

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA
KATEDRA ORGANICKÉ CHEMIE

**Molekulární identifikace a charakterizace klinicky
významných mikromycet**

Diplomová práce

Autor:	Bc. Anna Vávrová
Studijní program:	N1407 Chemie
Studijní obor:	Bioorganická chemie a chemická biologie
Typ studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	doc. MUDr. Petr Hamal, Ph.D.

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem předloženou diplomovou práci zpracovala samostatně pod vedením doc. MUDr. Petra Hamala, Ph.D. a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

Souhlasím s tím, aby má práce byla zpřístupněna v knihovně Katedry organické chemie, Přírodovědecké fakulty, Univerzity Palackého v Olomouci.

V Olomouci, 9. 5. 2019.....

Anna Vávrová

Poděkování

Na tomto místě bych chtěla poděkovat vedoucímu mé diplomové práce panu doc. MUDr. Petru Hamalovi, Ph.D. za odborné vedení, ochotu, čas a cenné rady, které mi poskytoval v průběhu řešení práce. Dále mé poděkování patří panu Mgr. Jakubu Mrázkovi ze Zdravotního ústavu se sídlem v Ostravě, za pomoc při sekvenaci genomu hub v jejich laboratoři a doc. RNDr. Aleši Panáčkovi, Ph.D. za odborné rady v oblasti fyzikální chemie.

Nesmím vynechat ani pracoviště Ústavu mikrobiologie Lékařské fakulty Univerzity Palackého v Olomouci a Fakultní nemocnici Olomouc za vytvoření přátelského pracovního prostředí.

V neposlední řadě musím poděkovat mé rodině a přátelům, kteří mě během mého studia plně podporovali.

Bibliografická identifikace:

Jméno a příjmení autora: Bc. Anna Vávrová
Název práce: Molekulární identifikace a charakterizace klinicky významných mikromycet
Typ práce: Diplomová práce
Pracoviště: Ústav mikrobiologie, Lékařská fakulta Univerzity Palackého v Olomouci
Školitel: doc. MUDr. Petr Hamal, Ph.D.
Rok obhajoby práce: 2019

Abstrakt:

Vláknité houby neboli mikromycety jsou organismy způsobující řadu závažných onemocnění. V klinických mykologických laboratořích se pro jejich charakterizaci používá makromorfologická detekce pomocí světelné mikroskopie. Tato technika vyžaduje zkušeného mykologa a není zcela bezchybná. MALDI – TOF MS je analytická metoda, v současné době využívaná pro charakterizace kvasinek (další třída mikromycet) ve většině mikrobiologických laboratořích. Využití MALDI – TOF MS je v případě vláknitých hub problematické a poskytuje nepřesné výsledky. V předložené diplomové práci jsme se pokusili vyvinout efektivní metodu využívající MALDI – TOF MS pro identifikaci vláknitých hub. Tato metoda kombinuje MALDI – TOF MS s kultivací v tekutém médiu a extrakcí. Zaměřili jsme se na porovnání výsledků obdržených ze všech tří výše uvedených technik. Na rozdíl od jednoduchého měření MALDI – TOF MS z kultury jsme ukázali, že metoda MALDI – TOF MS po kultivaci v tekutém médiu a extrakci poskytuje výsledky ve vysoké shodě s mikroskopickým stanovením. Abychom demonstrovali, která technika poskytuje přesnější výsledky, provedli jsme sekvencování genomu vybraných izolátů. Mikromycety *Aspergillus* a *Chaetomium* byly také použity pro studium antimykotického působení specificky modifikovaných látek pomocí nanočástic stříbra. Data obdržená z měření antimykotické aktivity jsou nejasná a diskutovaná v předložené práci.

Klíčová slova: MALDI – TOF MS, identifikace, mikromycety
Počet stran: 68
Jazyk: Český

Bibliographical identification:

Author: Bc. Anna Vávrová
Title: Molecular identification and characterization of clinically relevant micromycetes
Type of thesis: Master thesis
Department: Department of microbiology, Faculty of medicine and dentistry, Palacký University Olomouc
Advisor: doc. MUDr. Petr Hamal, Ph.D.
The year of presentation: 2019
Abstract:

Filamentous fungi are known as a micromycetes which cause a number of serious diseases. In clinical mycological laboratories, only macromorphological detection using light microscopy is used for their characterization. This technique requires experienced mycologist able to recognize all kinds of fungi and is not flawless. MALDI – TOF MS is analytical method nowadays conventionally used for characterization of yeasts (another class of micromycetes) in most microbiological laboratories. However, utilization of MALDI – TOF in case of filamentous fungi is problematic and provides inaccurate results. In my thesis, we tried to develop a new method for using MALDI – TOF MS for identification of filamentous fungi with high determination rate. The method utilizes MALDI – TOF MS combined with prolong cultivation (PC). We focused on comparison of all three previously mentioned techniques. Unlike simple MALDI – TOF, we have shown that MALDI – TOF MS with PC provides very high accordance with microscopic determination. To demonstrate which method provides more accurate results we perform genome sequencing currently. Micromycetes *Aspergillus* and *Chaetomium* were also used for antimycotic activity studies of specifically modified substances using silver nanoparticles. Data obtained from the measurement of antifungal activity are unclear and discussed in this thesis.

Keywords: MALDI – TOF MS, identification, micromycetes
Number of pages: 68
Language: Czech

Obsah

1	Úvod.....	8
2	Teoretická část	10
2.1	Základní charakteristika hub	10
2.2	Formy existence hub	10
2.3	Spory hub	11
2.4	Patogenita hub	12
2.4.1	Povrchové mykózy	13
2.4.2	Orgánové a systémové mykózy	13
2.4.3	Generalizované mykózy	14
2.5	Léčba houbových infekcí	14
2.5.1	Antifungální aktivita nanočástic stříbra	16
2.6	Vláknité mikromycety.....	16
2.6.1	Lékařsky významní zástupci.....	16
2.7	Možnosti identifikace kultur vláknitých hub	21
2.7.1	Kultivace	21
2.7.2	Mikroskopie	22
2.7.3	Polymerázová řetězová reakce.....	22
2.7.4	Hmotnostní spektrometrie.....	24
2	Cíle práce	29
3	Výsledky	30
3.1	Charakteristika studovaného souboru	30
3.2	Morfologická identifikace izolátů vláknitých hub	30
3.3	Identifikace izolátů vláknitých hub pomocí MALDI – TOF MS z kultury	32
3.4	Identifikace izolátů vláknitých hub pomocí MALDI – TOF MS po kultivaci v tekutém médiu a extrakci	34
3.5	Porovnání výsledků identifikace izolátů vláknitých hub	36
3.6	Identifikace vybraných izolátů vláknitých hub sekvencováním DNA	39

3.7	Testování antifungální aktivity AgNP v textilních látkách.....	41
4	Diskuze.....	46
5	Experimentální část.....	50
5.1	Materiál a metody	50
5.1.1	Vyšetřované kmeny a přehled metod identifikace.....	50
5.1.2	Mikroskopická identifikace	50
5.1.3	Identifikace MALDI – TOF MS přímo z kolonie.....	51
5.1.4	Identifikace MALDI – TOF MS pomocí kultivace v tekutém médiu a extrakce	51
5.1.5	Identifikace sekvenací DNA	52
5.1.6	Testování antifungální aktivity AgNP v textilních látkách	55
6	Závěr	58
7	Seznam zkratk	60
8	Literatura	62

1 Úvod

Mikromycety jsou vedle bakterií jednou z hlavních příčin mortality u hospitalizovaných pacientů. Velkou hrozbu představují hlavně pro onkologicky léčené pacienty, případně i pro jiné pacienty s potlačenou imunitou. ¹

Při určování houbových izolátů se v mykologických laboratořích tradičně uplatňují metody založené na fenotypových vlastnostech, zejména morfologických. ² Pro správnou identifikaci kmenů je nezbytné posouzení jejich vzhledu a rychlosti růstu na kultivačních mediích, stejně jako mikroskopické hodnocení mycelia, tvaru a uspořádání spor. Z tohoto důvodu je nezbytná dostatečná délka inkubace izolátů, což do značné míry omezuje rychlost získání výsledků, nutných pro zahájení cílené antifungální léčby. ³ Proto se do diagnostické praxe zavádějí nové techniky, které zmíněnou nevýhodu eliminují.

Hmotnostní spektrometrie s laserovou desorpčí a ionizací za účasti matrice s průletovým analyzátozem (MALDI – TOF MS) je v dnešní době nejrychlejší a zároveň nejpresnější rutinní diagnostickou metodou pro identifikaci bakterií a kvasinek. Využití uvedené techniky při určování vláknitých hub je však omezené, a to především díky značně limitované databázi druhů. ^{4,5} Dalším problémem je pevnější a robustnější stavba buněčné stěny v porovnání s bakteriální, proto příprava vzorku pro jejich identifikaci pomocí MALDI – TOF MS je instrumentálně a časově náročnější. ^{6,7}

Podle Světové zdravotnické organizace stoupá ve všech částech světa antibiotická rezistence na nebezpečně vysokou úroveň. Objevují se nové mechanismy odolnosti vůči antimikrobním látkám, což limituje možnosti léčby infekčních onemocnění. Přestože prevalence rezistence mykotických agens není zatím na úrovni srovnatelné s bakteriální, vzhledem k poměrně malému počtu účinných antifungálních látek jsou i možnosti léčby houbových infekcí omezené. ⁸ Proto dochází k vývoji a syntéze nových látek s účinkem proti mikromycetám. Mezi ně patří i nanočástice stříbra, které jsou známé již po staletí svou antibakteriální aktivitou. ⁹

Předložená diplomová práce se zabývá problematikou identifikace vláknitých hub pomocí MALDI – TOF MS, založené na kultivaci v tekutých mediích a extrakci proteinů. Zabírá se porovnáváním určování mikroskopických vláknitých hub pomocí morfologických znaků s výsledky MALDI – TOF MS, získanými jak postupem běžně

používaným k identifikaci bakterií a kvasinek, tak po kultivaci v tekutém médiu s následnou metodou prodloužené extrakce proteinů. Dále byla zkoumána antifungální aktivita nanočástic stříbra po impregnaci vzorků textilií.

2 Teoretická část

2.1 Základní charakteristika hub

Houby (včetně lesních kloboukatých) patří mezi eukaryotní organismy, dříve byly řazeny k rostlinám. Jejichž stáří se odhaduje na 300 milionů let. Typická je pro ně velká morfologická rozmanitost a schopnost přizpůsobit se rozmanitým ekologickým podmínkám. Označení mikromycety se v praxi používá pro houby mikroskopických rozměrů.

Buňky hub patří svou stavbou, podobně jako rostlinné a živočišné, mezi eukaryotické. Mají diferencované jádro s jadernou membránou, vyskytují se v ní mitochondrie, Golgiho aparát i endoplazmatické retikulum. Na rozdíl od živočišných buněk tvoří rostlinná i houbová buněčnou stěnu. Odlišnost mezi nimi spočívá hlavně v chemickém složení. Zatímco rostlinná obsahuje převážně celulózu, u hub se jedná o polysacharidy (chitin, fukan, glukany, manany). Cytoplazmatická membrána obsahuje steroly, konkrétně ergosterol. Hlavní zásobní látkou, přítomnou v cytoplazmě, je glykogen.¹⁰ Houby, na rozdíl od rostlin, neobsahují chlorofyl, postrádají tedy schopnost fotosyntézy, proto se jedná o heterotrofní organismy.

Houby se rozmnožují pohlavně i nepohlavně. Sexuální stádium se označuje jako teleomorfa, asexuální anamorfa. Rodové a někdy i druhové názvy obou stadií se liší, neboť jsou řazeny do různých rodů. Taxonomicky má přednost označení teleomorfy, v medicínské praxi je naopak užíván název anamorfy. Například teleomorfa nepohlavního stadia klinicky významného kvasinkovitého mikroorganismu *Candida krusei* je *Pichia kudriavzevii*, v případě vláknité houby *Aspergillus nidulans* je to *Emericella nidulans*. U některých druhů mikromycet však dosud nebylo pohlavní stádium prokázáno.¹¹

2.2 Formy existence hub

Na základě morfologie lze houby rozdělit do tří základních skupin, a to na vláknité, kvasinkovité a dimorfní.

Pro vláknité houby, lidově zvané plísně, je typickým znakem tvorba pravých vláken (tzv. hyf), které rostou postupným prodlužováním, větví se a splétají se do podoby

pravého podhoubí (tzv. mycelia). Jednotlivé buňky jsou odděleny příčnými přehrádkami (tzv. septy). Mezi klinicky významné zástupce patří rod *Aspergillus* nebo skupina zvaná dermatofyta.

Pro kvasinkovité houby, resp. pravé kvasinky jsou charakteristické kulaté až oválné buňky, které se množí pučením. Jedná-li se o pravou kvasinku, dceřiná buňka se od mateřské vždy oddělí, u kvasinkovitých mikroorganismů zůstávají spojeny. V posledně zmíněném případě tak vznikají útvary podobné pravým vláknům, resp. pravému podhoubí, z důvodu odlišného způsobu vzniku se však nazývají nepravé hyfy (tzv. pseudohyfy), resp. nepravé podhoubí (tzv. pseudomycelium). Příkladem klinicky významných pravých kvasinek je rod *Cryptococcus*, kvasinkovitých hub *Candida*.

Jako dimorfní se označují houby, schopné existovat v obou výše uvedených formách. Zda bude mikromyceta růst jako kvasinka či vláknitá houba, závisí na podmínkách prostředí, zejména na teplotě. Za nižší (zpravidla do 30 °C) existuje ve vláknité, při vyšší (obvykle mezi 35-37 °C) v kvasinkové formě. Prvně zmíněná forma se proto vyskytuje jako saprofyt v okolním prostředí, kvasinková pak parazituje v lidském organismu. Výskyt dimorfních hub má endemický charakter, vyskytují se tedy pouze v určitých regionech. V Evropě včetně České republiky takové oblasti neexistují, s onemocněními jimi vyvolanými se zde lze setkat výhradně jako s importovanými případy. Mezi jejich nejvýznamnější zástupce patří rody *Histoplasma*, *Coccidioides* a *Blastomyces*.¹²

2.3 Spory hub

Spory slouží k pohlavnímu i nepohlavnímu rozmnožování hub. Jsou většinou jednobuněčné.

Pohlavní jsou trojího typu. Askospory vznikají ve vacích, zvaných vřečka (asky). Houby, které je vytvářejí, se nazývají vřeckovýtrusné (askomycety). Naopak bazidiospory vyrůstají zevně na stopečkách tzv. plodných buněk (bazidií). Podle toho se uvedené houby označují jako stopkovýtrusné (bazidiomycety). Třetí typ pohlavních spor, zygospory, vznikají jako výsledek spojení dvou stejných hyf. Takové houby se jmenují spájivé (zygomycety). Vyvolání tvorby pohlavních spor je komplikované, mnohdy vyžadující speciální kultivační média, u heterotalických druhů navíc komplementární

(doplňující) kmen. Proto jsou zmíněné postupy vyhrazeny taxonomickým laboratořím, v běžné klinické diagnostice se nepoužívají.

Určování hub pomocí nepohlavních spor se naopak v běžné laboratorní praxi hojně využívá. Jsou rovněž trojího typu. První, zvané konidie, vznikají na povrchu vláken, často ve velkém počtu a jejich uspořádání je pak základem pro mikromorfologickou identifikaci. Mohou být malé (jednobuněčné), nebo velké (vícebuněčné). Druhé, označované jako sporangiospory, vznikají naopak ve vakovitých útvarech (tzv. sporangiích), umístěných zpravidla na konci vláken. Zde sporangiospory dozrají, poté sporangium praskne a spory jsou následně roznášeny vzduchem. Třetí typ nepohlavních spor se nazývá thalospory. Primárně neslouží k rozmnožování, ale k přežití mykoorganismu za nepříznivých podmínek. Patří sem chlamydo-spory lékařsky významného kvasinkovitého mikroorganismu *Candida albicans*, nebo artrospory rodu *Geotrichum* či *Trichosporon*.

2.4 Patogenita hub

Lékařsky významné mikromycety mohou v podstatě vyvolat tři typy onemocnění. Proniká-li houba do vnitřního prostředí makroorganismu, jedná se o invazivní proces a stav se označuje jako mykóza. Mikromycety však mohou poškozovat zdravotní stav člověka i tím, že produkují toxické látky, tzv. mykotoxiny. V tom případě je onemocnění nazýváno mykotoxikóza. Houba se může stát i spouštěčem alergické reakce a stav se pak označuje jako mykoalergóza. Z medicínského hlediska jsou nejvýznamnějšími patologickými stavy mykózy.

V posledních letech se počty pacientů s mykotickými infekcemi stále zvyšují. Důvodem je především nárůst těžce imunokompromitovaných pacientů, které je možno díky pokrokům v terapii na rozdíl od minulosti udržet při životě. S tím ovšem souvisí jejich vysoká úmrtnost na infekce, které pro člověka s normální mírou odolnosti nepředstavují velké riziko.¹³ K takovým nálezům mykózy patří, přičemž jejich mortalita přesahuje ve zmíněné ohrožené populaci 40 % navzdory současným možnostem antifungální léčby.¹⁴

V případě mykóz je v naprostá většina hub považována za oportunní (příležitostné) patogeny. Znamená to, že způsobují onemocnění především u pacientů s různým stupněm poruch imunity. Jedná se o nemocné s defekty lokální odolnosti až po těžce

imunokompromitované pacienty na onkologických odděleních, nebo se syndromem získaného selhání imunity (AIDS).^{12,15} Od toho se odvíjí míra invaze do tkání a stupeň ohrožení života pacienta.

Mykózy je z tohoto hlediska možno rozdělit na povrchové, systémové a generalizované. Epidemiologicky se pak rozlišují komunitní a nozokomiální infekce. Povrchové mykózy se, snad s výjimkou orgánových endemických, vyskytují především v komunitě, systémové a generalizované obvykle vyžadují hospitalizaci.

2.4.1 Povrchové mykózy

Do této skupiny onemocnění se řadí infekce kůže včetně jejích adnex (nehty, vlasy, chlupy) a sliznic. Ohroženi jsou zejména diabetici, malé děti a jedinci s poškozenou imunitou.^{16,17}

V případě kůže se jedná nejčastěji o postižení rohové vrstvy epidermis. Původci jsou většinou vláknité houby ze skupiny dermatofyt, neboť zmíněné mikromycety se živí keratinem, přítomným na kožním povrchu.¹⁸ Uvedená agens mohou samozřejmě napadat i další keratinové struktury, tj. nehty, vlasy a chlupy. V místech vlhké zapárky (v podpaží, tříslech, u žen pod prsy) se mohou pomnožit kvasinkovité mikroorganismy a vyvolat tzv. intertriginózní kandidózu.

Poslední zmíněné agens, zejména zástupci rodu *Candida*, jsou nejčastějšími vyvolavateli slizničních mykóz. Jedná se o různé formy orálních kandidóz, vznikajících například v souvislosti se širokospektrou antibioterapií, imunodeficitu, nebo nošením zubních protéz. Vulvovaginální infekce u žen vznikají především v souvislosti hormonálních změn, např. v těhotenství. Nejzávažnější formou povrchové mykózy je geneticky podmíněná chronická mukokutánní kandidóza.

Ve většině případů povrchových mykóz je postačující lokální terapie postižené oblasti, je však třeba ji zahájit včas. U některých chronických nebo recidivujících infekcí je nutná i celková léčba.

2.4.2 Orgánové a systémové mykózy

Jedná se o velmi závažné stavy v souvislosti poškozením jednotlivých orgánů nebo celých orgánových systémů. Vyskytují se zpravidla u těžce

imunokompromitovaných pacientů, např. v souvislosti s autoimunitním onemocněním, transplantacemi kostní dřeně a jiných orgánů, užíváním cytostatik či imunosupresiv. Mohou postihnout plíce, srdce, oči, ledviny, centrální nervovou soustavu, v těžších případech pak související orgánové systémy.¹¹

2.4.3 Generalizované mykózy

Generalizované mykózy jsou obvykle důsledkem fungémie, kdy se houbové agens šíří krví do celého těla. U závažných imunodeficitů končí zpravidla smrtí pacienta.

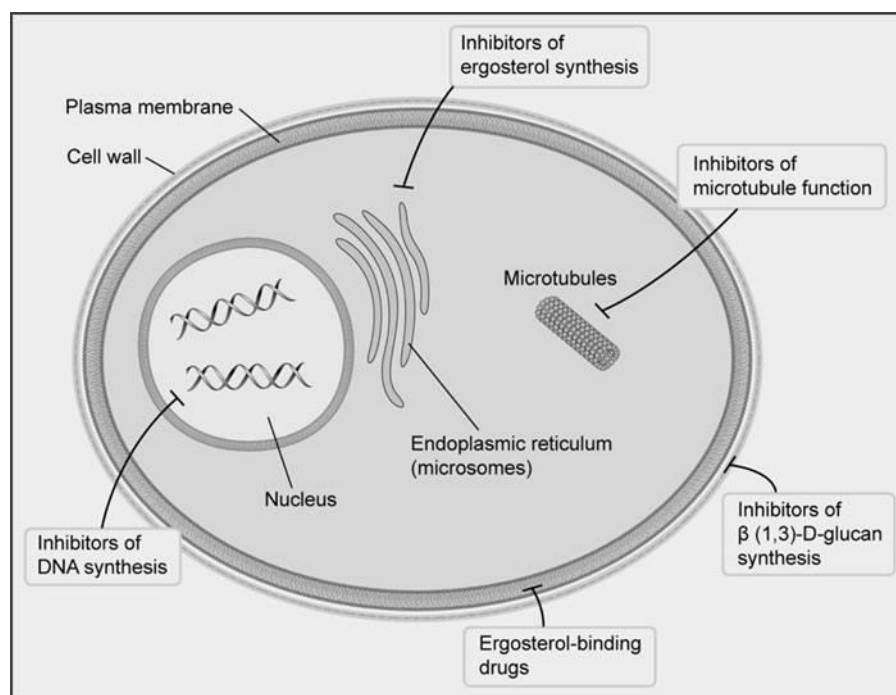
2.5 Léčba houbových infekcí

Proti houbovým infekcím, v naprosté většině případů mykózám, se používá zvláštní skupina antimikrobních látek označovaná jako antimykotika. Až na malé výjimky platí, že tyto látky nejsou účinné na bakterie a naopak, že antibiotika nelze použít k léčbě onemocnění vyvolaných mikromycetami. Účinkují na různé struktury v houbové buňce, což je sumarizováno na obr. 1. Na základě lékových forem lze antimykotika rozdělit na lokální, užívaná k terapii povrchových mykóz, a na systémová, určená většinou k léčbě orgánových, systémových a generalizovaných houbových infekcí. Používané je i členění do skupin podle chemické struktury, nejdůležitější z nich jsou:

- **Azoly.** Jsou nejpočetnější skupinou antifungálních léčiv. Jejich mechanismem účinku je inhibice syntézy ergosterolu, který je významnou složkou cytoplazmatické membrány hub. Mohou se dále dělit na starší imidazolové a novější triazolové deriváty. Nejznámějšími zástupci první skupiny je klotrimazol, užívaný k lokální terapii, z druhé pak systémová antimykotika flukonazol, užívaný k léčbě kandidóz, vorikonazol, účinný především na aspergily a posakonazol s antifungálním spektrem rozšířeným na mukormycety.^{19,20}
- **Polyeny.** Jedná se o fungicidní antimykotika, které se váží na ergosterol v cytoplazmatické membráně mikromycet, čímž dochází k porušení její permeability. Tato skupina zasahuje nejširší spektrum houbových agens. Nejvýznamnějším zástupcem je amfotericin B, který se jako jediný používá pro systémovou terapii. Je však silně nefrotoxický, proto se v současné době používá již jen v podobě lipidových forem, v nichž je intenzita tohoto nežádoucího účinku snížena.^{21,22} V lokální léčbě se používá nystatin a natamycin.

- **Echinokandiny.** Tato antimykotika, na rozdíl od předchozích skupin, zasahují na úrovni buněčné stěny. Blokují enzym β -(1,3)-D-glukan syntetázu, což vede k nedostatečné tvorbě odpovídajícího glukanu. Nejúčinnější jsou na kandidy, na něž působí fungicidně. Patří sem preparáty kaspofungin, mikafungin a anidulafungin. Kvůli odlišnému mechanismu účinku, existuje možnost je v systémové léčbě kombinovat s antimykotiky z předchozích skupin.²¹
- **Antimetabolity.** Jediným zástupcem této skupiny je flucytosin. Chemicky se jedná o fluorovanou pyrimidinovou bázi 5-fluorocytosin. V buňkách hub vestavěním fluorouracilu místo uracilu do ribozomální a transferové rRNA dochází k blokaci proteosyntézy. Má poměrně úzké spektrum účinku, zejména na kvasinkovité mikroorganismy, navíc na něj rychle vzniká rezistence. Jeho nevýhodou je i hematotoxicita.²¹
- **Allylaminy.** Tato skupina antifungálních látek je určena výhradně pro léčbu kožních mykóz, především dermatofytóz. Podobně jako azoly blokují syntézu ergosterolu v cytoplazmatické membráně, ovšem v dřívější fázi.²³ Pro systémovou léčbu je určen terbinafin, jako součást preparátů pro lokální terapii se používá naftifin.

Obrázek 1: Shrnutí působení antimykotik na buňku mikromycety (převzato z Principles of Pharmacology: the pathophysiologic basis of drug therapy, Golan et al.)²⁴



2.5.1 Antifungální aktivita nanočástic stříbra

Nanočástice stříbra (AgNP) jsou kovové struktury v nanoměřítku. Bylo prokázáno, že AgNP vykazují aktivitu proti bakteriím, virům, ale i vláknitým houbám.²⁵ Antibakteriální účinek stříbra je známý již po staletí.^{26,27} V roce 1928, kdy byl Alexandrem Flemingem objeven penicilín, však došlo k ústupu v jejich využití pro lékařské účely, jelikož výroba zmíněného antibiotika byla ekonomicky výhodnější.²⁸ S plošným používáním tohoto typu antibakteriálních látek však na ně postupně začala vznikat a vyvíjet se rezistence, proto se výzkumné skupiny, pracující na uvedené problematice, začaly vracet k možnostem využití nanočástic stříbra, jelikož na ně odolnost bakterií zatím nebyla zjištěna.²⁹ Rezistence hub vůči antifungálním léčivům není sice tak závažnou záležitostí jako je tomu u bakterií a antibakteriálních látek, problém v této oblasti však spočívá v omezeném počtu dostupných antimykotik s rozlišným mechanismem účinku.³⁰

Příprava stejnorodých AgNP se specifickými požadavky z hlediska velikosti, tvaru a fyzikálně chemických vlastností je velkou výzvou pro farmaceutické chemiky.³¹

AgNP mají řadu různých mechanismů účinků, mezi něž patří vazba na fosfátové skupiny v DNA, interakce s cytoplazmatickou membránou, což vede k disociaci protonů a smrti buňky, reakce se sulfhydrylovými skupinami proteinů a enzymů, interference s elektronovým transportním řetězcem, nebo narušení permeability buněčných membrán pro protony a fosfátové skupiny.^{32–36}

2.6 Vlákňité mikromycety

2.6.1 Lékařsky významní zástupci

2.6.1.1 Rod *Aspergillus*

V rámci uvedeného anamorfního rodu bylo dosud popsáno přes 200 druhů, z toho asi 40 v souvislosti s onemocněním člověka. Naprostá většina infekcí je vyvolána druhem *Aspergillus fumigatus*. Roste rychle v podobě zeleně zbarvených sametových kolonií se sloupcovitými hlavicemi, jak je demonstrováno na obr. 2. Je proto snadno morfologicky identifikovatelný, avšak byly zachyceny vzhledově téměř identické druhy (zatím s nejasným podílem), např. *Aspergillus lentulus* nebo *Aspergillus fumigatissimus*, které jsou významně rezistentnější k antimykotikům.³⁷

Obrázek 2: Makroskopický vzhled *Aspergillus fumigatus* (foto autorka práce)



Dalším lékařsky významným zástupcem je *Aspergillus flavus* s charakteristickým zelenožlutým zbarvením kolonií, jak je demonstrováno na obr. 3, a *Aspergillus niger* s černě zbarvenými sporami, které jim poskytují ochranu před slunečním a ultrafialovým zářením, a které jsou uspořádány do typických velkých kulovitých hlavic. Oříškově hnědě zbarvené kultury jsou zase charakteristické pro druh *Aspergillus terreus*.

Obrázek 3: Makroskopický vzhled *Aspergillus flavus* (foto autorka práce)



Aspergily jsou v přírodě velice rozšířeny, nacházejí se v půdě, ovzduší, na rostlinách a rozkládajících se organických látkách. V domácnostech bývají často součástí prachu. *A. flavus* je nejčastějším druhem kontaminujícím potraviny, zejména dlouho skladované, jelikož přežívá i při nízkém obsahu vody v prostředí a vyšších teplotách.³⁸ Je znám produkcí mykotoxinů zvaných aflatoxiny. *A. niger* bývá zase často izolován ze sušeného ovoce a ořechů.³⁹

Nozokomiální mykózy u imunosuprimovaných pacientů jsou typicky spojeny se stavebními pracemi v nemocnicích. Aspergilové spory se na klinická oddělení dostávají nejčastěji vzdušnou cestou jako součást kontaminovaného prachu. Většina infekcí vzniká jako důsledek inhalace spor, které pak snadno pronikají do bronchiálního stromu. Zde vyklíčí a ve formě vláken mohou prorůst do okolní tkáně. Nejzávažnější formou infekce

u těžce imunokompromitovaných pacientů s hematologickými chorobami je invazivní aspergilóza, často končící smrtí pacienta. Klinické příznaky nejsou specifické a včasné stanovení diagnózy je obtížné. U imunokompetentních jedinců s chronickými onemocněními plic, např. cystickou fibrózou, mohou aspergily osídlovat dutiny vzniklé v plicní tkáni a vytvořit tak tzv. aspergilom. U alergických pacientů mohou způsobit mykoalergózu, zvanou alergická bronchopulmonální aspergilóza. Z povrchových mykóz jsou nejčastější infekce zevního zvukovodu.

2.6.1.2 Řád *Mucorales*

V rámci uvedeného řádu existuje několik čeledí, resp. rodů, do nichž patří zástupci patogenní pro člověka. Nejvýznamnější jsou rody *Mucor*, *Lichtheimia* (dříve *Absidia*) a *Rhizopus*.¹² Řád patří do kmene *Zygomycota*, proto jsou lidská onemocnění nazývána **zygomykózy** nebo přesněji, podle názvu řádu, **mukormykózy**. Morfologicky se jedná o rychle rostoucí mikromycety obvykle s bílým až šedavým, vatovitým neseptovaným myceliem s černými tečkami, což jsou pouhým okem viditelná sporangia.

Tyto všudypřítomné půdní saprofytické houby zajišťují v přírodě rozklad organických substrátů. Jejich spory jsou běžně přítomné v ovzduší. Některé druhy parazitují na rostlinách, jiných houbách, hmyzu i obratlovcích. Jsou častými škůdci na uskladněném ovoci a potravinách.

Mukormykóza člověka je vzácné onemocnění. Nejčastěji jsou postiženy plíce a vedlejší nosní dutiny, odkud je u těžce imunokompromitovaných pacientů a nemocných s nekontrolovanou cukrovkou možná invaze do mozkové tkáně. Kožní forma vzniká nejčastěji v souvislosti s popáleninami nebo úrazy. Následkem všech zmíněných klinických forem může být generalizovaná mukormykóza, která končí i přes intenzivní antifungální léčbu téměř vždy smrtí pacienta.^{40,41}

2.6.1.3 Rod *Fusarium*

Jedná se o poměrně rychle rostoucí mikroskopické houby převážně s růžovým vlnatým myceliem, četnými mikrokonidii uspořádanými většinou do podoby hlavic a typickými člunkovitými makrokonidii. Jsou běžnými půdními mikroorganismy, avšak i významnými rostlinnými patogeny. Produkují značné množství mykotoxinů.

Člověka infikují vzácně. Nejčastějšími etiologickými agens mykóz jsou *Fusarium oxysporum* a *Fusarium solani*.⁴² *Fusaria* patří k nejčastějším etiologickým agens infekce

rohovky (keratitida), z níž se může vyvinout orgánové postižení, zejména zánět očního bulbu (endoftalmitida). U imunokompromitovaných pacientů dochází ke generalizované mykóze.⁴³

2.6.1.4 Dermatofyty

Vláknité houby, jejichž společným znakem je schopnost využívat keratin, přítomný v rohové vrstvě epidermis a v kožních adnexách. Podle jejich přirozeného prostředí se dělí na antropofilní, zoofilní a geofilní. V prvním případě se jedná primárně o lidské patogeny, ve druhém o zvířecí a ve třetím je jejich přirozeným prostředím půda. Onemocnění člověka mohou vyvolat zástupci všech tří zmíněných skupin.

Dermatofyta se dělí do tří rodů: *Trichophyton*, *Epidermophyton* a *Microsporum*. Z prvního jsou infekce nejčastější vyvolány antropofilními druhy *T. rubrum* a *T. interdigitale*. Do rodu *Epidermophyton* náleží jediný patogen, antropofilní *E. floccosum*. Z rodu *Microsporum* se u člověka nejčastěji vyskytuje *M. canis*, infikující zejména psy a kočky, známý je i geofilní druh *M. gypseum*. Jedná se o středně až pomalu rostoucí mikromycety, které se rozlišují na úroveň druhu na základě vzhledu makrokonidií: u rodu *Trichophyton* jsou tužkovité, *Epidermophyton* kyjovité a *Microsporum* větvenovité. Nutno však dodat, že makrokonidie lze pozorovat u izolátů získaných z případů dermatofytóz jen vzácně. Nejčastější druh, *T. rubrum*, získal svůj název podle červeného pigmentu, prokazatelného na periférii, ale zejména na spodině kolonií (viz obr. 4).^{12,44}

Obrázek 4: Makroskopický vzhled *Trichophyton rubrum* (foto autorka práce)



U lidí vyvolávají zmíněné mikromycety dermatofytózy, tj. onemocnění kůže a jejich adnex. Klinické projevy jsou rozmanité, závisí na lokalizaci infekce, intenzitě imunitní odpovědi hostitele a vyvolávajícím druhu. Většinou je aktivita houby omezena na rohovou vrstvu epidermis, vlasy, vousy, chlupy a nehty. Na kůži se pak zpravidla tvoří

vícečetná okrouhlá olupující se ohraničená ložiska, postupně splývající ve velkoplošné útvary, na periférii s různým stupněm zánětlivé reakce. Infikované vlasy se ulamují za vzniku krátkých pahýlků. Nehty se ztlušťují, ztrácejí lesk a hromadí se pod nimi zapáchající detritus. V některých případech, zejména u nálezů zoofilními druhy, je postižena i škára za vzniku hnisavých ložisek s regionálním zánětem lymfatických uzlin. V klinické praxi se dermatofytózy označují obecným názvem *tinea* a specifikací lokality infekce (např. *tinea corporis* = dermatofytóza trupu).

Přenos dermatofyt se uskutečňuje přímým stykem s nakaženými lidmi, zvířaty, případně sporami znečištěnou půdou nebo nepřímo prostřednictvím kontaminovaných předmětů, zejména obuvi a oděvů. Získání infekce usnadňují špatné hygienické podmínky a pobyt ve společných zařízeních, jako jsou sprchy, plavecké bazény apod.

2.6.1.5 Rod *Penicillium*

V rámci uvedeného rodu je v současnosti popsáno přes 200 druhů. Ze všech vláknitých mikromycet se v našich klimatických podmínkách vyskytuje nejčastěji. Český název štětičkovec (plíseň štětičková) dostal tento rod podle typických větvených konidioforů, zakončených řetízky konidií, které jsou v klinických laboratořích při mikroskopické identifikaci houby ve sklíčkové mikrokultuře základním diagnostickým znakem. Historicky nejznámější druh, *Penicillium notatum* (později přejmenovaný na *P. chrysogenum*), je spojený se jménem sira Alexandra Fleminga a zahájením éry antibiotik objevem penicilinu.²⁸ Spory této vláknité houby jsou běžnou součástí našeho životního i pracovního prostředí. Penicilia jsou významnými škůdci potravin, producenty mykotoxinů, jsou také jedním z významných alergenů. Využívána jsou v potravinářském průmyslu, např. *Penicillium roqueforti* nebo *Penicillium camemberti* při výrobě sýrů.⁴⁵ Mykózy jimi způsobené jsou velmi vzácné, jejich izolace v laboratoři je obvykle spojena s kontaminací z prostředí.¹¹

2.6.1.6 Melanizované houby

Společným znakem této skupiny patogenních hub jsou septované, silnostěnné, hnědě zbarvené hyfy, v jejichž stěně je ve zvýšeném množství přítomen pigment melanin. Jsou ubikvitní, nalézají se v půdě, na dřevě a jiných materiálech rostlinného původu.

Mykózy, způsobené těmito houbami, jsou nejčastější v tropických a subtropických oblastech. Invaduje-li houba do kůže a podkoží, označuje se nákaza obecně jako **chromblastomykóza**, napadá-li podkoží a vnitřní orgány, používá se

termín **feohyfomykóza** Původci **chromoblastomykózy** jsou s nejvyšší frekvencí příslušníci rodů *Phialophora*, *Fonsecaea*, *Cladophialophora* a *Rhinoctadiella*. Etiologickými agens **feohyfomykózy** mohou být zástupci rodů *Alternaria*, *Aureobasidium*, *Cladosporium*, *Exophiala*, nebo *Phialophora*.

2.7 Možnosti identifikace kultur vláknitých hub

2.7.1 Kultivace

Izolace čistých kultur hub na kultivačních půdách je zpravidla prvním krokem při jejich identifikaci. V případě vláknitých mikromycet se jedná o velmi rozmanité skupiny, proto jsou jejich požadavky na kultivační média, délku inkubace a optimální teplotu značně odlišné.

Nejčastěji používanou půdou pro kultivaci mikromycet je selektivní Sabouraudův agar s 2-4 % glukózy a s příměsí antibiotik (nejčastěji chloramfenikolu, nebo penicilinu s gentamicinem), dále jen SGAA. Antibakteriální látky jsou v půdě přítomny z důvodu potlačení růstu kontaminující bakteriální mikroflóry. Dále je možno přidat thiamin z důvodu lepší pigmentace některých druhů vláknitých hub. Přídavek antimykotika cykloheximidu se využívá zejména při kultivaci dlouhou dobu rostoucích mikromycet, jako jsou dermatofyty, neboť tím dochází zábraně růstu kontaminujících rychle rostoucích saprofytických vláknitých hub, jako jsou penicilia nebo aspergily.

Dalšími kultivačními půdami, používanými při identifikaci vláknitých hub, je Czapkův agar s kvasničným extraktem, nebo bramborový agar s dextrózou. Na uvedených médiích dochází k typičtějším zbarvení kolonií, než je tomu na SGAA. Speciální půdy lze využít k průkazu přítomnosti některých diagnosticky významných enzymů (např. ureázy, či elastázy), které slouží k rozlišení některých druhů mikromycet.¹¹

Délka inkubace se pohybuje od 2-3 dnů, např. u *A. fumigatus*, až do několika týdnů, což je charakteristické pro dermatofyty. Běžnou kultivační teplotou je 36 °C, houby parazitující na povrchu kůže na ni však nemusí být adaptovány, proto se inkubují při 27 °C.¹²

Další způsob kultivace vláknitých hub, určený k jejich mikroskopické identifikaci, je zhotovení mikrokultury. Za tímto účelem se obvykle využívá tzv.

Hamburský agar. Svým složením je podobný Sabouraudovu, je však nutričně chudší, a proto podporuje sporulaci mikromycet. Z agaru na Petriho misce se vykrojí bloček, který se nanese na podložní sklíčko, naočkuje vyšetřovaným kmenem, přiklopí krycím sklíčkem a umístí do vlhké komůrky, kde se inkubuje zhruba týden. Morfologie a uspořádání vytvořených spor se hodnotí mikroskopicky na principu nativního preparátu v procházejícím světle.⁴⁶

Obrázek 5: Narostlá mikrokultura vláknité houby (foto autorka práce)



2.7.2 Mikroskopie

Mikroskopické vyšetření kultur vláknitých hub se považuje za součást klasického způsobu určování mikromycet na základě jejich morfoloických znaků.¹¹ Využívány jsou postupy, založené na technice přípravy nativního preparátu s pozorováním v procházejícím světle. Uvedeným způsobem je možné hodnotit výše zmíněné mikrokultury. Přitom se používají objektivy zvětšující 10 - 20krát. Při nutnosti detailnějšího hodnocení mycelia a spor je možné z mikrokultury zhotovit preparát obarvený laktofenolovou modří, která se dobře váže na houbové struktury v preparátu. V takovém případě se odstraní agarový bloček, přikápně roztok uvedeného barviva a houbové elementy zachycené na podložním a krycím sklíčku se pak hodnotí ve 400násobném zvětšení.⁴⁷

2.7.3 Polymerázová řetězová reakce

Polymerázová řetězová reakce (PCR) je rychlá a snadná metoda sloužící k namnožení specifického úseku DNA. Jejím principem je replikace nukleových kyselin v opakujících se cyklech. Každá taková reakce vyžaduje přítomnost templátové DNA,

primerů, nukleotidů (dNTPs) a DNA polymerázy. Zmíněný enzym umožňuje připojování jednotlivých dNTPs do řetězce DNA za tvorby produktu PCR, kterým je výše zmíněný specifický úsek DNA. Samotná reakce probíhá v několika opakováních, kdy se postupně střídají teploty a dochází k denaturaci templátové DNA, navazování primerů, připojování nukleotidů a tím k prodlužování řetězce.^{48,49}

PCR je známa v několika modifikacích. Kromě jednoduché PCR, popsané výše, je to tzv. real-time PCR, nested PCR nebo multiplex PCR. Specifické produkty, vzniklé PCR, které mohou, ale nemusí být rodově či druhově specifické, je možné blíže analyzovat např. sekvencováním, restriční endonukleázovou analýzou, nebo blotovacími technikami.

2.7.3.1 Sekvence genomu

V dnešní době jsou mikroorganismy včetně vláknitých hub nejlépe identifikovány pomocí sekvenace jejich genomu. V rutinních mykologických laboratořích se však pro svou finanční a časovou náročnost zpravidla neprovádí. Nejčastěji se v případě identifikace, resp. charakterizace genomu eukaryotních organismů využívá 18S rDNA, přičemž je takto označována sekvence DNA kódující malou podjednotku ribozomální RNA.⁵⁰ Jedná-li se o organismy prokaryotní (bakterie), využívá se sekvenace analogického úseku této nukleové kyseliny, 16S rDNA.

Nejpoužívanější metodou sekvenace je Sangerova. Podobně jako PCR využívá proces replikace DNA. V klasickém provedení nasedá na jednořetězcovou DNA radioaktivně značený primer, komplementární k začátku sekvenovaného místa. Od navázaného primeru probíhá tvorba řetězce DNA za přítomnosti dNTPs a jednoho z dideoxynukleotidů (ddNTPs). DdNTP se náhodně začlení do syntetizovaného řetězce místo příslušného dNTP a protože nemá -OH skupinu, tvorba řetězce DNA se zastaví. Vzhledem k tomu, že v každé reakci je přítomno velké množství molekul DNA, začleňování ddNTPs do řetězců se děje náhodně a jen s nízkou pravděpodobností (v porovnání s dNTPs jsou totiž přítomny v nízké koncentraci), vzniká v každé reakci směs různě dlouhých fragmentů, jejichž délka (a sekvence dNTPs) je hodnocena elektroforézou v polyakrylamidovém gelu. V modifikované podobě, prováděné v současnosti, využívá Sangerova metoda fluorescenčně značených ddNTPs a vzniklé fragmenty jsou analyzovány kapilární elektroforézou.⁵¹

2.7.4 Hmotnostní spektrometrie

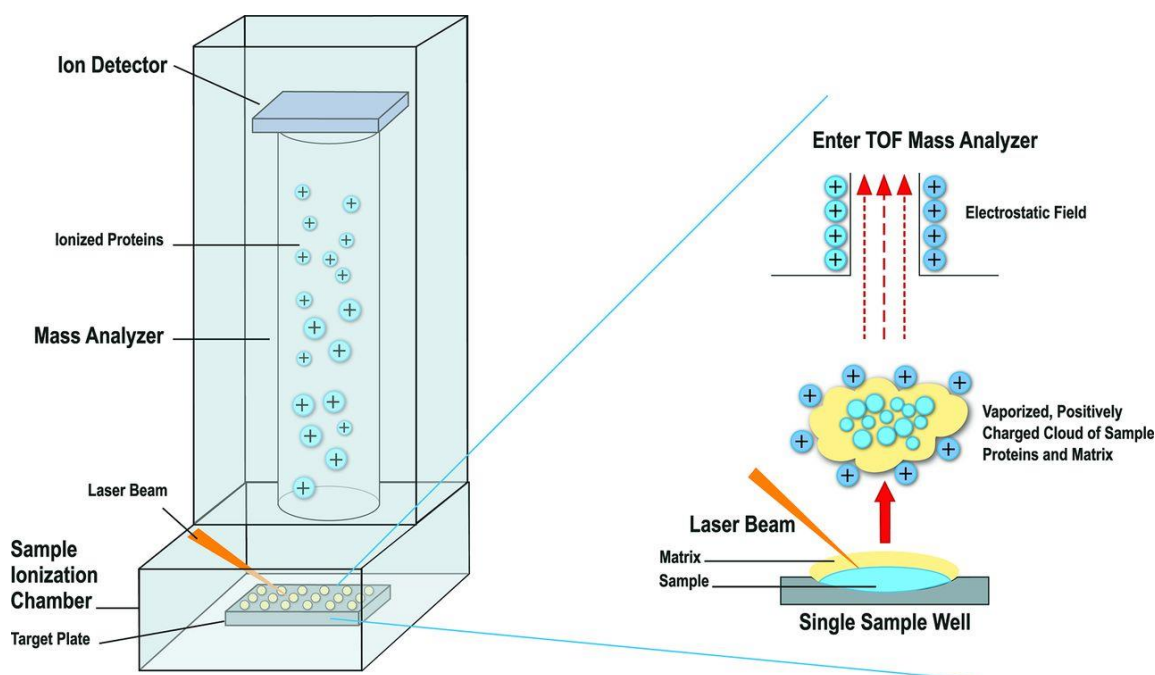
Hmotnostní spektrometrie (MS z anglického Mass Spectrometry) je metoda založená na rozdělení nabitých částic v elektrickém nebo magnetickém poli podle jejich molekulové hmotnosti. Ačkoliv byla objevena již na počátku 20. století, bylo její použití po dlouhou dobu omezeno pouze na chemické vědy. Používá se pro určení hmotnosti částic, stanovení elementárního složení vzorku nebo molekuly a pro objasnění chemické struktury molekul, např. peptidů. Princip MS spočívá v ionizaci chemických sloučenin, tvorbě nabitých molekul nebo fragmentů molekul a měření jejich poměru hmotnosti k náboji.

V posledních letech byla jako účinný nástroj pro identifikaci mikroorganismů vyvinuta varianta MS, zvaná MALDI-TOF. Jedná se o rychlou, citlivou a ekonomickou metodu, která je v dnešní době zavedena ve většině mikrobiologických laboratoří.⁵²

2.7.4.1 Princip analýzy pomocí MALDI – TOF

Princip analýzy vzorků pomocí MALDI – TOF je znázorněn na obr. 6. MALDI (z anglického Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization) je ionizační technika, která umožňuje analýzu biomolekul (proteinů, DNA, peptidů, sacharidů). Jejím základem je přítomnost matrice, což je látka, zabraňující tepelnému rozkladu vzorku. V principu se jedná o dvoufázový proces. Nejprve je směs, složená z analytů smíchaných s nadbytkem matrice ozařována krátkými pulsy laseru. Energie pulsů je absorbována převážně maticí, čímž dochází k její rychlé desorpci. Odpařující se částice matrice s sebou strhávají molekuly analytů a převádějí je do plynného skupenství. Desorpce a ionizace tak vytvářejí jednotlivé protonované ionty. V druhé fázi excitované molekuly matrice dále ionizují molekuly analytu přenosem protonu za vzniku pseudomolekulárních iontů. Ionty vytvořené MALDI jsou pak analyzovány průletovým hmotnostním analyzátozem TOF (z anglického Time of Flight).⁵³ V něm dochází k měření času, který potřebuje určitý ion k překonání vzdálenosti mezi iontovým zdrojem a detektorem, tj. tzv. doby letu (t). Ta je funkcí měrné hmotnosti iontu (m/z), kde (m) je hmotnost a (z) náboj, a lze ji vypočítat.^{54,55}

Obrázek 6: : Schéma hmotnostního spektrometru s technologií MALDI – TOF (převzato z MALDI – TOF MS for the diagnosis of infectious diseases, Patel et al.)⁵⁶

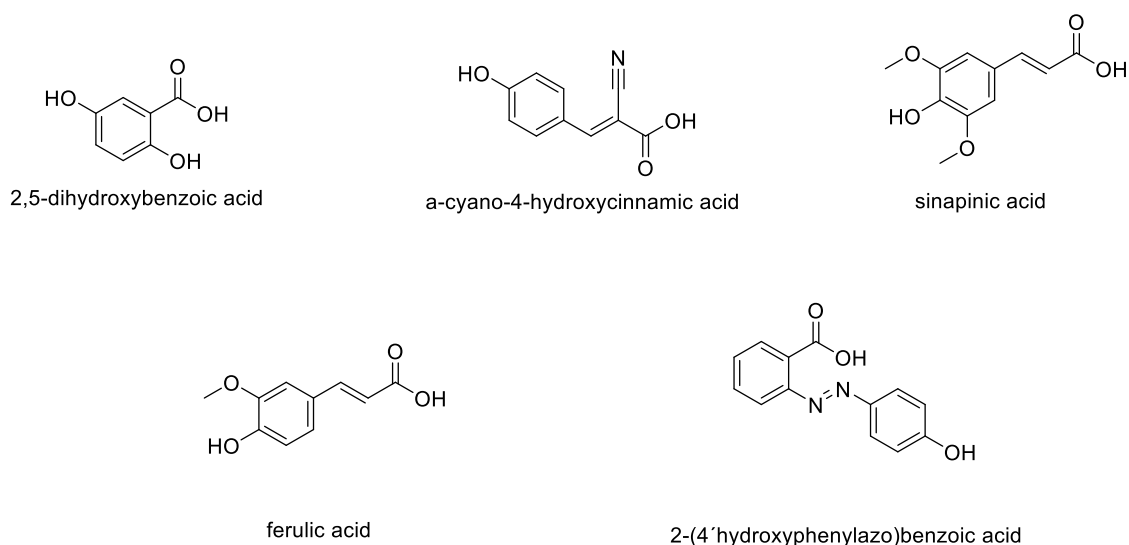


2.7.4.2 Matrice

Matrice je základní součástí procesu MALDI – TOF MS. Zabraňuje totiž tepelnému rozkladu vzorku a přenáší na něj energii z laseru. Tím dochází k převodu vzorku do plynné fáze a následnému vyhodnocení pomocí analyzátoru TOF. Proto jsou základními požadavky na matici absorpce při vlnové délce daného laseru, kyselý charakter (tím dochází k účinné ionizaci přenosem protonu na analyt) a tvorba krystalů s analytem.^{57,58}

Chemické struktury nejběžněji používaných matic jsou sumarizovány ve schématu 1. Obvykle se používají deriváty kyseliny skořicové a benzoové. Složení matrice pro mikrobiologické analýzy pomocí MALDI – TOF MS je následující: derivát aromatické kyseliny, acetonitril, voda, kyselina mravenčí a kyselina trifluoroctová.⁵⁹

Schéma 1: Laboratorně nejčastěji využívané matrice a jejich vzorce: ⁶⁰



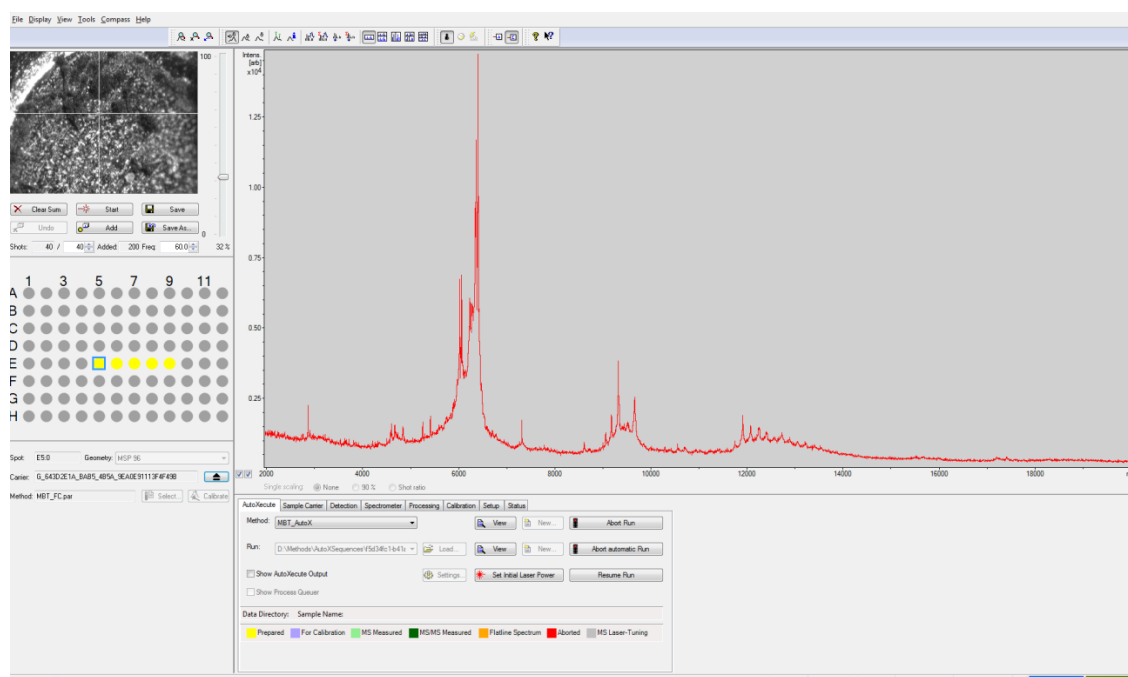
Zleva: Kyselina 2,5-dihydroxybenzoová; kyselina α -kyano-4-hydroxycinnamová; kyselina sinapová; kyselina ferulová; kyselina 2-(4'hydroxyfenylazo) benzoová

2.7.4.3 Hodnocení MALDI – TOF MS

Hmotnostní spektrometr MALDI – TOF je schopen analyzovat ionty v širokém rozsahu m/z , což umožňuje vyhodnocení velkého počtu různých molekul, od menších, jako jsou lipidy a peptidy, až po polymery a intaktní proteiny větší než 100 kDa.

Prvním krokem při analýze neznámých vzorků, resp. určování mikroorganismů pomocí techniky MALDI – TOF MS je, že pomocí speciálního počítačového programu dochází k převodu informací z detektoru doby letu o iontovém spektru vzorku na soubor píků, což je demonstrováno na obr. 7.

Obrázek 7: Spektrum píků získaných pomocí MALDI – TOF MS z izolátu vláknité houby *Aspergillus niger* pocházející z klinického vzorku pacienta Fakultní nemocnice Olomouc



Tím je vytvořen tzv. molekulární fingerprint, specifický pro analyzovaný vzorek. Zmíněný soubor píků je poté pomocí biostatického algoritmu porovnáván s referenční databází fingerprintů obsažené ve spektrometru a na základě míry shody dochází k výpočtu identifikačního skóre. Hodnota záporného dekadického logaritmu tohoto skóre se pohybuje mezi 0,00 a 3,00. Podle jeho výše je stanovena míra spolehlivosti rodové nebo druhové identifikace mikroorganismů.⁶¹ Jak je přehledně shrnuto v tab. 1, čím je hodnota vyšší, tím je určení spolehlivější.⁶²

Tabulka 1: Míra spolehlivosti správné identifikace⁶²

Barva	Rozsah	Popis
	2,000 –3,000	Druh byl s vysokou pravděpodobností identifikován
	1,700 –1,999	Nízká spolehlivost identifikace
	0,000 –1,699	Nespolehlivá identifikace

V současné době se pomocí MALDI – TOF MS v rutinní diagnostické praxi běžně identifikují bakterie a kvasinky,^{63,64} v případě vláknitých hub však není metoda tak často využívána. Důvodem je již dříve zmíněná složitější příprava vzorků pro určení s vysokou

hodnotou skóre a také omezenější šíře databáze těchto mikromycet. Kromě určování mikroorganismů může být MALDI – TOF MS využita v lékařské mikrobiologii také pro detekci bakteriální rezistence, konkrétně k průkazu β -laktamáz i karbapenemáz. ^{65,66}

Limitem zmíněné technologie, kdy nedojde k identifikaci izolátu, je nepřítomnost fingerprintu příslušného rodu/druhu/kmene v referenční databázi. Proto výrobci přístrojů pravidelně vydávají aktualizace databází. Některé hmotnostní spektrometry navíc umožňují jejich rozšiřování přímo uživateli.

2 Cíle práce

Hlavními cíli předložené diplomové práce bylo:

1. Porovnání spolehlivosti určování izolátů vláknitých hub z klinického materiálu pomocí morfologických metod a dvou způsobů zpracování vzorků pro identifikaci kmenů pomocí MALDI – TOF MS s perspektivou zavedení metody s nejlepším výsledkem do rutinní diagnostické praxe mykologické laboratoře Fakultní nemocnice Olomouc (FNOL)
2. Hodnocení antimykotického působení textilií impregnovaných nanočásticemi stříbra na kmeny *Aspergillus niger* a *Chaetomium globosum*.

3 Výsledky

3.1 Charakteristika studovaného souboru

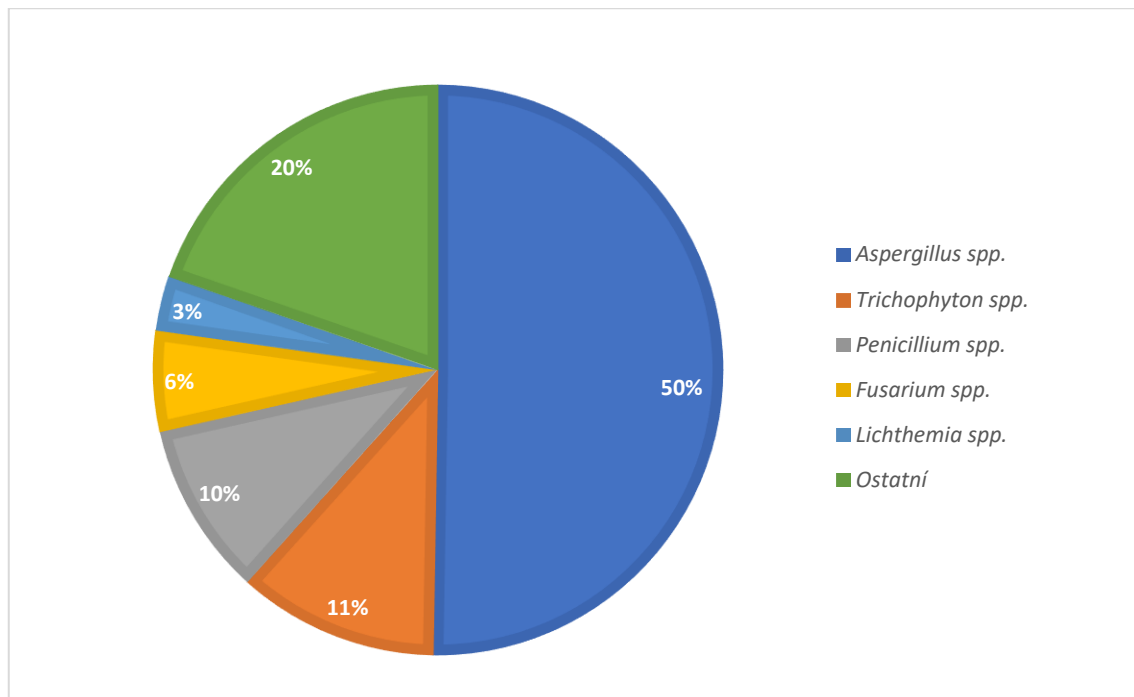
K identifikaci byl vybrán soubor 193 izolátů vláknitých hub pocházejících od 168 pacientů. Z toho bylo 51,2 % žen a 48,8 % mužů. Nejstarší byla žena ve věku 93 let, naopak nejmladší, stejného pohlaví, měla 1 rok. Kultury mikromycet byly získány nejčastěji ze sputa (n=51), následoval výtěr ze zevního zvukovodu (n=40), kůže, resp. její adnexa (n=27), tracheální sekret (n=15), stěry a výtěry z ran (n=14), výtěr ze sliznice nosních průduchů (n=10) a moč (n=4). Jiné klinické vzorky (např. výtěr z rekta, punktát nebo bronchoalveolární laváž) byly zastoupeny jen minimálně.

3.2 Morfologická identifikace izolátů vláknitých hub

Procentuální zastoupení jednotlivých rodů vláknitých mikromycet, identifikovaných na základě morfologie, je patrné z grafu 1. Ve studovaném souboru byli nejčastěji identifikováni zástupci rodu *Aspergillus*, následováni rody *Trichophyton*, *Penicillium*, *Fusarium* a *Lichtheimia*. Pětinu izolátů však tvořili zástupci jiných rodů (celkem 33 izolátů ze 14 rodů) s velmi malým počtem zástupců. V 6 případech nebylo možné izoláty rodově zařadit.

V tab. 2 je demonstrována podrobnější morfologická identifikace. Vyplývá z ní, že některé izoláty bylo možné určit na úroveň druhu (n=118; 61,4 %), jiné pouze rodově (n=69; 35,75 %), jeden izolát byl identifikován na úroveň řádu (*Mucoraceae*) a pět nebylo možné určit vůbec (výsledek sterilní mycelium (n=5; 2,59 %). V rámci rodu *Aspergillus* (n=97; 50,26 %) bylo možné rozlišit celkem 8 druhů (93,81 %), dalších šest izolátů bylo možné určit pouze na úroveň rodu (6,19 %). Z jednotlivých druhů byl nejčastěji identifikován *A. fumigatus* (n=38; 39,18 %), následovaný *A. niger* (n=21; 21,65 %) a *A. flavus* (n=21; 21,65 %). Posledním hojněji zastoupeným druhem byl *A. terreus* (n=7; 7,22 %). Druhým nejčastějším rodem byl *Trichophyton* (n=22; 11,4 %) v rámci něhož bylo možné rozlišit 3 druhy (81,82 %), další 4 izoláty (18,18 %) byly určeny pouze na úrovni rodu. Nejběžněji identifikovaných rodem byl *Trichophyton rubrum* (n=10; 45,45 %), druhým pak *Trichophyton interdigitale* (n=6; 27,27 %). U izolátů určených jako *Penicillium* (n=19), *Fusarium* (n=12) a *Lichtheimia* (n=6) došlo k určení vždy pouze na rodové úrovni.

Graf 1: Zastoupení jednotlivých rodů vláknitých hub identifikovaných morfologickými metodami



Tabulka 2: Výsledek identifikace vláknitých hub pomocí morfologických znaků

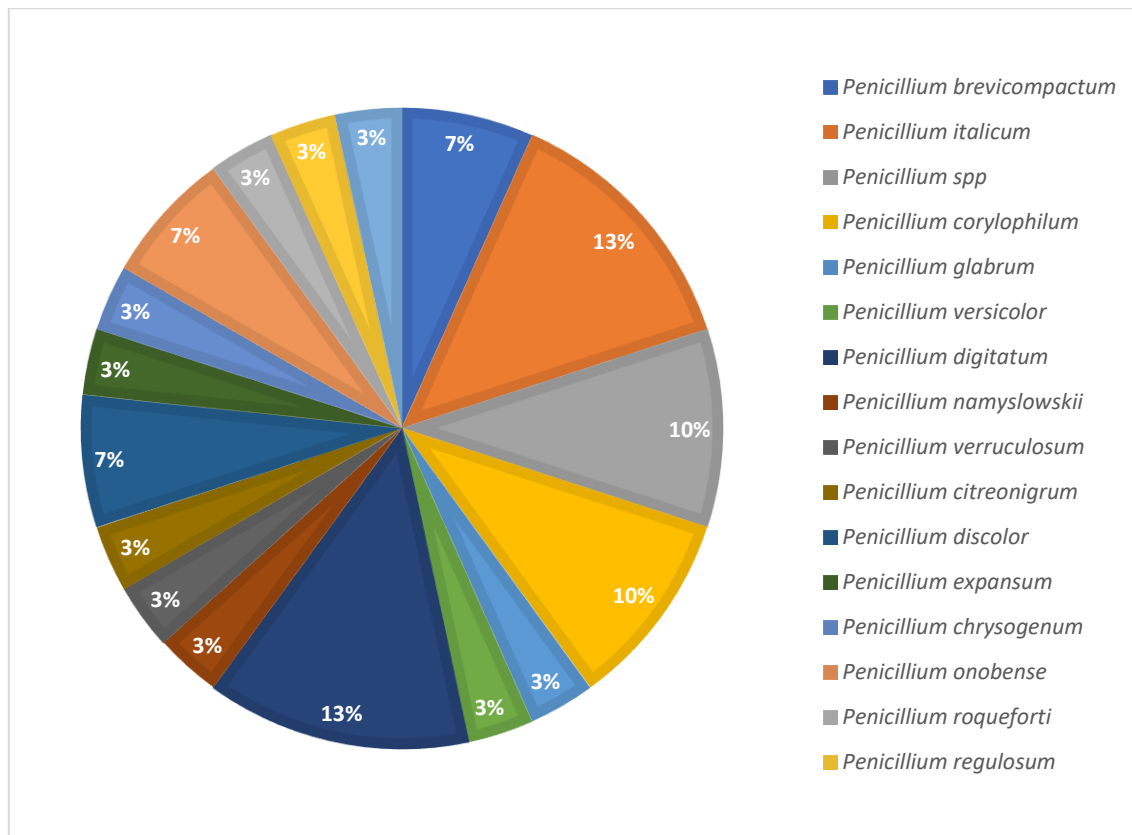
Identifikace mikromycety	Počet izolátů	Identifikace mikromycety	Počet izolátů
<i>Aspergillus fumigatus</i>	38	<i>Rhizomucor spp.</i>	3
<i>Aspergillus flavus</i>	21	<i>Acremonium spp.</i>	2
<i>Aspergillus niger</i>	21	<i>Microsporum canis</i>	2
<i>Penicillium spp.</i>	19	<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	2
<i>Trichophyton rubrum</i>	10	<i>Paecilomces spp.</i>	2
<i>Fusarium spp</i>	12	<i>Monocilium spp.</i>	2
<i>Aspergillus terreus</i>	7	<i>Chaetomium sp.</i>	1
<i>Trichophyton interdigitale</i>	6	<i>Aspergillus clavatus</i>	1
<i>Aspergillus spp.</i>	6	<i>Aureobasidium sp.</i>	1
<i>Lichtheimia spp.</i>	6	<i>Aspergillus glaucus</i>	1
<i>Alternaria spp.</i>	4	<i>Aspergillus nidulans</i>	1
<i>Scedosporium apiospermum</i>	4	<i>Aspergillus versicolor</i>	1
<i>Trichophyton spp.</i>	4	<i>Mucor sp.</i>	1
<i>Cladosporium spp.</i>	3	Neurčená mucormyceta	1
<i>Rhizopus spp.</i>	3	Sterilní mycelium	5
<i>Arthroderma benhamie</i>	3		

3.3 Identifikace izolátů vláknitých hub pomocí MALDI – TOF MS z kultury

Pomocí identifikace hmotnostní spektrometrií z kultury bylo z celkového počtu 193 izolátů určeno na rodovou úroveň pouze 9 (4,66 %), zbytek byl identifikován na úroveň druhu (n=184; 95,34 %). Celkem bylo určeno 75 druhů. Nejčastěji zastoupeným rodem byl *Aspergillus* (n=73; 37,82 %) v rámci něhož se podařilo rozlišit celkem 16 species. Nejčastěji byl identifikován *A. fumigatus* (n=20; 27,4 %), následoval

A. flavus (n=13; 17,8 %) a *A. terreus* (n=8; 10,96 %). Menší počet zástupců měly druhy *A. nidulans* (n=3), *A. ochraeus* (n=3), *A. oryzae* (n=3), *A. syndowii* (n=3), *A. versicolor* (n=3), *A. parasiticus* (n=2), *A. nominus* (n=2), *A. montevicensis* (n=2). Druhým nejpočetněji zastoupeným rodem bylo *Penicillium* (n=29; 15,03 %) v rámci něhož bylo určeno 16 druhů, většina z nich je uvedena v grafu 2. Nejčastěji bylo identifikováno *P. italicum* (n=4; 13,79 %), následované *P. brevicompactum* (n=3; 10,34 %) a *P. corylophilum* (n=3; 10,34 %). Tři izoláty byly určeny pouze na úroveň rodu (10,4 %). V rámci rodu *Trichophyton* (n=19; 9,84 %) bylo identifikováno 6 druhů. Nejčastějšími byly *T. tonsurans* (n=5; 26,32 %) a *T. interdigitale* (n=5; 26,32 %), následovaly *T. rubrum* (n=4; 21,04 %), *T. erinacei* (n=2; 10,53 %), *T. benhamiae* (n=2; 10,53 %) a *T. mentagrophytes* (n=1; 5,26 %). Celkem 17 izolátů bylo identifikováno jako zástupci rodu *Fusarium*, z toho 13 (76,47 %) bylo určeno na úroveň druhu. Z nich pět izolátů (29,41 %) jako *F. proliferatum*, tři jako *F. solani* (17,65 %), dva jako *F. oxysporum* (11,76 %) a po jednom jako *F. verticilloides*, *F. chlamydosporum* a *F. moniliforme*. V sedmi případech byli identifikováni příslušníci rodu *Rhizopus*, přičemž šest izolátů (85,71 %) bylo určeno druhově. Nejčastěji se jednalo o *R. oryzae* (n=3; 42,86 %), dále byl zjištěn *R. microsporus* (n=2; 28,57 %) a *R. stolonifer* (n=1; 14,29 %).

Graf 2: Přehled druhů rodu *Penicillium* identifikovaných pomocí MALDI – TOF MS z kultury



3.4 Identifikace izolátů vláknitých hub pomocí MALDI – TOF MS po kultivaci v tekutém médiu a extrakci

Uvedenou metodou byla po extrakci vzorku provedena vždy paralelně identifikace izolátů ze supernatantu i sedimentu, přičemž výsledek byl vždy stejný a hodnota identifikačního skóre se celkově i v rámci jednotlivých kultur lišila jen minimálně. V případě sedimentu bylo průměrné skóre 1,687, u supernatantu pak 1,648.

Výsledky identifikace touto metodou jsou přehledně demonstrovány v tab. 3. Z ní je zřejmé, že většinu izolátů se podařilo určit na úroveň druhu (n=190, 98,45 %), a jen ve třech případech (1,55 %) bylo možné zjistit pouze rod kultury. Celkem bylo rozlišeno 43 druhů vláknitých hub. Nejpočetněji byly zastoupeny rody *Aspergillus* (n=102; 52,85 %), *Trichophyton* (n=21; 10,88 %) a *Penicillium* (n=19; 9,84 %).

V rámci prvně zmíněného rodu byly nejčastěji zachyceny druhy *A. fumigatus* (n=40; 39,22 %) a *A. niger* (n=21; 20,59 %). V případě rodu *Trichophyton* byl v devíti případech izolován *T. rubrum* (42,86 %), v pěti *T. tonsurans* (23,81 %), ve třech *T. benhamiae* (14,29 %), ve dvou *T. mentagrophytes* (9,52 %), a po jednom zástupci mely druhy *T. erinacei* a *T. interdigitale*. V rámci rodu *Penicillium* bylo rozlišeno celkem šest druhů, dva zbylé izoláty byly určeny pouze na rodovou úroveň. Nejčastěji bylo zachyceno *P. glabrum* (n=5; 26,32 %), následovalo *P. corylophilum* (n=3; 15,79 %) a *P. chrysogenum* (n=3; 15,79 %).

Tabulka 3: Výsledky identifikace vláknitých hub pomocí MALDI – TOF MS po kultivaci v tekutém médiu s extrakcí

Identifikace mikromycety	Počet izolátů	Identifikace mikromycety	Počet izolátů
<i>Aspergillus fumigatus</i>	40	<i>Byssochlamys spectabilis</i>	2
<i>Aspergillus niger</i>	21	<i>Cladosporium herbarum</i>	2
<i>Aspergillus flavus</i>	18	<i>Fusarium solani</i>	2
<i>Trichophyton rubrum</i>	9	<i>Microsporum canis</i>	2
<i>Aspergillus terreus</i>	8	<i>Penicillium italicum</i>	2
<i>Lichtheimia corymbifera</i>	7	<i>Penicillium roqueforti</i>	2
<i>Fusarium oxysporum</i>	6	<i>Penicillium spp.</i>	2
<i>Aspergillus nidulans</i>	5	<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	2
<i>Penicillium glabrum</i>	5	<i>Aspergillus clavatus</i>	1
<i>Rhizopus oryzae</i>	5	<i>Aspergillus oryzae</i>	1
<i>Scedosporium apiospermum</i>	5	<i>Cladosporium cladosporioides</i>	1
<i>Trichophyton tonsurans</i>	5	<i>Fusarium cerealis</i>	1
<i>Alternaria alternata</i>	4	<i>Geosmithia argillacea</i>	1

Tabulka 3 - pokračování: Výsledky identifikace vláknitých hub pomocí MALDI – TOF MS po kultivaci v tekutém médiu s extrakcí

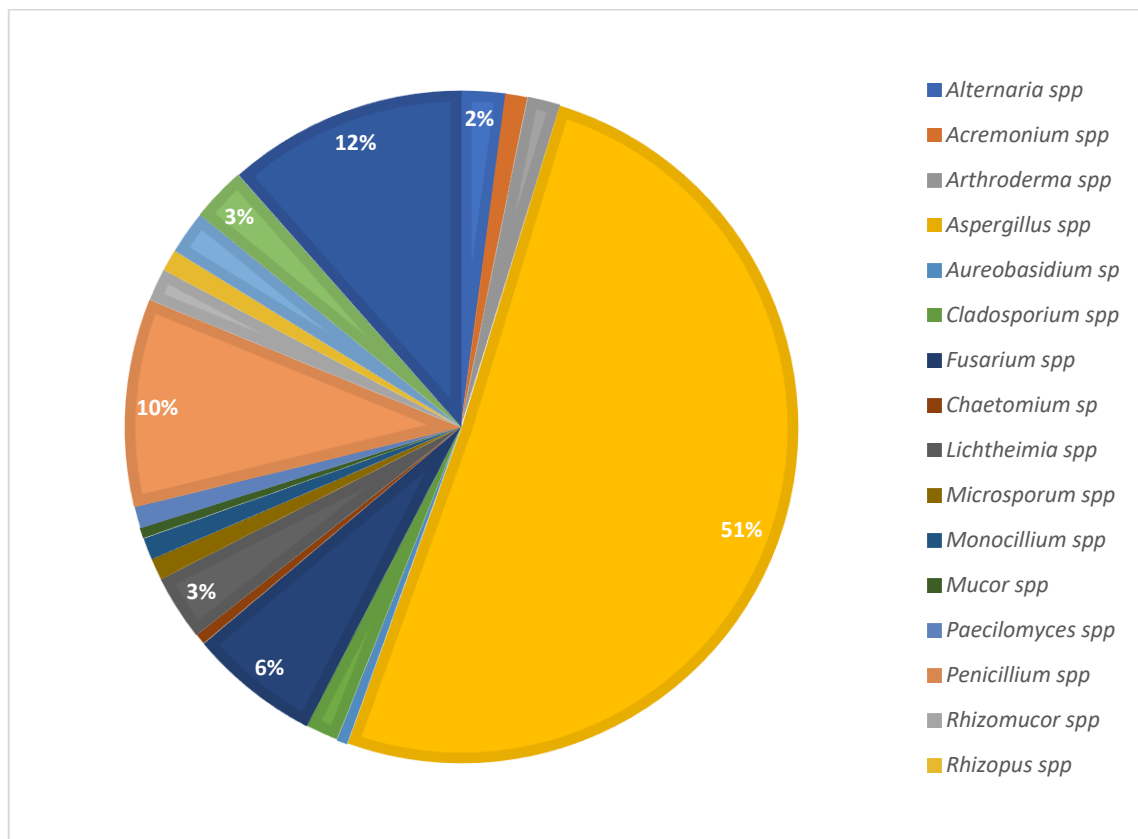
Identifikace mikromycety	Počet izolátů	Identifikace mikromycety	Počet izolátů
<i>Aspergillus amstelodami</i>	3	<i>Microsporium persicolor</i>	1
<i>Aspergillus montevicensis</i>	3	<i>Mucor circinelloides</i>	1
<i>Fusarium proliferatum</i>	3	<i>Penicillium citrinum</i>	1
<i>Penicillium corylophilum</i>	3	<i>Penicillium verruculosum</i>	1
<i>Penicillium chrysogenum</i>	3	<i>Syncephalastrum racemosum</i>	1
<i>Rhizomucor pussillus</i>	3	<i>Talaromyces sp.</i>	1
<i>Rhizopus microsporus</i>	3	<i>Trichophyton erinacei</i>	1
<i>Trichophyton benhamiae</i>	3	<i>Trichophyton interdigitale</i>	1
<i>Aspergillus versicolor</i>	2		

3.5 Porovnání výsledků identifikace izolátů vláknitých hub

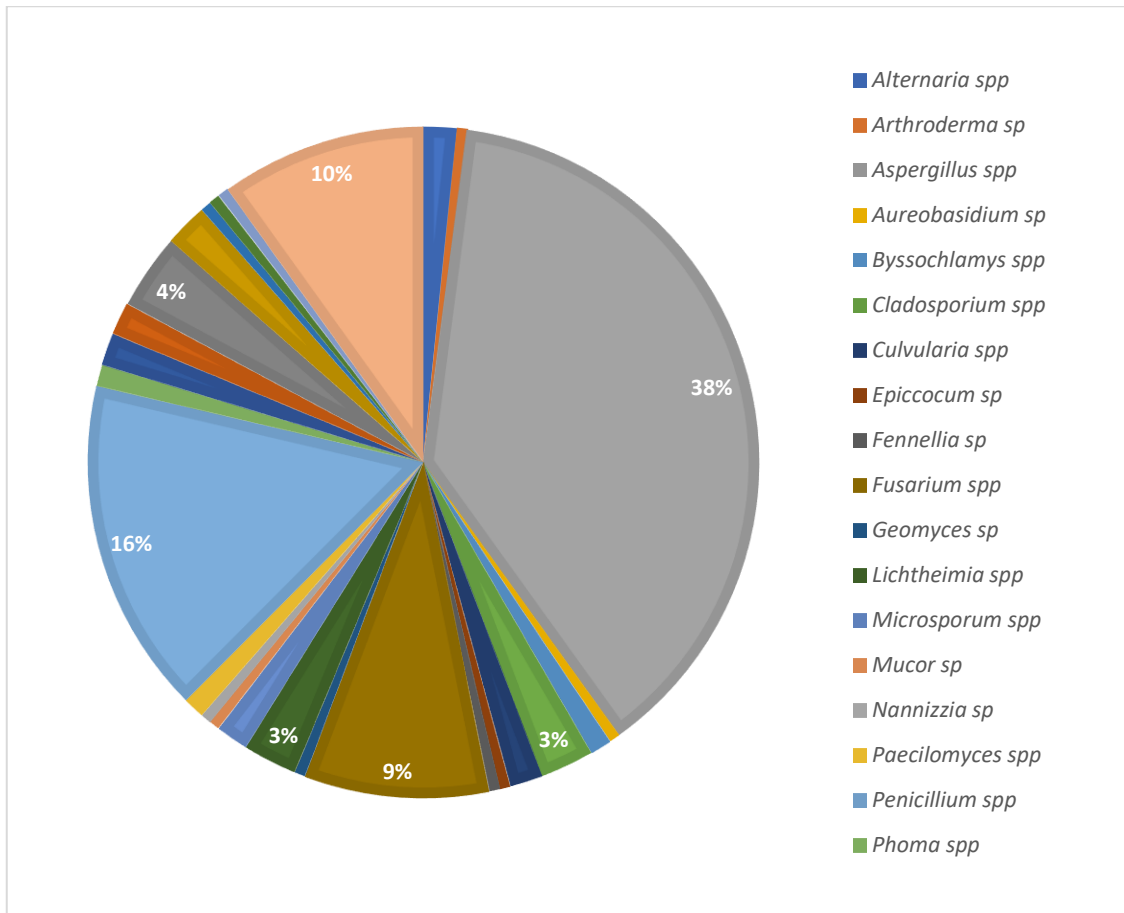
Všechny izoláty byly identifikovány pomocí tří výše uvedených metod, a to na základě morfologických znaků a pomocí MALDI – TOF MS, jednak přímo z kultury a také po kultivaci v tekutém médiu a extrakci. Při porovnávání identifikace izolátů na základě morfologických znaků proti oběma metodám MALDI – TOF MS bylo možné z důvodu převážně rodové identifikace pomocí morfologie hodnotit na úrovni rodu 187 izolátů (tj. bez blíže neurčené mukormycety a pěti kultur označených jako sterilní mycelium), na úrovni druhu pouze 118. Při vzájemném porovnání obou metod založených na hmotnostní spektrometrii bylo hodnocení provedeno na úrovni druhu, přičemž bylo možné využít celý soubor kmenů.

Míra shody mezi identifikací izolátů na základě morfologických znaků a pomocí MALDI – TOF MS z kultury na úrovni rodu je patrná z grafů 3 a 4. Shodný výsledek určení byl zjištěn na úrovni rodu u 113 kmenů (58,55 %), na úrovni druhu u 41 izolátů (22,24 %).

Graf 3: Spektrum rodů vláknitých hub identifikovaných podle morfologických znaků

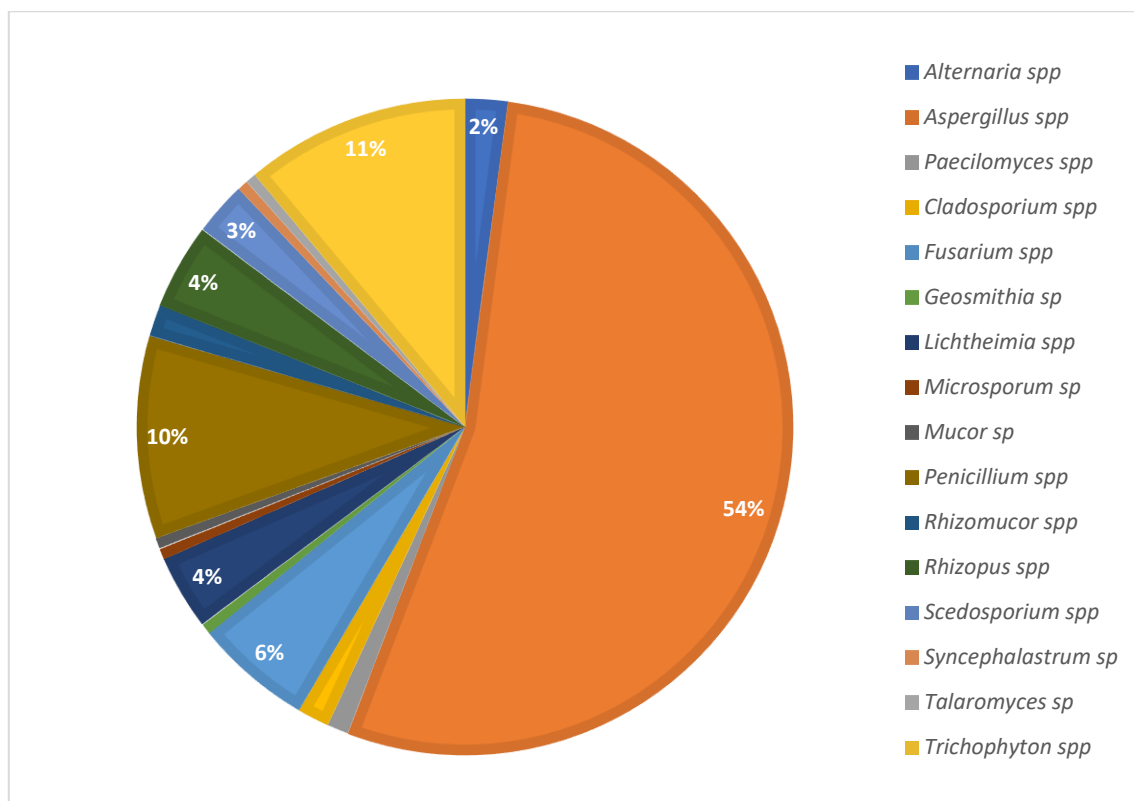


Graf 4: Spektrum rodů vláknitých hub identifikovaných pomocí MALDI – TOF MS z kultury



Míra shody mezi identifikací izolátů na základě morfologických znaků a pomocí MALDI – TOF MS po kultivaci v tekutém médiu a extrakci na úrovni rodu je patrná z grafu 3 a 5. Shodný výsledek určení byl zjištěn na úrovni rodu u 164 kmenů (84,97 %), na úrovni druhu u 89 izolátů (41,11 %).

Graf 5: Spektrum rodů vláknitých hub identifikovaných pomocí MALDI – TOF MS po kultivaci v tekutém médiu a extrakci



Míra shody mezi identifikací izolátů oběma metodami založenými na určování pomocí MALDI – TOF MS byla na úrovni rodu zjištěna u 122 kmenů (63,21 %), na úrovni druhu u 75 izolátů (38,68 %). Dále bylo zjištěno, že průměrné identifikační skóre bylo při identifikaci z kultury výrazně nižší (1,127) než po kultivaci v tekutém médiu (1,668). Dále, všechny izoláty, které byly správně určeny pomocí MALDI – TOF MS z kultury, byly zároveň správně identifikovány technikou MALDI – TOF po kultivaci v tekutém médiu a extrakci.

3.6 Identifikace vybraných izolátů vláknitých hub sekvencováním DNA

Soubor pro sekvencování DNA tvořilo celkem 21 izolátů, které byly vybrány na základě neshodných výsledků výše uvedených identifikačních metod. Zmíněná genetická metoda byla provedena v laboratořích Zdravotního ústavu se sídlem v Ostravě.

Z jednoho vzorku se nepodařilo izolovat DNA, nakonec bylo hodnoceno 20 kmenů. Porovnání výsledků identifikace u 10 vybraných izolátů je uvedeno v tab. 4.

Nejvyšší míra shody s výsledkem sekvenace DNA byla zjištěna u MALDI – TOF MS po kultivaci v tekutém médiu a extrakci, identický výsledek byl zjištěn u 14 kultur. Ke shodě mezi výsledky sekvenace DNA a MALDI – TOF MS z kultury došlo v 7 případech, kdy všechny izoláty byly zároveň shodně určeny metodou MALDI – TOF MS po kultivaci v tekutém médiu a extrakci.

U dvou kmenů (vzorky č. 235 a 668) byly sekvencováním určeny kvasinkovité mikroorganismy (*Galactomyces geotrichum*, *Blastobotrys sp*). Pravděpodobnou příčinou je kontaminace původních izolátů vláknitých hub. Další dva kmene (vzorky č. 913 a 1081) identifikované sekvencováním jako *Cadophora sp* a *Cryptendoxyla hypophloia*, nejsou zahrnuty v současné verzi komerční databáze vláknitých hub MALDI – TOF MS, a proto nemohl být v těchto případech výsledek porovnán.

Tabulka 4: Porovnání identifikace vybraných izolátů vláknitých hub pomocí morfologických znaků, MALDI – TOF MS z kultury a po kultivaci v tekutém médiu s extrakcí a sekvenace DNA

Číslo vzorku	Morfologie	MALDI – TOF z kultury	MALDI – TOF s extrakcí	Sekvenace DNA
141341	<i>Acremonium sp</i>	<i>Scedosporium apiospermum</i>	<i>Scedosporium apiospermum</i>	<i>Scedosporium apiospermum</i>
179	<i>Aspergillus clavatus</i>	<i>Penicilium cintreonigrum</i>	<i>Aspergillus amstelodami</i>	<i>Aspergillus amstelodami/clavatus</i>
668	<i>Acremonium sp.</i>	<i>Lichthemia corymbifera</i>	<i>Cladosporium cladosporioides</i>	<i>Blastobotrys sp.</i>
1073	<i>Penicilium sp.</i>	<i>Microsporium canis</i>	<i>Talaromyces sp</i>	<i>Talaromyces sp.</i>
1085	<i>Aspergillus glaucus</i>	<i>Aspergillus fumigatus</i>	<i>Aspergillus montevidensis</i>	<i>Aspergillus glaucus/montevidensis</i>
913	<i>Fusarium sp.</i>	<i>Aspergillus versicolor</i>	<i>Aspergillus montevidensis</i>	<i>Cadophora sp</i> (<i>Phialophora sp</i>)
356	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Penicilium onobense</i>	<i>Penicilium roqueforti</i>	<i>Aspergillus niger/ tubigenis</i>
235	Sterilní mycelium	<i>Rhizopus stolonifer</i>	<i>Rhizopus oryzae</i>	<i>Galactomyces geotrichum</i>
1022	Sterilní mycelium	<i>Fusarium cerealis</i>	<i>Aspergillus ochraceus</i>	<i>Acremonium sp.</i>
1081	Sterilní mycelium	<i>Penicilium onobense</i>	<i>Aspergillus tereus</i>	<i>Cryptendoxyla hypophloia</i>

3.7 Testování antifungální aktivity AgNP v textilních látkách

Bylo testováno celkem pět různě upravených vzorků textilií: směs bavlny a polyesteru (50/50 BA/PES), bavlna se s jedním, resp. dvěma zátěry

látkou TP55 (bavlna 1x zátěr TP55; bavlna 2x zátěr TP55), bavlna Carlton (100% bavlna Carlton) a bavlna bez úpravy. S výjimkou poslední zmíněné látky byly současně testovány vzorky stejných textilií, impregnovaných AgNP. Celkem tedy bylo hodnoceno devět variant textilních látek. Jejich antifungální aktivita byla zjišťována pomocí kmenů *A. niger* a *Chaetomium globosum*.

První experiment proběhl v prosinci roku 2017. V jeho rámci byla každá varianta textilie testována celkem čtyřikrát, tj. za tímto účelem byly použity čtyři inokulované Petriho misky a čtyři kolečka jednotlivých textilií. Pokud se hodnocení výsledků lišilo, byl uveden průměr. Vyhodnocení probíhalo podle kritérií shrnutých v tab. 13. Antifungální aktivita textilní látky proti mikromycetě je demonstrována na obr. 8.

Obrázek 8: Antifungální aktivita kmene *Chaetomium globosum* na textilií Bavlna 2x zátěr TP55 nano Ag (číslo vyhodnocení 1, bez inhibiční zóny)



Výsledky testování jsou sumarizovány v tab. 5. Z ní je patrné, že ve většině případů vykazovaly látky impregnované AgNP lepší antifungální aktivitu. Výjimkou byla bavlna s jedním zátěrem látkou TP55, kdy došlo k lepším výsledkům bez přítomnosti AgNP. Naopak nejlepší antimykotický účinek AgNP byl zjištěn u 100% Bavlna Carlton, kde dokonce došlo ke vzniku inhibiční zóny v okolí látky.

Tabulka 5: Výsledky antifungální aktivity hub vůči textilním látkám (první experiment, rok 2017)

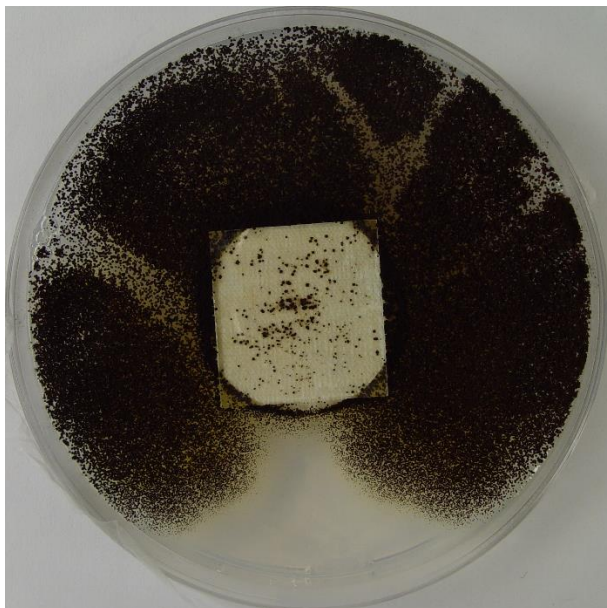
Specifikace textilie	Hodnota antifungální aktivity proti	
	<i>Chaetomium globosum</i>	<i>Aspergillus niger</i>
50/50 BA/PES	2	2-3
50/50 BA/PES nano Ag	1	1 (inhibiční zóna)
Bavlna 2x zátěr TP55	1, 2	4
Bavlna 2x zátěr TP55 nano Ag	1	2-3, 3
Bavlna 1x zátěr TP55	4	4
Bavlna 1x zátěr TP55 nano Ag	4, 5	4
100% Bavlna Carlton	4	1
100% Bavlna Carlton nano Ag	1 (inhibiční zóna)	1 (inhibiční zóna)
Bavlna bez úpravy	3	2-3

Antifungální aktivita všech výše uvedených textilií byla znova změřena po roce, v prosinci 2018. V rámci tohoto experimentu však byl opakovaně zjištěn nedostatečný růst kultury *A. niger* na Minerálním agaru s glukózou, kdy spory nebyly rozmístěny na celé ploše agaru, a proto v některých případech bylo objektivní posouzení antifungální aktivity obtížné (obr. 9). Navíc se výsledky tohoto druhého testování, sumarizované v tab. 6, zásadně lišily od prvního. Výhoda impregnace většiny látek AgNP, zjištěná v prvním experimentu, tak nebyla potvrzena.

Tabulka 6: Výsledky antifungální aktivity hub vůči textilním látkám (druhý experiment, rok 2018)

Specifikace textilie	Hodnota antifungální aktivity proti	
	<i>Chaetomium globosum</i>	<i>Aspergillus niger</i>
50/50 BA/PES	2	2
50/50 BA/PES nano Ag	2	2-3, 3
Bavlna 2x zátěr TP55	2	4
Bavlna 2x zátěr TP55 nano Ag	1-2, 2	3
Bavlna 1x zátěr TP55	4	4
Bavlna 1x zátěr TP55 nano Ag	4	4-5, 5
100% Bavlna Carlton	2-3, 3	2
100% Bavlna Carlton nano Ag	2, 2-3	2, 2-3
Bavlna bez úpravy	4	3

Obrázek 9: Hodnocení antimykotického působení při opakovaném měření látky BA/PES 50/50 nano Ag u kmene *Aspergillus niger*



4 Diskuze

Onemocnění způsobená houbami nejsou v současnosti nejdiskutovanějším tématem, hlavně ve srovnání s hrozbou bakteriálních nákaz rezistentních k antibiotické terapii nebo virových epidemií. Pozornost, zaměřená na mykotické infekce, rezistenci mikromycet k antimykotikům a vývoj nových antifungálních látek, není tak velká jako v případě bakterií. Málokdo si nákazy způsobené mikroskopickými houbami spojí s život ohrožující infekcí.^{67,68}

Podle časopisu *The European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* se počet postižených mykózami se závažným průběhem odhaduje na 832 milionů lidí ve 14 nejhůře postižených státech Asie, Ameriky, Evropy a severní Afriky. V každé z těchto zemí je některým z nejzávažnějších typů houbových infekcí, které mohou způsobit chronické onemocnění nebo dokonce smrt, postiženo 1,8 – 3 % populace.⁶⁹

Houbové infekce se vyskytují především u imunokompromitovaných osob, jako jsou pacienti podstupující chemoterapeutickou léčbu nebo s progredujícím syndromem získané imunodeficeince. Vlivem globálního oteplování a v souvislosti s rozvojem cestování dochází k rychlému šíření houbových patogenů, kteří se snadno přizpůsobují přežití ve vyšších teplotách.⁷⁰ Postupně se rovněž vyvíjí rezistence na omezený arzenál antimykotických léčiv, což se stává vážným problémem zejména u nejčastějších systémových mykóz způsobených rody *Candida* či *Aspergillus*. V případě posledně zmíněných infekcí se udává prevalence kmenů rezistentních na azolová antimykotika 30 % a míra mortality na invazivní formu aspergilózy v evropských nemocnicích až 90 %.^{71,72} Je proto nutné, aby docházelo k vývoji nových, rychlých diagnostických strategií a algoritmů antifungální léčby včetně vývoje nových preparátů.

V rutinní praxi laboratoří lékařské mykologie se identifikace houbových agens dlouhou dobu opírala o fenotypové metody, v případě vláknitých hub především o morfologické. Jsou sice levné, ale vyžadují značné znalosti a zkušenosti. To se v nedávné době změnilo s nástupem technologie MALDI – TOF MS, která je rychlá, přesná a až na počáteční investici do přístroje také ekonomicky výhodná.⁷³ Zejména v laboratořích velkých nemocnic se nyní standardně využívá pro určování bakterií a kvasinkovitých mikroorganismů. Jak už bylo zmíněno v úvodní části, limitem pro využití

při identifikaci vláknitých hub je pracnější a časově náročnější příprava vzorku a omezenější druhové spektrum v databázi.

U vláknitých hub totiž, při použití testování přímo z kultury, jako je tomu v případě bakterií a kvasinkovitých mikroorganismů, nedochází k získání relevantních výsledků; izoláty jsou většinou určovány s nízkým identifikačním skóre, a navíc se udává, že jsou často získána sacharidová spektra místo proteinových, na jejichž analýze je metoda identifikace mikroorganismů založena.⁷⁴ Důvodem jsou zřejmě zásadní rozdíly ve stavbě buněčné stěny vláknitých hub ve srovnání s ostatními mikroby. Bakteriální buňku lze rozrušit většinou pouze za účasti matrice, v případě kvasinkové se přidává kyselina mravenčí. U vláknitých hub je stěna až z 90 % tvořena polysacharidy, navíc převážně pevným chitinem, proto je třeba k jejímu rozrušení zvolit intenzivnější extrakční postup. Z tohoto důvodu byla vyvinuta metodická varianta založená na kultivaci v tekutém médiu s rotací kultur a následnou účinnější extrakcí buněčných proteinů. V literatuře je někdy označována také jako prodloužená kultivace.

Přestože je identifikace pomocí MALDI – TOF MS výhodná, cenově dostupná a rychlá, stále platí, že se výsledek musí verifikovat morfologicky. Lze to provést především na úrovni rodu, pokud izolát sporuluje. Shoda zejména s tzv. prodlouženou kultivací bývá velmi dobrá, což bylo potvrzeno i našimi výsledky. Např. u 51 izolátů studovaného souboru, zachycených ze sputa, byla zjištěna shoda morfologické identifikace s tzv. prodlouženou kultivací na úrovni rodu v 81,9 %, zatímco při identifikaci z kultury to bylo pouze 44,0 %.

Dalším argumentem pro výrazně vyšší spolehlivost identifikace MALDI – TOF MS po předchozí tzv. prodloužené kultivaci v porovnání s extrakcí z kultury byl výsledek sekvencování. Jelikož se objevilo celkem 21 kultur, které určily metody navzájem s rozdílným výsledkem, byla provedena sekvenace jejich DNA. Nejvyšší shoda byla zjištěna právě s tzv. prodlouženou kultivací, a to u 14 izolátů, jednoznačně chybná identifikace byla zjištěna pouze ve dvou případech. Určení dalších dvou izolátů nebylo možné zmíněnou metodou provést, neboť názvy mikromycet identifikované sekvenací nebyly začleněny do referenční databáze MALDI – TOF MS, v dalších dvou případech byla zjištěna kontaminace kvasinkovitými mikroorganismy a u zbylé kultury se nepodařila izolace DNA.

Výsledek identifikace MALDI – TOF MS může někdy opravit morfologické určení izolátu na druhové úrovni, i když kultura sporuluje a klíčové znaky vyhodnocuje zkušený mykolog. Nastává to za situace, kdy je morfologie izolátu atypická, třeba v souvislosti s probíhající antifungální léčbou. V průběhu studie byly hodnoceny dva izoláty od stejného pacienta, které původně, pomocí morfologických znaků, odpovídaly rodu *Monocilium*. Metodou kultivace v tekutém médiu s extrakcí však byly MALDI – TOF MS identifikovány jako *A. fumigatus* se skóre 2,204 a 1,912. Morfologie kultury však, ani při opakovaném hodnocení, tomuto určení neodpovídala. Nicméně sekvencováním byl výsledek identifikace hmotnostní spektrometrií potvrzen.

Další výhodou identifikace pomocí tzv. prodloužené kultivace je správné určení zejména na druhové úrovni. V naprosté většině případů jsou zástupci rodu *Penicillium* podle morfologických znaků identifikováni pouze na úroveň rodu, pomocí tzv. prodloužené kultivace byly, až na dva izoláty, všechny kultury dourčeny na druhovou úroveň. Rovněž u dermatofytů je druhové určení obtížné. Z celkového množství 22 identifikovaných dermatofytů v této studii se v 6 případech shodoval výsledek tzv. prodloužené kultivace s morfologickou identifikací. V dalších jedenácti případech byla pomocí MALDI – TOF MS opravena druhová identifikace dermatofyta, provedená na základě morfologických znaků. Příkladem může být vzorek č. 1394, který byl morfologicky určen jako *T. interdigitale*. Pomocí tzv. prodloužené kultivace byl však izolát identifikován jako *T. erinacei*, se skóre 2,161 a 1,890. Dále, některé z mikromycet jsou si evolučně příliš podobné, než aby byly rozlišeny morfologicky nebo dokonce ani pomocí MALDI – TOF MS. V těchto případech vydá identifikační databáze hmotnostního spektrometru dva různé výsledky, oba s dobrým identifikačním skóre.

Becker et al. se ve své studii zabývali identifikací vláknitých mikromycet pomocí MALDI – TOF MS s využitím vlastní interní databáze obsahující 760 kmenů, která byla evaluována na 390 klinických izolátech na základě porovnání výsledků z MALDI – TOF MS a klasické morfologické identifikace. Použití MALDI – TOF MS mělo za následek správnou identifikaci v 85,6 % izolátů na úrovni druhu s ohledem na spolehlivost identifikačního skóre podle Bruker Daltonik (tj. skóre vyšší než 1,7). Bez ohledu na jeho hodnotu bylo na úroveň druhu správně určeno dokonce 95,4 % izolátů.⁷⁵ Theel et al. zabývající se identifikací dermatofytů pomocí MALDI – TOF MS s využitím komerční databáze dosáhli úspěšné identifikace pouze v 20,5 % případech. Avšak při využití zmíněné knihovny společně s vlastní doplňkovou databází, obsahující

dalších 20 dermatofytických spekter, vzrostla úspěšnost identifikace na 60 %.⁷⁶ Z těchto studií je jasné, že výsledky identifikace vláknitých hub pomocí MALDI – TOF MS závisí na velikosti a kvalitě použité referenční knihovny.

Stále nejpřesnější metodou identifikace mikroorganismů je PCR s následnou sekvenací genomu, nicméně tato metoda je jak instrumentálně, tak časově náročná, navíc sekvenátory nejsou ve většině mikrobiologických laboratoří dostupné.

V posledních letech byl pozorován rychlý nárůst počtu bakterií, které jsou rezistentní vůči konvenčně používaným antibiotikům.²⁹ Ani antifungální terapie není výjimkou. Ačkoliv se zdá, že rezistence vůči fungicidním léčivům není tak závažným problémem jako odolnost bakterií k antibiotikům, z hlediska omezeného počtu antifungálních látek s rozdílným mechanismem účinku, se stává tato rezistence hrozbou. Jedním z dalších důvodů je skutečnost, že houby jsou eukaryotické organismy se strukturou buněk a metabolismem podobným svým hostitelům. Proto je potřebný vývoj nových látek s antifungálním účinkem působících novými mechanismy.

Antibakteriální účinky stříbra jsou již dlouho známé a mají řadu využití, protože jeho toxicita pro lidské buňky je podstatně nižší než pro bakteriální. I když je známý biocidní efekt a mechanismy působení iontů stříbra, míra antifungální aktivity AgNP proti vláknitým mikromycetám nebyla zatím příliš studována.³⁰

V rámci této práce byl hodnocen antifungální účinek AgNP porovnáním vlivu souboru textilií po impregnaci zmíněnými částicemi a bez ní, na vybrané izoláty vláknitých mikromycet. První experiment prokázal určitou míru aktivity AgNP proti těmto houbám. Avšak měření provedené se stejnými textiliemi po uplynutí jednoho roku uvedené výsledky nepotvrdilo. Tento rozdíl je možné přičíst zčásti na vrub jinému kmenu rodu *Chaetomium*, se kterým byl proveden druhý experiment a rovněž nedostatečnému růstu kultury *A. niger*. Skutečnou příčinou se nám však spíše jeví agregace či oxidace AgNP, které zřejmě po roce již ztratily svou antimykotickou aktivitu. Pro potvrzení této hypotézy byly látky předány zpět na Katedru fyzikální chemie PřF UP pro zjištění jejich současného stavu.

5 Experimentální část

5.1 Materiál a metody

5.1.1 Vyšetřované kmeny a přehled metod identifikace

Ke sběru kmenů vláknitých mikromycet, pocházejících převážně od pacientů FNOL, docházelo v době od září 2017 do prosince 2018. Izoláty pocházely z klinických vzorků, zasílaných do mikrobiologických laboratoří Lékařské fakulty Univerzity Palackého v Olomouci a Ústavu mikrobiologie FNOL k vyšetření. Vyšetřovány byly vzorky moči, sputa, výtěru ze zevního zvukovodu, kůže a jejích adnex. Dále byly využity kmeny vláknitých mikromycet z mykologické sbírky zmíněného Ústavu. Byl shromážděn soubor celkem 193 izolátů, které byly konzervovány v kryozkumavkách při -80 °C. Před vyšetřováním byly vyočkovány na šikmý SGAA, kde byly uchovávány maximálně po dobu 6 měsíců pro provádění opakovaných identifikací.

Všechny kmeny byly určeny na základě morfologických znaků, dále běžně používaným postupem pro identifikaci bakterií a kvasinkovitých mikroorganismů pomocí MALDI – TOF MS, a navíc ještě pomocí kultivace v tekutém médiu s extrakcí s vyhodnocením rovněž hmotnostní spektrometrií. V rámci posledně jmenovaného postupu identifikace byl testován sediment i supernatant. Nedostatečně spolehlivě určené nebo vůbec neurčené izoláty byly identifikovány sekvencováním jejich DNA. Výsledky získané mikroskopickou identifikací a MALDI – TOF MS byly porovnány z hlediska přesnosti identifikace.

5.1.2 Mikroskopická identifikace

Vyšetřované kmeny byly nejprve určeny pomocí morfologických znaků. Za tímto účelem byly očkovány třemi vpichy na plochu SGAA s thiaminem (Trios, Česká republika) v Petriho miskách. Vzhled narostlých kolonií (rychlost růstu, barva a textura povrchu, vzhled spodiny) byl hodnocen po 3-14 dnech v závislosti na rychlosti jejich růstu. Mikromorfologie byla hodnocena mikroskopicky suchým systémem v procházejícím světle po zhruba týdenní inkubaci mikrokultury, připravené vykrojením pomocí sterilní zkumavky z „hamburského“ agaru (glukosa 10 g; Proteose pept. 5 g; NaCl

5 g; Purified agar 10 g; Muller Hint. Br. 3,2 g; glycerin 5 ml; destilovaná voda 1 000 ml) nalitého v Petriho misce. Charakteristické znaky (vzhled mycelia, tvar a uspořádání spor) byly sledovány na okraji bločku.

5.1.3 Identifikace MALDI – TOF MS přímo z kolonie

Vyšetřovaný kmen byl vyočkován na SGAA s thiaminem (Trios). Po dostatečném nárůstu kultury byla odebrána část mycelia, přenesena na destičku MALDI a překryta 0,85 µl kyseliny mravenčí. Po zaschnutí byla směs převrstvena stejným množstvím matrice. Takto připravený vzorek byl podroben analýze MALDI – TOF MS. Každá kultura se skóre nižším než 2,0 byla opakovaně testována (celkem třikrát) a získaná skóre zprůměrována.

5.1.4 Identifikace MALDI – TOF MS pomocí kultivace v tekutém médiu a extrakce

Z kolonie vyšetřovaného kmene, vyrostlé na SGAA s thiaminem (Trios) byla odebrána část mycelia a přenesena do zkumavky s tekutým modifikovaným Sabouraudovým agarem (dextróza 20 g, směs peptického hydrolyzátu zvířecí tkáně a pankreatické tráveniny kaseinu v poměru 1:1 10 g) (Trios). Zkumavka byla umístěna do rotátoru Multi Bio RS-24 (Biosan, Litva) a inkubována 48 h při 20 otáčkách/min a laboratorní teplotě. Poté byla zkumavka přemístěna do stojánku na 10 min, přičemž došlo k usazení mycelia na dně zkumavky. Dále bylo 1,5 ml sedimentu přeneseno do mikrozukavky a centrifugováno 4 min/10 000 rpm. Po odstranění supernatantu byl sediment promyt 1 ml sterilní vody a postup centrifugace s promytím ještě dvakrát opakován. Po poslední centrifugaci byl sediment suspendován v 900 µl etanolu a 300 µl sterilní vody a opět centrifugován 4 min/10 000 rpm. Supernatant byl odstraněn a vzniklá peleta sušena 20 min při pokojové teplotě. V závislosti na velikosti pelety bylo přidáno odpovídající množství kyseliny mravenčí (10–100 µl), stejné množství acetonitrilu, směs byla ponechána sedimentovat 2-3 minuty při pokojové teplotě. Poté byl na terčík destičky MALDI pipetován:

1. 1 µl supernatantu a překryt 1 µl matrice nebo
2. 1 µl sedimentu (případně odpovídající množství přeneseno pomocí párátko) a překryt 1 µl matrice

Po zaschnutí matrice byla destička vložena do přístroje a vzorek podroben analýze MALDI – TOF MS. Každý izolát se skóre nižším než 2,0 byl opakovaně testován (celkem třikrát) a získaná skóre zprůměrována.

5.1.5 Identifikace sekvenací DNA

5.1.5.1 Izolace DNA

Nejprve bylo do mikrozkušavky o objemu 1,5 ml napipetováno 100 µl roztoku pro izolaci DNA PrepMan Ultra Sample Preparation Reagent (Applied Biosystems). Do této směsi byly pomocí bakteriologické kličky vpraveny spory vláknitých hub a zkumavka promíchána na vortexu po dobu 10-30 s. Následovala inkubace v blokovém termostatu 10 min při 100 °C. Poté byl vzorek centrifugován 3 min při 16 000 g. Následně bylo 5 µl sedimentu přemístěno do čisté zkumavky spolu se 495 µl vody pro PCR a roztok krátce promíchán na vortexu. Takto připravená izolovaná DNA může být uchovávána při -20 °C po dobu 6 měsíců.

5.1.5.2 Příprava vzorků pro sekvenační reakci

Vzorek izolované houbové DNA byl podroben PCR za použití čtyř různých primerů, které jsou specifikovány v tab. 7. Cílem byla amplifikace genu *benA*, dále oblastí ITS1-5,8-ITS2, D1-D2 LSU pro NL1 a NL4 a úseku ITS2.

Tabulka 7: Specifikace primerů použitých pro PCR ^{50,77,78}

Primery	Oblast	Primer forward
		Primer reverse
Bt2a + Bt2b	β-2 tubulinu	5'-GGTAACCAAATCGGTGCTGCTTTC-3' 5'-ACCCTCAGTG TAGTGACCCTTGGC-3'
ITS1 + ITS4	ITS1-5,8-ITS2	5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3' 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'
NL1 + NL4	D1-D2 LSU	5'-GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG-3' 5'-GGTCCGTGTTTCAAGACGG-3'
5,8SF + 28S-1R	ITS2	5'-GTGAATCATCGARTCTTTGAAC-3' 5'-TATGCTTAAGTTCAGCGGGTA-3'

Nejprve byla vytvořena reakční směs, jejíž složení je uvedeno v tab. 8.

Tabulka 8: Složení reakční směsi pro PCR

PCR komponenty	Objem na 1 reakci (μl)
TB Green Premix Ex Taq	12,5
Primer forward (10 pmol/μl)	1
Primer reverse (10 pmol/μl)	1
PCR voda	8,5

Do amplifikační zkumavky, umístěné v chladícím bločku, bylo pipetováno 23 μl reakční směsi a 2 μl vzorku. Zkumavka byla krátce centrifugována a vložena do SmartCycleru, v němž byl zvolen program SQ Fungi. Parametry reakce jsou uvedeny v tab. 9.

Tabulka 9: Průběh PCR reakce

Kroky reakce	Čas	Teplota
Úvodní denaturace	30 s	95 °C
Denaturace	5 s	95 °C
Hybridizace primerů	10 s	55 °C
Závěrečná extenze	15 s	72 °C
Melting	x	50-90 °C/ 0,1 °C

Vyhodnocení PCR probíhalo na základě teplot tání, stanovených pro jednotlivé primery a uvedených v tab. 10.

Tabulka 10: Melting teplota pro jednotlivé primery

Sada primerů	Melting
Bt2a + Bt2b	85-92 °C
ITS1 + ITS4	88-90 °C
NL1 + NL4	88-92 °C
5,8SF + 28S-1R	86-93 °C

S pozitivními vzorky, tj. takovými, v nichž byly detekovány produkty PCR, bylo dále pokračováno. Nejprve došlo k provedení jejich purifikace. Za tímto účelem bylo do amplifikační zkumavky na každých 5,5 μ l produktu PCR přidáno 1,5 μ l roztoku Exonuclease1 a Shrimp Alkaline Phosphatase (obojí Carolina Biosystems, Česká republika), následně byla směs krátce centrifugována a inkubována v termocykleru Biometra TRIO 48 (Analytik Jena, Německo) v programu ExoSAP po dobu 15 min při 37 °C, poté rovněž 15 min při 80 °C a na závěr 15 min při 4 °C. Takto připravené vzorky byly následně opět krátce centrifugovány.

V dalším kroku byl připraven premix obsahující komponenty důležité pro správný průběh sekvenační reakce. Jeho složení je uvedeno v tab. 11.

Tabulka 11: Složení premixu pro sekvenační reakci

	Objem na 1 reakci (μ l)
BDTv1.1 Sequencing RR	1,0
5x Sequencing Buffer	1,5
PCR voda	3,7
Primery F&R (10 pmol/ μ l)	0,3

Do amplifikační zkumavky bylo následně pipetováno 6,5 μ l premixu a 3,5 μ l purifikovaného produktu PCR. Po krátkém promíchání na vortexu a centrifugaci byla směs vložena do termocykleru Biometra TRIO 48 za účelem amplifikace produktu. Parametry amplifikační reakce jsou uvedeny v tab. 12.

Tabulka 12: Parametry amplifikace produktu pro sekvenační reakci

	Teplota	Čas
Úvodní denaturace	95 °C	5 min
25 x	95 °C	10 s
	62 °C	5 s
	60 °C	4 min
Chlazení	4 °C	

V další fázi procesu sekvenace, purifikaci produktu, byla použita souprava NucleoSEQ Columns (BioTech, Česká republika). Kolonka s amplifikovaným produktem byla centrifugována 30 s při 2800 rpm. Dále byla provedena hydratace gelu v kolonce přidáním 600 μ l DNA free vody (Sigma – Aldrich), kolonka byla poté opatrně vortexována a následně inkubována 30 min. Následně došlo k odstranění dolní zátky kolonky a centrifugaci 2 min při 2800 rpm a k umístění kolonky do čisté 1,5 ml mikrozkušavky. Na kolonku byl pipetován vzorek, následovala centrifugace 4-6 min při 2800 rpm a takto purifikovaný produkt byl smíchán s Hi-Di Formamidem (Applied Biosystems) v poměru 1:1 při celkovém objemu 12 μ l.

5.1.5.3 Automatizovaná sekvenace DNA

Do destičky pro sekvenaci bylo pipetováno 10 μ l vzorku. Došlo k uzavření jamek pomocí 96 – Well Plate Septa a krátké centrifugaci. Destička byla vložena do 96 – Well Plate Base a uzavřena pomocí 96 – Well Plate Retainer (vše Thermo Fischer Scientific). Dále došlo k vložení takto připravené destičky do autosampleru. Získaná data byla vyhodnocena pomocí Sequencing Analysis Software (Thermo Fischer Scientific), poté exportována a porovnána s databázemi BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) a holandské sbírky mikromycet CBS (Centraalbureau voor Schimmelcultures).

5.1.6 Testování antifungální aktivity AgNP v textilních látkách

K testování byly použity textilie poskytnuté Katedrou Fyzikální chemie Univerzity Palackého. Jednalo se celkem o pět různě upravených vzorků textilií: směs bavlny a polyesteru, bavlna se s jedním, resp. dvěma zátěry látkou TP55, bavlna Carlton a bavlna bez úpravy. S výjimkou posledně zmíněné látky byly dále poskytnuty vzorky

stejných textilií, které však byly impregnovány AgNP. Ze Sbírký kultur hub na Katedře botaniky Univerzity Karlovy v Praze byly získány kmeny *A. niger* a *Ch. globosum*.

Následně byl připraven roztok minerálních solí, jehož složení je uvedeno v tab 13.

Tabulka 13: Složení roztoku minerálních solí

Látka	Množství
NaNO ₃	2 g
KH ₂ PO ₄	0,3 g
KCl	0,5 g
MgSO ₄ *7H ₂ O	0,5 g
FeSO ₄ *7H ₂ O	0,01 g
H ₂ O	1000 ml

Poté bylo pH roztoku upraveno na 6,0-6,5 přidáním 0,01 mol/l sterilního NaOH. Ze zkoušených textilií byla vystřižena kolečka o průměru 3 cm, která byla dezinfikována ponořením do 70% etanolu po dobu 2 s a následně vysušena. U látek s rozdílným povrchem byly testovány obě strany.

Kmeny vláknitých hub, specifikované výše, byly vyočkovány na SGAA a inkubovány při 35 °C po dobu 3-5 dní, tj. do vytvoření dobře narostlých kolonií. Poté došlo k vytvoření suspenze spor seškrábnutím povrchu kolonií sterilní bakteriologickou kličkou do zkumavky s 5 ml roztoku minerálních solí. Následovala homogenizace přidáním skleněných kuliček a protřepáním. Úlomky mycelia byly odstraněny filtrací přes membránový filtr a suspenze byla poté centrifugována 5 min při 13 000 rpm. Následně byl odstraněn supernatant a sediment rozpuštěn v 10 ml roztoku minerálních solí. Uvedený postup promytí suspenze byl ještě jednou opakován. Koncentrace spor v roztoku byla poté turbidimetricky upravena na 10⁶ v ml a suspenze v této podobě byla použita k testování.

Minerální agar s glukózou (Trios, Česká republika) o objemu 1000 ml byl rozehrát v autoklávu a umístěn do vodní lázně nastavené na teplotu 45 °C, aby zůstal

v tekutém stavu. Byla připravena kontrola čistoty agarové půdy vylitím části rozehřátého kultivačního média do dvou Petriho misek. Ke každým 100 ml zbylé půdy byl přidán 1 ml připravené suspenze spor, takto inokulovaná směs byla promíchána a rozlita do Petriho misek do výšky přibližně 5 mm. Po ztuhnutí agarů bylo na jeho povrch sterilní pinzetou umístěno připravené kolečko zkoušené textilie, které bylo zatíženo kousky podložního skla. Současně byla připravena kontrola životaschopnosti spor vylitím inokulované půdy do dvou Petriho misek, na jejichž povrch nebyly umístěny žádné textilie. Takto připravené misky s agarovou půdou byly inkubovány 7 dní při 35 °C.

Antifungální aktivita zkoušených vzorků textilií byla hodnocena vizuálně podle kritérií shrnutých v tab. 13.

Tabulka 13: Kritéria pro hodnocení antifungální aktivity zkoušených vzorků textilií

Stupeň růstu	Hodnocení
0 ^a	Pod mikroskopem (zvětšení 50x), není zjevný žádný růst na zkoušené látce
1 ^a	Bez zvětšovacího přístroje není viditelný žádný růst na zkoušené látce
2	Bez zvětšovacího přístroje je viditelný růst pokrývající až 25 % povrchu zkoušené látky
3	Bez zvětšovacího přístroje je viditelný růst pokrývající až 50 % povrchu zkoušené látky
4	Značný růst pokrývající více než 50 % povrchu zkoušené látky
5	Rozsáhlý růst pokrývající celý povrch zkoušené látky
<i>Poznámka: Pokud je růst hub v okolí zkušební vzorku na agaru částečně nebo zcela omezen, je třeba popsat a změřit velikost inhibiční zóny.</i>	

6 Závěr

Z předložené práce lze učinit následující závěry:

- Identifikace vláknitých hub pomocí morfologických znaků je nejjednodušším a nejdostupnějším způsobem běžně používaným v diagnostických laboratořích lékařské mykologie. V řadě případů však vyžaduje značnou zkušenost hodnotitele a schopnost kmenů odpovídajícím způsobem sporulovat. I za těchto okolností je však často určování klinických izolátů uvedeným způsobem omezeno pouze na úroveň rodu.
- Hmotnostní spektrometrie, konkrétně MALDI – TOF MS, je pro svou rychlost a přesnost výraznou pomocí při určování mikroorganismů. V případě bakterií a kvasinkovitých mikroorganismů většinou postačuje identifikace přímo z kultury. U vláknitých hub však tento způsob vzhledem k pevnosti jejich buněčné stěny nebývá většinou příliš úspěšný. Určení je často chybné, resp. s nízkým identifikačním skóre. Proto byla vyvinuta metodika založená na kultivaci v tekutém médiu s následnou extrakcí, která umožňuje lepší uvolnění proteinů z buňky, což má za následek výrazné zvýšení přesnosti a spolehlivosti identifikace. Určitou nevýhodou je časová náročnost a pracnost uvedeného postupu. Limitací při určování vláknitých hub pomocí MALDI – TOF MS je navíc stále málo rozsáhlá komerční druhová databáze.
- Optimálním přístupem při identifikaci vláknitých hub v mykologických laboratořích, které vlastní hmotnostní spektrometr, je kombinace jejich určování podle morfologických znaků a pomocí MALDI – TOF MS po kultivaci v tekutém médiu a extrakci. Ke druhové identifikaci morfologicky typických izolátů, zejména nejběžnějších druhů *Aspergillus*, postačuje hodnocení vzhledu kultury a mikroskopických charakteristik, v ostatních případech je vhodné k určení na úroveň druhu použít hmotnostní spektrometrii. Avšak vzhledem k tomu, že zmíněný způsob identifikace není vždy bezchybný, je u sporulujících vláknitých hub nutné ověřit správnost určení izolátů na rodové úrovni zhodnocením morfologických znaků. Je-li identifikace zmíněnou kombinací metod nejednoznačná nebo nemožná, je třeba k dourčení využít postupy molekulární genetiky, především sekvencování.

- AgNP jsou již dlouhou dobu známé pro svou antimikrobiální aktivitu a zdají se být perspektivní i proti houbovým mikroorganismům. Námi získané výsledky při zkoušení účinku textilií impregnovaných těmito částicemi proti vláknitým mikromycetám jsou však rozporuplné. Nedostatečný účinek byl zjištěn především při opakovaném experimentu, uskutečněném po roce od prvního. Možnou příčinou by mohla být změna vlastností AgNP v čase, zejména pak oxidace, sulfidace či agregace nanočástic. To by znamenalo, že by se další experimenty v této oblasti měly zaměřit především na zajištění jejich dlouhodobé stability.

7 Seznam zkratek

AgNP	Stříbrné nanočástice
ASFL	<i>Aspergillus flavus</i>
ASFU	<i>Aspergillus fumigatus</i>
ASNI	<i>Aspergillus niger</i>
ASTE	<i>Aspergillus terreus</i>
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
bp	pár bazí
BT	Beta tubulin
CBS	Centraalbureau voor Schimmelcultures
CMP	chloramfenikol
ddNTPs	dideoxyribonukleotid trifosfáty
DNA	deoxyribonukleová kyselina
dNTPs	deoxyribonukleotid trifosfáty
FN	Fakultní nemocnice
FNOL	Fakultní nemocnice Olomouc
ITS	internal transcribed spacer, DNA spacer
LF UP	Lékařská fakulta Univerzity Palackého
LICO	<i>Lichtheimia corymbifera</i>
m/z	hmotnost/náboj
MALDI – TOF	Matrix assisted laser desorption/ionization time of flight
MS	hmotnostní spektrometr

NL	gen
-OH	hydroxy skupina
PC	prodloužená kultivace
PCR	polymerázová řetězová reakce
Primery F&R	primery forward and reverse
RNA	ribonukleová kyselina
rpm	revolutions per minute, počet otáček za minutu
rRNA	ribosomální RNA
SGAA	Sabouraudův agar s 2-4 % glukózy a s příměsí antibiotik
TOF	time of flight
tRNA	transferová RNA
WHO	World Health Organization

8 Literatura

1. Pappas, P. G. *et al.* Invasive Fungal Infections among Organ Transplant Recipients: Results of the Transplant-Associated Infection Surveillance Network (TRANSNET). *Clin. Infect. Dis.* **50**, 1101–1111 (2010).
2. Ciardo, D. E., Schär, G., Altwegg, M., Böttger, E. C. & Bosshard, P. P. Identification of moulds in the diagnostic laboratory—an algorithm implementing molecular and phenotypic methods. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **59**, 49–60 (2007).
3. Ciardo, D. E., Lucke, K., Imhof, A., Bloemberg, G. V & Böttger, E. C. Systematic internal transcribed spacer sequence analysis for identification of clinical mold isolates in diagnostic mycology: a 5-year study. *J. Clin. Microbiol.* **48**, 2809–2813 (2010).
4. Croxatto, A., Prod'hom, G. & Greub, G. Applications of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical diagnostic microbiology. *FEMS Microbiol. Rev.* **36**, 380–407 (2012).
5. Demirev, P. A. & Fenselau, C. Mass Spectrometry for Rapid Characterization of Microorganisms. *Annu. Rev. Anal. Chem.* **1**, 71–93 (2008).
6. Bader, O. MALDI-TOF-MS-based species identification and typing approaches in medical mycology. *Proteomics* **13**, 788–799 (2013).
7. Cassagne, C. *et al.* Mould routine identification in the clinical laboratory by Matrix-Assisted laser desorption ionization Time-Of-Flight mass spectrometry. *PLoS One* **6**, e28425 (2011).
8. Wiederhold, N. P. Antifungal resistance: current trends and future strategies to combat. *Infect. Drug Resist.* **10**, 249–259 (2017).
9. Rai, M., Yadav, A. & Gade, A. Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials. *Biotechnol. Adv.* **27**, 76–83 (2009).
10. Hoog, G. S. de. *Atlas of clinical fungi.* (CBS, 2000).

11. Votava, M. a kol. *Lékařská mikrobiologie speciální*. (Neptun, 2003).
12. Anaissie, E. J., McGinnis, M. R. & Pfaller, M. A. *Clinical Mycology*. (Churchill livingstone, 2003).
13. Brown, G. D. *et al.* Hidden Killers: Human Fungal Infections. *Sci. Transl. Med.* **4**, 165rv13 (2012).
14. Bitar, D. *et al.* Population-Based Analysis of Invasive Fungal Infections, France, 2001–2010. *Emerg. Infect. Dis. J.* **20**, 1163 (2014).
15. Brown, G. D., Denning, D. W. & Levitz, S. M. Tackling Human Fungal Infections. *Science* **336**, 647 (2012).
16. Bitar, A. Superficial mycoses. *Can. Fam. Physician* **19**, 65–68 (1973).
17. Ruzickova Jaresova, L. Povrchove kozni mykozy a pece o pokožku postizenou plisni. *Dermatology Pract.* **10**, 20–23 (2016).
18. Hubka, V. & Mallátová, N. Vlákňité houby z povrchu lidského těla. *Živa* **3**, 107–110 (2012).
19. Kathiravan, M. K. *et al.* The biology and chemistry of antifungal agents: A review. *Bioorg. Med. Chem.* **20**, 5678–5698 (2012).
20. Hamal, P. & Svobodova, L. Mykozy a antimykotika. *Intern. Med. Pract.* **13**, 445–449 (2011).
21. Rozsypal, H. Systemova antimykotika. *Clin. Pharmacol. Pharm.* **22**, 40–44 (2008).
22. Horak, P. Specificka antimykotika a jejich pouziti u vybranych patologickych stavu. *Intern. Med. Pract.* **13**, 171–175 (2011).
23. Birch, M. & Sibley, G. Antifungal Chemistry Review. in *Comprehensive Medicinal Chemistry III* (Elsevier, 2017).
24. Golan, E. D., Armstrong, J. E. & Armstrong, W. A. *Principles of pharmacology: the pathophysiologic basis of drug therapy*. (Wolters Kluwer, 2017).

25. Mallmann, E. J. J. *et al.* Antifungal activity of silver nanoparticles obtained by green synthesis. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo* **57**, 165–167 (2015).
26. Paterson, D. L. *et al.* Outcome of cephalosporin treatment for serious infections due to apparently susceptible organisms producing extended-spectrum beta-lactamases: implications for the clinical microbiology laboratory. *J. Clin. Microbiol.* **39**, 2206–2212 (2001).
27. Klasen, H. J. A historical review of the use of silver in the treatment of burns. II. Renewed interest for silver. *Burns* **26**, 131–138 (2000).
28. Tan, S. Y. & Tatsumura, Y. Alexander Fleming (1881–1955): Discoverer of penicillin. *Singapore Med. J.* **56**, 366–367 (2015).
29. Goffeau, A. The fight against fungi. *Nature* **452**, 541 (2008).
30. Kim, K.-J. *et al.* Antifungal activity and mode of action of silver nano-particles on *Candida albicans*. *BioMetals* **22**, 235–242 (2009).
31. Merisko-Liversidge, E., Liversidge, G. G. & Cooper, E. R. Nanosizing: a formulation approach for poorly-water-soluble compounds. *Eur. J. Pharm. Sci.* **18**, 113–120 (2003).
32. Matsumura, Y., Yoshikata, K., Kunisaki, S. & Tsuchido, T. Mode of Bactericidal Action of Silver Zeolite and Its Comparison with That of Silver Nitrate. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**, 4278–4281 (2003).
33. Gupta, A., Maynes, M. & Silver, S. Effects of halides on plasmid-mediated silver resistance in *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**, 5042–5045 (1998).
34. Feng, Q. *et al.* A Mechanistic Study of the Antibacterial Effect of Silver Ions on *Escherichia Coli* and *Staphylococcus Aureus*. *J. Biomed. Mater. Res.* **52**, 662–668 (2000).
35. Devaux, P. F., Herrmann, A., Ohlwein, N. & Kozlov, M. M. How lipid flippases can modulate membrane structure. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **1778**, 1591–1600 (2008).
36. Bocate, K. P. *et al.* Antifungal activity of silver nanoparticles and simvastatin

- against toxigenic species of *Aspergillus*. *Int. J. Food Microbiol.* **291**, 79–86 (2019).
37. Latgé, J. P. *Aspergillus fumigatus* and aspergillosis. *Clin. Microbiol. Rev.* **12**, 310–350 (1999).
 38. Jackson, S. A. & Dobson, Yeasts and Molds: *Aspergillus flavus*. *Reference Module in Food Science* 785–791 (2011)
 39. Moss, M. O. General characteristics of moulds. in *Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition* 401–414 (Woodhead Publishing, 2006).
 40. Ribes, J. A., Vanover-Sams, C. L. & Baker, D. J. Zygomycetes in human disease. *Clin. Microbiol. Rev.* **13**, 236–301 (2000).
 41. Amin, S., Ryan, R., A. Metlay, L. & J. Watson, W. *Absidia corymbifera* Infections in Neonates. *Clin. Infect. Dis.* **26**, 990–992 (1998).
 42. Nucci, M. & Anaissie, Hyalohyphomycosis. in *Clinical Mycology* 309–327 (Churchill Livingstone, Little Rock, 2009).
 43. Nelson, P. E., Dignani, M. C. & Anaissie, E. J. Taxonomy, biology, and clinical aspects of *Fusarium* species. *Clin. Microbiol. Rev.* **7**, 479–504 (1994).
 44. Lee, W. J. *et al.* Increasing Prevalence of *Trichophyton rubrum* Identified through an Analysis of 115,846 Cases over the Last 37 Years. *J. Korean Med. Sci.* **30**, 639–643 (2015).
 45. Abbas, A. & Dobson, A. D. W. Yeasts and Molds | *Penicillium camemberti*. in *Encyclopedia of Dairy Sciences* 776–779 (Academic Press, 2011).
 46. Skořepová, M. *Dermatologie v obrazech*. (Galén, 2008).
 47. Shamly, V., Kali, A., Srirangaraj, S. & Umadevi, S. Comparison of Microscopic Morphology of Fungi Using Lactophenol Cotton Blue (LPCB), Iodine Glycerol and Congo Red Formaldehyde Staining. *J. Clin. Diagn. Res.* **8**, 1–2 (2014).
 48. Garibyan, L. & Avashia, N. Polymerase Chain Reaction. *J. Invest. Dermatol.* **133**, 1–4 (2013).

49. B. Mullis, K. The Unusual Origin of the Polymerase Chain Reaction. *Sci. Am.* **262**, 56 – 61(1990).
50. Bruns, T., Lee, S. & Taylor, J. White, T. J., T. D. Bruns, S. B. Lee, and J. W. Taylor. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA Genes for phylogenetics. in *PCR - Protocols and Applications - A Laboratory Manual* 315–322 (Academic press, 1990).
51. Gomes, A. & Korf, B. Genetic Testing Techniques. in *Pediatric Cancer Genetics* 47–64 (Elsevier, 2018).
52. Dingle, T. C. & Butler-Wu, S. M. MALDI-TOF Mass Spectrometry for Microorganism Identification. *Clin. Lab. Med.* **33**, 589–609 (2013).
53. Yates III, J. R. Mass spectrometry and the age of the proteome. *J. Mass Spectrom.* **33**, 1–19 (1998).
54. Hillenkamp, F., Karas, M., Beavis, R. C. & Chait, B. T. Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry of Biopolymers. *Anal. Chem.* **63**, 1193-1203 (1991).
55. Jürgen, G. H. *Mass Spectrometry*. (Springer, Heidelberg, 2011).
56. Patel, R. MALDI-TOF MS for the Diagnosis of Infectious Diseases. *Clin. Chem.* **61**, 100 – 111 (2015).
57. Vorm, O., Roepstorff, P. & Mann, M. Improved Resolution and Very High Sensitivity in MALDI TOF of Matrix Surfaces Made by Fast Evaporation. *Anal. Chem.* **66**, 3281–3287 (1994).
58. Fenselau, C. & A. Demirev, P. Characterization of Intact Microorganisms by MALDI Mass Spectrometry. *Mass Spectrom. Rev.* **20**, 157- 171 (2001).
59. Opota, O., Prod'hom, G. & Greub, G. Applications of MALDI-TOF Mass Spectrometry in Clinical Diagnostic Microbiology. in *MALDI-TOF and Tandem MS for Clinical Microbiology* (Wiley, 2017).
60. Williams, T. L., Andrzejewski, D., Lay, J. O. & Musser, S. M. Experimental factors affecting the quality and reproducibility of MALDI TOF mass spectra

- obtained from whole bacteria cells. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **14**, 342–351 (2003).
61. Carbonnelle, E. *et al.* MALDI-TOF mass spectrometry tools for bacterial identification in clinical microbiology laboratory. *Clin. Biochem.* **44**, 104–109 (2011).
 62. MALDI Biotyper 3.0 uživatelský manuál Bruker Daltonics GmbH ©copyright 2014.
 63. Singhal, N., Kumar, M., Kanaujia, P. K. & Viridi, J. S. MALDI-TOF mass spectrometry: an emerging technology for microbial identification and diagnosis. *Front. Microbiol.* **6**, 791 (2015).
 64. DeMarco, M. L. & Ford, B. A. Beyond Identification: Emerging and Future Uses for MALDI-TOF Mass Spectrometry in the Clinical Microbiology Laboratory. *Clin. Lab. Med.* **33**, 611–628 (2013).
 65. Vrioni, G. *et al.* MALDI-TOF mass spectrometry technology for detecting biomarkers of antimicrobial resistance: current achievements and future perspectives. *Ann. Transl. Med.* **6**, 240 (2018).
 66. Ghebremedhin, B., Halstenbach, A., Smiljanic, M., Kaase, M. & Ahmad-Nejad, P. MALDI-TOF MS based carbapenemase detection from culture isolates and from positive blood culture vials. *Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob.* **15**, 5 (2016).
 67. Almeida, F., Rodrigues, M. L. & Coelho, C. The Still Underestimated Problem of Fungal Diseases Worldwide. *Front. Microbiol.* **10**, 214 (2019).
 68. Stop neglecting fungi. *Nat. Microbiol.* **2**, 17120 (2017).
 69. THE BURDEN OF FUNGAL DISEASE: NEW EVIDENCE TO SHOW THE SCALE OF THE PROBLEM ACROSS THE GLOBE. LIFE LEADING INTERNATIONAL FUNGAL EDUCATION. (2017). Available at: <http://www.life-worldwide.org/media-centre/article/the-burden-of-fungal-disease-new-evidence-to-show-the-scale-of-the-problem>.
 70. Garcia-Solache, M. A. & Casadevall, A. Global Warming Will Bring New Fungal Diseases for Mammals. *MBio* **1**, 00061-10 (2010).

71. Rivero-Menendez, O., Alastruey-Izquierdo, A., Mellado, E. & Cuenca-Estrella, M. Triazole Resistance in *Aspergillus* spp.: A Worldwide Problem? *J. fungi* **2**, 21 (2016).
72. Paassen, J., Russcher, A., In 't Veld-Van Wingerden, A. & Kuijper, E. Emerging aspergillosis by azole-resistant *Aspergillus fumigatus* at an intensive care unit in the Netherlands, 2010 to 2013. *Eur. Surveill.* **21**, 30300 (2016).
73. Murray, P. R. What is new in clinical microbiology-microbial identification by MALDI-TOF mass spectrometry: a paper from the 2011 William Beaumont Hospital Symposium on molecular pathology. *J. Mol. Diagn.* **14**, 419–423 (2012).
74. Santos, C., Paterson, R. R. M., Venâncio, A. & Lima, N. Filamentous fungal characterizations by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *J. Appl. Microbiol.* **108**, 375–385 (2010).
75. Becker, P. *et al.* Identification of filamentous fungi isolates by MALDI-TOF mass spectrometry: Clinical evaluation of an extended reference spectra library. *Med. Mycol.* **52**, 826–834 (2014).
76. Theel, E. S., Hall, L., Mandrekar, J. & Wengenack, N. L. Dermatophyte Identification Using Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry. *J. Clin. Microbiol.* **49**, 4067 – 4071 (2011).
77. Glass, N. L. & Donaldson, G. C. Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous ascomycetes. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**, 1323 – 1330 (1995).
78. Khot, P. D., Ko, D. L. & Fredricks, D. N. Sequencing and Analysis of Fungal rRNA Operons for Development of Broad-Range Fungal PCR Assays. *Appl. Environ. Microbiol.* **75**, 1559 – 1565 (2009).