

FARMAKOTERAPIE PRO PRAXI

Vyšlo za laskavé podpory firmy
Schering-Plough Central East AG



Schering-Plough

výhradní sponzor knihy

FARMAKOTERAPIE PRO PRAXI / Sv. 16

MUDr. Anna Jedličková

SYSTÉMOVÉ MYKÓZY

Průvodce ošetřujícího lékaře

**JESSENIUS
MAXDORF**

Autor:

MUDr. Anna Jedličková, ÚKBLD, Klinická mikrobiologie a antibiotické centrum VFN – 1. LF UK Praha

Rukopis recenzoval:

MUDr. Petra Olišarová

DŮLEŽITÉ UPOZORNĚNÍ

Autor i nakladatel vynaložili velkou péči a úsilí, aby všechny informace v knize obsažené týkající se dávkování léků a forem jejich aplikace odpovídaly stavu vědy v okamžiku vydání. Nakladatel však za údaje o použití léků, zejména o jejich indikacích, kontraindikacích, dávkování a aplikačních formách, nenese žádnou odpovědnost, a vylučuje proto jakékoli přímé či nepřímé nároky na úhradu event. škod, které by v souvislosti s aplikací uvedených léků vznikly. Každý uživatel je povinen důsledně se řídit informacemi výrobce léčiv, zejména informací přiloženou ke každému balení léku, který chce aplikovat.

Názvy farmaceutických přípravků, výrobců, resp. obchodních zastoupení jsou uváděny podle Pharmindex breviře 2005, 14. vydání, a MediStránek 2005, 7. vydání. Ochranné obchodní známky (chráněné názvy) léků ani dalších výrobků nejsou v knize zvlášť zdůrazňovány. Z absence označení ochranné známky proto nelze vyvozovat, že v konkrétním případě jde o název nechráněný.

Toto dílo, včetně všech svých částí, je zákonem chráněno. Každé jeho užití mimo úzké hranice zákona je nepřipustné a je trestné. To se týká zejména reprodukování či rozšiřování jakýmkoli způsobem (včetně mechanického, fotografického či elektronického), ale také ukládání v elektronické formě pro účely rešeršní i jiné. K jakémukoli využití díla je proto nutný *písemný souhlas* nakladatele, který také stanoví přesné podmínky využití díla. Písemný souhlas je nutný i pro případy, ve kterých může být udělen bezplatně.

Anna Jedličková: SYSTÉMOVÉ MYKÓZY

© Anna Jedličková, 2006

© Maxdorf, 2006

Cover design © Maxdorf, 2006

Vydal MAXDORF s.r.o., nakladatelství odborné literatury, Na Šejdru 247,
142 00 Praha 4, e-mail: redakce@maxdorf.cz, internet: www.maxdorf.cz

JESSENIUS® je chráněná značka [No.267113] označující publikace určené odborné zdravotnické veřejnosti

Edice Farmakoterapie pro praxi, svazek 16

Editor: MUDr. Jan Hugo

Vedoucí redakce: Markéta Fidlerová

Redakční zpracování: Ing. Jana Očenášková

Grafická úprava: MAXDORF PUBLISHING

Sazba: Mgr. Martina Bubáková

Tisk: TAVA Graphical s.r.o.

Printed in the Czech Republic

ISBN 80-7345-000-X

*Věnuji svému manželovi
Robertovi jako projev uznání a díky
za jeho podporu a velkorysý přístup*

PŘEDMLUVA EDITORA

Systémové mykózy patří k závažným a terapeuticky obtížným infekcím. Do začátku 50. let minulého století medicína neznala účinnou terapii systémových a invazivních mykóz. Jako první ze systémově použitelných antimykotik byl sice již v roce 1939 objeven griseofulvin – antibiotikum produkované myceliem plísňe *Penicillium griseofulvum* – zpočátku však byl užíván jen jako fungicid v zemědělství, takže do humánní medicíny se dostal až koncem 50. let. Slávu objevu prvního antimykotika tak mohly sklidit dvě ženy, Elizabeth Hazen a Rachel Fuller Brown, které v roce 1949 objevily nystatin, produkt bakterie *Streptomyces noursei*. Objev tohoto polyenového antimykotika odstartoval boom hledání dalších podobných látek, z nichž se po boku nystatinu brzy objevil produkt bakterie *Streptomyces natalensis* pimarinin (natamycin). Obě látky se v průběhu 50. let začaly široce užívat v léčbě kožních, vaginálních a střevních mykóz. O několik let později se pak objevil amfotericin B jako první antimykotikum použitelné u invazivních mykóz.

Druhé období rychlého rozvoje farmakoterapie mykóz začíná v roce 1970 objevem imidazolového antimykotika mikonazolu. K němu se v roce 1978 přidal ketokonazol a od 90. let řada dalších látek, včetně velmi úspěšného posakonazolu (2000) či vorikonazolu (2002). V posledních letech se do terapeutické praxe dostávají také nové skupiny jako echokandiny, nikkomyciny a další.

Účinné přípravky však představují pouze první polovinu úspěšné léčby. Tou druhou je správná volba a aplikace léčby u konkrétního pacienta. Nelehké úlohy napsání příručky pro praktickou farmakoterapii systémových mykóz se ujala MUDr. Anna Jedličková, dlouholetá vedoucí antibiotického centra VFN v Praze a autorka velmi úspěšného antibiotického vademeka *Antimikrobiální terapie* (2. vyd., Maxdorf 2004). Rozsáhlá zkušenost primářky Jedličkové, spolu s jejím dobře známým individuálním přístupem ke konkrétnímu pacientovi dává záruku, že čtenář dostává do rukou knížku výborně použitelnou v každodenní praxi.

OBSAH

Předmluva editora	7
1 Úvod	11
2 Původci mykotických onemocnění	12
2.1 Dermatomykózy	12
2.2 Systémové mykózy	14
3 Laboratorní diagnostika mykóz	18
3.1 Klinický materiál odebíraný k mykologickému vyšetření	18
3.2 Laboratorní mykologická vyšetření	19
3.3 Stanovení citlivosti mikromycet k antimykotikům	24
3.4 Sérologická diagnostika klinicky významných invazivních mykotických infekcí	27
3.5 Molekulárně genetické metody	33
3.6 Hodnocení vyšetřovacích metod ke stanovení přítomnosti kvasinek a plísni	34
4 Antimykotika	36
4.1 Ketokonazol (KET)	42
4.2 Flukonazol (FLU)	46
4.3 Itrakonazol (ITR)	52
4.4 Posakonazol (POS)	59
4.5 Vorikonazol (VOR)	65
4.6 Caspofungin (CFG; CAS)	70
4.7 Amfotericin B (AMB)	74
5 Terapie invazivních mykóz	114
5.1 Doporučená léčba invazivních mykóz	115
6 Chyby a omyly	120
Doporučená literatura	122
Přehled použitých zkratk	123
O autorce	124
Rejstřík	125

1 ÚVOD

Na celém světě dochází k nárůstu rezistence mikroorganismů k antimikrobiálním látkám v komunitě i v nemocnicích. Globálnímu problému bakteriální rezistence se oprávněně věnují vedle mikrobiologů i další odborníci. Mikrobiologové varují před stále stoupající bakteriální rezistencí, kterou monitorují, a snaží se vytvořit doporučení k terapii antibiotiky, aby došlo ke snížení jejího vývoje.

Součástí lékařské mikrobiologie je mykologie. Ve velkých nemocnicích jsou mykologické laboratoře zabývající se diagnostikou mikromycet. Význam mykologických laboratoří roste s narůstajícím počtem pacientů s predisponujícími faktory pro uplatnění původců invazivní kandidózy a aspergilózy. Pozornost je nutné věnovat nárůstu výskytu invazivní kandidózy a aspergilózy u hematologických pacientů, pacientů po transplantaci kostní dřeně nebo transplantaci orgánů, dále u kriticky nemocných na jednotkách intenzivní péče. Pacienti jsou pravidelně monitorováni, což umožňuje získat údaje nezbytné pro včasné zahájení antimykotické terapie a rovněž napomáhá ke sledování účinnosti terapie.

Nutnou podmínkou je však úzká spolupráce klinických pracovníků s mykology a s ATB středisky.

2 PŮVODCI MYKOTICKÝCH ONEMOCNĚNÍ

2.1 DERMATOMYKÓZY

V posledních letech stoupá počet onemocnění způsobených kvasinkami a plísněmi.

Primární onemocnění způsobují dermatofyta a *Cryptococcus neoformans*. Ostatní kvasinky a plísně jsou **původci sekundárních infekcí** u pacientů s predispozičními faktory.

Pro úplnost stručné popsání **původců dermatomykóz:**

- **Dermatofyta** jsou patogenní mikroskopické keratofilní houby a jsou nejčastějšími primárními vyvolavateli infekčního onemocnění kůže a kožních adnex (vlasy, vousy, chlupy a nehty). Dermatofyta můžeme dělit z epidemiologického hlediska podle primárního hostitele do skupin:
 - **antropofilní**, kde primárním hostitelem je člověk – *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton interdigitale*, *Epidermophyton floccosum*,
 - **zoofilní**, kde je primárním hostitelem zvíře, které může infikovat člověka – *Microsporum canis*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Trichophyton verrucosum*,
 - **geofilní** kontaminující půdu a příležitostně mohou být patogenní pro člověka i zvířata – *Trichophyton terrestre*, *Microsporum gypseum*.
- **Kvasinkovité organismy** – postihují nejčastěji sliznice. Projevují se jako orální kandidóza, vulvovaginální kandidóza, kandidová balanitida, chronická mukokutánní kandidóza. Na kůži působí anguli infectiosi, kandidové intertrigo, kandidové paronychium, mohou postihovat nehty (kandidová onychomykóza). Nejdůležitější vyvolavatele představují *Candida albicans*, *C. krusei*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis* a *C. tropicalis*, ale

i další lipoidní kvasinkovité houby z rodu *Malassezia*, které způsobují onemocnění pityriasis versicolor.

- **Oportunní mikromycety** – vyvolávají infekce u imunitně oslabených jedinců. Jde o rod *Aspergillus*, u onychomýkóz agens *Scopulariopsis brevicaulis*.

Podle stavu kůže se na její infekci podílejí různí vyvolavatelé. U **primárně neporušené kůže** se uplatňují jako agens dermatofyta (rody *Trichophyton*, *Epidermophyton*, *Microsporum*) a lipofilní kvasinky rodu *Malassezia*. Působí poškození povrchových vrstev kůže.

U **kůže primárně porušené mikrotraumaty a traumaty** se vedle původců kvasinkových uplatňují vláknité mikromycety saprofytních rodů (*Aspergillus*, *Fusarium*, *Absidia*, *Mucor*). Vláknité termofilní mikromycety mohou pronikat do hlubších tkání kůže.

U **dermatomýkóz** je nutné zvážit **klinické příznaky, anamnestické údaje a výsledky laboratorního vyšetření**.

Pro **laboratorní vyšetření** je nutný kvalitní odběr biologického materiálu, provedený sterilně a do sterilních nádobek. Před odběrem je nutno očistit odběrové místo čistým 70% ethylalkoholem.

V laboratoři provádíme **vyšetření mikroskopické** – před mikroskopií je nutné rozvolnění keratinových struktur v 20% roztoku KOH (nativní preparát). Preparát může být barven (Parkerův inkoust). K fluorescenčnímu vyšetření se používá hydroxid, ke kterému lze přidat některý z fluorochromů.

Kultivace se provádí na speciálních kultivačních médiích, nejčastěji se používá 2% Sabouraudův glukózový agar a jeho další modifikace – přidáváme ATB (chloramfenikol nebo PEN + STM). K potlačení růstu bakterií a saprofytických hub se používá přídavek cykloheximidu (Aktidion) k půdě. Ke zvýšení záchytnosti očkujeme biologický materiál vždy do dvou až tří zkumavek nebo na dvě až tři Petriho misky.

Inkubační teplota pro dermatofyta se doporučuje v rozmezí 25–27 °C, doba růstu u rychle rostoucích dermatofyt a saprofytních vláknitých mikromycet je 6–10 dnů. U pomalu rostoucích dermatofyt je doba růstu 2–5 týdnů. Kvasinkovité houby kultivujeme jak při teplotě 37 °C, tak i při teplotě v rozmezí 25–27 °C, kultivace trvá 4–6 dnů.

Narostlé kultury se identifikují morfologicky, ověřují se mikroskopicky a provádí se další identifikace.

2.2 SYSTÉMOVÉ MYKÓZY

Vznik a rozvoj onemocnění kvasinkami a plísněmi předpokládá určitou predispozici u hostitele. Kvasinky a plísně se uplatňují jako původci sekundárních infekcí u pacientů s rizikovými faktory. Vznik a rozvoj onemocnění kvasinkami a plísněmi je podmíněn změnou vztahu mezi mikroorganismy a makroorganismem a jeho obranyschopností. Sekundární mykózy ohrožují tyto pacienty na životě, komplikují i léčebné postupy, vyskytují se jako nozokomiální infekce (*Candida spp.*).

Podle **způsobu nákazy** dělíme mykotické infekce na infekce exogenní a endogenní.

Infekce exogenní – získané z vnějšího prostředí. Zdrojem je vzduch nemocničních pokojů, kůže a sliznice nemocných, předměty i potrava, ve kterých se vyskytují kvasinkovité mikroorganismy. K nákaze dojde inhalací, infekcí ran nebo popálenin. Výjimečně mohou infekce vznikat i zavlečením do organismu zdravotnickým zásahem.

Infekce endogenní – vznikají aktivací latentní infekce nebo přemnožením komensální saprofytické flóry u oslabeného jedince. Mikroorganismy se dostávají do krevního oběhu většinou přes střevní stěnu, mohou napadnout kterýkoli orgán a může dojít k diseminaci.

Při vzniku oportunní infekce má zásadní význam selhání obrany hostitele.

Obranné mechanismy:

- **Vnější** – nepoškozená kůže a sliznice mají významné postavení, dále se uplatňují sekrety na sliznicích, fyziologická flóra, neporušené osídlení.
- **Vnitřní** – klíčové postavení v obraně proti plísním mají fagocyty, jící buňky, granulocyty a monocyty. Samotné neutrofily a monocyty zabrání *in vitro* růstu hyf. Důležitá je úloha T lymfocytů v odpovědi na aspergilové infekce prostřednictvím produkce cytokinů. V obraně proti infekci se uplatňují Th1 lymfocyty charakterizované produkcí interleukinu 12 (IL-12), interferon γ a Th2 lymfocyty charakterizované produkcí IL-4 a IL-10. Pokud tato imunitní odpověď chybí, projevuje se neschopností eliminovat infekci.

Mezi nejčastější invazivní infekce patří invazivní kandidóza a invazivní aspergilóza.

Tabulka 2.1 Riziková pacienta a rizikové faktory

Riziková pacienta	Rizikové faktory
- pacienti s hematologickým onemocněním (ak. leukémie) - pacienti s transplantací kostní dřeně (allogenní, ale i autologní) - pacienti s transplantací srdce, jater a plic - věk – stavy přirozené vnímavosti dětství, stáří, těhotenství (novorozenci s nízkou porodní hmotností, neonatologičtí pacienti) - pacienti s diabetes mellitus s ketoacidózou - pacienti s autoimunitním onemocněním - pacienti s nefrologickým syndromem - pacienti s dlouhodobým chronickým oslabujícím onemocněním - stavy s nedostatkem železa nebo zinku - pacienti s HIV/AIDS a další stavy s defekty T lymfocytů - pacienti s popáleninami, s otevřenými ranami, s polytraumaty - pacienti po rozsáhlých a opakovaných operacích, hlavně břišních (peritonitida, pankreatitida) - pacienti s plicní fibrózou (s poklesem difúzní kapacity pod 40 % normálních hodnot) - pacienti s cystickou fibrózou - pacienti se závažným vrozeným nebo získaným imunodeficiencím - pacienti s invazivní mykózou v anamnéze - skóre APACHE II	- dlouhodobá léčba antibiotiky (doba a intenzita léčby ATB) – dochází ke změnám místní fyziologické bakteriální flóry - dlouhodobé podávání imunosupresiv - neutropenie - léčba kortikosteroidy - chemoterapie - radioterapie - dlouhodobá parenterální výživa (hyperalimentace) - změny na epitelu – vlhkost, okluze, trauma - poškození anatomických bariér, které umožňují vstup infekce u pacientů podrobených diagnostickým a léčebným zákrokům (centrální, žilní katétr, močový katétr) - mukozitida - reakce štetu proti hostiteli (graft versus host disease, GVHD) - cytomegalovirová infekce - hemodialýza, peritoneální dialýza a další eliminační metody - předchozí kolonizace kandidami - kolonizace, izolace kandid z více než dvou nesusledících míst - kolonizační index > 0,5 (počet míst s pozitivním nálezem/celkový počet vyšetřených míst) - kontaminace prostředí (stavební práce, rekonstrukční práce, kontaminovaná klimatizace)

2.2.1 Kandidóza

Téměř vždy jde o endogenní infekci. Kandidy patří mezi dimorfní houby, záleží na tom, v jaké se vyskytují formě. **Forma kvasinkovitá** (blastospory) se považuje většinou za saprofytickou a **forma vláknitá** (hyfy) za patogenní. Neutrofily ničí snáze formu kvasinkovitou, jsou schopny se přichytit i na hyfy a zničit je. Nedojde-li k úpravě neutropenie, je prognóza i při intenzivní léčbě antimykotiky nepříznivá. Kandidy kolonizují kůži, sliznici, a to včetně gastrointestinální sliznice, i u zdravých lidí. Za určitých podmínek pronikají střevní stěnou a mohou napadnout kterýkoli orgán. V naší mykologické laboratoři z biologického materiálu je nejčastěji zachycen asi v 50 % *Candida albicans*, pak následuje záchyt *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. tropicalis*, *C. kefyr*, *C. parapsilosis*, *C. lusitaniae*, *C. guilliermondii*, stoupá výskyt *Saccharomyces cerevisiae*.

Podle klinického projevu můžeme kandidózy rozdělit na:

- **Lokální infekce** – se slizničními a kožními projevy. Slizniční formy jsou nejčastěji projevem kandidové infekce. Jsou závažné, protože se mohou stát zdrojem kandidemie a diseminované kandidózy. Mezi lokální projevy patří i kandidová vulvovaginitida, která je velmi častá.
- **Orgánová a diseminovaná kandidóza** – nejčastější je orgánové postižení plic, jater, sleziny, ledvin a močových cest, oka, CNS. Je to forma charakterizovaná invazí vláknitých elementů do tkání. Do této skupiny patří i kandidemie charakterizovaná invazí vláknitých elementů do krevního řečiště.

2.2.2 Kryptokokóza

Nejčastější je infekce způsobená druhem *Cryptococcus neoformans*, vzácněji *Cryptococcus albidus*. Jde o exogenní infekci, zdrojem v přírodě je často holubí trus, ve kterém mohou blastospory přežívat dlouhou dobu. K nákaze dochází inhalací, proto je nejčastější formou plicní onemocnění, které může zůstat lokalizováno v plicích nebo se rozšířit na jiné orgány. Buňky kryptokoků jsou obaleny polysacharidovým pouzdrém, které je chrání před fagocytózou, takže onemocnění postihuje hlavně nemocné s defektem T lymfocytů. S tím souvisí v dnešní době se zvyšující výskyt tohoto onemocnění hlavně u pacientů s AIDS. V biologickém materiálu odebraném od hematologických pacientů jsme se setkali s nálezem *C. neoformans* jen výjimečně.

2.2.3 Aspergilóza

Zdroj infekce je vždy exogenní. Jde o saprofytické plísňe, které se nacházejí všude v prostředí obývaném člověkem. Se sporami *aspergillů* se setkáváme ve vzduchu, v půdě, na potravinách, na rostlinách. Spory mají rozměr 3–5 μm , k nákaze tedy dojde snadno inhalací spor do dýchacích cest a paranazálních dutin. Přenos přímým kontaktem lékařskými nástroji je vzácný. Nejčastější je plicní forma aspergilózy (bronchoinvasivní aspergilóza, alergická plicní aspergilóza, plicní aspergilom – mycetom). Jen v 20–30 % jsou postiženy jiné systémy – paranazální dutiny, mozek, GIT, játra, ledviny – většinou se současně vyskytuje infekce v plicích. Nejčastěji izolované jsou *Aspergillus fumigatus*, *A. niger*, *A. flavus*, *A. terreus*, *A. nidulans*.

2.2.4 Mukormykóza

Mukormykóza je akutní a většinou fatální oportunní mykóza. Původci jsou houby z řádu *Mucorales*. Jejich hyfy vnikají do stěn a lumen krevních cév, kde vytvářejí shluky smíšené s fibrinem, tím dochází ke vzniku trombózy a infarktaci okolních tkání. Onemocnění u člověka vyvolávají rody *Mucor*, *Absidia*, *Mycoclados*, *Rhizomucor* a *Rhizopus*.

Zástupci tohoto řádu jsou značně rozšířeni v přírodě, hlavně v půdě a na tlejících rostlinách, mohou se vyskytovat i v klimaticizaci. K infekci dochází inhalací spor, které se mohou uchytit na nosní sliznici a pak dále klíčí. Jindy se dostávají vdechnutím do dolních partií respiračního traktu. Méně často dochází k infekci vniknutím spor do poraněné kůže, např. při úrazech a popáleninách. Nejčastěji se setkáváme s těmito infekcemi u nemocných s hematologickými chorobami, po transplantaci kostní dřeně a po transplantaci orgánů. V naší laboratoři jsme se setkali se všemi výše uvedenými druhy, ale naštěstí velmi vzácně.

3 LABORATORNÍ DIAGNOSTIKA MYKÓZ

Ve fakultních nemocnicích jsou mykologické laboratoře hlavně tam, kde jsou interní kliniky s hematologickým zaměřením a kde se provádějí transplantace kostní dřeně a transplantace orgánů. Tyto mykologické laboratoře se zabývají laboratorní diagnostikou systémových mykóz, monitorují rizikové pacienty s rizikovými faktory pro vznik systémové mykózy, zjišťují původce onemocnění a jejich citlivost k antimykotikům (ATM).

3.1 KLINICKÝ MATERIÁL ODEBÍRANÝ K MYKOLOGICKÉMU VYŠETŘENÍ

3.1.1 Charakteristika odebíraného biologického materiálu

- materiál z horních cest dýchacích (výtěry z nosu, krku, uší, výplach z dutiny ústní, punktáty a výplachy z vedlejších nosních dutin)
- materiál z dolních cest dýchacích (sputum, bronchoalveolární laváž [BAL], aspirát z bronchů)
- urogynekologický materiál (moč, dialyzát, výtěr z uretry, pochvy, hrdla děložního, prostatický sekret)
- obsah žaludku, stolice
- punktáty, exsudáty, hnis, aspirát z abscesu
- stěry z oka (odběr z rohovky, odběr vitreální tekutiny)
- stěry z kůže, stěry ze sliznice, z ran
- peroperační materiál
- likvor
- hemokultura

3.1.2 Odběr biologického materiálu

Odběry musí být provedeny z validních míst. Na odběru provedeném podle všech pravidel záleží i výsledek mykologického vyšetření.

Biologický materiál musí být odebírán sterilně do sterilních nádobek (tekutý materiál), sterilními tampony nebo do transportních půd. Je třeba si uvědomit, že z materiálu odebraného do transportních půd nelze provést mikroskopii.

Někdy je nutný odběr přímo na tuhé půdy. Hemokultury jsou odebírány do hemokultivačních odběrových nádobek určených pro kultivaci do poloautomatických inkubačních systémů Bactec nebo BacT/AlerT. Do těchto odběrových nádobek lze odebrat a v nich kultivovat likvor nebo další tekutý materiál. Odběrové nádobky pro mykologickou kultivaci obsahují definované kultivační médium. Poloautomatické systémy (Bactec, BacT/AlerT) umožňují urychlení doby kultivace.

Pravidla odběrů jsou obdobná jako pro bakteriologické vyšetření, pro odběr přímo na půdy je nutné použití půd pro kultivaci kvasinkovitých a plísňových organismů. Půdy jsou k dispozici v mykologické laboratoři. Při transportu všech odebraných materiálů k mykologickému vyšetření je třeba dodržet pokojovou teplotu (v rozmezí 22–25 °C) (tab. 3.1).

3.2 LABORATORNÍ MYKOLOGICKÁ VYŠETŘENÍ

K základním mykologickým vyšetřením patří **mikroskopie a kultivace**.

3.2.1 Mikroskopické vyšetření

Materiál je nejprve vyšetřen **mikroskopicky**. Prohlížíme **nativní preparáty** nebo preparáty barvené. **Barvený preparát** nám pomůže zhodnotit validitu odebraného vzorku, přítomnost zánětu a přítomnost bakteriální i mykotické flóry. Preparáty jsou barveny různými metodami – podle Grama, Grama-Weigerta, Giemsky, barvení tuší, Schiffovou metodou (PAS), preparát připravený s laktofenolem. Pro mikroskopii dermatofyt se používá technika s 20% KOH samotným, nebo s přidavkem Parkerova inkoustu nebo methylenové modře. Je možné použít i stříbření, metody podle Grocotta a Gomoriho. Používáme i fluorescenční mikroskopické metody.

Tabulka 3.1/a Odběr klinického materiálu k mykologickému vyšetření (transport, množství odebraného materiálu, doba a teplota transportu)

Klinický materiál k odběru	Transport a množství odebraného materiálu	Doba a teplota transportu
Krev (hemokultura, HK), nutná správná dezinfekce kůže v místě vpichu odběru	Odběr do speciálních odběrových nádobek pro kultivaci kvasinkovitých a plísňových organismů; poloautomatický systém BACTEC, BacT/AlerT Množství: – dospělí 8–10 ml – děti 1–3 ml	Do 2 hodin při pokojové teplotě
Likvor, nutná správná dezinfekce kůže v místě vpichu odběru	Cerebrospinální tekutina, likvor ≥ 2 ml	Do 15 minut při pokojové teplotě nebo při 30 °C
Ucho (externí)	Odebrat rotujícím stěrem	Do 2 hodin při pokojové teplotě
Oko	- Odběr z rohovky –seškrab nebo otisk přímo na živnou tuhou půdu a na podložní sklíčko - Vitreální tekutina – odběr jehlou a přímo na živnou tuhou půdu a na podložní sklíčko	Do 15 minut, transport při pokojové teplotě
Z dolních cest dýchacích (BAL, výplachy, aspiráty)	Do sterilní nádoby množství > 1 ml	Do 2 hodin při pokojové teplotě
Sputum	Odběr do sterilního kontejneru 3–5 ml	Do 2 hodin při pokojové teplotě
Horní cesty dýchací, výplach dutiny ústní	- Stěr ze sliznice - Výplach z dutiny do sterilního kontejneru	Do 2 hodin při pokojové teplotě

Tabulka 3.1/b Odběr klinického materiálu k mykologickému vyšetření (transport, množství odebraného materiálu, doba a teplota transportu)
– pokračování

Klinický materiál k odběru	Transport a množství odebraného materiálu	Doba a teplota transportu
Vedlejší nosní dutiny	Většinou odběr peroperační, přímo inokulum na tuhou živnou půdu a podložní sklíčko	Do 15 minut při pokojové teplotě
Sterilní tekutiny (perikardiální, peritoneální, pleurální, synoviální)	Do sterilních nádobek o obsahu 10 ml, materiál se centrifuguje, inokulace sedimentu	Do 15 minut při pokojové teplotě
	Možný odběr do spec. nádobek pro kultivaci HK pro poloautomatické zpracování BACTEC nebo BacT/AlerT	Do 15 minut při pokojové teplotě
Hnis, exudát, aspirát z abscesu, biopsie	Do sterilních nádobek ≥ 1 ml nebo přímá inokulace na spec. tuhé půdy	Do 2 hodin při pokojové teplotě
Peroperační chirurgický materiál	• Do sterilního kontejneru • Při malém množství naočkovat inokulum na speciální živnou tuhou půdu • Stěr v transportním systému	• Do 15 minut při pokojové teplotě • Do 2 hodin při pokojové teplotě
Moč	Odběr do sterilního kontejneru, množství více než 1 ml, ranní moč, střední proud	Do 2 hodin při pokojové teplotě
Pochva	Výtěr (označit k mykologické kultivaci)	Do 2 hodin při pokojové teplotě
Prostatický sekret	Po masáži prostaty do sterilního kontejneru nebo inokulace přímo na tuhou půdu	Do 15 minut při pokojové teplotě

Pozn.: Tuhé půdy pro přímou inokulaci je nutné nechat vytemperovat na pokojovou teplotu po vyjmutí z chladničky. Nikdy neočkovat na Petriho misky čerstvě vyjmuté z chladničky.

Mikroskopie zobrazuje velikost a tvar buněk, způsob větvení mycelia, tvar vláken, přítomnost sept, tvorbu trvalých buněk. Nález charakteristických morfologických útvarů může vést k jednoznačné diagnóze: například přítomnost blastospor a fragmentů pseudomycelia svědčí pro kandidovou etiologii. Pro aspergily jsou typická septovaná vlákna s charakteristickým větvením do tvaru písmene V. Pro zygomycety jsou charakteristická neseptovaná široká mycelia odstupující pod úhlem 45 stupňů.

Mikroskopie vzorku zjistí rychle negativitu preparátu, bakteriální příměs, pozitivní nález kvasinkovitých nebo plísňových organismů. Mikroskopicky lze určit kvantitu organismu, ojedinělý či masivní nález, lze provést také přesnější určení kvantity. Výsledek mikroskopického vyšetření je v den přijetí vzorku.

Mikroskopie se provádí přímo z biologického materiálu. Využíváme ji také k určení kultivací narostlé izolované kultury.

3.2.2 Kultivační vyšetření

Při přijetí vzorku se současně s mikroskopií začne s **kultivačním vyšetřením** na tekutých i pevných médiích vhodných ke kultivaci kvasinkovitých a plísňových organismů.

Nejčastěji se používají růstové půdy, 2% (4%) Sabouraudův glukózový agar nebo jeho modifikace s přidáním thiaminu, chloramfenikolu s gentamicinem nebo se směsí penicilinu a streptomycinu, agar s mozkosrdcovým výluhem (BHI) bez antibiotik nebo s přidavkem antibiotik (chloramfenikol, gentamicin), agar s maltózou, CHROM Agar Candida (chloramfenikol a „chromogenický mix“), CandiSelect 4 (přímá identifikace některých druhů kandy), rýžový agar, Czapek-Dox agar, který je vhodnou půdou pro vláknité plísně. Kultivace probíhá jak při teplotě 37 °C, tak i při teplotě 25–27 °C.

Doba kultivace:

- zjištění přítomnosti kvasinek je do 48 hodin, s identifikací do 4–6 dnů
- negativní výsledek nebo přítomnost bakteriálního osídlení do 4–5 dnů
- rychle rostoucí dermatofyta a saprofytní vláknité mikromycety, výsledek za 6–12 dní
- pomalu rostoucí dermatofyta je třeba kultivovat 2–3 týdny i déle
- zjištění přítomnosti vláknitých hub, růst do 2 i více dnů (záleží na druhu).