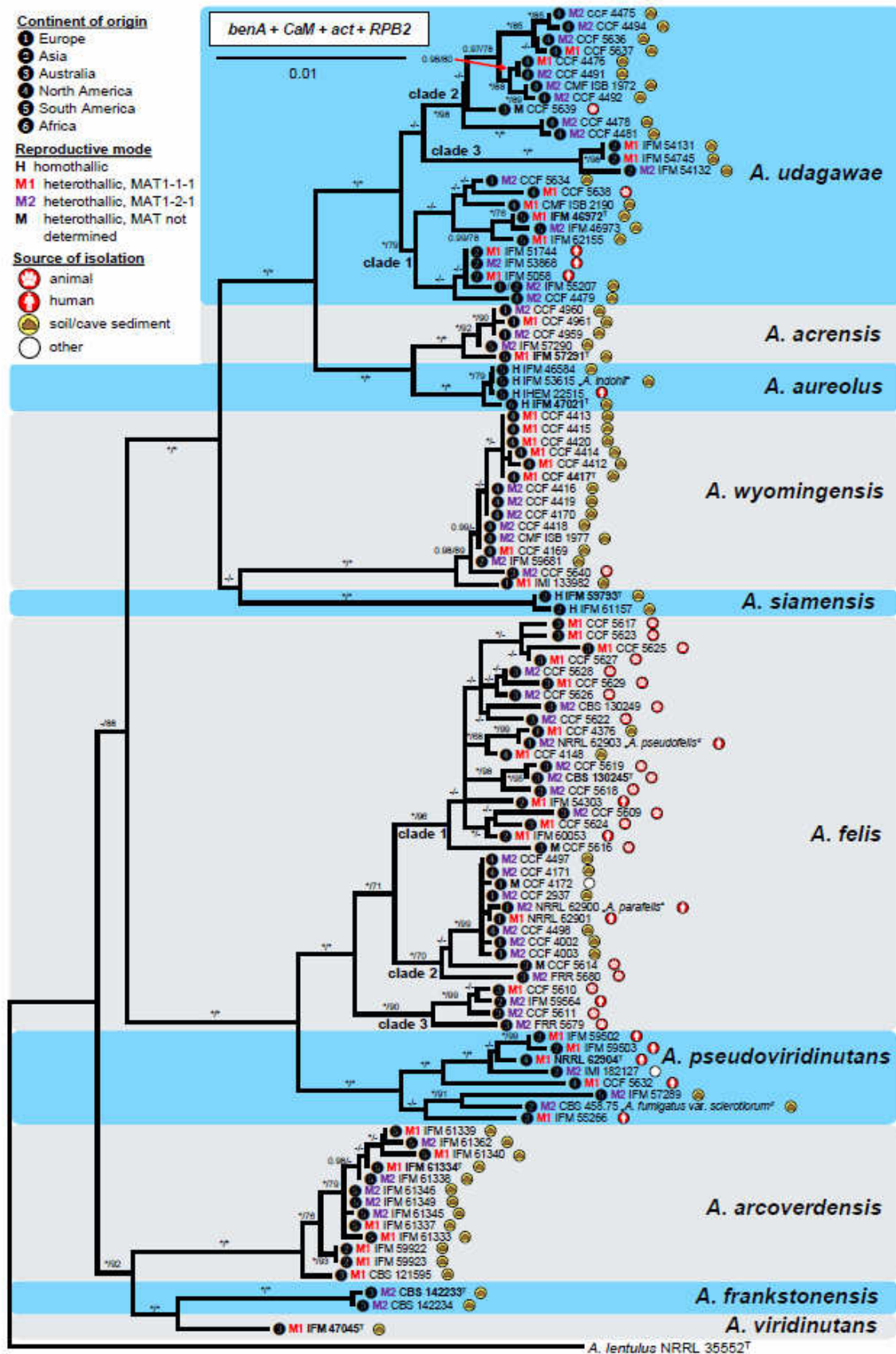
Obr. 3. Morfologie zástupců aspergilů ze sekce *Fumigati*: a) mikromorfologie (převzato z de Hoog *et al.*, 2000), b) makromorfologie (kolonie *A. fumigatus sensu stricto* na Sabouraudově dextrózovém agaru)



1.1.4.1. Zástupci kryptických kmenů komplexu *viridinutans* ze sekce *Fumigati*

Druhový komplex *A. viridinutans*, patřící do podrodu *Fumigati* (viz obrázky 3 a 4), obsahuje morfologicky vzájemně si podobné půdní druhy, které jsou v posledních letech stále častěji uváděny jako původci infekcí lidí a zvířat. Klinické spektrum jimi vyvolaných mykóz zahrnuje u lidí IA, chronické formy aspergilózy a dále keratitidy, u koček sinoorbitalní aspergilózu a u psů diseminovanou IA (25,30,32,33,35). Sekce zahrnuje druhy s typicky uniseriátními fialidami na konidioforech a s měchýřky subklavátního tvaru. Konidie jsou verukózní, obvykle kulovité, nazelenalé barvy (27). Tento komplex v současné době zahrnuje deset druhů a přinejmenším šest z nich bylo prokázáno jako klinicky relevantní (32,33,35-39). V porovnání s druhem *A. fumigatus*, mívají zástupci druhového komplexu *A. viridinutans* zvýšené hodnoty MIC k širší škále antifungálních látek (40). Navzdory relativně velkému počtu recentně publikovaných klinických případů, profily citlivosti těchto izolátů k ATM nebyly dosud testovány ve větším rozsahu.

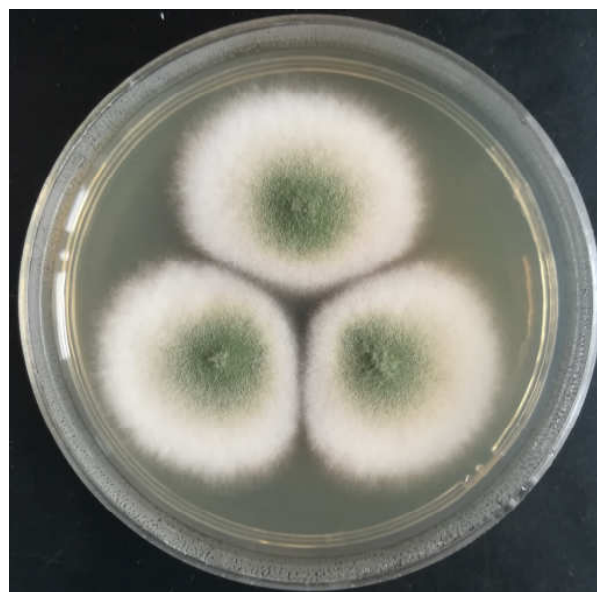
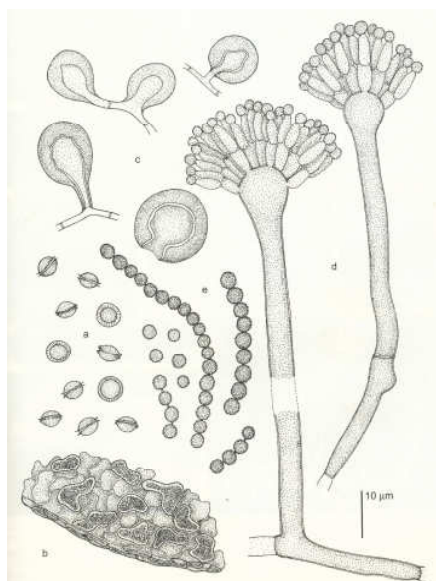
Obr. 4. Dendrogram rodu *Aspergillus*, druhového komplexu *viridinutans* (převzato z Hubka *et al.* [51])



1.1.4.2. Zástupci kryptických kmenů ze sekce *Nidulantes*

Sekce *Nidulantes* (viz obrázky 5 a 6) patří do podrodu *Nidulantes*, kam se řadí ještě dalších osm sekcí (*Aeni*, *Cavernicolus*, *Bisporus*, *Ochraceorosei*, *Silvati*, *Raperi*, *Sparsi*, *Usti*). Uvedená sekce zahrnuje kolem 75 druhů s výraznými morfologickými charakteristikami, jako jsou biseriální konidiofory s hnědě pigmentovanými konidiofory. Pokud kmeny produkují askomata, bývá přítomna masa hülle cells často spolu s červeno-hnědými askosporami (viz obrázek 5).

Obr. 5. Morfologie zástupců aspergilů ze sekce *Nidulantes*: a) mikromorfologie (převzato z deHoog *et al.*, 2000), b) makromorfologie (kolonie *A. spinulosporus* na Malt extrakt agaru)



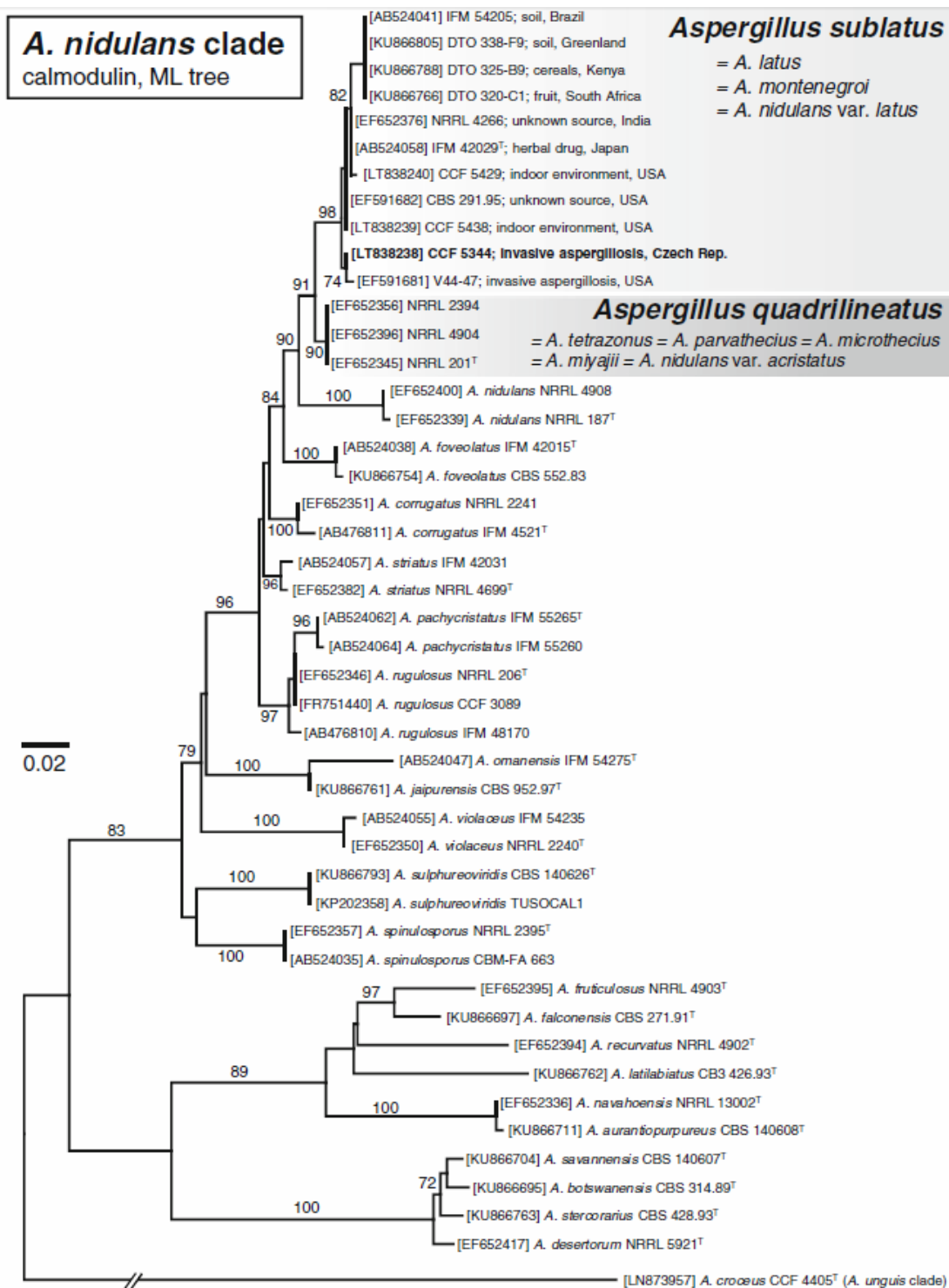
Mikromorfologie (obrázek vlevo): a) askospory, b) části stěny vřecka, c) hülle cells, d) konidiofory, e) konidie

Většina druhů v této sekci vytváří sexuální stádium, které v dřívějším duálním systému názvů mělo teleomorfní označení *Emericella* (41). Duální názvosloví znamená, že pro jeden druh byl rozlišován název pro nepohlavní stádium (tzv. anamorfu) a pohlavní stádium (tzv.

teleomorfu). V současné době je však přijat systém „one fungus = one name“, takže houby se již nepojmenovávají dvěma názvy, ale pouze jedním (42).

V literatuře byla publikována řada článků, ve kterých byl *A. nidulans* uváděn jako původce různých infekcí lidí. Byly popsány případy otomykózy, mycetomu, keratitidy, sinusitidy, plicního aspergilomu a také IA (41,43). Další zástupci této sekce, včetně kryptických druhů, jako *A. spinulosporus* (syn. *A. delacroixii*, *A. nidulans* var. *echinulatus*), *A. dentatus*, *A. protuberus*, *A. quadrilineatus*, *A. sublatus*, *A. unguis*, *A. sydowii*, *A. versicolor* a *A. hongkongensis* byly rovněž zmiňováni jako původci humánních infekcí (44,45).

Obr. 6. Dendrogram rodu *Aspergillus*, sekce *Nidulantes* (převzato z Chrenkova *et al.* [45])



1.2. Metodiky testování citlivosti *in vitro*

1.2.1. Standardizované metodiky testování citlivosti k antimykotikům

Vývoji standardizovaných metodik pro testování citlivosti mikromycet k ATM se věnují dvě instituce. Historicky starší je Ústav pro klinické a laboratorní standardy (CLSI), dříve nazývaný Národní výbor pro klinické laboratorní standardy (NCCLS), v rámci kterého byla ustanovena subkomise pro testování citlivosti k ATM. Ústav vypracoval několik dokumentů, a to dokument M27, popisující diluční bujónovou metodu pro testování citlivosti kvasinek, M38 pro testování vláknitých hub diluční metodou a M44 a M51 pro stanovení citlivosti kvasinek, resp. vláknitých hub diskovou difúzní metodou. V Evropě byla v roce 1997 založena Evropská komise pro testování antimikrobiální citlivosti (EUCAST), v rámci níž vznikla subkomise pro testování antifungální citlivosti (AFST). Členové EUCAST-AFST vytvořili dva dokumenty, E.Def.7.1 a E.Def.9.1, v nichž je popsáno testování citlivosti kvasinek resp. konidioformních vláknitých hub k systémovým ATM mikrodiluční metodou. Metodické postupy CLSI a EUCAST-AFST se principiálně shodují, v některých aspektech se však liší (46). Jedná se zejména o denzitu inokula a způsob přípravy, množství glukózy v médiu a dno jamek v mikrotitračních destičkách. Všechny rozdíly jsou přehledně shrnuty v tabulce 2 (47).

Tab. 2. Rozdíly v metodikách mezi dokumenty M38A CLSI a E.Def. 9.1 EUCAST (upraveno podle Lass-Flörl et Perkhofer [47]).

Charakteristika	CLSI M38A	EUCAST-AFST E.Def. 9.1
Denzita inokula	$0,4 - 5 \times 10^4$ CFU ml ⁻¹	$2 - 5 \times 10^5$ CFU ml ⁻¹
Standardizace inokula	Spektrofotometricky	Burkerova komůrka nebo zákal 0,5 McF (u aspergilů)
Testovací médium	RPMI 1640	RPMI s 2 % glukózy
Mikrotitrační destičky	jamky s kulatým dnem	jamky s plochým dnem

1.2.2. Komerční metody pro testování citlivosti k antimykotikům

1.2.2.1. Kvalitativní metody

Pro kvalitativní testování citlivosti, které umožňuje kategorizaci výsledků jako „citlivý“, „intermediární“ a „rezistentní“, jsou vhodné tablety Neosensitabs se standardizovaným obsahem ATM (Rosco Diagnostica, Dánsko) (46). Metoda je demonstrována na obrázcích 7 a 8. Pro testování kvasinek se jako médium používá Mueller-Hinton agar s methylenovou modří (MHAM), u vláknitých hub je metoda standardizována pro vybraná ATM (AMB, VRC, ITC, POS a CAS) na Mueller-Hintonově agaru (MHA) (48,49). Výhodou je nenáročnost provedení, rychlost a nízká cena. V případě, že se jedná o klinicky relevantní izoláty, měly by být výsledky upřesněny pomocí metod pro stanovení MIC.

Obr. 7. Testování citlivého kmene *Aspergillus fumigatus* k antimykotikům pomocí tablet Neosensitabs na Mueller-Hintonově agaru



MHA – Mueller-Hinton agar, 24h, 37°C, AMPHO – amfotericin B, ITRAC – itrakonazol, POSAC – posakonazol,
CASP5 – kaspofungin, VOR 1 – vorikonazol, PIM – pimaricin

Obr. 8. Testování citlivosti k antimykotikům kmene *Candida glabrata* rezistentního k azolům pomocí tablet Neosensitabs na Mueller-Hintonově agaru s metylénovou modří



MHAM - Mueller-Hinton agar s methylenovou modří, 24h, 37°C, FLUCZ – flukonazol, ITRAC – itrakonazol, MICOZ – mikonazol, KETOC – ketokonazol, VOR 1 – vorikonazol; POSAC – posakonazol, CASP5 – kaspofungin

1.2.2.2. Kvantitativní metody

Pro rutinní testování MIC ATM klinických izolátů kvasinek a vláknitých hub byly vyvinuty techniky odvozené od referenčních metod. V laboratořích je používán zejména Etest a Sentititre YeastOne (46).

1.2.2.2.1. Etest

Etest (bioMérieux, Francie) je inertní plastický proužek, který na jedné straně obsahuje exponenciální gradient koncentrací antimikrobní látky. Na druhé straně proužku je kontinuální stupnice, obvykle odpovídající patnácti ředěním testované antimikrobiální látky. Pro kultivaci se v případě testování citlivosti k antimykotikům používá médium pro tkáňové kultury, tzv. RPMI 1640 (Roosevelt Park Memorial Institute) agar. Na jeho povrch, naočkovaný inokulem testované mikromycety, se položí proužek Etestu. Po inkubaci, trvající

obvykle 24 h, se kolem proužku vytvoří zóna inhibice růstu kapkovitého až elipsovitého tvaru. MIC se odečítá v místě, kde okraj zóny přetíná proužek, jak je demonstrováno na obrázku 9 (46).

Obr. 9. Příklad stanovení minimálních inhibičních koncentrací (MIC) k antimykotikům *Aspergillus lentulus* pomocí diagnostických proužků Etest



Inkubace 48 h, 35°C na RPMI agaru. MIC: POS (posakonazol) 0,38 mg/l, AP (amfotericin B) > 32 mg/l, IT (itraconazol) 1,5 mg/l, VO (vorikonazol) 4 mg/l

1.2.2.2. Sensititre YeastOne

Sensititre YeastOne (YO; TREK Diagnostic Systems, USA) je kolorimetrický mikrodiluční test. Způsob provedení a hodnocení je odvozen od metodiky popsané v dokumentu M27-A2 CLSI. Jamky v mikrotitrační destičce obsahují několik ATM ve vysušeném stavu (např. Sensititre YO10; AFG, MFG, CAS, 5-fluorocytosin, POS, VRC, ITC, FLU a AMB) a kolorimetrický indikátor rezaurin (Alamar blue). Doporučená doba inkubace při 35 °C je 24 h pro kandidy, 72 h pro

kryptokoky a 48–72 h pro aspergily. Růst mikromycet se projeví barevnou změnou v jamce (přechod z původní modré na růžovou). MIC se stanovuje jako nejnižší koncentrace ATM se zachovaným modrým zbarvením, jak je demonstrováno na obrázku 10 (46).

Obr. 10. Příklad stanovení minimálních inhibičních koncentrací (MIC) antimykotik u kmene *Aspergillus felis* pomocí soupravy Sensititre YeastOne



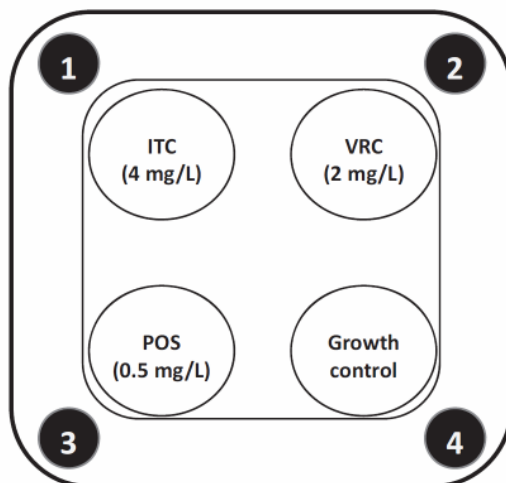
Inkubace 48h, 35°C. MIC AMB 2 mg/l (amfotericin B; sloupec 12), VRC 1 mg/l (vorikonazol; řádek F), ITC 12 mg/l (ittrakonazol; řádek G) a POS 0,12 mg/l (posakonazol; řádek E)

1.2.2.3. Testování rezistence k azolovým antimykotikům

Kromě detekce rezistentních izolátů pomocí referenčních metodik (EUCAST, CLSI), byla popsána také skriningová metoda (E.Def 10.1) pro detekci azolové rezistence u *A. fumigatus* pomocí čtyřjamkové agarové destičky s azolovými ATM (viz obrázek 11). Pokud testovaný kmen roste v jamkách obsahujících jednotlivá ATM, pak se potenciálně může jednat o rezistentní izolát (50). Protože jednotlivé kolonie aspergilů z jednoho vzorku mohou skrývat

různé profily citlivosti/rezistence, mělo by být testováno více kolonií (ideálně do pěti), aby se zvýšila senzitivita záchytu k azolům necitlivých kmenů (14).

Obr. 11. Čtyřjamková destička pro vyhledávání rezistence k azolovým antimykotikům



Destička obsahuje 1 ml média s azolovými antimykotiky (jamky 1-3) a médium bez antimykotik (jamka 4), které slouží jako kontrola růstu; ITC – itrakonazol, VRC – vorikonazol, POS – posakonazol (převzato z Guinea *et al.* [50])

2. Cíle práce

- ✓ Získání praktických zkušeností se standardizovanou metodikou pro testování vláknitých hub k ATM podle dokumentu EUCAST-AFST E.Def.9.3. Metodika nebyla dosud v České republice testována.
- ✓ Stanovení MIC u méně obvyklých klinických izolátů aspergilů se zaměřením na kryptické druhy v sekci *Fumigati* (druhový komplex *viridinutans*) a *Nidulantes*.
- ✓ Porovnání MIC uvedených druhů aspergilů získaných 1) pomocí standardizované metodiky EUCAST-AFST E.Def 9.3 a 2) kolorimetrickou soupravou YO. Zjištění míry

shody výsledků obou metod a z toho vyplývající použitelnost YO pro testování citlivosti těchto druhů aspergilů v rutinních laboratořích lékařské mykologie.

Záměrem této práce bylo zavést v České Republice standardizovanou metodu popsanou odborníky z Evropské komise pro testování antimikrobiální citlivosti zaměřenou na testování antifungálních látek (EUCAST-AFST). Tato metoda umožňuje stanovování hodnot MIC popř. MEC (minimální inhibiční/efektivní koncentrace) u vláknitých hub (nebo kvasinek).

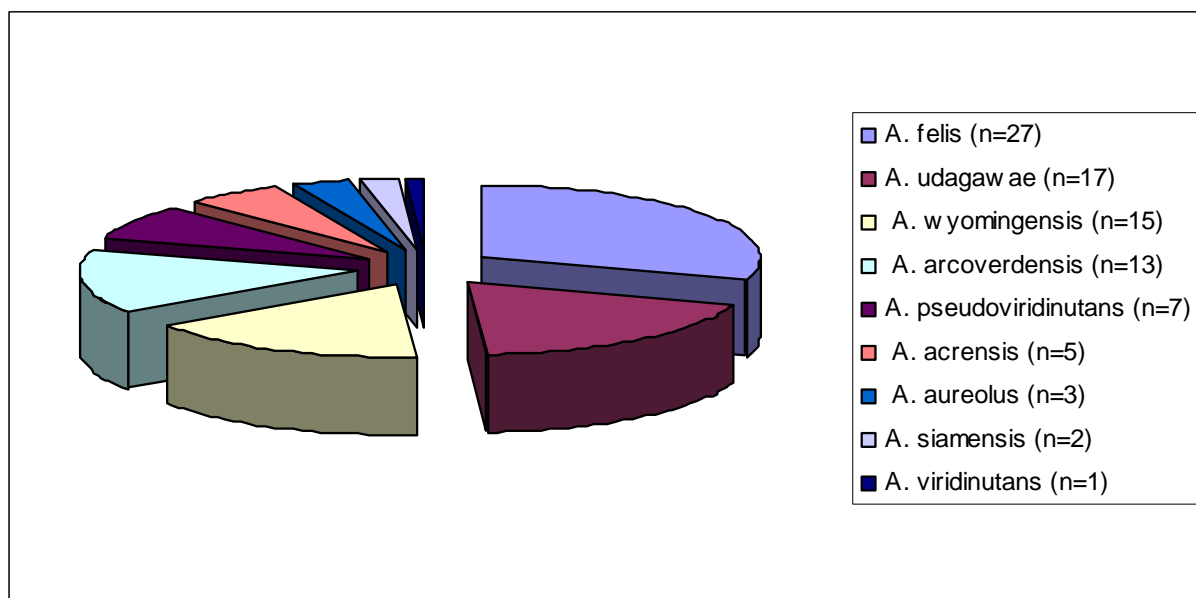
Standardizovanou metodikou měly být testovány kmeny vláknitých hub izolované z klinického materiálu jako pravděpodobné nebo prokázané původce infekce, aby se podařilo zjistit rozmezí hodnot MIC, které by později mohlo posloužit pro stanovení tzv. ECOFF (epidemiological cut-off values). Náplní práce bylo zaměřit se zejména na vzácnější druhy aspergilů, u kterých doposud nebyl testován větší soubor izolátů a pro něž chybějí konzistentnější epidemiologické údaje. Do souboru byly proto kromě kmenů izolovaných přímo z klinického materiálu zařazeny také kmeny izolované z jiných substrátů (např. z půdy), zejména pak kmeny, které jsou uloženy ve sbírkách hub v Praze (Culture Collection of Fungi; CCF) nebo jinde na světě, a jejichž identifikace byla ověřena molekulárně. Získaná epidemiologická data o hodnotách MIC u těchto vzácných druhů by do budoucna měly mít velký přínos pro lékaře a mikrobiology, kteří se s těmito málo nebo méně frekventovanými druhy v klinickém materiálu setkají jako s pravděpodobnými nebo prokázanými původci onemocnění. Zejména tam, kde se podaří identifikovat původce aspergilózy, ale nebude z nějakého důvodu možné rychle, nebo dokonce nebude možné vůbec, otestovat jeho citlivost. U některých méně obvyklých druhů rodu *Aspergillus* podobných *A. fumigatus* (kryptické druhy) byla totiž prokázána snížená citlivost (popř. rezistence) k VRC příp. k dalším anti-aspergilovým ATM.

3. Materiál a metody

3.1. Použité kmeny

Do této studie bylo zařazeno celkem 171 kmenů vybraných druhů aspergilů, a to převážně kryptických zástupců ze sekce *Fumigati* a *Nidulantes*, jejichž identifikace byla ověřena sekvenací vybraných genů. Pro zástupce sekce *Fumigati* z komplexu *A. viridinutans* byly sekvenovány geny pro β -tubulin (*BenA*), kalmodulin (*CaM*), RNA polymerázu II (*RPB2*) a aktin (*act*) (51). Pro zástupce sekce *Nidulantes* byly sekvenovány geny pro kalmodulin (*caM*) a RNA polymerázu II (*RPB2*), které jako jediné z užívaných genů dovedou rozlišit všechny kryptické druhy (33).

Graf 1. Druhové zastoupení izolátů komplexu *Aspergillus viridinutans* (n=90)

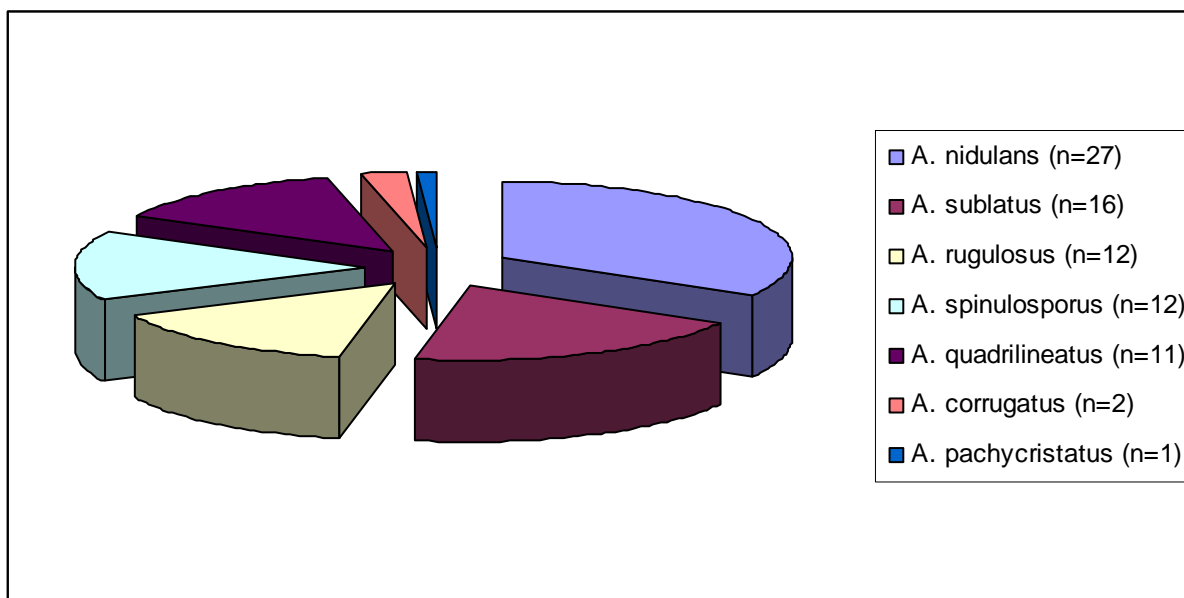


Celkem bylo testováno 90 zástupců komplexu *Aspergillus viridinutans* ze sekce *Fumigati*, kteří byli zastoupeni devíti druhy, jak je znázorněno v grafu č. 1. Z různých materiálů po celém světě (včetně klinických vzorků) byly získány následující druhy: *A. felis* (n=27), *A.*

udagawae (n=17), *A. wyomingensis* (n=15), *A. arcoverdensis* (n=13), *A. pseudoviridinutans* (n=7), *A. acrensis* sp. nov. (n=5), *A. aureolus* (n=3), *A. siamensis* (n=2) a jeden izolát *A. viridinutans*. Přehled těchto izolátů, jejich identifikace a zdroj je uveden v tabulce P1 v příloze. Oběma metodami (EUCAST a YO) byla testována čtyři ATM a to VRC, ITC, POS a AMB. Standardizovanou metodikou pak byly stanovovány hodnoty MEC pro echinokandiny.

Do studie bylo dále zahrnuto 81 kmenů ze sekce *Nidulantes*, které byly zastoupeny sedmi různými druhy, jak je znázorněno v grafu č. 2: *A. nidulans* (n=27), *A. sublatus* (n=16), *A. rugulosus* (n=12), *A. quadrilineatus* (n=11), *A. spinulosporus* (n=12), *A. corrugatus* (n=2) a jeden izolát *A. pachycristatus*. Přehled studovaných izolátů, včetně jejich identifikace a zdroje je uveden v tabulce P2 v příloze. Oběma metodami (EUCAST a YO) byla testována čtyři ATM a to VRC, ITC, POS a AMB.

Graf 2. Druhové zastoupení izolátů aspergilů ze sekce *Nidulantes* (n=81)



3.2. Antimykotika

AFG a VRC byly získány v práškové formě od firmy Pfizer Pharmaceutical Group (USA), MFG od firmy Astellas Pharma Inc. (Japonsko), CAS a POS od firmy Merck Sharp and Dohme Research Laboratories (USA); a ITC a AMB byl zakoupen od firmy Sigma-Aldrich (Česká Republika).

3.3. Metodika EUCAST-AFST E. Def 9.3.

Níže (v bodech 3.3.1-3.3.7) je uveden pracovní postup pro testování citlivosti vláknitých hub v souladu se standardizovanou metodikou EUCAST-AFST, podle kterého byly připraveny mikrotitrační destičky, jak je uvedeno v dokumentu E. Def 9.3 (52).

3.3.1. Postup přípravy média

Základním médiem je RPMI se 2 % glukózy (viz tabulka 3). Médium bylo připraveno přidáním do 900 ml destilované vody spolu s MOPS, dokud se mícháním všechny komponenty zcela nerozpustily. Pomocí 1M NaOH bylo při pokojové teplotě upraveno pH na 7,0. Následně byla doplněna voda do konečného objemu jeden litr. Médium bylo sterilizováno filtrací filtrem s póry o velikosti 0,22 μ l a bylo možno jej uchovávat při 4°C po dobu šesti měsíců. Pro účely kontroly kvality byla použita jedna alikvota sterilního média ke kontrole sterility a k otestování pH (6,9-7,1) a druhá jako růstová kontrola, na které byl otestován růst referenčního kmene.

Tab. 3. Složení RPMI média se 2 % glukózy pufovaného MOPS

Složka	Množství
Destilovaná voda	900 ml
RPMI 1640	20,8 g

MOPS	69,06 g
Glukóza	36 g

3.3.2. Příprava zásobního roztoku

ATM substance v prášku se nechaly vytemperovat při pokojové teplotě. Pro přípravu zásobního roztoku bylo nutné vzít v úvahu potenci dané šarže ATM. Množství látky v suchém stavu anebo rozpouštědla k přípravě standardního roztoku bylo vypočítáno podle následujícího vzorce:

$$\text{Hmotnost (g)} = \frac{\text{objem(l)} \times \text{koncentrace(mg/l)}}{\text{assay_potency(mg/g)}}$$

$$\text{Objem (l)} = \frac{\text{hmotnost(g)} \times \text{assay_potency(mg/g)}}{\text{koncentrace(mg/l)}}$$

ATM prášek byl při vážení 100 mg zvážen na analytických vahách s přesností na dvě desetinná místa. Zásobní roztok byl připraven o koncentraci 200 × vyšší než byla nejvyšší testovaná koncentrace. Rozpouštědla a doporučená rozmezí koncentrací jsou uvedeny v tabulce 4.

Tab. 4. Rozpouštědla pro přípravu zásobního roztoku, charakteristika a příslušné rozmezí testovaných koncentrací antimykotik

Antimykotikum	Rozpouštědlo	Charakteristika	Testovací rozmezí (mg/l)
Amfotericin B	DMSO	Hydrofobní	0,0312 - 16
Anidulafungin	DMSO	Hydrofobní	0,0312 - 16
Kasporfungin	DMSO	Hydrofobní	0,0312 - 16
Itrakonazol	DMSO	Hydrofobní	0,0156 - 8
Mikafungin	DMSO	Hydrofobní	0,0312 - 16
Posakonazol	DMSO	Hydrofobní	0,0156 - 8
Vorikonazol	DMSO	Hydrofobní	0,0156 - 8

Neuvádí-li výrobce jinak, zásobní roztoky byly skladovány v malých objemech ve sterilních propylenových nebo polyesterových lahvičkách minimálně při -70°C a to nejdéle po dobu 6 měsíců (včetně echinokandinů). Po vytažení a rozmrazení byl zásobní roztok použit ještě tentýž den a zůstatek byl vyhozen.

3.3.3. Příprava pracovního roztoku

Rozmezí testovaných koncentrací by mělo zahrnovat breakpoint (BP) a stejně tak i hodnotu MIC, která je očekávána u QC kmene (Quality Control strain; kontrolní kmen). Rozmezí koncentrací pro jednotlivá ATM je uvedeno v tabulce 4. Řada dvojnásobného ředění byla připravena v RPMI médiu se 2 % glukózy (viz tabulka 5, 6). Médium použité v destičkách bylo připraveno v dvojnásobné koncentraci, protože po přidání inokula došlo k 50% zředění.

Tab. 5. ISO schéma pro přípravu série ředění antimykotik s finální koncentrací 0,0312-16 mg/l

Krok	Koncentrace (mg/l)	Zdroj	Objem antimykotika (μl)	Objem rozpouštědla (μl)	Získaná koncentrace (mg/l)	Koncentrace (mg/l) po zředění 1:100 s RPMI s 2 % glukózy
1	3 200	Zasobní roztok	200	0	3 200	32
2	3 200	Zasobní roztok	100	100	1 600	16
3	3 200	Zasobní roztok	50	150	800	8
4	3 200	Zasobní roztok	50	350	400	4
5	400	Krok 4	100	100	200	2
6	400	Krok 4	50	150	100	1
7	400	Krok 4	50	350	50	0,5
8	50	Krok 7	100	100	25	0,25
9	50	Krok 7	50	150	12,5	0,125
10	50	Krok 7	25	175	6,25	0,0625

Tab. 6. ISO schéma pro přípravu série ředění antimykotik s finální koncentrací 0,0156-8 mg/l

Krok	Koncentrace (mg/l)	Zdroj	Objem antimykotika (μl)	Objem rozpouštědla (μl)	Získaná koncentrace (mg/l)	Koncentrace (mg/l) po zředění 1:100 s RPMI s 2 % glukózy
1	1 600	Zasobní roztok	200	0	1 600	16
2	1 600	Zasobní roztok	100	100	800	8
3	1 600	Zasobní roztok	50	150	400	4
4	1 600	Zasobní roztok	50	350	200	2
5	200	Krok 4	100	100	100	1
6	200	Krok 4	50	150	50	0,5
7	200	Krok 4	50	350	25	0,25
8	25	Krok 7	100	100	12,5	0,125
9	25	Krok 7	50	150	50	0,0625
10	25	Krok 7	25	175	25	0,03125

Postup pro přípravu pracovního ředění:

1. Vezme se lahvička se zásobním roztokem ATM z mrazícího boxu (min. -70°C).
2. Do devíti dalších zkumavek se rozplní příslušný objem rozpouštědla (viz tabulka 4,5,6).
3. Následují se kroky viz tabulka 5,6, aby byla získána série ředění 200 × vyšší než je nejvyšší testovaná koncentrace.
4. Do 10 zkumavek se přenese 9,9 ml RPMI se 2 % glukózy. Odebere se 100 μl z každé zkumavky a přenese se do 10 zkumavek s 9,9 ml kultivačního média (ředění 1:100).
5. Do jamky v každém sloupci (1-10) se přidá 100 μl z každé zkumavky obsahující odpovídající koncentraci ATM. Do každé z jamek 11, 12 se přidá 100 μl RPMI se 2 % glukózy.
6. Destičky mohou být zataveny v plastických sáčcích nebo v aluminiové fólii. Mohou být skladovány zamražené při -70°C až po dobu šesti měsíců nebo při teplotě -20°C, maximálně

po dobu jednoho měsíce. Po rozmražení již destičky nesmějí být znova zamrazeny. Echinokandiny musejí být skladovány při teplotě minimálně -70°C (nikoli při -20°).

3.3.4. Příprava inokula

Standardní hustota inokula je zcela zásadní pro získání validních výsledků. Konečné inokulum by mělo mít hustotu buněk $1 \times 10^5 - 2,5 \times 10^5$ cfu/ml.

Izoláty aspergilů byly inkubovány při teplotě 35°C na bramborovo-dextrózovém agaru (PDA; Trios, Česká Republika). Suspenze inokula byla připravena ze sedm až 14 dní starých kolonií (aby bylo dosaženo dostatečné sporulace kmene). Kolonie byly přelity pěti mililitry sterilní vody s přídavkem 0,1 % Tweenu 20 a sterilní vatovou štětičkou byly jemně setřeny konidie. Suspenze byla následně přenesena sterilní stříkačkou a přefiltrována za použití sterilních nylonových filtrů s póry o velikosti $11 \mu\text{m}$ (Merck, Česká Republika) do sterilní zkumavky. Poté byla denzita upravena na zákal odpovídající 0,5 podle McFarlandovy stupnice (což odpovídá denzitě buněk $2-5 \times 10^6$ konidií/ml a optické denzitě 0,09–0,11). Suspenze byla homogenizována 15 s vortexem (2000 rpm) a nesmělo být přítomno mnoho hyf a cuků (> 5 %). Suspenze byla poté zředěna 1:10 sterilní destilovanou vodou na konečnou pracovní koncentraci $2-5 \times 10^5$ cfu/ml, se kterou byly inokulovány destičky.

3.3.5. Inokulace mikrotitračních destiček

Destičky byly inokulovány do 30 min od přípravy inokula. Suspenze inokula byla vortexována a do každé jamky (1 až 10) bylo přidáno $100 \mu\text{l}$ suspenze o denzitě $2-5 \times 10^5$ cfu/ml, čímž byla získána konečná koncentrace buněk $1 \times 10^5 - 2,5 \times 10^5$ cfu/ml. Jamka 11 byla také inokulována a sloužila jako kontrola růstu. Jamka 12 byla naplněna $100 \mu\text{l}$ použité sterilní destilované vody a sloužila jako negativní kontrola a kontrola sterility.

Pro ověření kvality připravených destiček byly použity QC kmeny. Byla také ověřena správná denzita inokula, a to tak, že bylo odebráno 10 μ l ze suspenze inokula a rozředěno ve dvou mililitrech sterilní destilované vody s 0,1 % Tweenu 20. Homogenizace byla provedena pomocí vortexu a 100 μ l bylo rozetřeno po povrchu vhodného média a inkubováno po dobu 24-48h. Mělo by vyrůst 100-250 kolonií.

3.3.6. Inkubace mikrotitračních destiček a odečítání výsledků

Mikrotitrační destičky byly inkubovány při 35°C v normální atmosféře po dobu 48 hodin. Bylo nutné, aby byl v růstové kontrole dostatečný nárůst, jinak bylo potřeba kultivaci destiček prodloužit (ne však déle než o dalších 24h). U vláknitých hub byly endpointy odečítány vizuálně. Pro všechna ATM s výjimkou echinokandinů byly odečítány hodnoty MIC. Hodnota MIC je koncentrace, ve které není okem viditelný žádný růst. Byly ignorovány jednotlivé kolonie na povrchu a tzv. „přeskočené jamky“. Pro odečítání výsledků byl použit horizontální černý a bílý papír jako pozadí, aby se přechod mezi bílou a černou jevil ostrý a zřetelný, při prohlížení skrze nadzvednutou jamku. Pro echinokandiny byla stanovena MEC. Tato hodnota vyjadřuje nejnižší koncentraci vedoucí k makroskopickým změnám vláknitého růstu (srovnatelného s pozitivní kontrolou) pozorovatelného jako mikrokolonie nebo granulární růst. Nezkoušená osoba by měla odečítat MEC mikroskopicky, vyšetřením malého objemu z prvních jamek, které vykazují přítomnost změněných kolonií. MEC je tedy nejnižší koncentrace echinokandinu, kdy je možno pozorovat abnormální, krátké a větvené shluky hyf v srovnání s dlouhými, nevětvenými hyfami.

3.3.7. Kontrola kvality – kontrolní kmeny

Hodnoty MIC QC kmenů, při kontrole nových nebo skladovaných šarží destiček, by měly být ideálně blízko středové hodnoty daného rozpětí. V každé testovací sérii destiček byly zahrnuty přinejmenším dva QC kmeny (tabulka 7). Dva nebo více kmenů bylo potřeba použít, zejména pokud MIC ATM některého z QC kmenů byla mimo testované rozmezí. Pokud byly zjištěné hodnoty mimo dané rozmezí, test musel být opakován. Pokud by byla zjištěna odchylka pro více než jeden test na 20 testů ($>1/20$), pak musí být zjištěna chyba. Každý test zahrnoval jamku bez ATM, která sloužila jako kontrola růstu a možnost kontroly zákalu.

Pro ověření kvality připravených destiček byly použity QC kmeny *Candida parapsilosis* ATCC 22019 a *Candida krusei* ATCC 6258.

Tab. 7. Kontrolní kmeny, které je možno použít pro kontrolu destiček

<i>Candida krusei</i> ATCC 6258
<i>Candida parapsilosis</i> ATCC 22019
<i>Candida albicans</i> CNM-CL F8555
<i>Candida krusei</i> CNM-CL-3403
<i>Aspergillus fumigatus</i> ATCC 204305
<i>Aspergillus flavus</i> ATCC 204304
<i>Aspergillus flavus</i> CNM-CM-1813
<i>A. fumigatus</i> SSI-4524
<i>A. fumigatus</i> SSI-5586

3.4. Sensititre YeastOne

YO panel byl testován podle instrukcí výrobce. Z čisté kultury vláknité houby, inkubované sedm dní (popř. déle, aby bylo dosaženo dostatečné sporulace) na PDA při 35°C, byla ve sterilní vodě vytvořena homogenní suspenze konidií, upravená na denzitu 0,5 podle McFarlandovy zákalové stupnice. Přenesením 20 μ l této směsi do zkumavky s 11 ml YeastOne bujónu byla získána požadovaná koncentrace $1,5 - 8 \times 10^3$ CFU/ml. Destičky byly

inkubovány při 35°C po dobu 48 a 72h. Ke kontrole kvality byly použity kmeny *C. krusei* ATCC 6258 a *C. parapsilosis* ATCC 22019. Hodnoty MIC pro rod *Aspergillus* byly stanovovány jako nejnižší koncentrace s modrou barvou. Hodnoty MIC pro AMB, VRC, ITC a POS byly hodnoceny po 48 (YO48) a zároveň po 72 hodinách (YO72) inkubace. Echinokandiny nebyly touto metodou hodnoceny, protože endpointy MEC by měly být stanovovány po 24 hodinách.

3.5. Analýza dat

Pro výsledky získané metodikou EUCAST byly pro každý druh, ATM a inkubační dobu spočítány rozmezí MIC a příslušné GM hodnoty (geometric mean; geometrický průměr). Údaje o MIC₅₀ (MIC inhibující růst 50 % izolátů) a MIC₉₀ (MIC inhibující růst 90 % izolátů) byly spočítány pro celý soubor a pro ty druhy, které byly zastoupeny nejméně pěti izoláty. Rozdíly mezi získanými MIC, které se pro standardizovanou a komerční metodiku nelišily o více než dvě ředění (± 2), byly použity pro výpočet procentuální shody, která byla spočítána pro každou kombinaci kmen, ATM a inkubační doba pro druhy, které byly zastoupeny minimálně pěti izoláty.

Pro výpočet GM byly hodnoty $<0,015$ mg/l nastaveny jako 0,008 mg/l a hodnoty MIC >16 mg/l byly nastaveny jako 32 mg/l, podobně hodnoty MEC $<0,008$ mg/l byly nastaveny jako 0,004 mg/l, a MEC >8 mg/l jako 16 mg/l. Pro kalkulaci shody mezi YO a EUCAST metodikou byly krajní hodnoty zpracovány obdobně.

4. Výsledky

4.1. Výsledky testování citlivosti aspergilů sekce *Fumigati* komplexu *viridinutans*

4.1.1. Hodnocení MIC standardizovanou metodikou EUCAST

Rozmezí MIC, MIC₅₀, MIC₉₀ a GM u 90 kmenů aspergilů komplexu *viridinutans* získané podle metodiky EUCAST jsou demonstrovány v tabulce 8 a grafech 3-6. Většina testovaných kmenů vykazovala zvýšené hodnoty MIC k ITC, VRC a také k AMB. GM pro VRC se pohyboval v rozmezí od 2,52 mg/l pro druh *A. aureolus* do 5,81 mg/l pro *A. arcoverdensis*. Polovina kmenů všech testovaných druhů s výjimkou *A. arcoverdensis* byla inhibována koncentrací VRC ≤4 mg/l. U všech testovaných izolátů byly zaznamenány vysoké MIC ITC (GM = 9,85 mg/l a MIC₅₀ >8 mg/l). Nízké MIC byly naproti tomu zjištěny pro POS (GM od 0,16 mg/l pro *A. wyomingensis* do 0,45 mg/l pro *A. arcoverdensis*).

U všech testovaných druhů byla variabilní citlivost k AMB. Polovina izolátů byla inhibována koncentrací ≤2 mg/l, nejvyšší hodnoty MIC byly zaznamenány pro *A. udagawae*. Hodnoty MEC pro echinokandiny byly nízké pro téměř všechny izoláty a hodnota GM byla 0,04 mg/l pro AFG, 0,05 mg/l pro CAS a 0,05 mg/l pro MFG.

4.1.2. Porovnání MIC podle EUCAST s YO

Procentuální shoda mezi EUCAST a YO (YO48 a YO72) je demonstrována v tabulce 8 a grafu 7-10. Celkově byla shoda 67 % mezi EUCAST a YO48 a 82 % pro YO72. MIC se pro různá ATM výrazně lišily, přičemž nejvyšší shoda byla pozorována pro VRC a AMB (93 % resp. 91 %, YO72). Většina hodnot MIC YO48 byla pro všechna ATM výrazně nižší v srovnání s EUCAST. Z tohoto důvodu byla procentuální shoda pro VRC, ITC, POS a AMB nižší (shoda 74,4; 36,7; 70 resp. 85,6 %,) ve srovnání s odečtem po 72 hodinách (shoda 93,3; 56,7; 87,8 resp. 91,1 %).

Nejnižší míra shody byla zaznamenána pro ITC u některých druhů. Nejnížší korelace s EUCAST byla zjištěna pro *A. wyomingensis*, tj., 0 % po 48h i 72h (viz tabulka 8 a graf 8). Naproti tomu 100% shoda byla zaznamenána pro všechny izoláty druhu *A. pseudoviridinutans*, který měl výrazně zvýšené hodnoty MIC k tomuto ATM (MIC >8 mg/l), a pro *A. arcoverdensis* (84,6 %) po 72 hodinách.

Tab. 8. Citlivost kmenů komplexu *Aspergillus viridinutans* k vybraným systémovým antimykotikům. Porovnání výsledků získaných metodou EUCAST a shoda s diagnostickou soupravou Sensititre YeastOne

Druh (n=90)	Testované	Rozmezí MIC získané EUCAST (mg/l)				YeastOne				
		ATM	Rozmezí	GM ¹	MIC ₅₀	MIC ₉₀	Rozmezí (mg/l)	Shoda (%; 48h) ¹	Rozmezí (mg/l)	Shoda (%; 72h) ¹
<i>A. felis</i> (27)	VRC		1->8	4,79	4	>8	0,5-4	100	1->8	100
	ITC		1->8	13,3	>8	>8	0,03->16	44,4	0,25->16	70,4
	POS		0,125-2	0,39	0,5	1	0,03-1	96,3	0,06-0,5	100
	AMB		0,25-8	1,63	2	8	0,25-4	100	1-8	100
	AFG		≤0,0312-0,125	0,03	≤0,0312	0,0625	ND	ND	ND	ND
	CAS		≤0,0312-8	0,08	≤0,0312	1	ND	ND	ND	ND
	MFG		≤0,0312-0,0625	0,03	≤0,0312	0,0625	ND	ND	ND	ND
Celková shoda								85,2		92,6
<i>A. udagawae</i> (17)	VRC		1->8	4	4	8	0,12-4	76,5	0,25-8	94,1
	ITC		0,25->8	7,37	>8	>8	0,03->16	35,3	0,03->16	52,9
	POS		0,0625-4	0,31	0,25	1	0,015-0,12	58,8	0,015-0,25	82,4
	AMB		1->8	3,54	8	8	0,5-4	76,5	0,5-8	88,2
	AFG		≤0,0312-0,25	0,04	≤0,0312	0,0625	ND	ND	ND	ND
	CAS		≤0,0312-2	0,07	≤0,0312	0,25	ND	ND	ND	ND
	MFG		≤0,0312-2	0,05	≤0,0312	0,0625	ND	ND	ND	ND
Celková shoda								61,8		79,4
<i>A. wyomingensis</i> (15)	VRC		4-8	4,2	4	4	0,12-2	33,3	0,5-2	86,7
	ITC		1->8	9,2	>8	>8	<0,015-0,25	0	0,03->16	0
	POS		0,125-0,25	0,16	0,125	0,25	0,008-0,5	46,7	0,015-1	80
	AMB		1->16	1,3	2	8	0,12-4	60	0,25-8	73,3

	AFG	≤0,0312–0,0625	0,03	≤0,0312	≤0,0312	ND	ND	ND	ND
	CAS	≤0,0312–0,25	0,04	≤0,0312	0,25	ND	ND	ND	ND
	MFG	≤0,0312–0,0625	0,03	≤0,0312	≤0,0312	ND	ND	ND	ND
Celková shoda							35		60
<i>A. arcuverdensis</i> (13)	VRC	4–8	5,81	8	8	0,25–2	53,8	1–4	84,6
	ITC	4→8	12,3	>8	>8	0,015→16	61,5	0,5→16	84,6
	POS	0,125–2	0,45	0,5	1	0,008–0,25	53,8	0,06–0,5	84,6
	AMB	0,5–8	1,6	2	2	0,25–2	84,6	1–2	100
	AFG	≤0,0312–0,125	0,03	≤0,0312	≤0,0312	ND	ND	ND	ND
	CAS	≤0,0312–0,25	0,05	≤0,0312	0,125	ND	ND	ND	ND
	MFG	≤0,0312–0,0625	0,03	≤0,0312	0,0625	ND	ND	ND	ND
Celková shoda							63,5		88,5
<i>A. pseudoviridinutans</i> (7)	VRC	4→8	5,3	4	>8	1–4	100	1–8	100
	ITC	>8	ND	>8	>8	>16	100	>16	100
	POS	0,125–1	0,4	0,5	1	0,12–0,25	100	0,25–1	100
	AMB	0,5–8	2	2	8	1–2	100	1–4	85,7
	AFG	≤0,0312–0,125	0,04	≤0,0312	0,125	ND	ND	ND	ND
	CAS	≤0,0312–0,25	0,05	≤0,0312	0,25	ND	ND	ND	ND
	MFG	≤0,0312–0,125	0,04	≤0,0312	0,125	ND	ND	ND	ND
Celková shoda							100		96,4
<i>A. acrensis</i> (5)	VRC	1–4	3,3	4	4	1–4	100	4–8	100
	ITC	1–4	3,3	4	4	0,06–0,12	0	0,12→16	40
	POS	0,125–1	0,38	0,5	1	0,03–0,06	40	0,06–0,12	80
	AMB	1–8	2	2	8	2–4	100	2–4	100
	AFG	≤0,0312–0,0625	0,04	≤0,0312	0,0625	ND	ND	ND	ND
	CAS	≤0,0312–0,25	0,125	0,125	0,25	ND	ND	ND	ND

	MFG	≤0,0312–0,0625	0,04	≤0,0312	0,0625	ND	ND	ND	ND
Celková shoda							60		80
<i>A. aureolus</i> (3)	VRC	1–4	2,52	ND	ND	0,25–1	ND	1–4	ND
	ITC	8→8	12,7	ND	ND	0,12–0,25	ND	>16	ND
	POS	0,125–0,5	0,25	ND	ND	0,06–0,12	ND	0,12–0,25	ND
	AMB	0,5–1	0,79	ND	ND	0,25–1	ND	1–2	ND
	AFG	≤0,0312–1	0,1	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	CAS	≤0,0312–0,125	0,05	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	MFG	≤0,0312–1	0,1	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Celková shoda							66,7		100
<i>A. siamensis</i> (2)	VRC	4	4	ND	ND	0,5–1	ND	1–2	ND
	ITC	4	4	ND	ND	0,03–0,12	ND	0,06–0,25	ND
	POS	0,125–0,25	0,18	ND	ND	0,03–0,06	ND	0,03–0,12	ND
	AMB	0,25–1	0,5	ND	ND	1–2	ND	1–4	ND
	AFG	≤0,0312–0,25	0,09	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	CAS	0,25–0,125	0,18	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	MFG	ND	0,03	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Celková shoda							37,5		50
<i>A. viridnutans</i> (1)	VRC	4	ND	ND	ND	0,25	ND	0,5	ND
	ITC	4	ND	ND	ND	<0,015	ND	0,03	ND
	POS	0,125	ND	ND	ND	<0,008	ND	0,015	ND
	AMB	1	ND	ND	ND	0,5	ND	0,5	ND
	AFG	≤0,0312	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	CAS	0,0625	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	MFG	≤0,0312	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Celková shoda							25		25
Všechny izoláty (90)	VRC	1→8	4,46	4	8	0,12–4	74,4	0,25→8	93,3

ITC	0,25→8	9,85	>8	>8	0,015→16	36,7	0,03→16	56,7
POS	0,0625–4	0,31	0,25	1	0,008–1	70	0,015–1	87,8
AMB	0,25→16	2,5	2	8	0,12–4	85,6	0,25–8	91,1
AFG	≤0,0312–1	0,04	≤0,0312	0,0625	ND	ND	ND	ND
CAS	≤0,0312–8	0,05	≤0,0312	0,25	ND	ND	ND	ND
MFG	≤0,0312–2	0,05	≤0,0312	0,0625	ND	ND	ND	ND

Celková shoda metod

(pro všechna ATM)

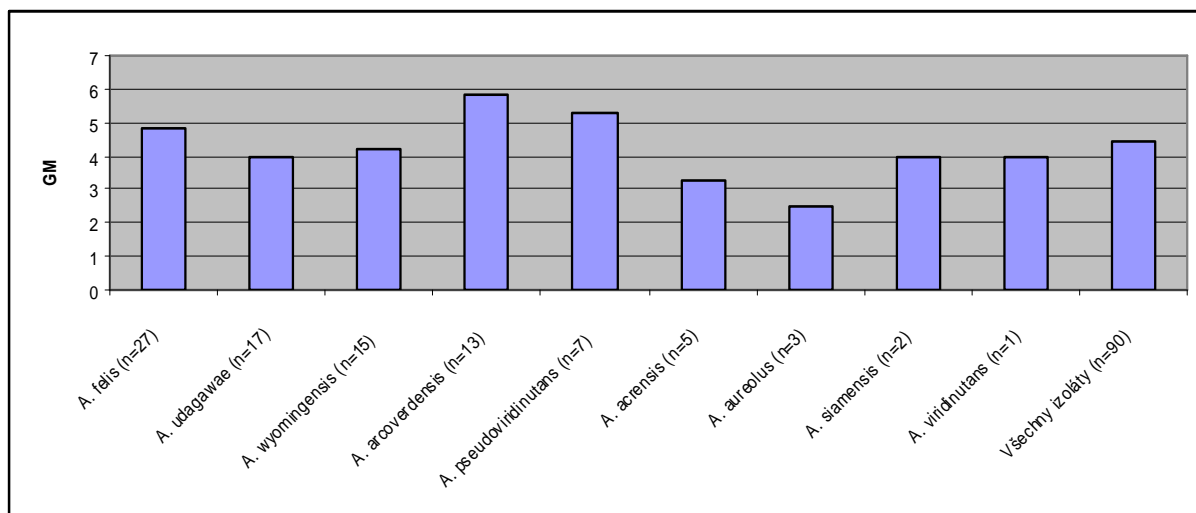
66,7

82,2

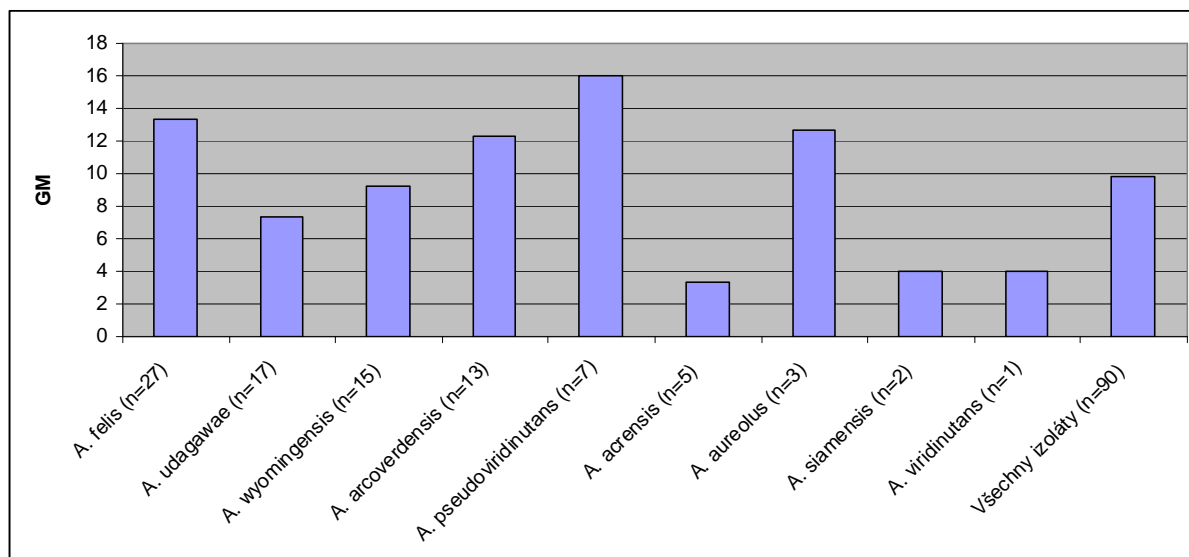
VRC – vorikonazol; ITC – itrakonazol; POS – posakonazol; AMB – amfotericin B; AFG – anidulafungin; CAS – kaspofungin; MFG – mikafungin; ND – nestanoveno; GM – geometrický průměr; MIC – minimální inhibiční koncentrace; ATM – antimykotika;

¹GM a procentuální shoda byly stanovovány pouze v případě, že byl druh reprezentován minimálně pěti izoláty

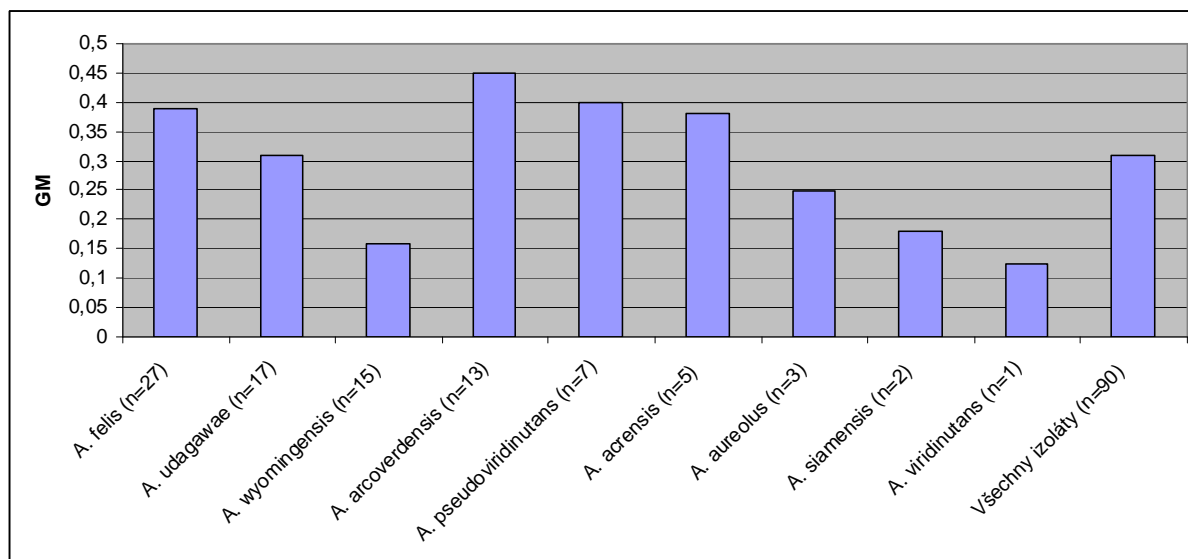
Graf 3. Geometrický průměr (GM) hodnot minimálních inhibičních koncentrací vorikonazolu u zástupců komplexu *Aspergillus viridinutans*



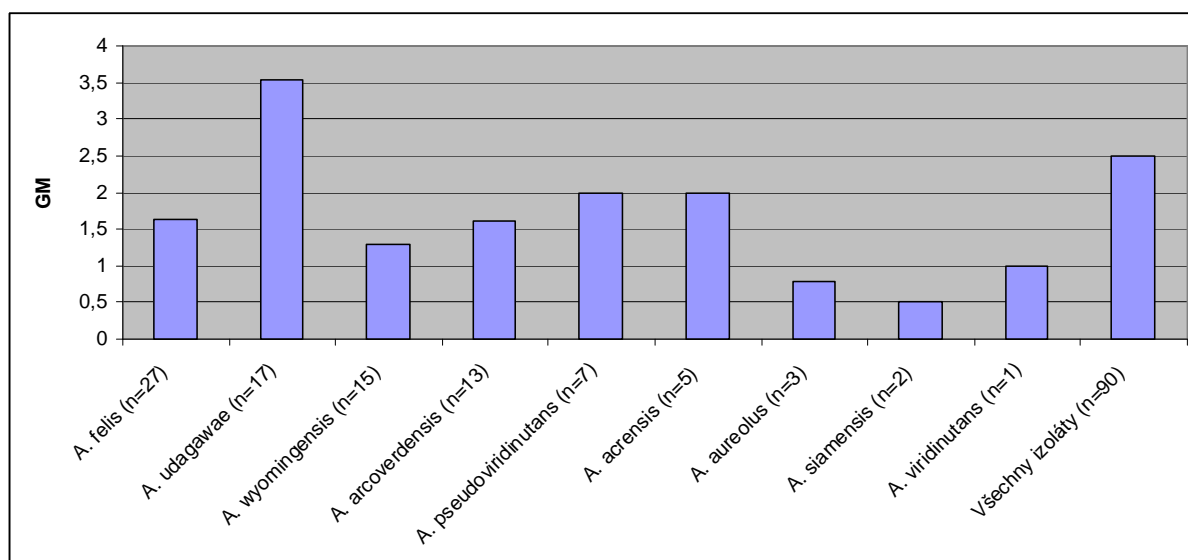
Graf 4. Geometrický průměr (GM) hodnot minimálních inhibičních koncentrací itrakonazolu u zástupců komplexu *Aspergillus viridinutans*



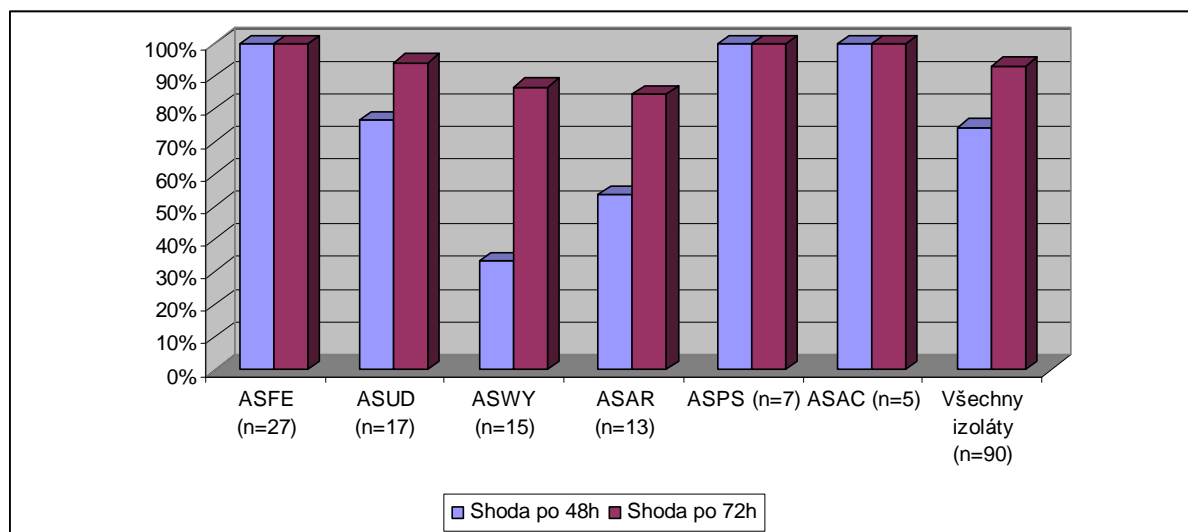
Graf 5. Geometrický průměr (GM) hodnot minimálních inhibičních koncentrací posakonazolu u zástupců komplexu *Aspergillus viridinutans*



Graf 6. Geometrický průměr (GM) hodnot minimálních inhibičních koncentrací amfotericinu B u zástupců komplexu *Aspergillus viridinutans*

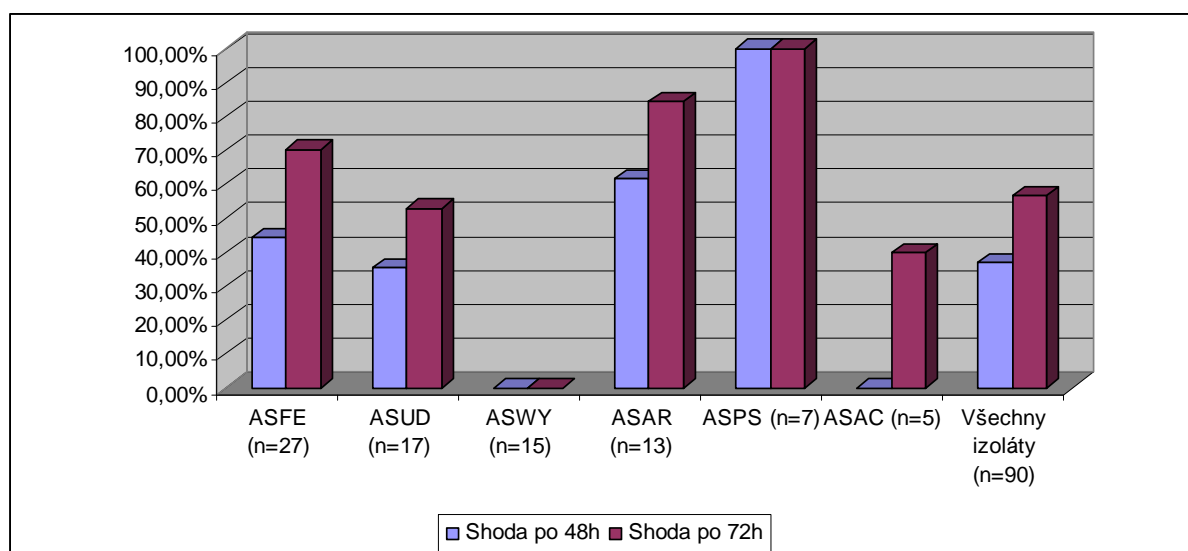


Graf 7. Porovnání minimálních inhibičních koncentrací vorikonazolu podle EUCAST se soupravou YeastOne hodnocenou po 48 a 72 hodinách



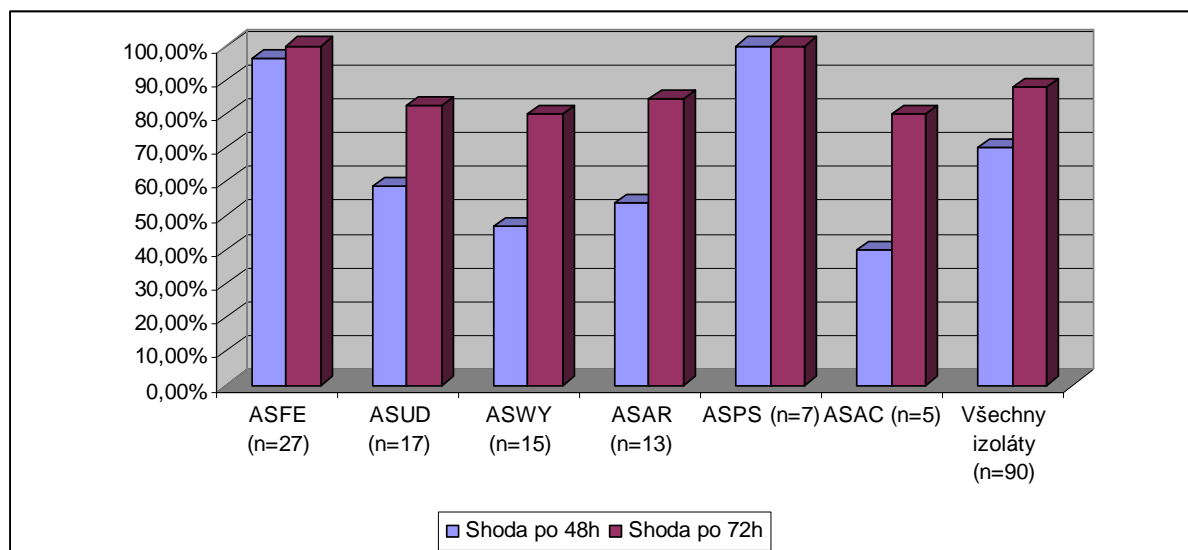
ASFE – *A. felis*; ASUD – *A. udagawae*; ASWY – *A. wyomingensis*; ASAR – *A. arcoverdensis*; ASPS – *A. pseudoviridinutans*; ASAC – *A. acrensis*

Graf 8. Porovnání minimálních inhibičních koncentrací itrakonazolu podle EUCAST se soupravou YeastOne hodnocenou po 48 a 72 hodinách



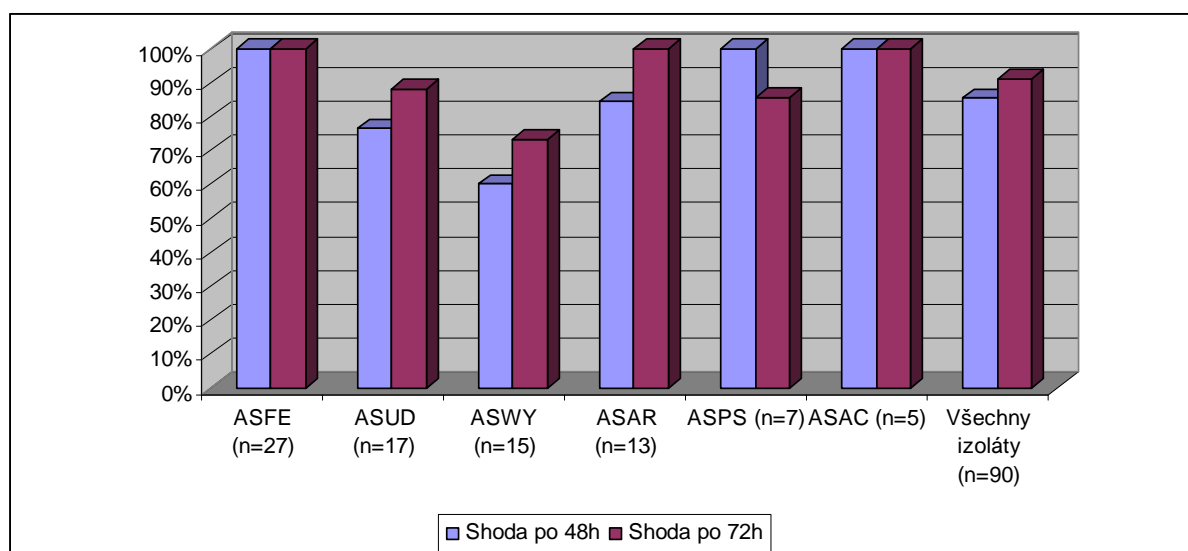
ASFE – *A. felis*; ASUD – *A. udagawae*; ASWY – *A. wyomingensis*; ASAR – *A. arcoverdensis*; ASPS – *A. pseudoviridinutans*; ASAC – *A. acrensis*

Graf 9. Porovnání minimálních inhibičních koncentrací posakonazolu podle EUCAST se soupravou YeastOne hodnocenou po 48 a 72 hodinách



ASFE – *A. felis*; ASUD – *A. udagawae*; ASWY – *A. wyomingensis*; ASAR – *A. arcovirdensis*; ASPS – *A. pseudoviridinutans*; ASAC – *A. acrensis*

Graf 10. Porovnání minimálních inhibičních koncentrací amfotericinu B podle EUCAST se soupravou YeastOne hodnocenou po 48 a 72 hodinách



ASFE – *A. felis*; ASUD – *A. udagawae*; ASWY – *A. wyomingensis*; ASAR – *A. arcovirdensis*; ASPS – *A. pseudoviridinutans*; ASAC – *A. acrensis*

4.2. Výsledky testování citlivosti aspergilů ze sekce *Nidulantes*

4.2.1. Hodnocení MIC standardizovanou metodikou EUCAST

Výsledky EUCAST jsou uvedeny v tabulce 9 a grafu 11-14.

V případě AMB byly nejvyšší hodnoty MIC zjištěny u druhu *A. nidulans* (GM 1,29 mg/l), zatímco ostatní druhy vykazovaly nižší koncentrace, tj. ≤ 1 mg/l. Celková hodnota GM pro všechny testované kmeny byla 0,71 mg/l. Polovina izolátů byla inhibována koncentracemi $\leq 0,5$ mg/l a 90 % kmenů bylo inhibováno koncentracemi ≤ 2 mg/l.

Výsledky MIC azolových ATM byly převážně nízké. Hodnoty GM pro všechny izoláty pro VRC, ITC a POS byly 0,38, 0,25 resp. 0,08 mg/l. Polovina kmenů byl inhibována koncentracemi $\leq 0,5$ mg/l, $\leq 0,25$ mg/l resp. $\leq 0,06$ mg/l. A devadesát procent kmenů bylo inhibováno koncentracemi $\leq 0,5$ mg/l, $\leq 0,5$ mg/l resp. $\leq 0,25$ mg/l. Nejvyšší hodnoty MIC pro VRC byly získány u druhu *A. sublatus* (GM = 0,52 mg/l a MIC₉₀ ≤ 1 mg/l). Pro ostatní testovaná ATM s výjimkou VRC byly nejvyšší hodnoty MIC zjištěny pro druh *A. nidulans* (GM ITC = 0,37 mg/l, POS = 0,13 mg/l, AMB = 1,29 mg/l; viz tabulka 9).

Tab. 9. Citlivost zástupců sekce *Nidulantes* k vybraným systémovým antimykotikům. Porovnání výsledků získaných metodou EUCAST a shoda s diagnostickou soupravou Sensititre YeastOne

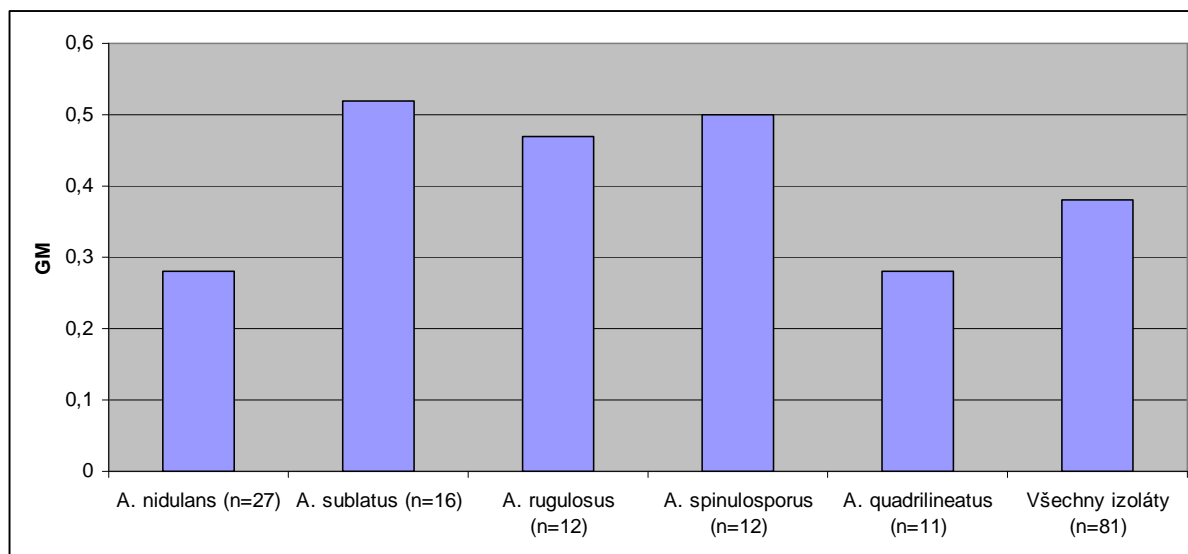
Druh (n=81)	Testované ATM	Rozmezí MIC získané EUCAST (mg/l)				YeastOne			
		Rozmezí	GM ¹	MIC ₅₀	MIC ₉₀	Rozmezí (mg/l)	Shoda (%; 48h) ¹	Rozmezí (mg/l)	Shoda (%; 72h) ¹
<i>A. nidulans</i> (27)	VRC	0,12–0,5	0,28	0,25	0,5	0,03–0,25	100	0,06–0,5	100
	ITC	0,12–2	0,37	0,25	1	0,016–0,25	55,6	0,016–0,5	74,1
	POS	0,016–0,5	0,13	0,125	0,5	0,008–0,5	74,1	0,016–0,5	85,2
	AMB	0,25–16	1,29	1	4	1–4	85,2	1–8	85,2
Celková shoda							78,7		86,1
<i>A. subblatus</i> (16)	VRC	0,25–1	0,52	0,5	1	0,25–0,5	100	0,25–1	100
	ITC	0,12–0,5	0,25	0,25	0,5	0,06–0,12	100	0,06–0,25	100
	POS	0,03–0,12	0,07	0,06	0,12	0,03–0,12	100	0,03–0,25	100
	AMB	0,25–1	0,48	0,5	1	1–4	50	2–4	25
Celková shoda							87,5		81,3
<i>A. rugulosus</i> (12)	VRC	0,25–0,5	0,47	0,5	0,5	0,25–0,5	100	0,5	100
	ITC	0,12–0,5	0,2	0,19	0,25	0,03–0,12	75	0,03–0,25	100
	POS	0,03–0,12	0,06	0,06	0,12	0,03–0,12	100	0,03–0,12	100
	AMB	0,25–1	0,42	0,5	0,5	2–4	33,3	2–4	16,7
Celková shoda							77,1		79,2
<i>A. spinulosporus</i> (12)	VRC	0,5	0,5	0,5	0,5	0,12–0,5	100	0,25–0,5	100
	ITC	0,12–0,25	0,21	0,25	0,25	0,016–0,12	75	0,016–0,25	91,7
	POS	0,03–0,12	0,07	0,06	0,12	0,016–0,12	100	0,016–0,12	100
	AMB	0,25–1	0,42	0,5	1	1–4	58,3	2–4	41,7

Celková shoda							83,3		83,4
<i>A. quadrilineatus</i> (11)	VRC	0,25–0,5	0,28	0,25	0,5	0,12–0,25	100	0,12–0,25	100
	ITC	0,12–0,25	0,17	0,12	0,25	0,06–0,12	100	0,06–0,25	100
	POS	0,03–0,06	0,04	0,03	0,06	0,03–0,12	100	0,03–0,25	91
	AMB	0,12–8	0,73	0,5	2	1–4	72,7	2–4	45,5
Celková shoda							93,2		84,1
<i>A. corrugatus</i> (2)	VRC	0,25–0,5	ND	ND	ND	0,12–0,25	ND	0,25	ND
	ITC	0,25	ND	ND	ND	0,016–0,03	ND	0,03	ND
	POS	0,12–0,25	ND	ND	ND	0,016–0,03	ND	0,016–0,03	ND
	AMB	1–8	ND	ND	ND	2	ND	2–4	ND
Celková shoda							50		50
<i>A. pachycristatus</i> (1)	VRC	0,5	ND	ND	ND	0,25	ND	0,5	ND
	ITC	0,25	ND	ND	ND	0,25	ND	0,25	ND
	POS	0,06	ND	ND	ND	0,12	ND	0,25	ND
	AMB	0,5	ND	ND	ND	1	ND	4	ND
Celková shoda							100		75
Všechny izoláty (81)	VRC	0,12–1	0,38	0,5	0,5	0,03–0,5	100	0,06–1	100
	ITC	0,12–2	0,25	0,25	0,5	0,03–0,25	75,3	0,016–0,5	87,7
	POS	0,15–0,5	0,08	0,06	0,25	0,008–0,25	88,9	0,016–0,5	91,3
	AMB	0,12–16	0,71	0,5	2	1–4	65,4	1–8	50,6
Celková shoda metod (pro všechna ATM)							82,4		82,4

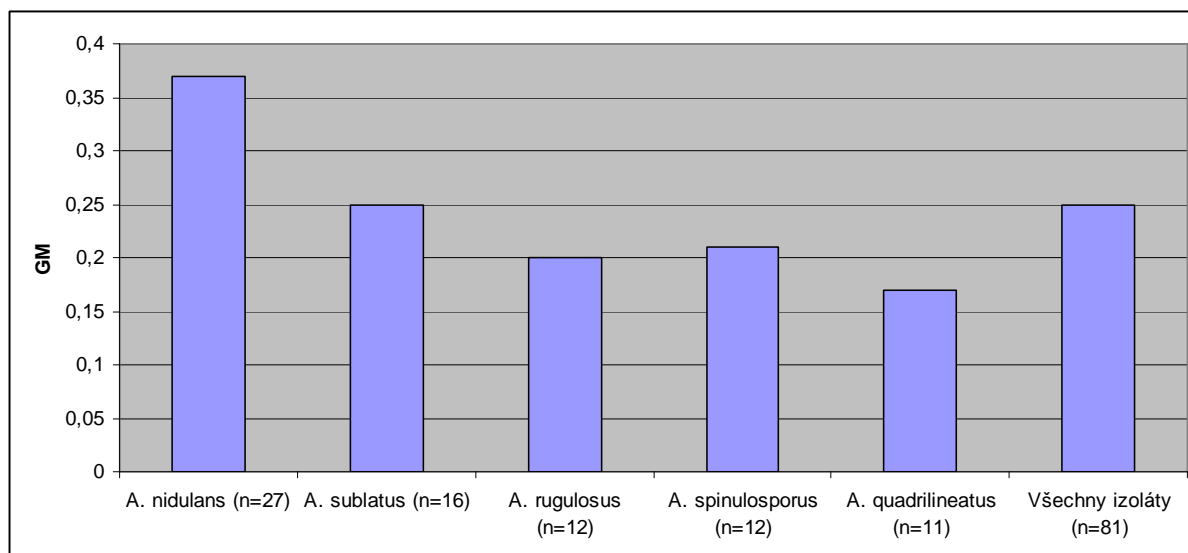
VRC – vorikonazol; ITC – itrakonazol; POS – posakonazol; AMB – amfotericin B; ND – nestanoveno; GM – geometrický průměr; MIC – minimální inhibiční koncentrace; ATM – antimykotika;

¹GM a procentuální shoda byly stanovovány pouze v případě, že byl druh reprezentován minimálně pěti izoláty

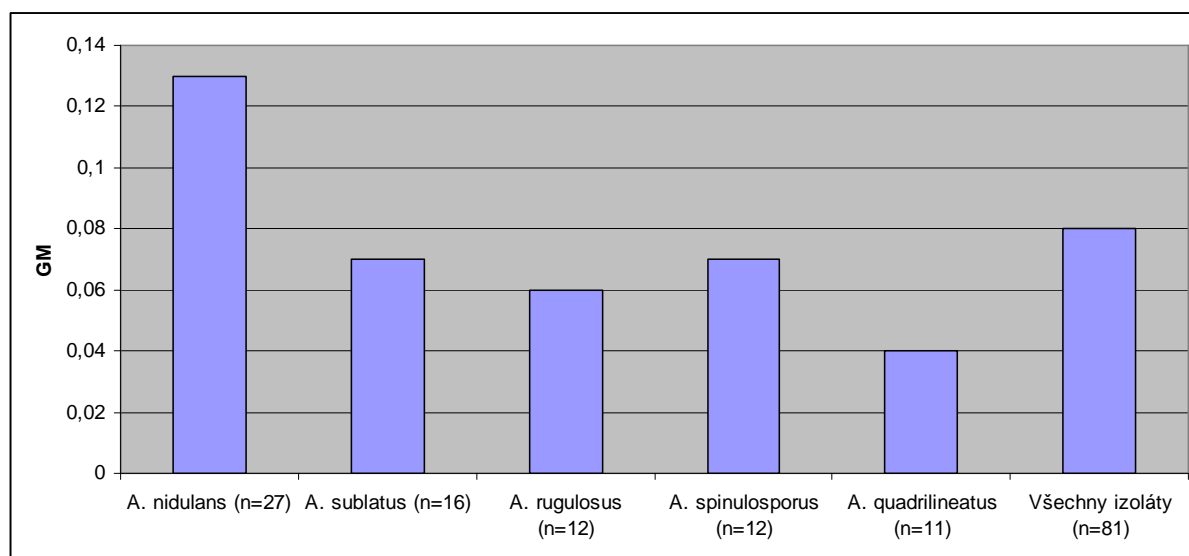
Graf 11. Geometrický průměr (GM) hodnot minimálních inhibičních koncentrací vorikonazolu u zástupců aspergilů ze sekce *Nidulantes*



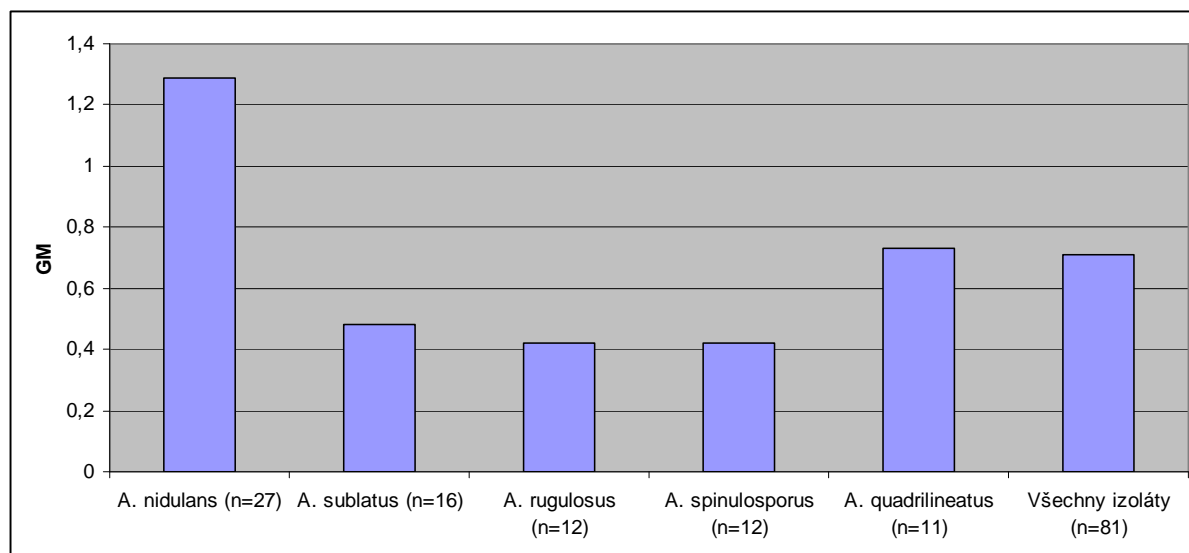
Graf 12. Geometrický průměr (GM) hodnot minimálních inhibičních koncentrací itrakonazolu u zástupců aspergilů ze sekce *Nidulantes*



Graf 13. Geometrický průměr (GM) hodnot minimálních inhibičních koncentrací posakonazolu u zástupců aspergilů ze sekce *Nidulantes*



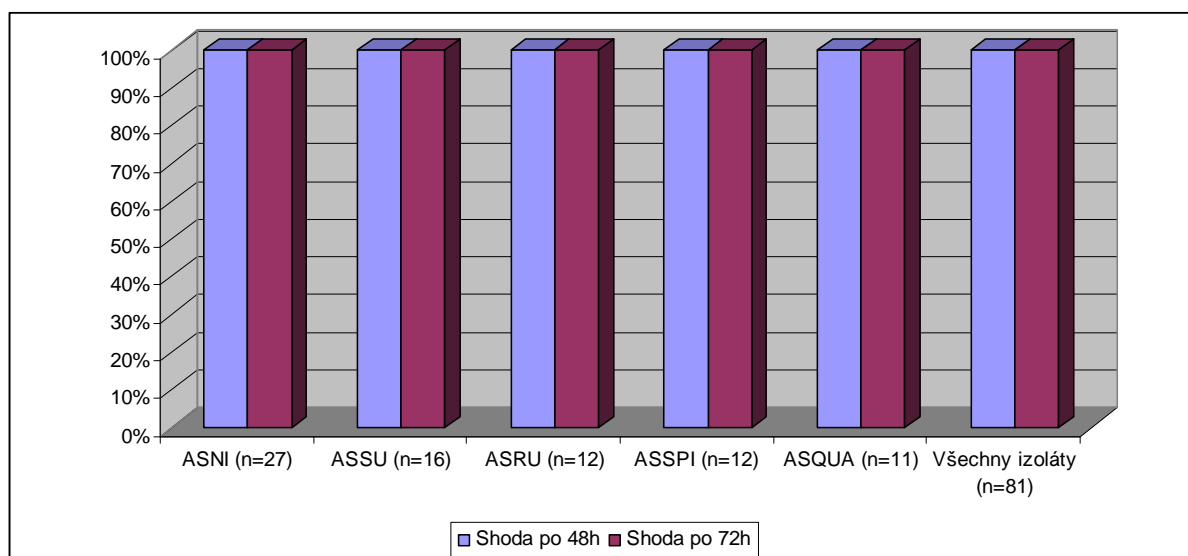
Graf 14. Geometrický průměr (GM) hodnot minimálních inhibičních koncentrací amfotericinu B u zástupců aspergilů ze sekce *Nidulantes*



4.2.2. Porovnání MIC podle EUCAST s YO

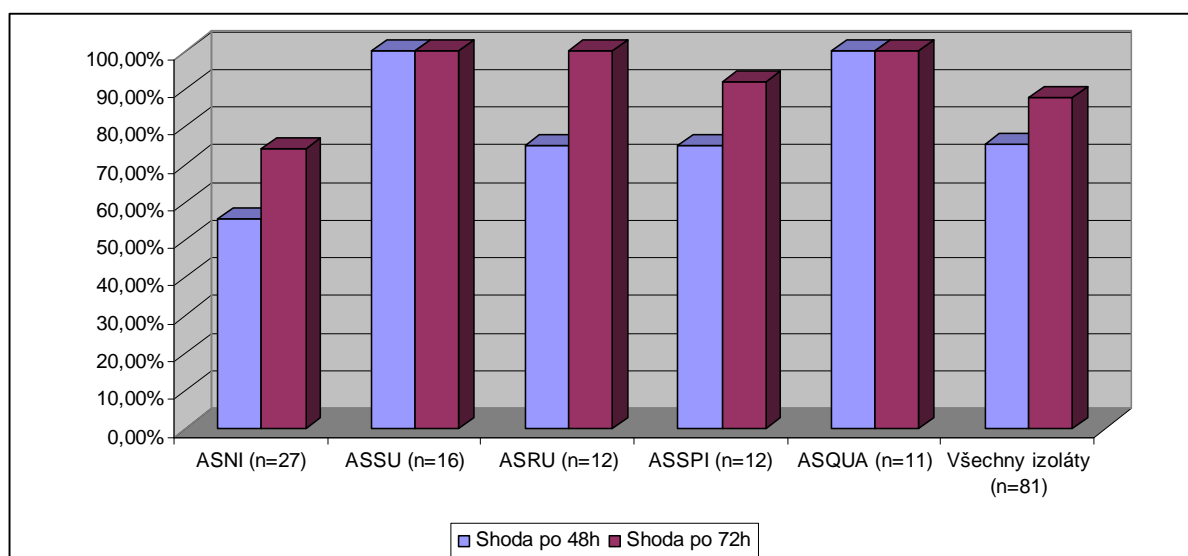
Výsledky metodiky EUCAST byly porovnány s výsledky YO48 a YO72 a jsou uvedeny v tabulce 9 a grafu 15-18. Celková shoda všech testovaných druhů a ATM se jevila stejná po 48 i 72 h (82,4 %). Vysoká shoda byla dosažena u všech azolových ATM (viz tabulka 9) pro druh *A. sublatus* (YO48 a YO72 100 %), *A. rugulosus* (YO72 100 %), *A. spinulosporus* (VRC a POS YO72 100 %; ITC YO72 91,7 %) a *A. quadrilineatus* (YO48 100 %). Shoda pro VRC byla excelentní (100 %) pro všechny testované izoláty při obou intervalech hodnocení (viz graf 15). Pro druh *A. nidulans* byla pro ostatní azolová ATM shoda o něco nižší a lepší korelace bylo dosaženo po 72 hodinách. Poměrně malá shoda pro všechny zástupce byla zjištěna u AMB (YO48 65,4 %; YO72 50,6 %). Nižší shoda byla obvykle dosažena po delší době inkubace (YO72), kdy MIC AMB vycházely proti metodice EUCAST výrazně vyšší. Hodnoty MIC k AMB nejlépe korelovaly u *A. nidulans* (85,2 %).

Graf 15. Porovnání minimálních inhibičních koncentrací vorikonazolu podle EUCAST se soupravou YeastOne hodnocenou po 48 a 72 hodin



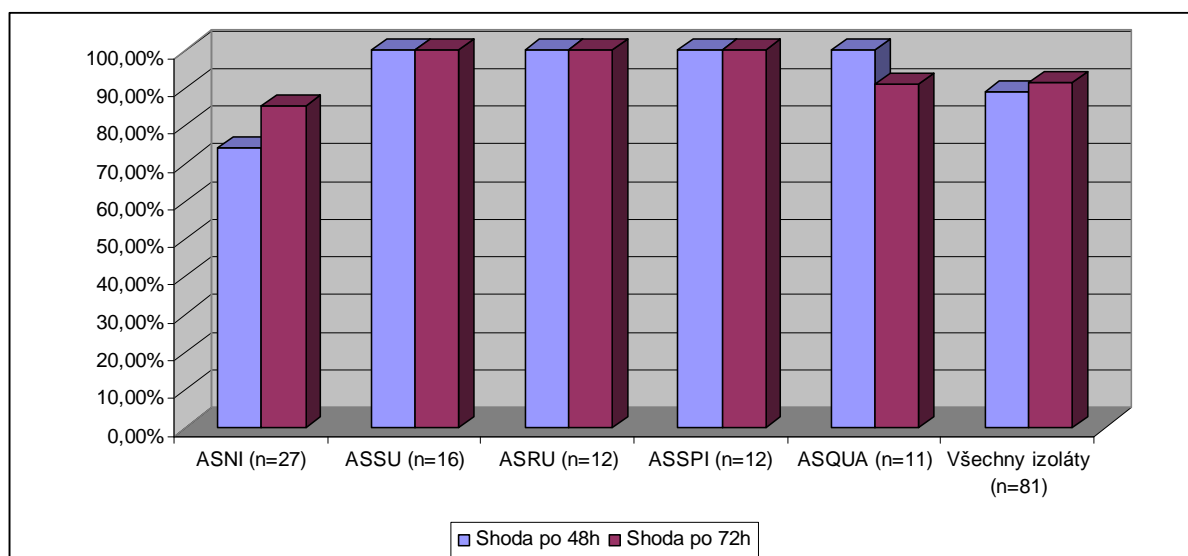
ASNI – *A. nidulans*; ASSU – *A. sublatus*; ASRU – *A. rugulosus*; ASSPI – *A. spinulosporus*; ASQUA – *A. quadrilineatus*

Graf 16. Porovnání minimálních inhibičních koncentrací itrakonazolu podle EUCAST se soupravou YeastOne hodnocenou po 48 a 72 hodin



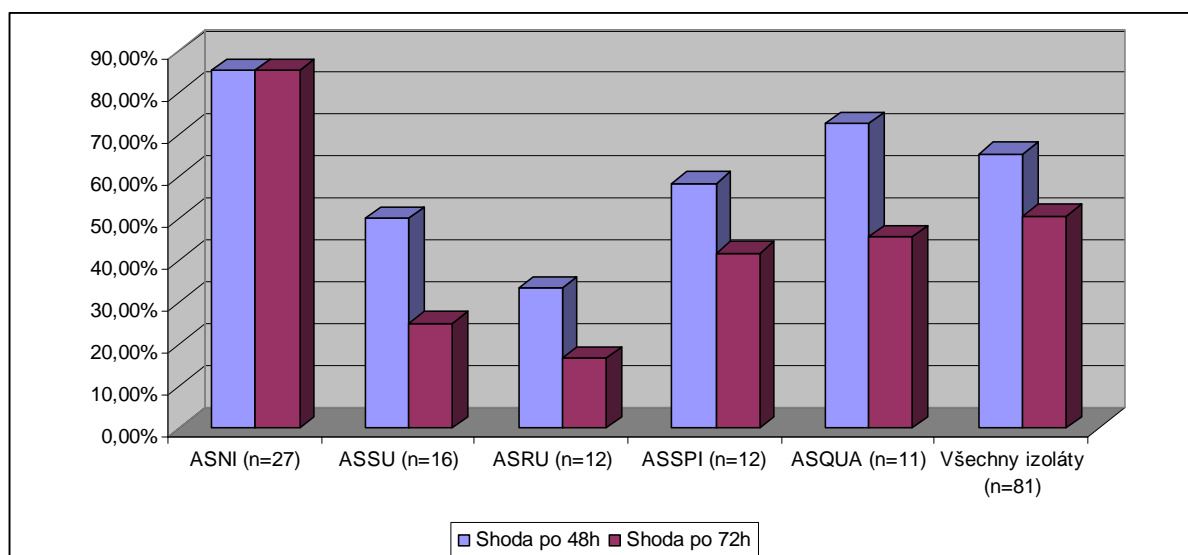
ASNI – *A. nidulans*; ASSU – *A. sublatus*; ASRU – *A. rugulosus*; ASSPI – *A. spinulosporus*; ASQUA – *A. quadrilineatus*

Graf 17. Porovnání minimálních inhibičních koncentrací posakonazolu podle EUCAST se soupravou YeastOne hodnocenou po 48 a 72 hodin



ASNI – *A. nidulans*; ASSU – *A. sublatus*; ASRU – *A. rugulosus*; ASSPI – *A. spinulosporus*; ASQUA – *A. quadrilineatus*

Graf 18. Porovnání minimálních inhibičních koncentrací amfotericinu B podle EUCAST se soupravou YeastOne hodnocenou po 48 a 72 hodin



ASNI – *A. nidulans*; ASSU – *A. sublatus*; ASRU – *A. rugulosus*; ASSPI – *A. spinulosporus*; ASQUA – *A. quadrilineatus*

5. Diskuse

5.1. Prevalence kryptických zástupců v klinickém materiálu

Druhový komplex *Aspergillus viridinutans* patří do sekce *Fumigati* a morfologické odlišení od druhu *A. fumigatus sensu stricto*, který je nejčastějším původcem IA, vyžaduje odborné znalosti a zkušenosti (25,29,32,53,54). Obdobně *A. nidulans sensu stricto*, který je hlavním zástupcem sekce *Nidulantes* a také je z této sekce nejčastějším vyvolavatelem IA je obvykle morfologicky neodlišitelný od ostatních druhů (55,56). Takzvané kryptické druhy mohou zůstat nerozpoznány zejména v laboratořích, které k identifikaci používají pouze fenotypové metody. Jejich identifikace však může být velmi důležitá, protože některé z nich vykazují odlišný profil citlivosti ve srovnání s jejich dobře známými příbuznými druhy.

Frekvence kryptických zástupců v klinických vzorcích je uváděna zhruba mezi 12 až 15 procenty (29,57,58). V námi studovaných sekcích (*Fumigati* a *Nidulantes*) se jejich podíl v jednotlivých studiích liší, výskyt v klinickém materiálu se uvádí v rozmezí 0 až 5 % v sekci *Fumigati*, a sekce *Nidulantes* se pohybuje mezi 0 až 1,6 % (25,29,57,58). Castro *et al.* ve své studii, zaměřené na četnost kryptických druhů ve vzorcích z respiračního traktu, překvapivě nezjistili žádné zástupce ze sekce *Fumigati* ani *Nidulantes* (57). V České Republice byly zmíněné kmeny v klinickém materiálu prokázány (59).

5.2. BP a ECOFF

V případě, že jsou pro daný druh a ATM stanoveny BP, pak je možné získané výsledky kategorizovat a podle toho hodnotit výsledný efekt daného ATM na testované agens *in vivo*.

BP jsou stanoveny u vybraných ATM pro *A. fumigatus sensu stricto* a pro *A. nidulans sensu stricto*. Je možné je dohledat na webových stránkách EUCAST (http://www.eucast.org/clinical_breakpoints/), kde jsou pravidelně aktualizovány. Pro druh

A. fumigatus byly stanoveny BP pro AMB, ISA, ITC, POS, VRC (1; 1; 1; 0,125 resp. 1 mg/l). Pro druh *A. nidulans* byly BP stanoveny pouze pro ISA (0,25 mg/l) a ITC (1 mg/l). Pro kryptické kmeny však tyto hodnoty z důvodu raritního výskytu infekcí jimi vyvolaných resp. diagnostikovaných stanoveny nejsou. BP mohou být do jisté míry nahrazeny údaji zvanými epidemiological cutt-off values (ECOFF v případě EUCAST resp. ECVs u CLSI) a často se s nimi shodují (17). Bohužel ani tyto hodnoty zatím nelze u kryptických kmenů dohledat, z důvodu testování malého souboru izolátů v publikovaných pracích.

5.3. Zástupci kryptických kmenů komplexu *viridinutans* sekce *Fumigati*

Naše výsledky naznačují, že druhy komplexu *A. viridinutans* mají variabilní hodnoty MIC k AMB a zvýšené hodnoty MIC ITC a VRC (viz tabulka 6). Nejvyšší MIC byly pozorovány v případě ITC, zatímco MIC většiny zástupců komplexu *A. viridinutans* k POS resp. MEC k echinokandinům byly převážně nízké.

Publikované případy infekcí vyvolaných zástupci zmíněného komplexu ukazují, že mnoho jejich zástupců má zvýšené MIC k ITC, VRC a AMB (25,31,32,34,35,40,60-76). Howard (77) revidoval poznatky o některých kryptických kmenech a označil druhy *A. viridinutans* a *A. felis* jako převážně citlivé k AMB, redukovane citlivé k VRC a variabilně citlivé k ITC, POS a echinokandinům (77). Detekce zvýšených hodnot MIC k polyenům, azolům nebo k echinokandinům u izolátů morfologicky odpovídajících *A. fumigatus* během testování citlivosti může být známkou nálezu kryptického kmene (78,79). Vzhledem k tomu, že většina kmenů je k těmto ATM citlivá, ačkoliv rezistence k azolům je stále častěji v některých zemích zaznamenávána (19,78,79).

Většina autorů uvádí nízké MEC pro echinokandiny, což se shoduje s našimi výsledky (35,40,61,63,65,66,68,71,72). Výjimkou je studie Yaguchi *et al.*, kteří uvádějí vysokou MIC pro MFG (>16 mg/l), kterou stanovili pomocí metodiky CLSI (34).

Barrs *et al.* testovali MIC pro 13 kmenů *A. felis* pomocí YO48 a zjistili, že MIC pro ITC byly nižší než 1 mg/l (35). Avšak, jak je demonstrováno v tabulce 8 a grafu 8 hodnocení YO pouze po 48 hodinách je spojeno s vysokým procentem falešně nízkých hodnot MIC pro ITC. Někteří autoři uvádějí vysoké hodnoty MIC k ITC získaných pomocí standardizovaných metodik pro zástupce komplexu *A. viridinutans*, což dobře koreluje s našimi výsledky (32,61-63,65,69). U mnoha kmenů jsme pro ITC zaznamenali tzv. paradoxní růst při odečtech YO48 a YO72. Výrobce uvádí, že u ITC se občas vyskytuje paradoxní růst, kdy je zaznamenán nárůst ve vyšších koncentracích, což se projeví tím, že tyto jamky zrůžoví. Tento jev je také znám jako Eaglův fenomén a odkazuje na pozorování, kdy zvýšení koncentrace antibiotika nad určitou hodnotu, vede k paradoxnímu nárůstu počtu přežívajících mikroorganismů. Růst ve vyšších koncentracích by měl být v těchto případech ignorován a měla by být zaznamenána nižší hodnota MIC. Avšak podle našich výsledků to vypadá, že by zmíněný efekt ignorován být neměl, protože může upozornit na zvýšené hodnoty MIC k tomuto ATM.

Publikované případy lidských a zvířecích infekcí vyvolaných zástupci komplexu *A. viridinutans*, byly nejčastěji připisovány druhům *A. udagawae*, *A. felis* a *A. viridinutans*, přičemž mnoho z těchto infekcí bylo popsáno jako klinicky rezistentních k antifungální léčbě, přestože v některých případech byly u testovaných kmenů zjištěny nízké hodnoty MIC pro tato ATM (64,62,63,65,69-71,73,76) (62,63,65). Někteří autoři popisují dobrý klinický efekt při terapii POS, POS s CAS a nebo AMB s CAS (62,63,65,67). Byl také popsán případ IA u člověka vyvolaný *A. udagawae*, který byl úspěšně vyléčen VRC a případ infekce kočky, velmi dobře reagující na terapii vysokými dávkami ITC (68,70). Ve většině dalších případů byl však

klinický efekt VRC, resp. ITC slabý nebo vůbec žádný (40,62,63,65,69,70). Coelho *et al.* publikovali případ, kdy na začátku léčby aspergilózy došlo ke klinickému zlepšení po POS, avšak později uvedená terapie selhala a pacient zemřel (65). To mohlo být způsobeno pokročilým stadiem infekce, nebo vývojem rezistence.

Vznik odolných kmenů v průběhu léčby je v literatuře dokumentován v souvislosti s infekcemi vyvolanými původně dobře citlivými kmeny *A. fumigatus* (21). Lékem volby IA je v současné době VRC (20). V případě zjištění rezistence k azolovým ATM, je doporučována změna terapie na lipozomální AMB. Pokud je zjištěná environmentální rezistence aspergilových kmenů $\geq 10\%$ v příslušné lokalitě, je vhodná kombinace VRC s echinokandinem nebo lipozomální AMB (20).

Vzhledem k nízké frekvenci kryptických kmenů aspergilů, které se vyskytují v klinickém materiálu, nejsou k dispozici žádné spolehlivější klinické údaje, které by mohly sloužit jako vodítka pro terapii (80). Navíc se citlivost aspergilů u jednotlivých izolátů a v rámci druhů může lišit, proto je u všech kmenů izolovaných od pacientů se systémovými mykózami vhodné otestovat citlivost k ATM *in vitro*.

5.4. Zástupci *A. nidulans sensu stricto* a kryptické kmeny ze sekce *Nidulantes*

Hodnoty MIC ATM testovaných podle EUCAST byly u všech kmenů sekce *Nidulantes* vesměs nízké, zejména v případě VRC, ITC a POS. Předběžně jsme předpokládali, že by zástupci sekce *Nidulantes* mohli vykazovat zvýšené hodnoty MIC k AMB. Rovněž tyto MIC však dosahovaly většinou jen nízkých hodnot, přičemž nejvyšší byly zjištěny u izolátů *A. nidulans sensu stricto* (GM = 1,29 mg/l).

V literatuře bývá zmiňováno, že druh *A. nidulans* je často *in vitro* rezistentní k AMB a až v 50 % případů refrakterní k terapii tímto ATM (81). V naší studii bylo 50 % testovaných

kmenů inhibováno koncentracemi do 0,5 mg/l a 90 % kmenů do 4 mg/l. Hodnoty MIC pro *A. nidulans* se v publikovaných pracích pohybují v rozmezí 0,06-32 mg/l. Pro AMB byla zatím stanovena pouze hodnota ECV, a to 4 mg/l, EUCAST zatím analogickou hodnotu ECOFF neuvádí (17,82-84). Verweij *et al.* ve své studii zjistili u 12 testovaných kmenů *A. nidulans* zvýšené MIC pro AMB (v rozmezí 1-16 mg/l), což se shoduje s našimi výsledky (82).

Co se týká azolů, hodnoty pro *A. nidulans* získané z literatury se pohybují pro VRC v rozmezí 0,016-16 mg/l (ECOFF = 1 mg/l, ECV = 2 mg/l), pro POS 0,016-32 mg/l (ECOFF = 0,5 mg/l, ECV = 1 mg/l) a pro ITC 0,03-16 mg/l (ECOFF = 1 mg/l, ECV = 1 mg/l) (17,83,84). Uvedené MIC pro *A. nidulans* jsou v souladu s našimi výsledky, i když např. u VRC jsme nezjistili MIC vyšší než 0,5 mg/l. Příčinou této skutečnosti může být malý soubor testovaných kmenů, ve kterém se nevyskytovaly izoláty nesoucí rezistenci k azolovým ATM.

Z izolátů kryptických druhů této sekce vykazovaly zvýšené hodnoty MIC k AMB některé testované kmeny *A. quadrilineatus* (MIC 0,12-8 mg/l). V literatuře však zcela chybí kompaktnější údaje o jejich antifungální citlivosti, které by bylo možné porovnat s našimi výsledky. Hodnoty MIC jsou uváděny pouze v rámci jednotlivých kazuistik, přičemž se jedná o jeden nebo jen malé množství izolátů. Gugnani *et al.* popsali kazuistiku, v níž uvádějí MIC jednoho izolátu *A. quadrilineatus* k VRC (0,12 mg/l), ITC (0,12 mg/l) a AMB (0,5 mg/l), které se shodují s našimi daty (85). Masih *et al.* publikovali MIC k azolovým ATM pro druh *A. corrugatus* (VRC 0,5 mg/l; POS 0,125 mg/l a ITC 0,25 mg/l) rovněž v souladu s našimi výsledky (86,87). Nejvyšší hodnoty MIC pro VRC byly získány u druhu *A. sublatus* (GM = 0,52 mg/l a MIC₉₀ ≤ 1 mg/l), přesto lze tyto hodnoty stále považovat za nízké a dá se přepokládat dobrý efekt terapie VRC. V literatuře je možno dohledat kazuistiky, v nichž jsou uvedeny MIC tří izolátů *A. sublatus* k VRC (0,25-0,5 mg/l), POS (0,125-0,25 mg/l), ITC (0,25-0,5 mg/l) a AMB (0,25-1 mg/l) (45). Většina kmenů ze studie Verweije *et al.*, původně identifikovaná jako *A.*

quadrilineatus, byla molekulárními metodami identifikována jako *A. sublatus*, přičemž převažující počet z nich byl testován také v naší práci (82,45). Autoři uvádějí průměrné MIC pro zmíněných 12 izolátů, a to pro VRC 0,39 mg/l, POS 0,22 mg/l, ITC 0,13 mg/l, a AMB 0,5 mg/l (82). Stejně jako rozmezí MIC u tří izolátů *A. spinulosporus* ke čtyřem ATM (VRC 0,125-0,5 mg/l, POS 0,125 mg/l, ITC 0,5-1 mg/l a AMB 0,5-2 mg/l) v zásadě korelují všechny zmíněné údaje o citlivosti s našimi výsledky (88,89).

Všechny námi testované izoláty ze sekce *Nidulantes* velmi dobře rostly při teplotě 37°C a proto můžeme předpokládat, že jsou schopny vyvolat invazivní onemocnění u člověka. V literatuře jsou nejčastěji publikovány případy systémových mykóz vyvolaných *A. nidulans*. Tyto infekce byly prokázány zejména u pacientů s chronickým granulomatózním onemocněním (CDG) nebo u nemocných s akutní lymfoblastickou leukémií (ALL) a zahrnovaly případy osteomyelitidy, pneumonie, kožních lézí, mozkového abscesu a diseminované infekce (55,90-93). Z kryptických zástupců byly dosud publikovány ojedinělé případy mykóz vyvolaných druhů *A. quadrilineatus*, *A. sublatus* a *A. spinulosporus* (45,82,85,88,89,94-97). Byly prokázány u pacientů s CDG, leukémií po transplantaci kostní dřeně a dále u nemocného na dlouhodobé terapii glukokortikoidy. Rovněž byly popsány případy onychomykóz, jednak u pacienta bez základního onemocnění, ale také u nemocného s CHOPN (45,82,85,88,89,94-97).

Z hlediska terapie mykóz uvedené etiologie je v případě IA lékem volby VRC (20). V literatuře se uvádí, že *A. nidulans* společně s *A. terreus* mají limitovanou citlivost k AMB (98). Dále bývá zmiňováno, že infekce vyvolané *A. nidulans* jsou, na rozdíl od *A. fumigatus*, refrakterní k intenzivní terapii ATM a proto bývá nutný chirurgický zákrok (55). Segal *et al.*, kteří popsali šest případů osteomyelitid včetně diseminované infekce u pacientů s CDG, uváděli, že terapie ATM byla v případě *A. nidulans* delší a infekce častěji končily smrtí (55).

V popisovaných kazuistikách byli pacienti většinou léčeni AMB, přičemž v některých případech byl klinický efekt pozitivní a vedl k vyléčení infekce (55,92). Sadarangani *et al.* popsali dobrou klinickou odpověď při terapii mozkového abscesu vyvolaného *A. nidulans* u pacienta s ALL, kterému byla podávána kombinace VRC s CAS (93).

Co se týká léčby mykóz vyvolaných kryptickými druhy sekce *Nidulantes*, publikovali Polacheck *et al.* kazuistiku sinusitidy způsobenou *A. quadrilineatus* a úspěšně zvládnutou kombinací AMB v koloidní disperzi, chirurgické terapie a transfúze granulocytů (94). Naproti tomu dva případy IA vyvolané *A. sublatus* skončily i přes terapii dvěma lipidovými AMB (lipozomálním a v lipidovém komplexu), VRC a CAS nakonec smrtí obou pacientů (96,45). Byly také popsány tři případy infekce *A. spinulosporus*. Pacient v kazuistice IA, kdy později došlo k vytvoření kožního abscesu a rozvoji osteomyelitidy, byl léčen AMB (97). Úspěšná byla i terapie dalšího případu IA, tentokrát kombinací VRC a MICA (88). V poslední kazuistice, popsané Uhrinem *et al.*, se jednalo o aspergilovou endokarditidu. Ta byla nejprve úspěšně zvládnuta VRC, avšak později byl *A. spinulosporus* zachycen v hemokulturách. Přes intenzivní terapii lipidovým AMB a VRC došlo v důsledku dalších komplikací ke smrti pacienta (89).

5.5. Porovnání EUCAST a panelu YeastOne pro testování aspergilů

Ve dříve provedených studiích byly porovnávány komerční metody včetně YO a hodnocena jejich použitelnost při stanovení MIC (zejména azolových ATM) pro nejčastější zástupce rodů *Candida* a *Aspergillus* (99). Porovnání referenčních a komerčních metod pro kryptické kmeny v literatuře zcela chybí. Stanovení MIC pomocí soupravy YO pro zástupce rodu *Aspergillus* a AMB, ITC, VRC a POS bylo odvozeno od metodiky CLSI (98). Shoda YO a zmíněné standardizované metodiky byla testována pro nejčastější druhy aspergilů a byla po 48h poměrně vysoká - pro VRC 82%, POS 97 %, ITC 84,6 % a AMB 99,8 % (100-102).

V některých studiích byla po 48h pro *A. nidulans* uváděna u AMB a POS shoda 100 %, u ITC 86,8 % pro CLSI (101,102). Uvedená zjištění však úplně nekorelují s našimi daty, navíc na základě našich výsledků se YO lépe shoduje s EUCAST (s výjimkou AMB) až po delší době inkubace, tj. po 72h. Všeobecně se uvádí, že YO panel je vhodný pro testování citlivostí zástupců aspergilů, navíc dokáže detekovat rezistenci k ITC. Výhodou proti standardizovaným metodám je i snadné provedení (98).

6. Závěr

Na základě výsledků této studie je možné učinit následující závěry:

1. Standardizované metody stanovení citlivosti k ATM jsou vhodné zejména pro přehledové epidemiologické studie mykóz a pro ověření citlivosti méně obvyklých klinicky významných nálezů. Z důvodu požadavků na chemikálie (především čisté substance ATM) a pro technickou náročnost jejich přípravy je využitelnost v běžné diagnostice značně omezená. Proto by bylo vhodné soustředit testování citlivosti k ATM standardizovanými metodami do jedné nebo jen několika málo erudovaných laboratoří, které by měly vytvořeny odpovídající podmínky.
2. Komerční souprava YO se jeví jako vhodná pro testování MIC aspergilů k ATM v běžné diagnostické praxi, korelace se standardizovanými metodami však není vždy optimální. Proto u méně obvyklých, klinicky významných izolátů doporučujeme provádět konfirmaci citlivosti s využitím standardizovaných metodik.
3. Kryptické kmeny aspergilů jsou přítomny v klinickém materiálu a mohou představovat velké riziko v případech, kdy nejsou včas rozpoznány, není u nich testována citlivost, nebo nejsou-li použity vhodné metody pro její stanovení. Zástupci sekce *Fumigati* běžně vykazují zvýšené hodnoty MIC k různým antifungálním látkám a v praxi u nich často selhává empirická léčba. Naopak kryptické kmeny ze sekce *Nidulantes* obvykle mívají dobrou citlivost *in vitro* k azolovým ATM i AMB. Pro hlavního představitele této sekce, *A. nidulans sensu stricto*, však bývají typické vyšší hodnoty MIC k AMB.

7. Souhrn

Aspergilóza je nejfrekventovanější systémovou infekcí vyvolanou vláknitými houbami a jejím nejčastějším etiologickým agens je *A. fumigatus sensu stricto*. Dalšími obvyklejšími původci humánních mykóz jsou *A. nidulans*, *A. flavus*, *A. niger* a *A. terreus*. Z taxonomického hlediska nejsou uvedené druhy samostatné, ale řadí se do sekcí (*Fumigati*, *Nidulantes*, *Flavi*, *Nigri*, *Terrei*), v nichž představují nečastější zástupce. V klinických vzorcích však mohou být přítomny kmeny, které morfologicky vypadají identicky, ve skutečnosti se však jedná o jiné druhy. Bývají označovány jako kryptické a v rutinních mykologických laboratořích jsou pomocí běžných identifikačních postupů, založených na morfologických znacích, velmi často nesprávně identifikovány. Důsledkem může být nezjištění jejich rezistence k antimykotikům, což je časté zejména v sekci *Fumigati* (např. u druhového komplexu *A. viridinutans*, *A. lentulus*, *A. udagawae*). Cílem předložené dizertační práce bylo zjistit antifungální profil testovaných kmenů pomocí standardizované metodiky a porovnat s komerční soupravou YO. Studováno bylo celkem 171 kmenů aspergilů sekce *Fumigati* (n=90) a *Nidulantes* (n=81), převážně kryptických druhů, jejichž identifikace byla ověřena molekulárně-genetickými metodami. Bylo provedeno testování citlivosti k AMB, VRC, ITC, POS a echinokandinům pomocí standardizované metodiky EUCAST a komerční diagnostické soupravy YO. Byly stanoveny MIC uvedených antimykotik a procentuální shoda obou metod.

Většina zástupců sekce *Fumigati*, zejména komplexu *A. viridinutans*, vykazovala zvýšené hodnoty MIC k ITC a VRC, míra *in vitro* rezistence k AMB byla variabilní. Naopak k POS a echinokandinům byly izoláty obvykle dobře citlivé. Celkový antifungální profil se mezi jednotlivými druhy výrazně lišil a rovněž vnitrodruhová variabilita byla poměrně vysoká. Shoda MIC mezi EUCAST a YO byla u všech ATM poměrně vysoká, zejména v případě klinicky

významných druhů (*A. felis*, *A. udagawae* a *A. pseudoviridinutans*). Důležitým zjištěním byla skutečnost, že YO často neodhalila zvýšené MIC k ITC.

Všichni testovaní zástupci sekce *Nidulantes* obvykle vykazovali poměrně nízké hodnoty MIC ke všem testovaným azolovým ATM. V případě AMB měly kryptické druhy této sekce obvykle nižší hodnoty MIC v porovnání s *A. nidulans sensu stricto*. Shoda EUCAST a YO byla poměrně vysoká pro azolová antimykotika. U zástupců obou testovaných sekcí bylo dosaženo lepší shody po 72 než 48 h.

Z výsledků vyplývá, že vzhledem ke zjištěné vysoké vnitrodruhové variabilitě MIC aspergilů z komplexu *viridinutans* je nezbytné pro jejich stanovení používat spolehlivé metody, které dokáží odhalit častou rezistenci k systémovým ATM. Výsledky hodnocení citlivosti *in vitro* jsou proto u těchto izolátů v podstatě důležitější než správná druhová identifikace. V případě sekce *Nidulantes* se většina testovaných zástupců kryptických druhů vyznačovala spíše srovnatelnými nebo dokonce nižšími hodnotami MIC v porovnání s hlavním představitelem, proto se jejich neodhalení nejeví jako zásadní problém.

8. Summary

Aspergillosis is the most common systemic infection caused by filamentous fungi, and the most common etiologic agent is *A. fumigatus sensu stricto*. Other species frequently causing human infections are *A. flavus*, *A. nidulans*, *A. niger* and *A. terreus*. Taxonomically, these species do not stand alone but are classified into sections (*Fumigati*, *Nidulantes*, *Flavi*, *Nigri*, *Terrei*) in which they are the most common representatives. In clinical specimens, however, strains may be present that morphologically appear to be identical but they actually belong to different species. These are called cryptic species and are very often misidentified using conventional morphological identification techniques. As a result, their antifungal resistance may not be detected, as frequently seen in the section *Fumigati* (e.g. *A. viridinutans* species complex, *A. lentulus*, *A. udagawae*). The aim of the study was to determine the antifungal profile of the tested strains using standardized methodology and to compare it with the commercial kit YO.

A total of 171 *Aspergillus* strains were studied, predominantly cryptic agents from the sections *Fumigati* (n = 90) and *Nidulantes* (n = 81), whose identification was confirmed by molecular-genetic methods. Susceptibility to AMB, VRC, ITC, POS and echinocandins was tested in accordance with the EUCAST standardized methodology and with the YO commercial panel. MICs for the above antifungals were determined and percentage agreement for the two methods was calculated.

Most isolates from the section *Fumigati*, in particular *A. viridinutans* species complex, demonstrated elevated MICs for ITC and VRC, *in vitro* resistance to AMB was variable. In contrast, the isolates mostly showed good susceptibility to POS and echinocandins. There were considerable differences in the overall antifungal profile between the species, and intraspecific variation was relatively high. The agreement between the YO and the EUCAST

method was high, especially for clinically important species (*A. felis*, *A. udagawae*, and *A. pseudoviridinutans*). Importantly, however, the YO frequently failed to detect elevated MICs of ITC.

All the tested strains from the section *Nidulantes* usually exhibited relatively low MIC values for all azole antifungals. Concerning AMB, cryptic species from the section typically had lower MICs compared to *A. nidulans sensu stricto*. The agreement between the YO and EUCAST was relatively high for azole antifungals. For both sections, better agreement was observed after 72 hours than after 48 hours.

The result suggest that given the detected high intraspecific variability in MICs for strains from the *A. viridinutans* species complex, reliable methods for MIC determination able to reveal early resistance to systemic antifungals are needed. Therefore, *in vitro* susceptibility testing results are more important than correct species identification in case of these isolates. Since most of the tested cryptic species from the section *Nidulantes* showed comparable or even lower MIC values compared to the main representative, the failure to detect them does not seem to be a major problem.

9. Literatura

1. Gugnani HC. Ecology and taxonomy of pathogenic aspergilli. *Front Biosci.* 2003;8(1-3):346.
2. Brown, G. D., Denning, D. W., Gow, N. A., *et al.* Hidden killers: human fungal infections. *Sci Transl Med.* 2012;4(165):165rv13.
3. Dagenais TR, Keller NP. Pathogenesis of *Aspergillus fumigatus* in invasive aspergillosis. *Clin Microbiol Rev.* 2009;22(3):447-65.
4. Soubani AO, Chandrasekar PH. The clinical spectrum of pulmonary aspergillosis. *Chest.* 2002;121(6):1988-99.
5. Haber J, Vašáková M, Mallátová N, *et al.* Plicní aspergilové syndromy—diagnostika a léčba, doporučené postupy odborných společností. *Studia Pneumologica et Phthiseologica.* 2016;76(3):82-106.
6. Hussein HS, *et* Brasel JM. Toxicity, metabolism, and impact of mycotoxins on humans and animals. *Toxicol.* 2001;167(2):101-134.
7. Van Burik JAH, Colven R, Spach DH. Cutaneous aspergillosis. *J Clin Microbiol.* 1998;36(11):3115-21.
8. Ráčil Z, Mayer J. Invazivní aspergilóza: současné možnosti diagnostiky. *Vnitř Lék.* 2007;53.
9. De Pauw B, Walsh TJ, Donnelly JP, *et al.* Revised definitions of invasive fungal disease from the European organization for research and treatment of cancer/invasive fungal infections cooperative group and the national institute of allergy and infectious diseases mycoses study group (EORTC/MSG) consensus group. *Clin Infect Dis,* 2008;46(12):1813-21.

10. Stevens DA, Kan VL, Judson MA, *et al.* Practice guidelines for diseases caused by *Aspergillus*. *Clin Infect Dis*. 2000;696-709.
11. Reischies F, Hoenigl M. The role of surgical debridement in different clinical manifestations of invasive aspergillosis. *Mycoses*. 2014;57:1-14.
12. Arendrup MC, Cuenca-Estrella M, Lass-Flörl C, *et al.* EUCAST technical note on *Aspergillus* and amphotericin B, itraconazole, and posaconazole. *Clin Microbiol Infecti*. 2012;18(7):E248-50.
13. Ráčil Z, Kocmanová I, Haber J, *et al.* Léčba invazivní aspergilózy – doporučení odborníků s podporou CELL. *Postgrad med*. 2014;16(3):7-9.
14. Ullmann AJ, Aguado JM, Arikan-Akdogli S, *et al.* Diagnosis and management of *Aspergillus* diseases: executive summary of the 2017 ESCMID-ECMM-ERS guideline. *Clin Microbiol Infect*. 2018;24:e1-e38.
15. Kouba M, Ráčil Z, Haber J, *et al.* Primární profylaxe invazivních mykotických infekcí u hematoonkologických nemocných – doporučení odborníků s podporou CELL, ČHS JEP, ČOS JEP, SOS. *Postgrad Med*. 2014;16(3):19-21.
16. Pfaller MA, Diekema DJ, Ghannoum MA, *et al.* Wild-type MIC distribution and epidemiological cutoff values for *Aspergillus fumigatus* and three triazoles as determined by the Clinical and Laboratory Standards Institute broth microdilution methods. *J Clin Microbiol*. 2009;47(10):3142-6.
17. Arendrup MC, Cuenca-Estrella M, Lass-Flörl C, *et al.* Breakpoints for antifungal agents: an update from EUCAST focussing on echinocandins against *Candida* spp. and triazoles against *Aspergillus* spp. *Drug Resist Update*. 2013;16(6):81-95.

18. Perlin DS, Rautemaa-Richardson R, Alastruey-Izquierdo A. The global problem of antifungal resistance: prevalence, mechanisms, and management. *Lancet Infect Dis.* 2017;17(12):e383-e392.
19. van der Linden JW, Arendrup MC, Warris A, *et al.* Prospective multicenter international surveillance of azole resistance in *Aspergillus fumigatus*. *Emerg Infect Dis.* 2015;21:1041-4.
20. Verweij PE, Ananda-Rajah M, Andes D, *et al.* International expert opinion on the management of infection caused by azole-resistant *Aspergillus fumigatus*. *Drug Resist Updat.* 2015;21:30-40.
21. Verweij PE, Zhang J, Debets AJ, *et al.* In-host adaptation and acquired triazole resistance in *Aspergillus fumigatus*: a dilemma for clinical management. *Lancet Infect Dis.* 2016;16:e251-e60.
22. van der Linden JW, Snelders E, Kampinga GA, *et al.* Clinical implications of azole resistance in *Aspergillus fumigatus*, The Nizozemsko, 2007–2009. *Emerging Infecti Dis.* 2011;17(10):1846.
23. Chowdhary A, Kathuria S, Xu J, *et al.* Emergence of azole-resistant *Aspergillus fumigatus* strains due to agricultural azole use creates an increasing threat to člověk health. *PLoS pathogens*, 2013;9(10):e1003633.
24. Raper KB, Fennell DI. The genus *Aspergillus*. 1. vyd. Baltimore: The Williams and Wilkins company;1965. s. 686.
25. Balajee SA, Kano R, Baddley JW, *et al.* Molecular identification of *Aspergillus* species collected for the transplant-associated infection surveillance network. *J Clin Microbiol.* 2009;47:3138-41.

-
26. Frisvad JC. Taxonomy, chemodiversity, and chemoconsistency of *Aspergillus*, *Penicillium*, and *Talaromyces* species. *Front Microbiol.* 2015;5:773.
 27. de Hoog GS, Guarro J. Atlas of clinical fungi. 2. vyd. Utrecht: Centraalbureau voor schimmelcultures; 2000. s. 1126.
 28. Lin SJ, Schranz J, Teutsch SM. Aspergillosis case-fatality rate: systematic review of the literature. *Clin Infect Dis.* 2001;32:358-66.
 29. Alastruey-Izquierdo A, Mellado E, Peláez T, et al. Population-based survey of filamentous fungi and antifungal resistance in Španělsko (FILPOP Study). *Antimicrob Agents Chemother.* 2013;57:3380-7.
 30. Lamoth F. *Aspergillus fumigatus*-Related Species in Clinical Practice. *Front Microbiol.* 2016;7:683.
 31. Balajee SA, Gribskov JL, Hanley E, et al. *Aspergillus lentulus* sp. nov., a new sibling species of *A. fumigatus*. *Eukaryot Cell.* 2005;4:625-32.
 32. Sugui JA, Vinh DC, Nardone G, et al. *Neosartorya udagawae* (*Aspergillus udagawae*), an emerging agent of aspergillosis: how different is it from *Aspergillus fumigatus*? *J Clin Microbiol.* 2010;48:220-8.
 33. Nováková A, Hubka V, Dudová Z, et al. New species in *Aspergillus* section *Fumigati* from reclamation sites in Wyoming (USA) and revision of *A. viridinutans* complex. *Fungal Divers.* 2014;64:253-74.
 34. Yaguchi T, Horie Y, Tanaka R, et al. Molecular phylogenetics of multiple genes on *Aspergillus* section *Fumigati* isolated from clinical specimens in Japonsko. *Jap J Med Mycol.* 2007;48:37-46.
 35. Barrs VR, van Doorn TM, Houbraken J, et al. *Aspergillus felis* sp. nov., an emerging agent of invasive aspergillosis in humans, cats, and dogs. *PLoS One*, 2013;8:e64871.

-
36. Eamvijarn A, Manoch L, Chamswarnng C, *et al.* *Aspergillus siamensis* sp. nov. from soil in Thailand. *Mycoscience*. 2013;54:401-5.
 37. Barrs V, Beatty J, Dhand NK, *et al.* Computed tomographic features of feline sino-nasal and sino-orbital aspergillosis. *Vet J*. 2014;201:215-22.
 38. Sugui JA, Peterson SW, Figat A, *et al.* Genetic relatedness versus biological compatibility between *Aspergillus fumigatus* and related species. *J Clin Microbiol*. 2014;52:3707-21.
 39. Matsuzawa T, Takaki GMC, Yaguchi T, *et al.* *Aspergillus arcoverdensis*, a new species of *Aspergillus* section *Fumigati* isolated from caatinga pũda in State of Pernambuco, *Brazillie Mycoscience*. 2015;56:123-31.
 40. Shigeyasu C, Yamada M, Nakamura N, *et al.* Keratomycosis caused by *Aspergillus viridinutans*: an *Aspergillus fumigatus*-resembling mold presenting distinct clinical and antifungal susceptibility patterns. *Med Mycol*. 2012;50:525-8.
 41. Chen AJ, Frisvad JC, Sun BD, *et al.* *Aspergillus* section *Nidulantes* (formerly *Emericella*): Polyphasic taxonomy, chemistry and biology. *Stud Mycol*. 2016;84, 1-118.
 42. Hawksworth DL. Naming *Aspergillus* species: progress towards one name for each species. *Med Mycol*. 2011;49(S1):S70-S76.
 43. Gabrielli E, Fothergill AW, Brescini L, *et al.* Osteomyelitis caused by *Aspergillus* species: a review of 310 reported cases. *Clin Microbiol Infect*. 2014;20(6):559-65.
 44. Hubka V, Novakova A, Peterson SW, *et al.* A reappraisal of *Aspergillus* section *Nidulantes* with descriptions of two new sterigmatocystinproducing species. *Plant Syst Evol*. 2016;2016(302):1267–99.

-
45. Chrenkova V, Hubka V, Cetkovsky P, *et al.* Proven Invasive Pulmonary Aspergillosis in Stem Cell Transplant Recipient Due to *Aspergillus sublatus*, a Cryptic Species of *A. nidulans*. *Mycopathol.* 2018;183(2):423-9.
 46. 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.
 47. Lass-Flörl C, *et* Perkhofer S. *In vitro* susceptibility-testing in *Aspergillus* species. *Mycoses.* 2008;51(5):437-446.
 48. 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.
 49. Espinel-Ingroff A, Canton E. Comparison of Neo-Sensitabs tablet diffusion assay with CLSI broth microdilution M38-A and disk diffusion methods for testing susceptibility of filamentous fungi with amphotericin B, caspofungin, itraconazole, posaconazole, and voriconazole. *J Clin Microbiol.* 2008;46(5):1793-803.
 50. Guinea J, Verweij PE, Meletiadis J, *et al.* How to: EUCAST recommendations on the screening procedure E. Def 10.1 for the detection of azole resistance in *Aspergillus fumigatus* isolates using four well azole-containing agar plates. *Clin Microbiol Infect.* 2018;1-7.
 51. Hubka V, Barrs V, Dudová Z, *et al.* Unravelling species boundaries in the *Aspergillus viridinutans* complex (section *Fumigati*): opportunistic člověk and animal pathogens capable of interspecific hybridization. *Persoonia.* 2018;41:142-74.

-
52. Arendrup MC, Guinea J, Cuenca-Estrella M, *et al.* and the Subcommittee on Antifungal Susceptibility Testing (AFST) of the ESCMID European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). 2015. EUCAST Method for the determination of broth dilution minimum inhibitory concentrations of antifungal agents for conidia forming moulds version 9.3. (December, 2015).
 53. Balajee SA, Borman AM, Brandt ME, *et al.* Sequence-based identification of *Aspergillus*, *Fusarium*, and *Mucorales* species in the clinical mycology laboratory: where are we and where should we go from here? *J Clin Microbiol.* 2009;47(4),877-84.
 54. Gautier M, Normand AC, Ranque S. Previously unknown species of *Aspergillus*. *Clin Microbiol Infect.* 2016;22:662-9.
 55. Segal BH, DeCarlo ES, Kwon-Chung KJ, *et al.* *Aspergillus nidulans* infection in chronic granulomatous disease. *Medicine.* 1998;77(5):345-54.
 56. Paulussen C, Hallsworth JE, Álvarez-Pérez S, *et al.* Ecology of aspergillosis: insights into the pathogenic potency of *Aspergillus fumigatus* and some other *Aspergillus* species. *Microb Biotechnol.* 2017;10(2):296-322.
 57. Castro C, Galán-Sánchez F, Linares MJ, *et al.* A prospective survey of *Aspergillus* spp. in respiratory tract samples: Species identification and susceptibility patterns. *Med Mycol.* 2018;80:1-9.
 58. Vidal-Acuña MR, Ruiz M, Torres MJ., *et al.* Prevalence and *in vitro* antifungal susceptibility of cryptic species of the genus *Aspergillus* isolated in clinical samples. *Enfermedades infecciosas y microbiología clinica.* 2018;1-5.

-
59. Hubka V, Kubatova A, Mallatova N, *et al.* Rare and new etiological agents revealed among 178 clinical *Aspergillus* strains obtained from Czech patients and characterized by molecular sequencing. *Med Mycol.* 2012;50(6):601-10.
 60. Katz ME, Dougall AM, Weeks K, *et al.* Multiple genetically distinct groups revealed among clinical isolates identified as atypical *Aspergillus fumigatus*. *J Clin Microbiol.* 2005;43:551-5.
 61. Alcazar-Fuoli L, Mellado E, Alastruey-Izquierdo A, *et al.* *Aspergillus* section Fumigati: antifungal susceptibility patterns and sequence-based identification. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008;52:1244-51.
 62. Vinh DC, Shea YR, Jones PA, *et al.* Chronic invasive aspergillosis caused by *Aspergillus viridinutans*. *Emerg Infect Dis.* 2009;15:1292-4.
 63. Vinh DC, Shea YR, Sugui JA, *et al.* Invasive aspergillosis due to *Neosartorya udagawae*. *Clin Infect Dis.* 2009;49:102-11.
 64. Kano R, Itamoto K, Okuda M, *et al.* Isolation of *Aspergillus udagawae* from a fatal case of feline orbital aspergillosis. *Mycoses.* 2008;51:360-1.
 65. Coelho D, Silva S, Vale-Silva L, *et al.* *Aspergillus viridinutans*: an agent of adult chronic invasive aspergillosis. *Med Mycol.* 2011;49:755-9.
 66. Posteraro B, Mattei R, Trivella F, *et al.* Uncommon *Neosartorya udagawae* fungus as a causative agent of severe corneal infection. *J Clin Microbiol.* 2011;49:2357-60.
 67. Barrs VR, Halliday C, Martin P, *et al.* Sinonasal and sino-orbital aspergillosis in 23 cats: aetiology, clinicopathological features and treatment outcomes. *Vet J.* 2012;191:58-64.
 68. Gyotoku H, Izumikawa, K, Ikeda H, *et al.* A case of bronchial aspergillosis caused by *Aspergillus udagawae* and its mycological features. *Med Mycol.* 2012;50:631-6.

-
69. Escribano P, Peláez T, Muñoz P, *et al.* Is azole resistance in *Aspergillus fumigatus* a problem in Spain? *Antimicrob Agents Chemother.* 2013;57:2815-20.
 70. Kano R, Shibahashi A, Fujino Y, *et al.* Two cases of feline orbital aspergillosis due to *Aspergillus udagawae* and *A. viridinutans*. *J Vet Med Sci.* 2013;75:7-10.
 71. Pelaez T, Alvarez-Perez S, Mellado E, *et al.* Invasive aspergillosis caused by cryptic *Aspergillus* species: a report of two consecutive episodes in a patient with leukaemia. *J Med Microbiol.* 2013;62:474-8.
 72. Alastruey-Izquierdo A, Alcazar-Fuoli L, Cuenca-Estrella M. Antifungal susceptibility profile of cryptic species of *Aspergillus*. *Mycopathol.* 2014;178:427-33.
 73. Álvarez-Pérez S, Mellado E, Serrano D, *et al.* Polyphasic characterization of fungal isolates from a published case of invasive aspergillosis reveals misidentification of *Aspergillus felis* as *Aspergillus viridinutans*. *J Med Microbiol.* 2014;63:617-19.
 74. Tamiya H, Ochiai E, Kikuchi K, *et al.* Secondary metabolite profiles and antifungal drug susceptibility of *Aspergillus fumigatus* and closely related species, *Aspergillus lentulus*, *Aspergillus udagawae*, and *Aspergillus viridinutans*. *J Infect Chemother.* 2015;21:385-91.
 75. Chong GM, Vonk AG, Meis JF, *et al.* Interspecies discrimination of *A. fumigatus* and siblings *A. lentulus* and *A. felis* of the *Aspergillus* section *Fumigati* using the AsperGenius® assay. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2017;87:247-52.
 76. Seki A, Yoshida A, Matsuda Y, *et al.* Fatal fungal endocarditis by *Aspergillus udagawae*: an emerging cause of invasive aspergillosis. *Cardiovasc Pathol.* 2017;28:14-7.
 77. Howard SJ. Multi-resistant aspergillosis due to cryptic species. *Mycopathol.* 2014;178:435-9.

-
78. Diekema DJ, Messer SA, Hollis RJ, *et al.* Activities of caspofungin, itraconazole, posaconazole, ravuconazole, voriconazole, and amphotericin B against 448 recent clinical isolates of filamentous fungi. *J Clin Microbiol.* 2003;41:3623-6.
 79. Sabatelli F, Patel R, Mann PA, *et al.* *In vitro* activities of posaconazole, fluconazole, itraconazole, voriconazole, and amphotericin B against a large collection of clinically important molds and yeasts. *Antimicrob Agents Chemother.* 2006;50:2009-15.
 80. Nedel WL, Pasqualotto AC. Treatment of infections by cryptic *Aspergillus* species. *Mycopathol.* 2014;178:441-5.
 81. Kontoyiannis DP, Lewis RE, May GS, *et al.* *Aspergillus nidulans* is frequently resistant to amphotericin B. *Mycoses.* 2002;45(910):406-7.
 82. Verweij PE, Varga J, Houbraken J, *et al.* *Emericella quadrilineata* as cause of invasive aspergillosis. *Emerging Infect Dis.* 2008;14(4):566.
 83. Espinel-Ingroff A, Diekema DJ, Fothergill A, *et al.* Wild-type MIC distributions and epidemiological cutoff values for the triazoles and six *Aspergillus* spp. for the CLSI broth microdilution method (M38-A2 document). *J Clin Microbiol.* 2010;48(9):3251-3257.
 84. Espinel-Ingroff A, Fothergill A, Fuller J, *et al.* Wild-type MIC distributions and epidemiological cutoff values for caspofungin and *Aspergillus* spp. for the CLSI broth microdilution method (M38-A2 document). *Antimicrob Agents Chemother.* 2011;55(6):2855-2859.
 85. Gugnani HC, Vijayan VK, Tyagi P, *et al.* Onychomycosis due to *Emericella quadrilineata*. *J Clin Microbiol.* 2004;42(2):914-6.
 86. Masih A, Singh PK, Kathuria S, *et al.* Identification by molecular methods and matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry and antifungal

-
- susceptibility profiles of clinically significant rare *Aspergillus* species in a referral chest hospital in Delhi, India. *J Clin Microbiol.* 2016;54(9):2354-64.
87. Masih A, Singh PK, Kathuria S, *et al.* Clinically significant rare *Aspergillus* species in a referral chest hospital, Delhi, India: molecular and MALDI TOF identification and their antifungal susceptibility profiles. *J Clin Microbiol.* 2016; JCM-00962.
88. Yu J, Mu X, Li R. Invasive pulmonary aspergillosis due to *Emericella nidulans* var. *echinulata*, successfully cured by voriconazole and micafungin, *J Clin Microbiol.* 2013;51:1327–9.
89. Uhrin GB, Jensen RH, Korup E, *et al.* Recurrent prosthetic valve endocarditis caused by *Aspergillus delacroixii* (formerly *Aspergillus nidulans* var. *echinulatus*). *Med Mycol Case Rep.* 2015;10:21-3.
90. Walmsley S, Devi S, King S, *et al.* Invasive *Aspergillus* infections in a pediatric hospital: a ten-year review. *J Pediatr Infect Dis.* 1993;12(8):673-82.
91. Lucas GM, Tucker P, Merz WG. Primary cutaneous *Aspergillus nidulans* infection associated with a Hickman catheter in a patient with neutropenia. *Clin Infect Dis.* 1999;29(6):1594-6.
92. Dotis J, Roilides E. Osteomyelitis due to *Aspergillus* spp. in patients with chronic granulomatous disease: comparison of *Aspergillus nidulans* and *Aspergillus fumigatus*. *Int J Infect Dis.* 2004;8(2):103-10.
93. Sadarangani M, Harvey M, McDonald A, *et al.* Brain abscesses due to *Aspergillus nidulans* infection during induction chemotherapy for acute lymphoblastic leukemia. *J Pediatr Hematol Oncol.* 2015;37(6):e384-e386.
94. Polacheck I, Nagler A, Okon E, *et al.* *Aspergillus quadrilineatus*, a new causative agent of fungal sinusitis. *J Clin Microbiol.* 1992;30(12):3290-3.

-
95. Sharma D, Capoor MR, Ramesh V, *et al.* A rare case of onychomycosis caused by *Emericella quadrilineata* (*Aspergillus tetrazonus*). *Indien J Med Microbiol.* 2015;33(2):314.
 96. de Fontbrune FS, Denis B, Meunier M, *et al.* Iterative breakthrough invasive aspergillosis due to TR (34)/L98H azole-resistant *Aspergillus fumigatus* and *Emericella sublata* in a single hematopoietic stem cell transplant patient. *Transpl Infect Dis.* 2014;16(4):687-691.
 97. White CJ, Kwon-Chung KJ, Gallin JI. Chronic granulomatous disease of childhood. An unusual case of infection with *Aspergillus nidulans* var. *echinulatus*, *Am J Clin Pathol.* 1988;90:312–6.
 98. Lass-Flörl, C. In vitro susceptibility testing in *Aspergillus* species: an update. *Future Microbiol.* 2010;5(5):789-99.
 99. Espinel-Ingroff A, Turnidge J, Alastruey-Izquierdo A, *et al.* Method-dependent epidemiological cutoff values for detection of triazole resistance in *Candida* and *Aspergillus* species for the Sensititre YeastOne colorimetric broth and Etest agar diffusion methods. *Antimicrob Agents Chemother.* 2019;63(1):e01651-18.
 100. Castro C, Serrano MC, Flores B, *et al.* Comparison of the Sensititre YeastOne colorimetric antifungal panel with a modified CCLS M38-A method to determine the activity of voriconazole against clinical isolates of *Aspergillus* spp. *J Clin Microbiol.* 2004;42(9):4358-60.
 101. Patel R, Mendrick C, Knapp CC, *et al.* Clinical evaluation of the Sensititre YeastOne plate for testing susceptibility of filamentous fungi to posaconazole. *J Clin Microbiol.* 2007;45(6):2000-2001.

102. Meletiadis J, Mouton JW, Meis JF, *et al.* Comparison of the Etest and the sensititre colorimetric methods with the NCCLS proposed standard for antifungal susceptibility testing of *Aspergillus* species. *J Clin Microbiol.* 2002;40(8):2876-85.

10. Publikační činnost v průběhu DSP

10.1. Publikace v časopisech s impakt faktorem

1. **Lyskova P**, Hubka V, Petricakova A, *et al.* Equine Dermatophytosis due to *Trichophyton bullosum*, a Poorly Known Zoophilic Dermatophyte Masquerading as *T. verrucosum*. *Mycopathol.* 2015;180(5-6):407-419.
2. Tyll T, **Lyskova P**, Hubka V, *et al.* Early diagnosis of cutaneous mucormycosis due to *Lichtheimia corymbifera* after a traffic accident. *Mycopathol.* 2015:1-6.
3. **Lyskova P**, Kubanek M, Hubka V, *et al.* Successful Posaconazole Therapy of Disseminated Alternariosis due to *Alternaria infectoria* in a Heart Transplant Recipient. *Mycopathol.* 2016:1-7.
4. **Lyskova P**, Hubka V, Svobodova L, *et al.* Antifungal susceptibility of the *Aspergillus viridinutans* complex: comparison of two *in vitro* methods. *Antimicrob Agents Chemother.* 2018;01927.
5. Chrenkova V, Hubka V, Cetkovsky P, Kouba M, Weinbergerova B, **Lyskova P**, *et al.* Invasive Pulmonary Aspergillosis in Stem Cell Transplant Recipient Due to *Aspergillus sublatus*, a Cryptic Species of *A. nidulans*. *Mycopathologia.* 2018;183(2): 423-429.
6. Kocmanová I, **Lysková P**, Chrenkova V, *et al.* Nozokomiální kandidémie v České republice v letech 2012–2015: výsledky mikrobiologické multicentrické studie *Epidemiol Mikrobiol Immunol.* 2018;67(1):3-10.
7. Dobias R, Jaworska P, Tomaskova H, Kanova M, **Lyskova P**, *et al.* Diagnostic value of serum galactomannan, (1-3)- β -D-glucan, and *Aspergillus fumigatus*-specific IgA and IgG assays for invasive pulmonary aspergillosis in non-neutropenic patients. *Mycoses.* 2018;61(8):576-586.

-
8. Dobias R, Filip M, Vragova K, Dolinska D, Zavodna P, Dujka A, Linzer P, Jurek P, Studena B, Cerna E, Mrazek J, Jaworska P, Kantorova M, **Lyskova P**, et al. Successful surgical excision of cerebral abscess caused by *Fonsecaea monophora* in an immunocompetent patient and review of literature. *Folia Microbiologica*. 2018:1-6.

10.2. Publikace v recenzovaných časopisech bez impakt faktoru

1. **Lysková P**, Hubka V, Bodnárová J. – Příklad tinea corporis vyvolaný *Microsporum incurvatum*, geofilním druhem příbuzným *M. gypseum*. *Česk Dermatol*. 2014;89(4):187-191.
2. Hubka V, Větrovský T, Dobiasova S, Skorepova M, **Lyskova P**, et al. Molekulární epidemiologie dermatofytóz v České republice – výsledky dvouleté studie. *Česk Dermatol*. 2014;89(4):167-174.
3. Hubka V, Čmoková A, Skořepová M, Mallátová N, Dobiášová S, **Lysková P**, et al. Současný vývoj v taxonomii dermatofytů a doporučení pro pojmenovávání klinicky významných druhů. *Česk Dermatol*. 2014;89:151-165.
4. Svobodová L, **Lysková P**, Hamal P. Vulvovaginal candidiasis. *Klin Mikrobiol Inf Lék*. 2015;21(2):74-81.
5. **Lysková P**. Invazivní infekce vyvolané oportunními vláknitými houbami. *Živa*. 2017;5:254.
6. **Lysková P**, Dobiáš R, Kuklová I, et al. Pět případů lidských dermatofytóz vyvolaných zoofiliím druhem *Trichophyton erinacei* přeneseným z ježků. *Česk Dermatol*. 2018;93(6):237-243.
7. Hubka V, Čmoková A, Peano A, Větrovský T, Dobiáš R, Mallátová N, **Lysková P**, et al. Zoonotické dermatomykózy: klinický obraz, diagnostika, etiologie, léčba a epidemiologická situace u nás. *Česk Dermatol*. 2018;93 (6):208-235.

10.3 Přednášky a postery s abstraktem

1. **Lysková P**, Dobiáš R *et* Hamal P. Diagnostika aspergilových plicních infekcí u non-neutropenických pacientů. Sborník abstrakt XXII. Moravsko-slovenské mikrobiologické dny; 2014 říjen 2-4; Luhačovice.
2. Svobodova L, Stromerova N, Bardon J, **Lyskova P**, *et al.* 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.
3. Cmokova A, Hubka V, Kolarik M, Dobiasova S, Skorepova M, **Lyskova P**, *et al.* 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.
4. **Lysková P**, Tyll T, Muller M, *et al.* Kasuistika: časně diagnostikovaná kožní mukormykóza u pacienta s polytraumatem. Sborník abstrakt KMINE 2015; 2015 září 23-25; Špindlerův Mlýn.
5. **Lysková P**, Tyll T, Muller M, *et al.* Kazuistika: časná diagnostika kožní mukormykózy. Sborník abstrakt XXIII. Moravsko-slovenské mikrobiologické dny; 2015 červen 1-3; Tatranská Lomnica SK
6. **Lyskova P**, Tyll T, Hubka V, *et al.* A case of cutaneous mucormycosis caused by *Lichtheimia corymbifera*. *Abstracts of the 7th Trends in Medical Mycology*. Lisbon. *Mycoses*. 2015;58(Suppl 4):119.

7. **Lyskova P**, Hubka V, Petricakova A, *et al.* Equine dermatophytosis due to *Trichophyton bullosum* in the Česká Republika. *Abstracts of the 7th Trends in Medical Mycology*. Lisabon. *Mycoses*. 2015;58(Suppl 4):126.
8. Svobodova L, **Lyskova P**, Hamal P. Epidemiology of *Candida pelliculosa*, *Candida utilis* and *Candida fabianii* in the Česká Republika. *Abstracts of the 7th Trends in Medical Mycology*. Lisabon. *Mycoses*. 2015;58(Suppl 4):136.
9. Hamal P, Hubka V, Cmokova A, Vetrovsky T, Svobodova L, Dobiasova S, Skorepova M, Mallatova N, **Lyskova P**, *et al.* Molecular epidemiology of dermatophytosis: results of a three year multicentric survey in the Česká Republika. *Abstracts of the 4th European Confederation of Medical Mycology Educational Symposium*. Tel-Aviv. *Mycoses*. 2016;59(Suppl 1):14.
10. **Lyskova P**, Hubka V, Petricakova A, *et al.* Equine dermatophytosis due to *Trichophyton bullosum* in the Česká Republika. *Mycoses*, 2015, vol. 58, suppl. 4, p. 126.
11. **Lyskova P**, Tyll T, Hubka V, *et al.* A case of cutaneous mucormycosis caused by *Lichtheimia corymbifera*. *Mycoses*, 2015, vol. 58, suppl. 4, p. 119.
12. **Lyskova P**, Tyll T, Hubka V, *et al.* Kasuistika: časně diagnostikovaná kožní mukormykóza u pacienta s polytraumatem. Sborník abstrakt XXII. Kongres KMINE; 2015 září 23.-25; Špindlerův mlýn.
13. Dobiáš R, Janíčková I, Vrba Z, **Lysková P**, *et al.* Pohled na mykotické infekce (*Aspergillus sp.*, *Cryptococcus neoformans*) s využitím kombinací moderních diagnostických metod. Časopis Slovenskej spoločnosti klinickej mikrobiológie, Slovenskej lekárskej spoločnosti a Sekcie klinickej mikrobiológie Slovenskej lekárskej komory ročník XV. – program a zborník abstraktov. 2015, s. 20; Nový Smokovec.

-
14. Dobiáš R, Vrba Z, **Lysková P**, *et al.* Diagnostický význam protilátek IgA a IgG specifických k antigenům *Aspergillus fumigatus* při invazivní plicní aspergilóze u non-neutropenických pacientů. Programový sborník kongresu klinické mikrobiologie, infekčních nemocí a epidemiologie – KMINE 2015. 2015, s. 57; Špindlerův Mlýn.
 15. **Lyskova P**, Kubanek M, Hubka V, *et al.* Příklad vzácné mykotické infekce: diseminovaná alternarióza. Sborník abstrakt XX. Česko-slovenský kongres o infekčních nemocech; 2016 červen 15.-17; Karlovy Vary.
 16. **Lyskova P**, Kubanek M, Hubka V, *et al.* Phaeohyfumykóza – diseminovaná alternarióza (kazuistika). *Mykologické listy*. 2016, 135, p. 87-89.
 17. **Lyskova P**, Hubka V, Petricakova A, *et al.* Case report - equine dermatophytosis due to *Trichophyton bulbosum* in Czech Republic. Abstrakt book ISHAM Workshop developments in clinical and Fundamentals aspects of dermatophytes; 2016 October 29.-30; Utrecht, The Nizozemsko.
 18. Dobiáš R, Němeček O, Mrázek J, Kantorová M, Jaworská P, **Lysková P**, *et al.* *Scedosporium apiospermum* jako původce chronické maxilární sinusitidy. XX. česko-slovenský kongres o infekčních nemocech. 2016; Praha.
 19. Dobiáš R, Sekanina Z, Křižáková L, Maslíková A, Jaworská P, **Lysková P**, *et al.* Přínos moderních sérologických metod v diagnostice kandidových infekcí u hospitalizovaných pacientů. XX. česko-slovenský kongres o infekčních nemocech. 2016; Praha.
 20. **Lyskova P**, Hubka V, Svobodova L, *et al.* „Rezistence kryptických druhů aspergilů k systémovým antimykotikům: testování citlivosti zástupců komplexu *Aspergillus viridinutans* (sekce *Fumigati*) metodikou EUCAST a kolorimetrickým testem Sensititre YeastOne. Sborník abstrakt VI. Kongres KMINE; 2017 říjen 25.-27; Praha

-
21. **Lyskova P**, Hubka V, Svobodova L, *et al.* „Multirezistentní kryptické druhy aspergilů z komplexu *Aspergillus viridinutans* (sekce *Fumigati*): testování citlivosti metodikou EUCAST a kolorimetrickým testem Sensititre YeastOne. Sborník abstrakt XXI. Moravsko-slovenské mikrobiologické dny; 2017 listopad 23.-25; Ostrava
22. **Lyskova P**, Hamal P, Hubka V, *et al.* Antifungal susceptibility patterns of opportunistic pathogens from the *Aspergillus viridinutans* complex (section *Fumigati*) determined by the EUCAST E.DEF 9.3 method and Sensititre YeastOne colorimetric antifungal panel. *Mycoses*, 2017, vol. 60, suppl. 2, p. 71.
23. Dobiáš R, Jaworská P, Mrázek J, Kantorová M, **Lysková P**, *et al.* Use of PCR for direct detection of rDNA of agents causing dermatomycosis from samples of the skin and its adnexa. *Mycoses*, 2017, s. 205-206.
24. Dobiáš R, Jaworská P, Mrázek J, Kantorová M, **Lysková P**, *et al.* Využití PCR při přímé detekci rDNA původců dermatomykóz ze vzorků kůže a jejích adnex. VI. Kongres mikrobiologie, infekčních nemocí a epidemiologie; 2017 říjen 25 – 27; Praha.

11. Seznam tabulek, grafů, obrázků a zkratk

11.1. Seznam tabulek

- Tab: 1.** Definice diagnostické jistoty invazivní aspergilózy
- Tab: 2.** Podmínky diluční metodiky CLSI a EUCAST pro vláknité houby
- Tab: 3.** Složení RPMI média se 2 % glukózy pufovaného MOPS
- Tab: 4.** Rozpouštědla pro přípravu zásobního roztoku, charakteristika a příslušné rozmezí testovaných koncentrací daných antimykotik
- Tab: 5.** ISO schéma pro přípravu série ředění antimykotik s finální koncentrací 0,0312-16 mg/l
- Tab: 6.** ISO schéma pro přípravu série ředění antimykotik s finální koncentrací 0,12-64 mg/l
- Tab: 7.** QC kmeny, které je možno použít pro kontrolu destiček
- Tab: 8.** Citlivost kmenů komplexu *Aspergillus viridinutans* k vybraným systémovým antimykotikům. Porovnání výsledků získaných metodou EUCAST a shoda s diagnostickou soupravou Sensititre YeastOne
- Tab: 9.** Citlivost zástupců sekce *Nidulantes* k vybraným systémovým antimykotikům. Porovnání výsledků získaných metodou EUCAST a shoda s diagnostickou soupravou Sensititre YeastOne

11.2. Seznam grafů

- Graf 1:** Druhovému zastoupení izolátů komplexu *Aspergillus viridinutans* (n=90)
- Graf 2:** Druhovému zastoupení izolátů aspergilů ze sekce *Nidulantes* (n=81)

-
- Graf 3:** Geometrický průměr (GM) hodnot minimálních inhibičních koncentrací vorikonazolu u zástupců komplexu *Aspergillus viridinutans*
- Graf 4:** Geometrický průměr (GM) hodnot minimálních inhibičních koncentrací itrakonazolu u zástupců komplexu *Aspergillus viridinutans*
- Graf 5:** Geometrický průměr (GM) hodnot minimálních inhibičních koncentrací posakonazolu u zástupců komplexu *Aspergillus viridinutans*
- Graf 6:** Geometrický průměr (GM) hodnot minimálních inhibičních koncentrací amfotericinu B u zástupců komplexu *Aspergillus viridinutans*
- Graf 7:** Porovnání minimálních inhibičních koncentrací vorikonazolu podle EUCAST se soupravou YeastOne hodnocenou po 48 a 72 hodinách
- Graf 8:** Porovnání minimálních inhibičních koncentrací itrakonazolu podle EUCAST se soupravou YeastOne hodnocenou po 48 a 72 hodinách
- Graf 9:** Porovnání minimálních inhibičních koncentrací posakonazolu podle EUCAST se soupravou YeastOne hodnocenou po 48 a 72 hodinách
- Graf 10:** Porovnání minimálních inhibičních koncentrací amfotericinu B podle EUCAST se soupravou YeastOne hodnocenou po 48 a 72 hodinách
- Graf 11:** Geometrický průměr (GM) hodnot minimálních inhibičních koncentrací vorikonazolu u zástupců aspergilů ze sekce *Nidulantes*
- Graf 12:** Geometrický průměr (GM) hodnot minimálních inhibičních koncentrací itrakonazolu u zástupců aspergilů ze sekce *Nidulantes*
- Graf 13:** Geometrický průměr (GM) hodnot minimálních inhibičních koncentrací posakonazolu u zástupců aspergilů ze sekce *Nidulantes*
- Graf 14:** Geometrický průměr (GM) hodnot minimálních inhibičních koncentrací amfotericinu B u zástupců aspergilů ze sekce *Nidulantes*

- Graf 15:** Porovnání minimálních inhibičních koncentrací vorikonazolu podle EUCAST se soupravou YeastOne hodnocenou po 48 a 72 hodin
- Graf 16:** Porovnání minimálních inhibičních koncentrací itrakonazolu podle EUCAST se soupravou YeastOne hodnocenou po 48 a 72 hodin
- Graf 17:** Porovnání minimálních inhibičních koncentrací posakonazolu podle EUCAST se soupravou YeastOne hodnocenou po 48 a 72 hodin
- Graf 18:** Porovnání minimálních inhibičních koncentrací amfotericinu B podle EUCAST se soupravou YeastOne hodnocenou po 48 a 72 hodin

11.3. Seznam obrázků

- Obr. 1:** Infekční cyklus *A. fumigatus*
- Obr. 2:** Cesty vzniku rezistence k azolovým antimykotikům při infekci *A. fumigatus*
- Obr. 3:** Typická mikromorfologie zástupců aspergilů ze sekce *Fumigati* a makromorfologie kolonie *A. fumigatus sensu stricto*
- Obr. 4:** Dendrogram rodu *Aspergillus* sekce *viridinutans*
- Obr. 5:** Typická mikromorfologie zástupců aspergilů ze sekce *Nidulantes* a makromorfologie kolonie *A. spinulosporus*
- Obr. 6:** Dendrogram rodu *Aspergillus* sekce *Nidulantes*
- Obr. 7:** Příklad testování citlivosti k antimykotikům pomocí tablet Neosensitabs na MHA - disková difúzní metoda u citlivého kmene *Aspergillus fumigatus*
- Obr. 8:** Příklad testování citlivosti k antimykotikům pomocí tablet Neosensitabs na MHAM - disková difúzní metoda u kmene *Candida glabrata* rezistentního k azolům
- Obr. 9:** Příklad stanovení hodnot MIC k antimykotikům pomocí Etestu

Obr. 10: Příklad stanovení hodnot MIC k antimykotikům pomocí Sensititre YeastOne

Obr. 11: Čtyřjamková destička pro vyhledávání azolové rezistence

11.4. Seznam zkratk

AFG	Anidulafungin
ALL	Akutní lymfoblastická leukémie
AMB	Amfotericin B
ASAC	<i>Aspergillus acrensis</i>
ASAR	<i>Aspergillus arcoverdensis</i>
ASFE	<i>Aspergillus felis</i>
ASNI	<i>Aspergillus nidulans</i>
ASPS	<i>Aspergillus pseudoviridinutans</i>
ASQUA	<i>Aspergillus quadrilineatus</i>
ASRU	<i>Aspergillus rugulosus</i>
ASSPI	<i>Aspergillus spinulosporus</i>
ASSU	<i>Aspergillus sublatus</i>
ASUD	<i>Aspergillus udagawae</i>
ASWY	<i>Aspergillus wyomingensis</i>
ATM	Antimykotika
BAT	Bronchoalveolární tekutina
BP	Breakpoint
CAS	Kaspofungin
CCF	Sbírka kultur hub (Culture Collection of Fungi)
CDG	Chronické granulomatózní onemocnění

CLSI	Ústav pro klinické a laboratorní standardy (Clinical and Laboratory Standard); dříve NCCLS (Národní výbor pro klinické laboratorní standardy)
ECOFF	Epidemiological cut-off value (EUCAST)
ECV	Epidemiological cut-off value (CLSI)
EUCAST-AFST	Evropská komise pro testování antimikrobiální citlivosti zaměřená na testování antifungálních látek (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing – Antifungal susceptibility testing)
FLU	Flukonazol
GM	Geometrický průměr (geometric mean)
CHOPN	Chronická obstrukční plicní nemoc
IA	Invazivní aspergilóza
IPA	Invazivní plicní aspergilóza
ISA	Isavukonazol
ITC	Itrakonazol
MEA	Malt extrakt agar
MEC	Minimální efektivní koncentrace
MFG	Mikafungin
MHA	Mueller-Hinton agar
MHAM	Mueller-Hinton agar s methylenovou modří
MIC	Minimální inhibiční koncentrace
MIC₅₀	Hodnota MIC, kdy je inhibován růst 50 % testovaných izolátů
MIC₉₀	Hodnota MIC, kdy je inhibován růst 90 % testovaných izolátů
PDA	Bramborovo-dextrózový agar

POS	Posakonazol
QC kmeny	Kontrolní kmeny (Quality Control strains)
SDA	Sabouraudův dextrózový agar
TBC	Tuberkulóza
VRC	Vorikonazol
YO	Sensititre YeastOne
YO48	Sensititre YeastOne odečítaný po 48 hodinách
YO72	Sensititre YeastOne odečítaný po 72 hodinách

12. Přílohy

Tab. P1. Seznam kmenů r. *Aspergillus* a informace o zdroji

Druh / Identifikační číslo (Sbírka) ^{1,2}	Lokalita, substrát, rok izolace
<i>Aspergillus</i> sp.	
IFM 57290 = CCF 4666	Brazílie, Amazonas, Manaus, tropický deštný prales, půda, 2001
IFM 57291 = CCF 4670	Brazílie, Acre, Xapuri, louky, půda z dobytčí farmy, 2001
CCF 4959 (S973)	Rumunsko, Movile cave, nad Lake Room, jeskynní sediment, 2014
CCF 4960 (S974)	Rumunsko, Movile cave, křížení, jeskynní sediment, 2014
CCF 4961 (S975)	Rumunsko, Movile cave, Lake Room, jeskynní sediment, 2014
<i>A. arcoverdensis</i>	
IFM 61334 ^T = JCM 19878 ^T = CCF 4900 ^T (6-2-32)	Brazílie, Pernambuco, poblíž Arcoverde, polopouštní půda v oblasti caatinga, 2011
IFM 61333 = CCF 4899 (10-2-3)	Brazílie, Pernambuco, poblíž Arcoverde, polopouštní půda v oblasti caatinga, 2011
IFM 61337 = JCM 19879 = CCF 4901 (1-1-34)	Brazílie, Pernambuco, poblíž Arcoverde, polopouštní půda v oblasti caatinga, 2011
IFM 61338 = JCM 19880 = CCF 4902 (6-2-3)	Brazílie, Pernambuco, poblíž Arcoverde, polopouštní půda v oblasti caatinga, 2011
IFM 61339 = CCF 4903 (2-1-11)	Brazílie, Pernambuco, poblíž Arcoverde, polopouštní půda v oblasti caatinga, 2011
IFM 61340 = CCF 4904 (7-2-33)	Brazílie, Pernambuco, poblíž Arcoverde, polopouštní půda v oblasti caatinga, 2011
IFM 61345 = CCF 5633 (3-2-2)	Brazílie, Pernambuco, poblíž Arcoverde, polopouštní půda v oblasti caatinga, 2011
IFM 61346 = CCF 4906 (4-2-14)	Brazílie, Pernambuco, poblíž Arcoverde, polopouštní půda v oblasti caatinga, 2011
IFM 61349 = CCF 4907 (4-2-9)	Brazílie, Pernambuco, poblíž Arcoverde, polopouštní půda v oblasti caatinga, 2011
IFM 61362 = CCF 4908 (5-2-2)	Brazílie, Pernambuco, poblíž Arcoverde, polopouštní půda v oblasti caatinga, 2011
IFM 59922 = CCF 4560 (08-SA-2-2)	Čína, půda, 2008
IFM 59923 = CCF 4569 (08-SA-2-1)	Čína, půda, 2008
FRR 1266 = CBS 121595 = DTO 019-F2 = CCF 4574	Austrálie, New South Wales, Warrumbungle National Park, písčité půda, 1971
<i>A. aureolus</i>	
IFM 47021 ^T = IFM 46935 ^T = IFM 53589 ^T = CBS 105.55 ^T = NRRL	
2244 ^T = IMI 06145 ^T = KACC 41204 ^T = KACC 41095 ^T = CCF 4644 ^T =	Ghana, Tafo, půda, 1950
CCF 4646 ^T = CCF 4648 ^T	

IFM 46584 = IFM 46936 = CBM-FA-0692 = CCF 4645 = CCF 4647	Brazílie, São Paulo State, Botucatu, půda, 1993
IFM 53615 = CBM-FA-934 = CCF 4571 (ex-type of <i>A. indohii</i>)	Brazílie, Acre, Cruzeiro do Sul, půda na travnaté pláni v a tropickém deštném pralese, 2001
IHEM 22515 (RV 71215)	Peru, Lima, lidská rohovka, <1995
A. felis	
CBS 130245 ^T = DTO 131-F4 ^T = CCF 5620 (Tiger Fitzpatrick)	Austrálie, Sydney, retrobulbární masa, sino-orbitální aspergillóza u 3.5-let staré domestikované krátkosrsté kočky, MN ⁵ , 2008
NRRL 62900 = CM-3147 = CCF 4895 (ex-type of <i>A. parafelis</i>)	Španělsko, lidský oropharyngeální exudát, 2004
NRRL 62903 ^T = CM-6087 ^T = CCF 4897 ^T (ex-type of <i>A. pseudofelis</i>)	Španělsko, člověk, sputum, 2010
NRRL 62901 = CM-5623 = CCF 4896 = CCF 4557 (Viridi-Pinh)	Portugalsko, bronchoalveolární laváž, chronická invazivní aspergillóza u 56-letého muže, 2007
IFM 59564 = CCF 5612	Japonsko, člověk, sputum, 2011
IFM 60053 = CCF 4559	Japonsko, abscess poblíž stehenní kosti, 40-letý muž s osteomyelitis, 2012
IFM 54303 = CCF 4570	Japonsko, člověk, klinický materiál, <2007
FRR 5679 = CCF 5613 (MK246)	Austrálie, hrudní masa u kočky s aspergilózou, <2005
FRR 5680 = CCF 5615 (MK284)	Austrálie, retrobulbární absces u kočky, <2005
CCF 2937	Česká Republika, poblíž Kladna, půda hlušinového náspu, 1993
CCF 4002 (AK 196/07)	Česká Republika, Markovičky, poblíž Kutné Hory, stará stříbrná skládka důlních odpadů, 2007
CCF 4003 (AK 27/07)	Česká Republika, Chvaletice, půdní krusta, opuštěný kalový rybník, 2007
CCF 4171 = CMF ISB 2162 = IFM 60852 (F39)	USA, Wyoming, Glenrock, půda ze skládky uhelného dolu, 2010
CCF 4172 (F47)	Španělsko, Andalusia, Aracena, Gruta de la Maravillas, jeskynní ovzduší, 2010
CCF 4148 = CMF ISB 1975 = IFM 60868 (F22)	USA, Wyoming, Glenrock, půda ze skládky uhelného dolu, 2010
CCF 4376 (AK 102/11)	Česká Republika, Krušné hory, poblíž Abertamy, půda ze staré skládky, 2011
CCF 4497 = CMF ISB 1936 (F6)	USA, Wyoming, Glenrock, půda ze skládky uhelného dolu, 2010
CCF 4498 = IFM 60853 (F49)	USA, Wyoming, Glenrock, půda ze skládky uhelného dolu, 2010
DTO 131-E4 = CCF 5609 (2384/07, Dipsy)	Austrálie, Brisbane, retrobulbární masa, sino-orbitální aspergillóza u 7-leté domestikované krátkosrsté kočky, FN ³ , 2007
DTO 131-E5 = CCF 5610 (4091/09, Porsha Davies)	Austrálie, Brisbane, retrobulbární masa, sino-orbitální aspergillóza u 3-leté Himalájské kočky, FN ³ , 2009
DTO 131-G1 = CCF 5611 (834/07, Cookie)	Austrálie, Sydney, retrobulbární masa, sino-orbitální aspergillóza u 2-leté Himalájské kočky, MN ³ , 2007

CCF 5614 (14/4138, Theodore Baird)	Austrálie, Sydney, sino-orbitální aspergilóza (později diseminovaná) u 5-leté kočky, Ragoll, MN ³ , 2013
CCF 5616 (Felix Hayes D)	Austrálie, Canberra, sino-orbitální aspergilóza u 8-leté domestikované dlouhosrsté kočky
DTO 131-F1 = CCF 5617 (66/10, Kirra)	Austrálie, Brisbane, retrobulbární masa, sino-orbitální aspergilóza u 5-leté domestikované krátkosrsté kočky, FN ³ , 2010
CCF 5618 (Luigi Croker)	Austrálie, Sydney, sino-orbitální aspergilóza (později diseminovaná) u 2-leté Britské krátkosrsté kočky, MN ³ , 2012
CBS 130248 = DTO 131-G3 = CCF 5619 (1767/10, Blackie)	Austrálie, Brisbane, retrobulbární masa, sino-orbitální aspergilóza u 4-leté domestikované krátkosrsté kočky, FN ³ , 2010
CBS 130249 = DTO 155-G3 = CCF 5621 (1207/05, Snoopy Hoebes)	Austrálie, Sydney, vitreální obsah 9-letého Staroanglického ovčáckého psa, MN ³ , 2005
DTO 131-F2 = CCF 5622 (3532/09, Ari Meyers)	Austrálie, Brisbane, retrobulbární masa, sino-orbitální aspergilóza u 4.5-leté kočky Ragdoll, MN ³ , 2009
CBS 130247 = DTO 131-G2 = CCF 5623 (1020/07, Mollie)	Austrálie, Sydney, retrobulbární masa, sino-orbitální aspergilóza u 2-leté domestikované krátkosrsté kočky, FN ³ , 2007
DTO 131-E9 = CCF 5624 (1848/08, Schreader)	Austrálie, Brisbane, retrobulbární masa, sino-orbitální aspergilóza u 1.5-leté domestikované krátkosrsté kočky, MN, 2008
DTO 131-E3 = CCF 5625 (3008/08 D, Lily Moore)	Austrálie, Brisbane, retrobulbární masa, sino-orbitální aspergilóza u 8-leté Perské kočky, FN ³ , 2008
DTO 131-F6 = CCF 5626 (8651/09, Kipp)	Austrálie, Brisbane, retrobulbární masa, sino-orbitální aspergilóza u 8-leté domestikované krátkosrsté kočky, MN ³ , 2009
CBS 130244 = DTO 131-E6 = CCF 5627 (4067/09D, Miki)	Austrálie, Sydney, retrobulbární masa, sino-orbitální aspergilóza u 5-leté Cornish Rex kočky, FN ³ , 2009
DTO 131-F3 = CCF 5628 (2188/08, Kcee)	Austrálie, Brisbane, retrobulbární masa, sino-orbitální aspergilóza u 7-leté domestikované krátkosrsté kočky, FN ³ , 2008
CBS 130246 = DTO 131-F9 = CCF 5629 (448/08, Simba)	Austrálie, Sydney, sinonasální dutina, sino-orbitální aspergilóza u 13-leté domestikované dlouhosrsté kočky, MN ³ , 2008
A. pseudoviridinutans	
NRRL 62904 ^T = CCF 5631 (NIHAV1, 1720)	USA, U.S. National Institutes of Health, biopsie mediastinálního lymfatického nodulu, 14-letý chlapec s chronickým granulomatózním onemocněním, 2004
CBS 458.75 = KACC 41203 = IHEM 9862 (ex-type of <i>A. fumigatus</i> var. <i>sclerotiorum</i>)	Indie, Lucknow, Mohanlalganj, půda, <1971

IMI 182127 = KACC 41614 = CCF 5630

IFM 55266 = CCF 5644

IFM 57289 = CCF 4665

IFM 59502 = CCF 4561

IFM 59503 = CCF 4562

CCF 5632 (NIHAV2, 2594)

A. siamensis

IFM 59793^T = KUFC 6349^T = CCF 4685^T

IFM 61157 = KUFC 6397 = CCF 4686

A. udagawae

IFM 46972^T = CBS 114218^T = KACC 41156^T = CCF 4558^T

IFM 46973^T = CBS 114217^T = KACC 41155^T

IFM 5058 = CCF 4662

IFM 51744 = CCF 4671

IFM 53868 = CCF 4667

IFM 54131 = CBM-FA-0697 = CCF 4663

IFM 54132 = CBM-FA-0698 = CCF 4664

IFM 54745 = CBM-FA-694 = CCF 4661

IFM 55207 = NBRC 31952 = CCF 4660

IFM 62155 = CCF 4668

CCF 4475 (F2)

CCF 4476 (F32)

CCF 4478 = CMF ISB 2193 (F66)

CCF 4479 = CMF ISB 2189 (F70)

CCF 4481 = CMF ISB 2191 (F83)

CCF 4491 = CMF ISB 1971 (F3)

CCF 4492 (F21)

Srí Lanka, *Pinus caribea*, <1974

Japonsko, člověk, plíce, 2004

Brazílie, Mato Grosso, půda

Japonsko, kornea, keratomykóza u 26-leté ženy, 2011

Japonsko, kornea, keratomykóza u 26-leté ženy, 2011

USA, plicní biopsie, 8-letý chlapec s hyperimmunoglobulin-E syndromem, 2004

Thajsko, Chonburi Province, Samaesarn Island, půda pobřežního lesa, 2008

Thajsko, Chiang Mai, termití hnízdo, půda, 2009

Brazílie, São Paulo State, Botucatu, Lagoa Seka Avea, půda z plantáže, 1993

Brazílie, São Paulo State, Botucatu, Lagoa Seka Avea, půda z plantáže, 1993

Japonsko, člověk, oko

Japonsko, člověk, klinický materiál, 2002

Japonsko, člověk, klinický materiál, 2004

Čína, Shaanxi, půda, 1994

Čína, Shaanxi, půda, 1994

Čína, Shaanxi, půda, 1994

Rusko, půda, 1985

Brazílie, půda, 2008

USA, Wyoming, Glenrock, prerie, půda, 2010

USA, Wyoming, Glenrock, půda, skládka důlních odpadů, 2010

USA, Wyoming, Gillette, půda, skládka důlních odpadů, 2011

USA, Illinois, půda, skládka důlních odpadů, 2011

USA, Wyoming, Gillette, půda, skládka důlních odpadů, 2011

USA, Wyoming, Glenrock, prairie půda, 2010

USA, Wyoming, Glenrock, půda, skládka důlních odpadů, 2010

CCF 4494 (F44)	USA, Wyoming, Glenrock, prerie, půda, 2010
CMF ISB 1972 = CCF 4502 (F11)	USA, Wyoming, Glenrock, půda, skládka důlních odpadů, 2010
CMF ISB 2190 = CCF 5635 (F76)	USA, Indiana, půda, skládka důlních odpadů, 2011
CMF ISB 2509 = CCF 5636 (F20)	USA, Wyoming, Glenrock, půda, skládka důlních odpadů, 2010
CCF 5637 (F37)	USA, Wyoming, Gillette, půda, skládka důlních odpadů, 2008
CCF 5638 (3C8, Percy)	USA, Philadelphia, sino-orbitalní aspergilóza u 4-leté Perské kočky, MN ³ , 2012
DTO 166-D6 = CCF 5639 (11.3356, Milo)	Austrálie, Sydney, sino-orbitalní aspergilóza u 2-leté domestikované krátkosrsté kočky, 2011
CCF 5634 (B3)	Česká Republika, Hostěradice, žížalí vývržky, 2012
A. viridinutans	
IFM 47045 ^T = IFM 47046 ^T = IMI 367415 ^T = IMI 062875 ^T = NRRL	
4365 ^T = NRRL 576 ^T = CBS 127.56 ^T = KACC 41142 ^T = CCF 4382 ^T =	Austrálie, Victoria, Frankston, králičí trus, <1954
CCF 4568 ^T	
A. wyomingensis	
CCF 4417 ^T = CMF ISB 2494 ^T = CBS 135456 ^T (F30)	USA, Wyoming, Glenrock, půda, skládka důlních odpadů, 2010
CCF 4169 = CMF ISB 2486 (F24)	USA, Wyoming, Glenrock, půda, 2010
CCF 4170 = CMF ISB 2485 (F12)	USA, Wyoming, Glenrock, půda, 2010
CCF 4411 = CMF ISB 1977 = IFM 60854 (F5)	USA, Wyoming, Glenrock, půda, skládka důlních odpadů, 2010
CCF 4412 (F9)	USA, Wyoming, Glenrock, půda, skládka důlních odpadů, 2010
CCF 4413 = CMF ISB 2317 (F10)	USA, Wyoming, Glenrock, půda, skládka důlních odpadů, 2010
CCF 4414 = CMF ISB 1974 = IFM 60856 (F13)	USA, Wyoming, Glenrock, půda, skládka důlních odpadů, 2010
CCF 4415 = CMF ISB 2487 (F28)	USA, Wyoming, Glenrock, půda, skládka důlních odpadů, 2010
CCF 4416 = CMF ISB 1976 = CBS 135455 (F29)	USA, Wyoming, Glenrock, půda, skládka důlních odpadů, 2010
CCF 4418 = CMF ISB 2162 = IFM 60855 (F31)	USA, Wyoming, Glenrock, půda, skládka důlních odpadů, 2010
CCF 4419 = CMF ISB 2495 (F53)	USA, Wyoming, Glenrock, půda, skládka důlních odpadů, 2010
CCF 4420 = CMF ISB 2491 (F60)	USA, Wyoming, Glenrock, půda, skládka důlních odpadů, 2010
IMI 133982 = CCF 4383	Rusko, Moskva, půda, <1968
IFM 59681 = CCF 4563	Čína, Urumqi, půda, 2008

DTO 155-G2 = CCF 5640 (Yogurt Rogers) Austrálie, Melbourne, retrobulbární masa, sino-orbitální aspergilóza u 1.5-leté Britské krátkosrsté kočky, 2010

outgroup

A. fischeri NRRL 181^T = CBS 544.65^T = CBS 101.12^T = ATCC 1020^T
= JCM 1740^T = FRR 181^T = IMI 211391^T Není známo, konzervovaná jablka, 1923

A. lentulus NRRL 35552^T = CBS 117885^T = IBT 27201^T = KACC
41940^T USA, člověk, klinický materiál

A. fumigatus NRRL 163^T = ATCC 1022^T = ATCC 4813^T = CBS
133.61^T = IMI 16152^T USA, Connecticut, kuřecí plíce

¹Culture collection acronyms: ATCC, American Type Culture Collection, Manassas, USA; CBM-FA, Natural History Museum & Institute, Chiba, Japonsko; BCCM/IHEM, Belgian Coordinated Collections of Microorganisms, Biomedical Fungi and Yeasts Collection, Scientific Institute of Public Health, Brussel, Belgie; CBS, Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, Nizozemsko; CCF, Culture Collection of Fungi, Prague, Česká Republika; CM, Filamentous fungus collection of the Spanish National Center for Microbiology, Madrid, Španělsko; CMF ISB, Collection of Microscopic Fungi, Institute of Půda Biology, Academy of Sciences of the Česká Republika, České Budějovice, Česká Republika; DTO, working collection of the Applied and Industrial Mycology department housed at CBS-KNAW; FRR, Food Fungal Culture Collection, North Ride, Austrálie; IBT, culture collection of the DTU Systems Biology, Lyngby, Dánsko; IMI, CABI's collection of fungi and bacteria, Egham, UK; JCM, Japonsko Collection of Microorganisms, Tsukuba, Japonsko; KACC, Korean Agricultural Culture Collection, Wanju, Jižní Korea; NBRC (IFO), Biological Resource Center, National Institute of Technology and Evaluation, Chiba, Japonsko; NRRL, Agricultural Research Service Culture Collection, Peoria, Illinois, USA.

²původní čísla kmenů a osobních označení jsou uvedena v závorce

³FN, female neutered (desexed), MN = male neutered

Tab. P2. Původ a specifikace kmenů zástupců sekce *Nidulantes*

Druh/identifikační číslo		
sbírka	Další označení kmene	Lokalita, substrát
<i>Aspergillus corrugatus</i>		
	CBS 191.77 = NHL 2763 = IMI	
DTO 047-I9	212201 = IBT 22829	půda pod <i>Saccharum officinarum</i> , Thajsko
CCF 4683	5b/13, PL 249	klinický materiál, plicní infekce, Česká Republika
<i>A. nidulans</i>		
DTO 042-B6	V44-45	Sputum, pacient with pulmonary mycobacterial disease and cavitary lung disease, (NIH, USA), Kolonizace
DTO 042-B8	V44-48	Sputum, pacient s nádorem tračníku, (NIH, USA), Kolonizace
DTO 042-C3	V32-12	BAL-tekutina, pacient s MDS, (Nijmegen, Nizozemsko), Pravděpodobná IA
DTO 042-C7	V45-01	Kožní stěr (Nijmegen, Nizozemsko), Kolonizace
DTO 042-D1	V06-20	Stěr z nosu (Nijmegen, Nizozemsko), Kolonizace
DTO 042-C6	V44-46	Sputum, pacient s imunodeficitem a bronchiektáziemi, (NIH, USA), Kolonizace
CCF 4880	690, PL 314	klinický materiál, plicní infekce, Česká Republika
CCF 4881	723d, PL 315	klinický materiál, plicní infekce, Česká Republika
CCF 4882	PL 683/14	klinický materiál, plicní infekce, Česká Republika
CCF 4355	MY13040, AK 3/12	klinický materiál, plicní infekce, Česká Republika
CCF 5343	MY988	klinický materiál, plicní infekce, Česká Republika
CCF 5342	MY3003	klinický materiál, plicní infekce, Česká Republika
CCF 5772	MY1169	klinický materiál, plicní infekce, Česká Republika
CCF 5794	NPL 1037/16	klinický materiál, plicní infekce, Česká Republika
CCF 5771	NPL 1490/16	klinický materiál, plicní infekce, Česká Republika
CCF 5795	NPL 952/16	klinický materiál, plicní infekce, Česká Republika
IFM 41396		pacient, Japonsko
IFM 47003	NBRC 9852	Říční sediment, Japonsko
IFM 51356		BAL, Japonsko

CCF 4363	CMF ISB 1766	vermikompost, <i>Eisenia andrei</i> - střevo
CCF 4364	CMF ISB 1767	ovzduší
CCF 4365	CMF ISB 1768	Žížalí vývržky
CCF 4366	CMF ISB 1818	jeskynní sediment
CCF 3379		stěr – sluchový kanál 21-letého muže, Hradec Králové, Česká Republika, 2002
CCF 2912		siláž, poblíž Ústí nad Labem, Česká Republika, 1992, K. Říhová
CCF 4064	73ME	sputum, Pardubice, Česká Republika
CCF 5869	NPL 1157/17	BAT, žena, 53, dg pneumonie, poslal to Dr. Stehlík z TN, odběr 27.9.17, izolováno 3.10.17.
A. pachycristatus		
CCF 5372	EMSL No. 2267	sesterna, nemocniční ovzduší, USA, Tuscon, Arizona, 2014, Ž. Jurjević
A. quadrilineatus		
DTO 007-H4	V43-63	Nehet (Bulandshahr, Indie), Prokázána onychomycosis
DTO 047-H4	CBS 493.65	Kůže muže, Kalifornie
DTO 319-F9	CBS 113684	Nehty, Uttar Pradesh
	CBS 119.55 = NRRL 2394 = ATCC	
DTO 047-G6	16839 = IBT 11111 = IMI 061453	Exponovaná továrna, Nové Mexiko
DTO 048-A8	CBS 125.55	Kontaminanta plodin, Recife, Brazílie
DTO 320-C3	CBS 467.88	Zahradní půda, Spain
DTO 325-D5	CBS 126215 = IBT 23423	Povrch písčité duny, půda, poušť, Namibie
	CGMCC 3.04661 = CGMCC	
DTO 322-D3	3.04661 = CCRC 32222 = IFO 5859	Neznámý zdroj, Japonsko
DTO 346-C7		Kojenecká výživa, Nizozemsko
IFM 52249		půda, Brazílie
CCF 5428	EMSL No. 2188	Vnitřní prostředí, vzduch v nemocnici, Arizona, USA, 2013, Ž. Jurjević
A. rugulosus		
DTO 007-G6	V43-77	Kost, pacient s CGD (Thessaloniki, Řecko), Prokázána
DTO 276-F1		BAL, Irán

	CBS 133.60 = NRRL 206 = ATCC	
DTO 321-H1	16820 = IMI 136775 = IBT 22820	Půda, New Jersey, USA
	CBS 200.75 = IBT 22848 = IMI	
DTO 047-I8	131554 = NRRL 3651	Půda, Kaulbhaskar, zemědělská farma, Allahaba, Indie
DTO 319-F8	CBS 113407	Granule netopýřího trusu, poblíž Gaba, Omán
DTO 319-G1	CBS 117.50 = IBT 22519	Hnůj, Thunder Bay, Ontario, Kanada
DTO 322-I9	CGMCC 3.06394	Kukuřičná mouka, Yunnan provincie, Čína
DTO 325-A7	IBT 10998	Hlavice květů Amaranthus, Dánsko
DTO 325-B8	IBT 13207	<i>Dipodomys ordii</i> lícni váček, Sevilleta National Wildlife Refuge, Socorro County, New Mexico, USA
DTO 325-F3	IBT 31140	Saltern, Secovlje, Slovinsko
DTO 061-D7	IBT 12265	Neznámý zdroj
CCF 3089		stěr z nekroz z pericararu, 1-měsíční novorozenec, Prague, Česká Republika , 1998
<i>A. spinulosporus</i>		
DTO 007-F2	4606	kmen AZN4606: biopsie, pacient s CGD (Nijmegen, Nizozemsko), Prokázána
DTO 042-C9	V53-70	V53-70: Sputum, pacient s COPD (Nijmegen, Nizozemsko), Kolonizace
	CBS 120.55 = NRRL 2395 = ATCC	
DTO 047-G9	16825 = IBT 22841 = IMI 061454	Půda, Buenos Aires, Argentina
	CBS 564.80 = IBT 22840 = IMI	
DTO 047-H1	250977	Kontaminace plodin, Kanada
DTO 065-F7		Ovzduší, farmaceutická továrna , Vídeň, Austria
DTO 325-D9	IBT 23829	Vnitřní prostředí, továrna, Dánsko
CCF 4367, CCF 4706	485, PL 191	klinický materiál, plicní infekce, Česká Republika
CCF 5773	NPL 430B/16	klinický materiál, plicní infekce, Česká Republika
CCF 4705	MY1150	klinický materiál, plicní infekce, Česká Republika
CCF 5796	NPL 2456/15	klinický materiál, plicní infekce, Česká Republika
CCF 5797	NPL 2029/15	klinický materiál, plicní infekce, Česká Republika
<i>A. sublatus</i>		

DTO 007-G7	V40-61	BAL-tekutina, pacient s CGD (případ 1, Nijmegen, Nizozemsko), Pravděpodobná IA
DTO 007-G9	V42-23	Bronchiální aspirát (případ 2, Nijmegen, Nizozemsko), Kolonizace
DTO 007-H1	V42-43	Biopsie mozku, BMT příjemce (Duke, USA), Prokázaná cerebrální aspergilóza
DTO 007-H2	V42-81	Biopsie mozku, pacient s CLL (case 4, Nijmegen, Nizozemsko), Prokázaná cerebrální aspergilóza
DTO 007-H3	V43-21	Sputum (případ 3, Nijmegen, Nizozemsko), Kolonizace
DTO 042-C2	V49-25	Plicní biopsie, pacient s CGD, (NIH, USA), Prokázaná IA
DTO 042-C4	V49-18	Sputum, pacient s bronchiálními (Nijmegen, Nizozemsko), Kolonizace
DTO 042-C5	V44-47	Plicní biopsie, pacient s CGD (NIH, USA), Prokázaná IA
DTO 042-C8	V24-62	Bronchiální aspirát (Nijmegen, Nizozemsko), Kolonizace
	CBS 140630 = IFO 30906 = IBT	
DTO 338-F7	19356 = IFM 4553 = DTO 338-F7	Půda pod <i>Saccharum officinarum</i> , Nakorn Pathom, Thajsko
	CBS 492.65 = ATCC 16848 = IBT	
DTO 047-H2	22844 = IMI 074181 = NRRL 200	Neznámý zdroj
	IBT 25906 = DTO 338-F9 = DTO	
DTO 325-E9	325-E9	Půda pod <i>Erica</i> sp., Zachenberg, Grónsko
DTO 346-C1		Dětská výživa, Nizozemsko
CCF 5344	MY1854	klinický materiál, plicní infekce, Česká Republika
CCF 5429	EMSL No. 2817	Prach v pracovně, Oceanside, New York, USA, 2015, Ž. Jurjevič
CCF 5438	EMSL No. 3247	Kuchyň, stěr, Bronx, NY, USA, 2015, Ž. Jurjevič
