



## Středoškolská technika 2024

Setkání a prezentace prací středoškolských studentů na ČVUT

### Mikroskopické vláknité houby se zaměřením na diagnostiku rodu *Aspergillus*

Eliška Čermáková

Střední zdravotnická škola a Vyšší odborná škola zdravotnická Havlíčkův Brod  
Masarykova 2033, Havlíčkův Brod

#### **Anotace**

Ve své práci SOČ jsem se zabývala vláknitými mikroskopickými houbami (plísněmi). Teoretická část se zaměřuje na rody a druhy plísní, rozebírá podmínky pro život plísní a jejich rozmnožování. Zmiňuji také lokace plísní na lidském organismu, potíže způsobené plísněmi ale také využití. V praktické části se zabývám převážně rodem *Aspergillus*, laboratorními postupy, metodami a kazuistikou.

# **STŘEDOŠKOLSKÁ ODBORNÁ ČINNOST**

**Obor č. 4: Biologie, geografie a geologie**

## **Mikroskopické vláknité houby se zaměřením na diagnostiku rodu *Aspergillus***

**Eliška Čermáková  
Kraj Vysočina**

**Havlíčkův Brod 2024**

# STŘEDOŠKOLSKÁ ODBORNÁ ČINNOST

Obor č. 4: Biologie, geografie a geologie

**Mikroskopické vláknité houby se zaměřením na  
diagnostiku rodu *Aspergillus***

**Microscopic filamentous fungi with a focus on the  
diagnosis of the genus *Aspergillus***

**Autor:** Eliška Čermáková

**Škola:** Střední zdravotnická škola a Vyšší odborná škola  
zdravotnická, Masarykova 2033, 580 02 Havlíčkův Brod

**Kraj:** Kraj Vysočina

**Konzultant:** Mgr. Antonín Melichar

Havlíčkův Brod 2024

## **Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem svou práci SOČ vypracovala samostatně a použila jsem pouze prameny a literaturu uvedené v seznamu bibliografických záznamů.

Prohlašuji, že tištěná verze a elektronická verze soutěžní práce SOČ jsou shodné.

Nemám závažný důvod proti zpřístupnění této práce v souladu se zákonem č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších předpisů.

V Havlíčkově Brodě dne 19. 2. 2024.....Eliška Čermáková

## **Poděkování**

Touto cestou bych chtěla poděkovat vedoucímu mé práce panu Mgr. Antonínu Melicharovi, za umožnění práce v laboratoři, poskytnutí materiálů, odborný dohled a cenné informace, trpělivost a strávený čas při konzultacích nad prací. Dále nesmím zapomenout poděkovat paní učitelce Mgr. Janě Krupičkové za češtinářskou korekci práce.

## Anotace

Ve své práci SOČ jsem se zabývala vláknitými mikroskopickými houbami (plísněmi). Teoretická část se zaměřuje na rody a druhy plísní, rozebírá podmínky pro život plísní a jejich rozmnožování. Zmiňuji také lokace plísní na lidském organismu, potíže způsobené plísněmi ale také využití. V praktické části se zabývám převážně rodem *Aspergillus*, laboratorními postupy, metodami a kazuistikou.

Cíle práce:

- při sepsání literární rešerše na téma plísně (teorie) se seznámit s morfologií, fyziologií a taxonomií plísní
- seznámit se s provozem mikrobiologické laboratoře, konkrétně s prací na úseku klinické mykologie
- naučit se a vyzkoušet si praktické metody v mykologické laboratoři – mikroskopie, kultivace, mikrokultura a identifikace vláknitých hub
- naučit se metodiku identifikace rodu *Aspergillus*
- zmapovat výskyt plísní rodu *Aspergillus* v Nemocnici Havlíčkův Brod v letech 2018 – 2023
- na příkladu kazuistiky se seznámit s léčbou plísní u reálného pacienta

## Klíčová slova

plísně; *Aspergillus*; Nemocnice Havlíčkův Brod; laboratoř; laboratorní metody; mykologie

## Annotation

In my SOČ paper, I deal with filamentous microscopic fungi (molds). The theoretical part focuses on genera and species of fungi, and discusses the conditions for the life of fungi and their reproduction. I also mention the locations of fungi on the human body, the problems caused by fungi, but also the uses of them. In the practical part, I mainly deal with the genus *Aspergillus*, laboratory procedures, methods and case studies.

Work objectives:

- to become familiar with the morphology, physiology and taxonomy of fungi when writing a literature review on the topic of fungi (theory)
- to become familiar with the operation of the microbiology laboratory, specifically with the work in the clinical mycology section
- learn and try practical methods in the mycology laboratory - microscopy, cultivation, microculture and identification of filamentous fungi
- to learn the methodology for the identification of the genus *Aspergillus*
- map the occurrence of fungi of the *Aspergillus* genus in Havlíčkův Brod Hospital in 2018 - 2023
- using the example of a case study, learn about the treatment of fungus of a real patient

## Keywords

molds; *Aspergillus*; Havlíčkův Brod Hospital; laboratory; laboratory methods; mycology

# Obsah

1	Úvod.....	8
2	Teoretická část .....	9
2.1	Plísně .....	9
2.1.1	Mykotoxiny neboli houbové jedy .....	9
2.1.2	Těkavé organické látky .....	9
2.2	Typy plísní .....	10
2.2.1	Rod <i>Alternaria</i> .....	10
2.2.2	Rod <i>Aspergillus</i> .....	10
2.2.3	Rod <i>Cladosporium</i> .....	13
2.2.4	Rod <i>Penicillium</i> .....	14
2.3	Stavba buňky plísní .....	15
2.4	Výživa plísní.....	15
2.4.1	Způsob výživy .....	15
2.5	Podmínky pro život .....	16
2.5.1	Vlhkost .....	16
2.5.2	Teplota .....	16
2.5.3	pH .....	16
2.6	Rozmnožování .....	16
2.6.1	Pohlavní rozmnožování .....	17
2.6.2	Nepohlavní rozmnožování.....	18
2.7	Výskyt.....	19
2.8	Přenos .....	19
2.9	Lokace plísní na lidském organismu .....	20
2.10	Potíže způsobené plísněmi .....	20
2.10.1	Mykózy .....	21
2.10.2	Plísně a chronická onemocnění .....	21
2.11	Druhy vzorků pro mykologické vyšetření .....	21
2.12	Prokázání plísní v lidském organismu.....	21
2.13	Využití plísní.....	22
2.14	Léčba mykotických infekcí .....	22
2.15	Morfologie <i>Aspergillus niger</i> .....	22



2.16	Popis mikroskopu .....	25
3	Praktická část .....	26
3.1	Obsah praktické části.....	26
3.2	Seznámení s Oddělením společných laboratoří.....	26
3.3	Průzkum aspergilů v Nemocnici Havlíčkův Brod .....	27
3.4	Typy vzorků.....	29
3.5	Vyzkoušené metody – postup .....	29
3.5.1	Primární preparát .....	29
3.5.2	Kultivace.....	32
3.5.3	Příprava mikrokultury (sklíčkové kultury).....	40
3.5.4	Identifikace narostlé kultury .....	43
3.5.5	Měření mikroskopických objektů .....	48
3.6	Kazuistika .....	51
4	Závěr.....	52
5	Zdroje .....	54
6	Seznam obrázků.....	56
7	Seznam grafů .....	57

# 1 ÚVOD

Každý den vycházíme z našich domovů s pocitem dobře uklizené domácnosti, a ačkoliv se to nezdá, v domě žijí všude okolo nás mikroorganismy, které nemusíme spatřit svými očima. Mezi ně patří i plísně. Když se řekne slovo plísně, většina lidí si představí plíseň třeba na citronu nebo na zdi. Ale málokoho napadne, že plíseň může růst i na nás.

Jednoho dne po příchodu ze školy jsem zjistila, že v mé konvici se zbytkem starého ovocného čaje se objevily na povrchu hladiny podivné útvary, které mi připomínaly plísně. Při pohybu s konvicí jsem zpozorovala nevšední koule, připomínající gelové dekorativní kuličky, do kterých se aranžují květiny. Začala jsem tedy blíže pátrat a svůj pokus s čajem jsem několikrát zopakovala. Plísně mě díky tomu začaly velmi zajímat a staly se první volbou tématu pro sepsání této práce.

Mým cílem je dostat plísně do většího podvědomí veřejnosti a seznámit ji i s možným nebezpečím, které plísně dokáží zapříčinit vzhledem k lidskému organismu.

## 2 TEORETICKÁ ČÁST

### 2.1 Plísně

Termín plísně je nevědecké označení pro skupinu mikroskopických vláknitých eukaryotních mikroorganismů, které se řadí mezi houby (*Fungi*). Od roku 1835 jsou ve vědě známy houby, které způsobují nemoci, jsou tedy známy déle než viry a bakterie. Plísně jsou všude objevující se mikroorganismy. Pokrývají povrch substrátu malým bílým nebo barevným *myceliem* (*mycelium* = podhoubí, vzájemně propletená vlákna, zejména u hub) nebo substrátem prorůstají.<sup>2, 3, 9</sup>

Dělí se na jednobuněčné kvasinky a vláknité houby (mikromycety). Mikrobiologové rozdělují choroboplné plísně na tři rozdílné skupiny: kvasinky, plísně a dermatofyty.<sup>9</sup>

Plísně vyrábějí mykotoxiny (mykotoxiny = škodlivé látky) a těkavé organické látky, které jim pomáhají v boji s živými organismy. Jsou hlavním zdrojem inhalačních alergenů. Alergeny plísní se objevují v prostředích vnitřních (kuchyně, koupelny, sklady, atd.) a zevních (zemědělská půda, zahrady, atd.). Plísně se dokážou svými neviditelnými pletivy dostat až do buněk lidského těla.<sup>2, 3, 9</sup>

#### 2.1.1 Mykotoxiny neboli houbové jedy

„Mykotoxiny jsou jedovaté produkty látkové výměny hub, vznikající během jejich růstu. Dokonce i pro jejich původce jsou tak nebezpečné, že je houby musejí rychle vyloučit, aby jim mykotoxiny neublížily“ (Langeová, Guzeková, 2013, 24). Plísně produkují mykotoxiny pouze mají-li dostatek živin a vhodnou teplotu. Plísně potřebují hodně energie k růstu. Nejznámějším mykotoxinem je aflatoxin. Ten může i v nepatrném množství vyvolat zhoubná onemocnění jater. Produkuje ho plíseň rodu *Aspergillus*.<sup>4, 10</sup>

Většinou všechny mykotoxiny během delšího působení na organismus poškozují játra, ledviny, krevní oběh a negativně působí na imunitní systém. Někdy napadají v malém množství kůži. Produkce mykotoxinů potravin znehodnocuje a ohrožuje na lidském zdraví. Neexistuje žádná efektivní metoda, která by dokázala mykotoxiny v potravinách zničit.<sup>4, 10</sup>

#### 2.1.2 Těkavé organické látky

Těkavé organické látky jsou různé chemické sloučeniny, které produkují plísně do ovzduší při svém růstu, např. plísně produkují alkoholy jako vedlejší produkt do vzduchu během svého růstu v rámci metabolických procesů. Tento jev se zejména vyskytuje v případě, kdy plísně rostou na organickém materiálu, jako jsou např. potraviny nebo dřevo. Při produkci těkavých organických látek závisí hlavně na obsahu vody v materiálu, na kterém plísně rostou. V lidském těle působí hluboko v respiračním traktu mnoho těkavých organických látek,

ale většinou způsobují jen podráždění. Ale jednoznačně vyplývá, že těkavé organické látky mají negativní vliv na lidský organismus.<sup>9</sup>

## 2.2 Typy plísní

Plísně rodu *Aspergillus*, *Alternaria*, *Cladosporium*, *Penicillium*, *Fusarium* a *Trichoderma* jsou příklady široké škály vláknitých mikroskopických hub. Rod *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium* patří mezi nejvýznamnější toxinogenní plísně v souvislosti s potravinami.<sup>9</sup>

### 2.2.1 Rod *Alternaria*

Plísně rodu *Alternaria* jsou celosvětově rozšířeny na nejrůznějších substrátech. Tuto plíseň bychom od jara do podzimu našli ve vnějším prostředí. Pro svůj vývoj upřednostňují teplotu 20-25 °C, ale vyvinou se i při teplotě 0 °C. *Alternaria alternata* mají velikost spor 23-56 × 7-8 μm (Obr. 1). Nejčastěji se vyskytují na zdech v bytech, kde již plíseň byla, a na fasádách domů. Druh plísně *Alternaria alternata* se pokládá za hlavního původce astmatu a alergií u malých dětí. Je zodpovědná i za alergický zánět nosní sliznice, hypersenzitivní pneumonitidy (zánětlivé postižení plic) a bronchiolitidy. Plísně rodu *Alternaria* vyprodukují několik různých mykotoxinů. Nejvíce toxický je *alternariol* (*alternariol* = mykotoxin, který kontaminuje nejvíce ovoce a obiloviny).<sup>9, 10</sup>



Obr. 1: Spory *Alternaria alternata*

### 2.2.2 Rod *Aspergillus*

Plísně rodu *Aspergillus* se řadí mezi plísně, které nejčastěji poškozují zdraví člověka. Mají malé spory do velikosti 5 μm. Vytvářejí mykotoxiny, alergeny a těkavé organické látky. Výskyt spor v ovzduší je sezónní, v největším počtu se vyskytuje na podzim. Spory plísní rodu *Aspergillus* se nejsnadněji uvolňují do ovzduší s porovnáním s ostatními rody plísní. V ovzduší se mohou vyskytovat v blízkosti zdí a bytů, kde se plíseň už vyskytla. Existuje více, jak 100 druhů plísní rodu *Aspergillus*. V roce 1856 byl poprvé popsán rod *Aspergillus* jako příčina onemocnění plic. Zánětlivé postižení plicních sklípků bylo poprvé popsáno Barnadinem Ramazzimem v roce 1713. Tato plíseň nejčastěji způsobuje

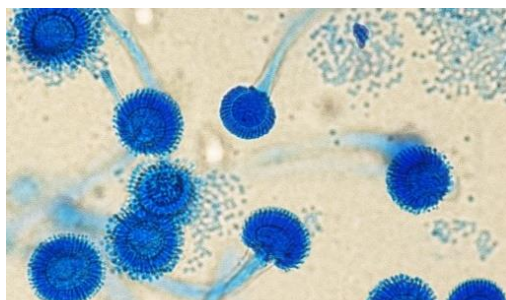
např. *bronchopulmonální aspergilózu*, zánět dutin a ušní infekce. *Bronchopulmonální aspergilóza* je nebezpečná forma alergického onemocnění, kterou způsobuje právě rod plísně *Aspergillus*. *Bronchopulmonální aspergilóza* je typická pro zahradníky a pracovníky v potravinářských provozech (např. pekárny, sýrárny, pivovary, atd.).<sup>9, 10</sup>

- a) *Aspergillus flavus* (Obr. 2) napadá širokou škálu potravin a různé plody, na kterých vytváří mykotoxiny. Napadená potravina po sněžení způsobuje v lidském organismu problémy. Patří mezi nejvýznamnější lidský patogen stejně jako *Aspergillus fumigatus*. Tento druh roste v rozmezí teplot 10-48 °C, nejčastěji v teplotách 33 °C. Spory dosahují 3,5 µm. Často způsobuje infekce v ranách a v popáleninách pacientů. Je příčinou zánětu uší a kožních zánětů.<sup>9, 10</sup>



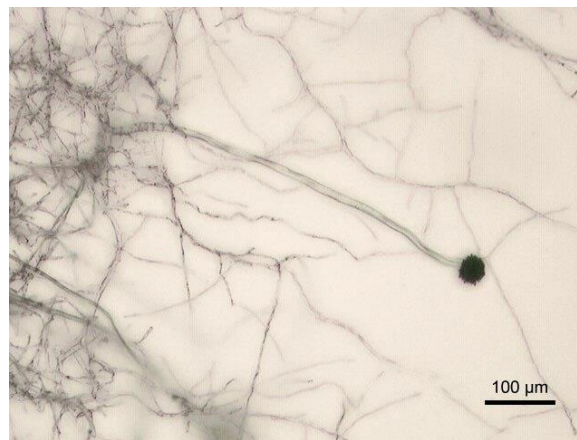
Obr. 2: *Aspergillus flavus*

- b) *Aspergillus fumigatus* (Obr. 3) se vyskytuje v ovzduší ve vnitřním, i vnějším prostředí. Nejčastěji roste v teplotách mezi 40-42 °C (optimální). *Aspergillus fumigatus* způsobuje alergická onemocnění (rýmu, astma, záněty dutin). Spory *Aspergillus fumigatus* jsou velmi malé, velikost 2-3 µm. Jsou nebezpečné především pro lidský organismus, protože mohou vniknout do průdušek a průdušnic. Produkuje také mykotoxiny. Tento druh je nejvíce odpovědný za vznik lidské aspergilové infekce a nejvíce poškozuje lidský organismus. Když se *Aspergillus fumigatus* nediodagnostikuje včas, může tato infekce vést k systémové aspergilóze, která může zapříčinit i smrt např. u zaintubovaných pacientů.<sup>9, 10</sup>



Obr. 3: Mikroskopický snímek *Aspergillus fumigatus*

- c) *Aspergillus niger* (Obr. 4) se velmi často vyskytuje v teplých měsících. Roste nejčastěji v teplotních rozpětích 35-37 °C, při minimu 6-8 °C a maximu 45-47 °C. Roste na vlhkých fasádách domů nebo na zdech v koupelnách, na kterých zanechává černé skvrny, proto je nazývána tzv. černou plísní. Tento druh produkuje nejméně toxinů ze všech plísní rodu *Aspergillus*, proto je to nejméně nebezpečný druh. Má schopnost vyvolávat plicní a kožní infekce, ušní záněty a astma. V laboratořích se *Aspergillus niger* používá při testování např. k produkci enzymů. Tyto enzymy jsou pak využívány při studiu enzymatických reakcí nebo k průmyslové výrobě enzymů. Používají se také k fermentaci, protože *Aspergillus niger* má schopnost fermentovat různé substráty, čehož se využívá v průmyslovém měřítku pro výrobu např. kyseliny citrónové. Slouží ke studiu fermentačních procesů. Další možností aplikace této plísně je u testování antimykotik. Množí se velkým počtem výtrusů.<sup>9, 10</sup>



Obr. 4: *Aspergillus niger*

- d) *Aspergillus versicolor* (Obr. 5) se vyskytuje hojně ve vnějším i vnitřním prostředí, často je součástí prachu domácností. Roste v rozmezí teplot 9-39 °C, ale ideální je teplota 27 °C. Spory dosahují velikosti 2-3 μm. Je to typická alergenní plíseň. Produkuje mykotoxiny a je příčinou mykotoxických onemocnění u lidí (např. poškození a onemocnění ledvin, podílí se na vzniku astmatu a rakoviny, atd.).<sup>9,10</sup>



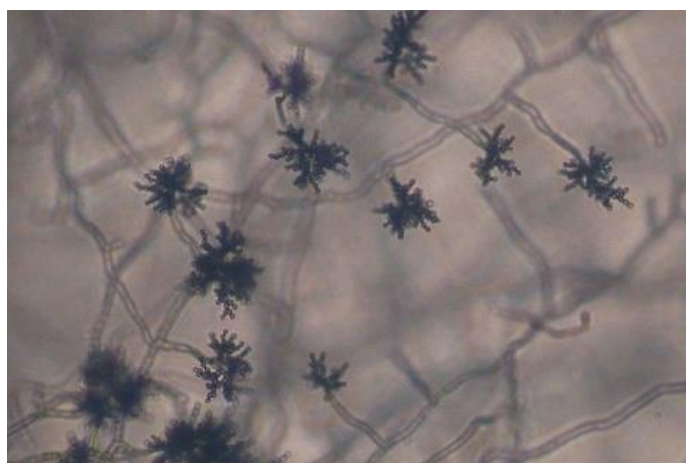
Obr. 5: *Aspergillus versicolor*

### 2.2.3 Rod *Cladosporium*

Plísň rodu *Cladosporium* (Obr. 7) se vyskytují v různě vysokém množství v závislosti na sezoně. Jejich sezona je na celém světě od jara do podzimu. Nejvíce rostou v teplotách 18-28 °C, ale i v extrémních teplotách. Spory rodu *Cladosporium* dosahují 5,5-13 × 3,8-6 μm (druh *Cladosporium herbarum*). Vyskytují se na vlhkých substrátech (např. matrace, koberce, tapety). Spory tohoto rodu způsobují plísňové alergie u dětí do 4 let. Neprodukují žádné významné mykotoxiny. Rod *Cladosporium* způsobuje i zánět oční rohovky, plicní infekce a byl nalezen i v podpažních cystách. Způsobuje hnilobu ovoce a zeleniny (Obr. 6).<sup>9, 10</sup>



Obr. 6: Plíseň vyskytující se na citrusech

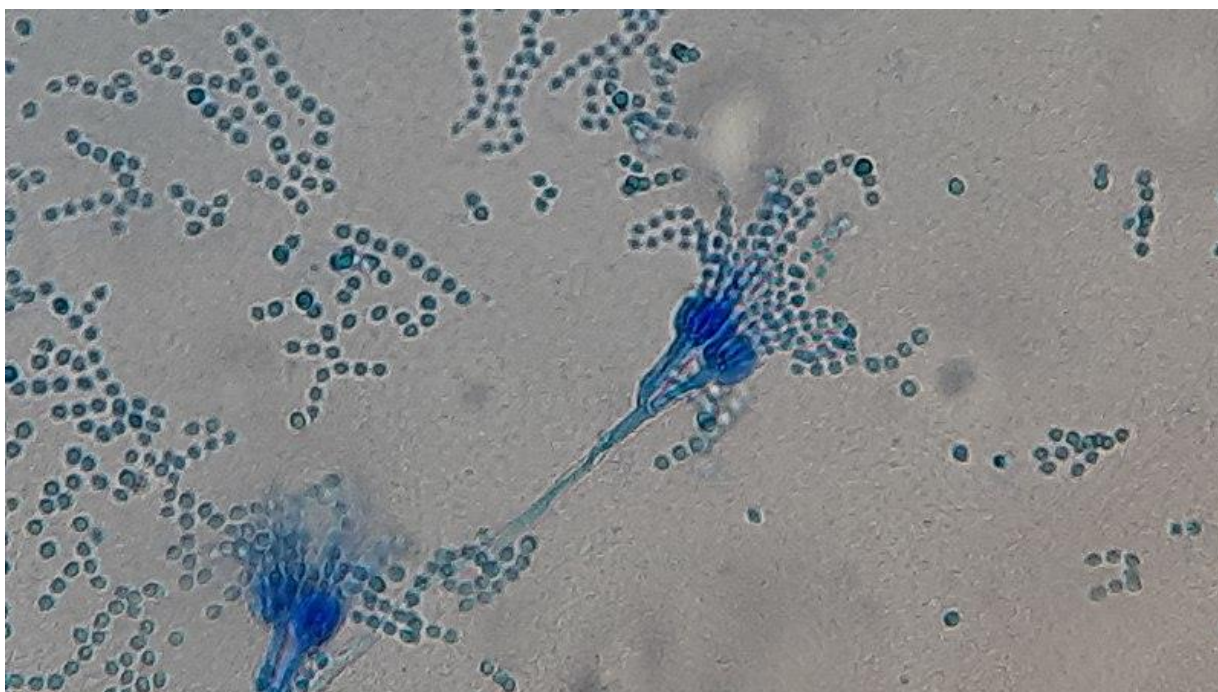


Obr. 7: Rod *Cladosporium*

## 2.2.4 Rod *Penicillium*

Plísně rodu *Penicillium* (Obr. 8) mají více jak 200 druhů. Tato plíseň má velmi malé spory, které pronikají do dýchacích cest a produkují nepříliš významné alergeny. Rostou při teplotě 18-25 °C, ale i v teplotě od 3 °C. Vyskytují se po celý rok. Spory plísni rodu *Penicillium* se velmi snadno uvolňují do ovzduší stejně jako rod *Aspergillus*. Lidské zdraví poškozují nejčastěji druhy *Penicillium chrysogenum* a *Penicillium citrinum*. Plísně rodu *Penicillium* vytváří mykotoxiny (kyselina penicilová). Některé druhy této plísně produkují těkavé organické látky. Tento rod plísně objevil skotský lékař a vědec Alexander Fleming, který zkoumal delší dobu vlastnosti *stafylokoků*.

Alexander Fleming jednou před odjezdem na dovolenou s rodinou naočkoval stafylokoky na kultivační misky a zanechal je v nekrytých Petriho miskách vedle otevřeného okna v rohu své laboratoře. Když se z dovolené 3. září 1928 vrátil povšiml si, že na kultivačních miskách je jedna kultura kontaminovaná sporami plísni. Zjistil, že kolonie *stafylokoků* přímo obklopené sporami plísni byly zničeny, zatímco ostatní kolonie *stafylokoků* ve větší vzdálenosti byly normální. Fleming tuto plíseň nejdříve nazýval plísňovou štávou. Tuto plíseň identifikoval jako plíseň rodu *Penicillium*. Až 7. března 1929 pojmenoval účinnou látku z plísně rodu *Penicillium* jako penicilin. Penicilin se nakonec proslavil pod názvem zázračný lék. Látka, která je produkována plísněmi, má v sobě přítomnou antibakteriální látku. Později zjistil, že tento lék je účinný proti všem grampozitivním patogenům, které jsou zodpovědné za nemoci, jako např. zápal plic, kapavka, atd.<sup>1, 7, 9, 10</sup>



Obr. 8: Rod *Penicillium* sp.



## 2.3 Stavba buňky plísni

„Plísně mají pravé buněčné jádro ohraničené membránou i další buněčné orgány. Vegetační forma plísni se skládá z více či méně větvených vláken. Buněčnou stěnu mají obvykle tvořenou chitinem a glukánem“ (Klánová, 2013, 12). Na přítomnosti těchto látek je založena diagnostika plísni v klinickém materiálu. Ani jedna z těchto látek se nevyskytuje v buněčné stěně bakterií, tudíž je pro plísně specifická.<sup>9</sup>

## 2.4 Výživa plísni

„Plísně jsou heterotrofní organismy, které energii a látky pro stavbu svých těl získávají z látek organického původu“ (Klánová, 2013, 12). Živiny z ovzduší přijímají přes buněčnou stěnu. Některé látky jsou příliš velké a buněčnou stěnou neprojdou, a proto vytváří plísně enzymy. Enzymy jsou látky bílkovinné povahy, které rozkládají katalytickou reakcí látky na látky jednodušší.<sup>9</sup>

### 2.4.1 Způsob výživy

Způsob výživy se dělí na:

- a) „*Saprofytický* – živiny jsou přijímány z odumřelých těl jiných organismů (plísně, které kazí potraviny).
- b) *Parazitický* – živiny jsou přijímány z jiných živých organismů (plísně, způsobující choroby).
- c) *Komensalismus* – způsob života, při kterém plísně žijí v partnerství s jiným organismem, partner není poškozován, není to pro něj ale nijak výhodné.
- d) *Symbióza* – způsob života, při kterém plísně žijí v partnerství s jiným organismem, partner není poškozován, ale je to pro něj výhodné“ (Klánová, 2013, 12).

Příkladem symbiózy může být řasa a houba. V tomto případě žije v symbióze plíseň (houba) a řasa - lišejník. Plíseň poskytuje řase minerální látky a vodu, naopak řasa poskytuje plísni organické látky, např. cukr, který vzniká při průběhu fotosyntézy. Průběh fotosyntézy se dělí na dvě fáze. Primární neboli světelná fáze probíhá jen na světle, v membránách tylakoidů. Funguje na principu přeměny světelné energie na energii chemickou. Cíl této fáze je výroba energie a redukčního činidla. Sekundární neboli temnostní fáze - Calvinův cyklus, probíhá nezávisle na světle ve stromatu chloroplastu. Cílem této fáze je vznik cukru z CO<sub>2</sub>. Tento cukr potom poskytuje řasa plísni - houbě.

## 2.5 Podmínky pro život

Plísně se velmi dobře přizpůsobují k extrémním podmínkám prostředí. Snášejí nízké i vysoké teploty, nízké pH, nižší obsah vody na využití.<sup>9</sup>

Produkují spory (reprodukční jednotky) ve velkém množství. Spory plísní jsou velmi malé, většina alergologicky důležitých spor má rozměry 3-10  $\mu\text{m}$ . Potřebují teplotu mezi 25-30 °C, vlhkost nad 65 %, dostatek organického substrátu, aby mohly růst.<sup>9</sup>

### 2.5.1 Vlhkost

Vlhkost je nejdůležitější faktor pro růst plísní. Pro růst potřebují danou vlhkost substrátu i okolí, kde se vyskytují. Pro rozmnožování je potřeba jiná vlhkost než pro klíčení a růst. Nikdy nelze předpovídat, kde se jaká plíseň vyskytne, protože každý rod, každý druh a každý jedinec potřebuje něco jiného. Přesně daná je jen vlhkost substrátu, která se stanoví dvěma způsoby. První se může určit podle obsahu vody, který se uvádí ve hmotnostních procentech (hmotnostní vlhkost). Druhý podle obsahu vody v substrátu, tj. součinitel hydroskopické rovnováhy a ta se značí značkou  $a_w$  (vodní aktivita). „Tato veličina udává poměr tlaku vodní páry v hydroskopickém materiálu k tlaku vodní páry nad čistou vodou za stejných podmínek. Pro čistou vodu platí  $a_w = 1$ “ (Klánová, 2013, 15). Nejnižší nároky na vlhkost má rod *Aspergillus*. Plísně rodu *Penicillium* žijí i při hodnotách vlhkosti  $a_w$  nižší než 0,8. Plísně rodu *Cladosporium* potřebují pro růst vlhkost substrátu  $a_w = 0,8-0,9$ . Nejnáročnější na vlhkost je plíseň rodu *Alternaria* a to hodnoty vlhkosti  $a_w = 0,9$  a více.<sup>9</sup>

### 2.5.2 Teplota

Ideální teplota pro růst plísní je 18-28 °C. Některé druhy plísní mohou přežít i při teplotách pod bodem mrazu (např. některé druhy rodu *Aspergillus* a *Penicillium*). Teploty větší než 70 °C plísně hubí. Většina plísní preferuje teplotu kolem 37 °C, což je teplota lidského těla. Tuto teplotu preferují druhy plísní, který způsobují lidská onemocnění.<sup>9</sup>

### 2.5.3 pH

Nejlepší podmínky pro růst plísní je pH prostředí mírně kyselé až neutrální. Z tohoto důvodu plísně žijí i na ovocných výrobcích (např. jogurt, džem, atd. – všude kde se ve složení výrobku vyskytuje ovoce).<sup>9</sup>

## 2.6 Rozmnožování

Plísně mají schopnost střídat pohlavní a nepohlavní způsob rozmnožování.

Existují dvě základní morfologické jednotky plísní. A tou jsou blastokonidie a hyfy. Blastokonidie jsou oválné nebo kulaté buňky. Hyfy jsou vlákna, která jsou různě větvená s přepážkami, nebo bez přepážek. Soubor hyf je nazýván *mycelium*. *Mycelium* je dvojího

typu: vegetativní (ukotvuje plísně v substrátu) a vzdušné neboli generativní (může nést rozmnožovací strukturu plísní). Vzdušné *mycelium* se dělí na pohlavní a nepohlavní.<sup>14</sup>

Pro pohlavní neboli sexuální rozmnožování plísní by měl být používán pouze termín spora. Naopak pro vegetativní rozmnožování (typ nepohlavního rozmnožování) by měl být vyhrazen pouze termín konidie.<sup>14</sup>

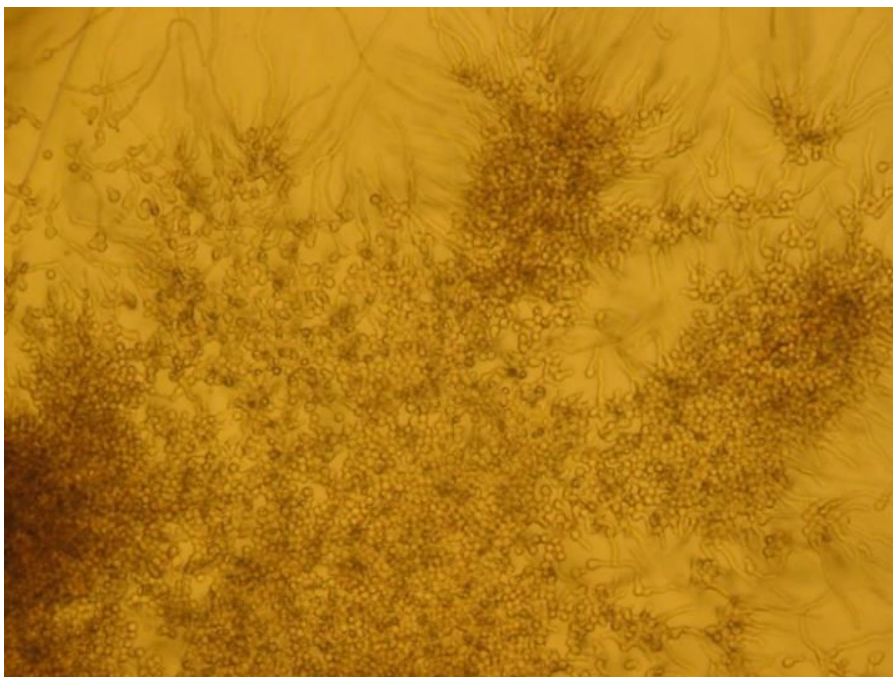
### 2.6.1 Pohlavní rozmnožování

Mezi pohlavní rozmnožovací elementy patří askospory, oospory a zygospory.

Askospora vypadá jako váček obsahující vždy sudý počet pohlavních buněk, který má kompletní sadu chromosomů. „Oospora vzniká splynutím velké nepohyblivé buňky samičí a s malou pohyblivou buňkou samčí. Vznik zygospory dává spojení dvou stejně velkých buněk opačného pohlaví“ (Votava, 2003, 212). Obě reprodukce zprostředkovávají i výměnu genetické informace mezi dvěma odlišnými jedinci způsobem meiozy a jejich potomstvo poté nese znaky obou rodičů.<sup>14</sup>

„Zvláštním typem pohlavního rozmnožování je potom tzv. spájení hyf, kdy se k sobě přiloží samčí a samičí vlákno a vytvořeným můstkem (který může mít velmi pestré až bizarní podoby) opět dojde k výměně genů“ (Votava, 2003, 212).

Spory mají na povrchu stěnu, která je chrání před vysycháním. Rozšiřují se pomocí vzduchu a hmyzu. Pro růst potřebují živiny ze substrátu. Pro klíčení (Obr. 9), růst a vytváření spor je důležitá správná vlhkost, teplota a dostatek živin.<sup>9</sup>



Obr. 9: Klíčící spory plísní

Plísně vytváří i útvary, kterým se říká kolonie. Kolonie mohou mít různé barvy: bílou, žlutou, růžovou, zelenou, hnědou a černou (Obr. 10). Z jedné spory vyrůstá právě jedna celá kolonie.<sup>9</sup>

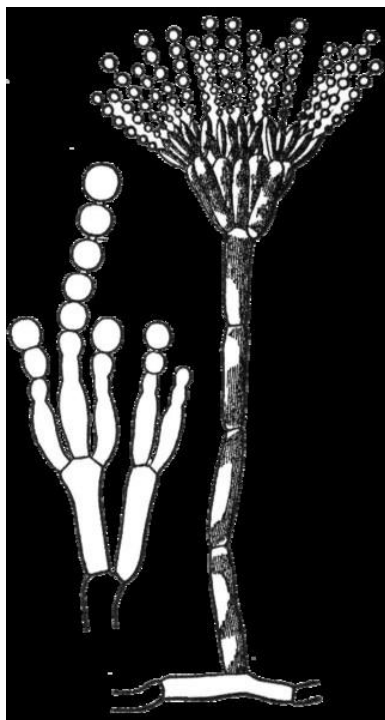


Obr. 10: Kolonie plísní

## 2.6.2 Nepohlavní rozmnožování

Nepohlavní rozmnožování je velmi časté a tento způsob množení u plísní převládá. „Lze je dělit do několika skupin podle toho, zda jsou volně uložena na vláknech, nebo zda jsou opatřeny ochrannými obaly“ (Votava, 2003, 212).

Nepohlavní rozmnožovací elementy se vyskytují volně na hyfách. Rozlišujeme několik typů konidií (Obr 11): arthrokonidie, chlamydokonidie a mikrokonidie. Arthrokonidie vznikají například postupnou fragmentací (celek se dělí na menší části) koncových částí vláken. Mají obvykle hranatý obdélníkový tvar. Blastokonidie vznikají z nepravých hyf sestavených z velmi protáhlých buněk oddělených zaškrcením. Na jejich koncích se vytvářejí oválné nebo kulaté buňky, podobné buňce mateřské. Chlamydokonidie jsou silnostěnné kulaté útvary, které vznikají kdekoli v průběhu hyf, nebo na jejich koncích. U plísní se také hojně vyskytují mikrokonidie. To jsou kulovitá, oválná nebo hruškovitá tělíška rozmístěna jednotlivě nebo ve svazečcích kdekoli v průběhu hyf. Řetízkovitě uspořádané konidie jsou typické pro rody plísní *Aspergillus* a *Penicillium*.<sup>14</sup>



Obr. 11: Konidie

## 2.7 Výskyt

Plísně napadají nejrůznější organické materiály. Hlavní výskyt plísni je v půdě, ze které se dostávají do vzduchu, ale také na organickém materiálu převážně rostlinného původu, na výkalech zvířat a průmyslových předmětech uložených ve vlhku. Napadají například povrchy otevřených zavařenin, chléb nebo navlhle suroviny (např. mouku, ořechy, mák, atd.). Vyskytují se na zdech vlhkých bytů (vytváří typické černé nebo zelenomodré povlaky rodu *Aspergillus*), v hlíně květináčů, na půdě, na odumřelých částech rostlin, v lednicích, na potravinách a ovoci (*Penicillium*). Často ve zvlhčovačích nebo v klimatizacích, ve sklepech a oknech. Plísně (plísňové výtrusy) poletují ve vzduchu, vyskytují se ve vodě, v přírodě, v půdě, na potravinách, v bytech, ve sklepech, v popelnicích na biologických odpadech, na kompostu, někdy i v živých organismech (např. domácí zvířata, lidé).<sup>9</sup>

## 2.8 Přenos

Plísně a především jejich spory se šíří zejména vzduchem. Možným přenašečem plísni je hmyz, a to např. mouchy, mravenci. Tak mohou plísně cestovat z místa na místo a mohou se přenášet i mezi lidmi. Je dokonce možné, že se plíseň přenese z jednoho člověka na druhého pouhým polibkem, kdy se plíseň dostává přes ústa až do celého zažívacího traktu. Kromě toho mohou být plísně přenášeny i domácími mazlíčky (např. morčaty, psy, atd.).<sup>10</sup>

Existuje druh mykotické infekce s názvem *Dermatitits mycotica* (mykotická dermatitida), která napadá mnoho druhů domácích i volně žijících zvířat. Tuto infekci způsobují plísně

(např. rod *Trichophyton*). Napadá zejména hovězí dobytek, kozy, kočky, psy, ovce, koně, atd. Infekce je přenosná i na člověka. Nejvíce ohroženi touto nemocí jsou lidé pracující v zemědělství a majitelé domácích mazlíčků.<sup>13</sup>

## 2.9 Lokace plísni na lidském organismu

Odborníci si myslí, že škodlivých plísni je v lidském organismu kolem 100 druhů. Plísně dokáží dlouhodobě přežít v lidském organismu a čerpat z něho živiny. V tomto případě se jedná o parazity. Lékaři choroboplodné plísně nazývají patogenními. Některé plísně umí svými chemickými látkami rozpustit kožní buňky a prorůst nimi. Plísně většinou v organismu hledají potravu, kterou by se mohly živit, a tak pronikají střevní stěnou až do cév. V cévách se živí cukrem obsaženým v krvi. V lidském organismu se plísním dobře přežívá, mají totiž v těle příznivé životní podmínky, které jim zajišťují živiny a dostatek cukru.<sup>10</sup>

Lidské tělo je rájem pro plísně, přináší jim teplo, vlhko a pravidelný přísun živin. Na lidském těle se nejčastěji vyskytují ve vlasech, v močových cestách, v uších, očích, na pohlavních orgánech, ve střevě, na kůži, na nehtech a v dýchacích cestách.<sup>10</sup>

- a) *Kůže, vlasy, nehty* - Na těchto místech se plísně vyskytují za příznivých podmínek nejčastěji u seniorů. Výživu hledají v horních vrstvách kůže a rohoviny.<sup>10</sup>
- b) *Močové cesty* - Fungující imunitní systém zahubí plísňové buňky dřív, než mohou napáchat škody v lidském organismu. Když imunitní systém správně nefunguje, mohou se plísňové buňky usadit i v jiných orgánech, Tak tomu může být v močovém měchýři nebo v ledvinách. Poté jsou prokazatelné v moči.<sup>10</sup>
- c) *Dýchací cesty* - Pokud se ve vzduchu vznáší hodně spor, které se dostanou při dýchání do plic. Taková infekce může způsobit těžká onemocnění. Dýchací cesty jsou nejvíce vyhledávané místo výskytu plísni v organismu. Plísně totiž potřebují k životu i kyslík. Napadají průdušky a vyvolávají problémy přirovnatelné k astmatickým. Plíseň, která roste v průduškách, dráždí povrch průdušek tak intenzivně, že nutí nakaženého člověka k silnému kašli. A tímto způsobem se uvolní spory do ovzduší.<sup>10</sup>

## 2.10 Potíže způsobené plísněmi

Nechtěné vdechnutí plísni je nejčastější příčinou alergické reakce. Typické příznaky jsou alergická rýma, průduškové astma, zánětlivé poškození plicních sklípků, chronický zánět průdušek, apod. Spouštěčem astmatu (chronické onemocnění průdušek) jsou plísně rodu *Alternaria* a *Cladosporium*. Pacienti, kteří mají alergie na venkovní plísně, mají skoro stejné potíže jako pacienti, kteří jsou alergičtí na pyl. Pro člověka mohou být některé plísně patogenní.<sup>2, 10</sup>

### 2.10.1 Mykózy

Mykotická onemocnění jsou např. otomykózy, onychomykózy, keratitida, apod. Otomykóza je zánět zevního zvukovodu, který způsobují plísňe rodu *Aspergillus*. Onychomykóza je nemoc, která napadá nehty a je způsobena plísní např. *Alternaria alternata*. A keratitida je zánět oční rohovky, který způsobují např. plísňe rodu *Cladosporium*. Dermatomykózy jsou nejběžnější mykotické infekce, které postihují vlasy, kůži a nehty.<sup>10</sup>

### 2.10.2 Plísně a chronická onemocnění

Lidé, kteří trpí chronickým onemocněním, mají oslabený imunitní systém. Jsou náchylnější k výskytu mykotických onemocnění než ostatní zdraví lidé. Mezi chronická onemocnění často spojená s výskytem těchto onemocnění patří např. *diabetes mellitus*, *lupenka*, *lupy*, atd.<sup>10</sup>

#### a) *Diabetes mellitus* – cukrovka

U nemocných s cukrovkou nefunguje dostatečně imunitní systém, který je potřebný k obraně proti plísním. V těle diabetika mají plísňe neustálý přísun živin. energii k růstu jim dodává cukr z krve. Diabetici mají plísňe především v ústech. Odtud putují plísňe do střev a pak se mohou přesunout i do ostatních orgánů. Klasické příznaky diabetu se zlepšují po vyléčení z plísněvého onemocnění.<sup>10</sup>

#### b) *Lupenka*

Nejčastějším příznakem lupénky je často svědivá, loupající se kůže zbarvená červeně až rudě. Příčina této choroby není dodnes známá.<sup>10</sup>

#### c) *Lupy*

Plísňe mohou za silnou tvorbu lupů. K tvorbě lupů může ale vést i fénování vlasů.<sup>10</sup>

## 2.11 Druhy vzorků pro mykologické vyšetření

Ke zjištění plísní v organismu stačí vzorek z kůže (svědivá, mokvavá a červená místa na kůži), vlasů a vousů, stolice, ušního mazu, nehtů, sputa (samovolně vykašlaný hlen z plic, který měl minimální kontakt se slinami), z moči, bronchiálního sekretu (tekutina vylučovaná průduškami), z úst (zejména u kojenců, bílý povlak na jazyku a dásních). Z těchto vzorků lze v laboratořích zjistit plísňe v organismu nebo na některých částech těla.<sup>10</sup>

## 2.12 Prokázání plísní v lidském organismu

Vyšetřovací metody se dělí na přímý průkaz, což je např. mikroskopie kultivace, atd. (zmiňuji v praktické části) a nepřímý průkaz, který zahrnuje sérologii.

Sérologie je obor, který je založený na reakci mezi antigenem a protilátkou. Vždy je známá jedna složka reakce, druhou vyšetřujeme.<sup>6</sup> Sérologické metody se provádí tak, že se pacientovi odebere krev, z krve se pomocí centrifugace získá sérum, které lze použít v diagnostice, v našem případě k prokázání antigenu aspergilů. Tím je polysacharid buněčné stěny zvaný

galaktomannan, dalším používaným antigenem je glukán, který se nachází v buněčné stěně všech hub (tzv. panfungální antigen). Z lidského séra lze prokázat i protilátky kvasinek zvané antimannany.

Pacientovi jsou vždy odebrány dva vzorky séra s časovým rozestupem. Z důvodu prokázání začátku nebo konce infekce. Neví se totiž jestli množství protilátek v krvi klesá nebo stoupá.

## 2.13 Využití plísní

Kromě škodlivých druhů plísní existují i plísně neškodlivé, mezi které patří ušlechtilé plísně např. v sýru. Plísně se využívají v potravinářském průmyslu k výrobě salámů, uheráků, hermelínů i dalších druhů sýrů, kyseliny citronové, atd. Ve farmaceutickém průmyslu k přípravě antibiotik, léčiv, přípravku biologické ochrany rostlin, atd.<sup>10</sup>

Pro zajímavost, Egypťané ve středověku používali plísně, které by se daly v této době přirovnat k biologickým zbraním. Příkladem je např. takzvaná kletba faraónů. Při objevení hrobky faraóna Tutanchamona zemřelo okolo 25 lidí na otravu mykotoxiny. Později bylo zjištěno, že Egypťané pěstovali nebezpečné plísně v nádobách, které schovávali do hrobek jako nástrahu proti lupičům faraonských hrobek.<sup>10</sup>

## 2.14 Léčba mykotických infekcí

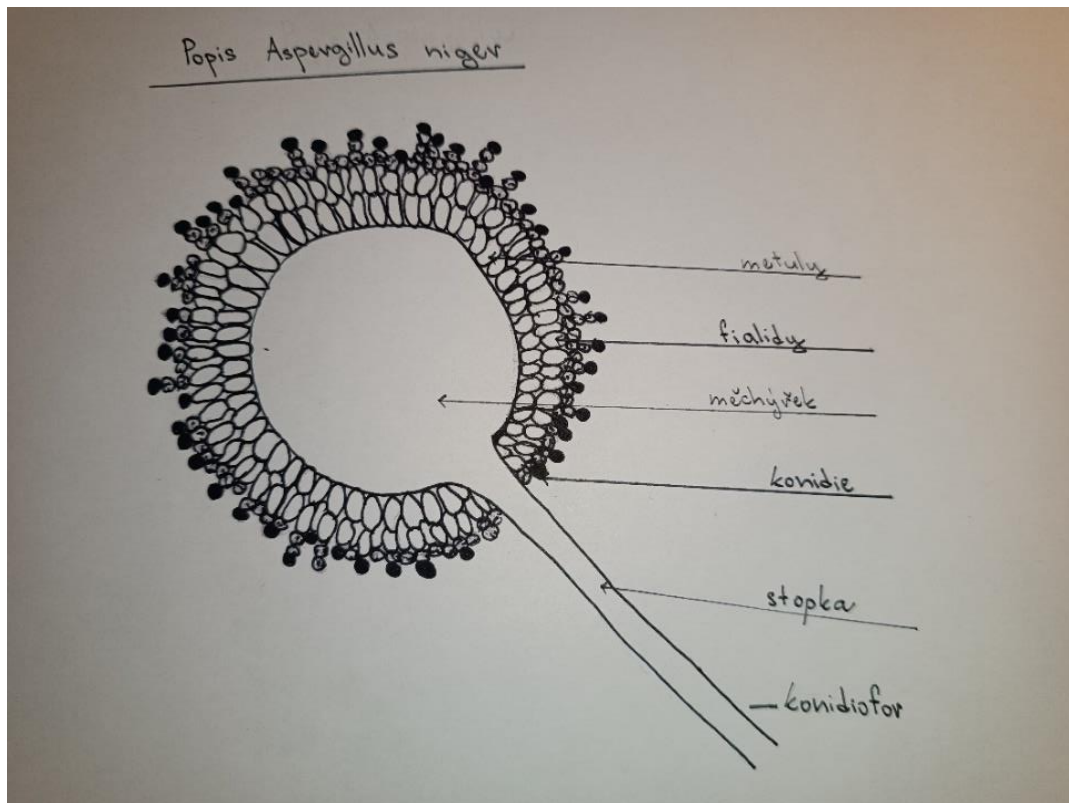
Nejúčinnější léčba plísní je včasné stanovení diagnózy a následné podání vhodných léků od lékaře. Druhů léků proti plísním je více. Existují rezistence proti některým lékům. Některé léky mají i nežádoucí účinky, a mohou dokonce i vést k poškození jater. Proti kožním plísním pomáhají speciální šampony, léky, tinktury, krémy, masti, lázně a roztoky (protiplísňové účinné látky). Tyto preparáty téměř všechny zabírají proti plísním na těle.<sup>10</sup>

## 2.15 Morfologie *Aspergillus niger*

*Aspergillus niger* je výjimečný svojí kulatou hlavičkou oproti *Aspergillus fumigatus*, což je vidět na první pohled. Kreslený obrázek zachycuje části této plísně (Obr. 12).

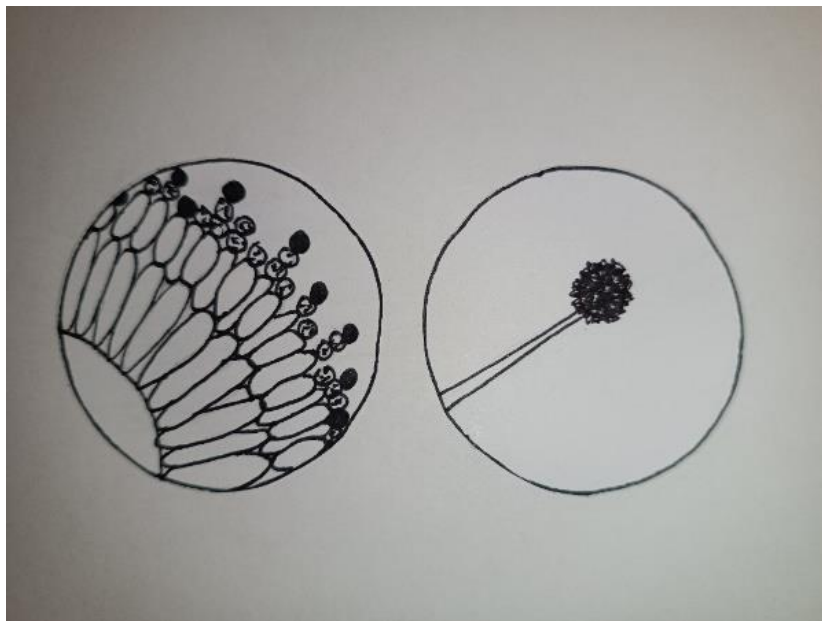
Dříve neexistovala moderní technika, která by mohla zachytit zkoumanou plíseň, jak reálně vypadala. A proto se zkoumaný objekt ručně nakreslil. Správně zpracovaná kresba zachytí mnohem více detailů než samotná fotografie. To lze vidět v přiložených obrázcích.





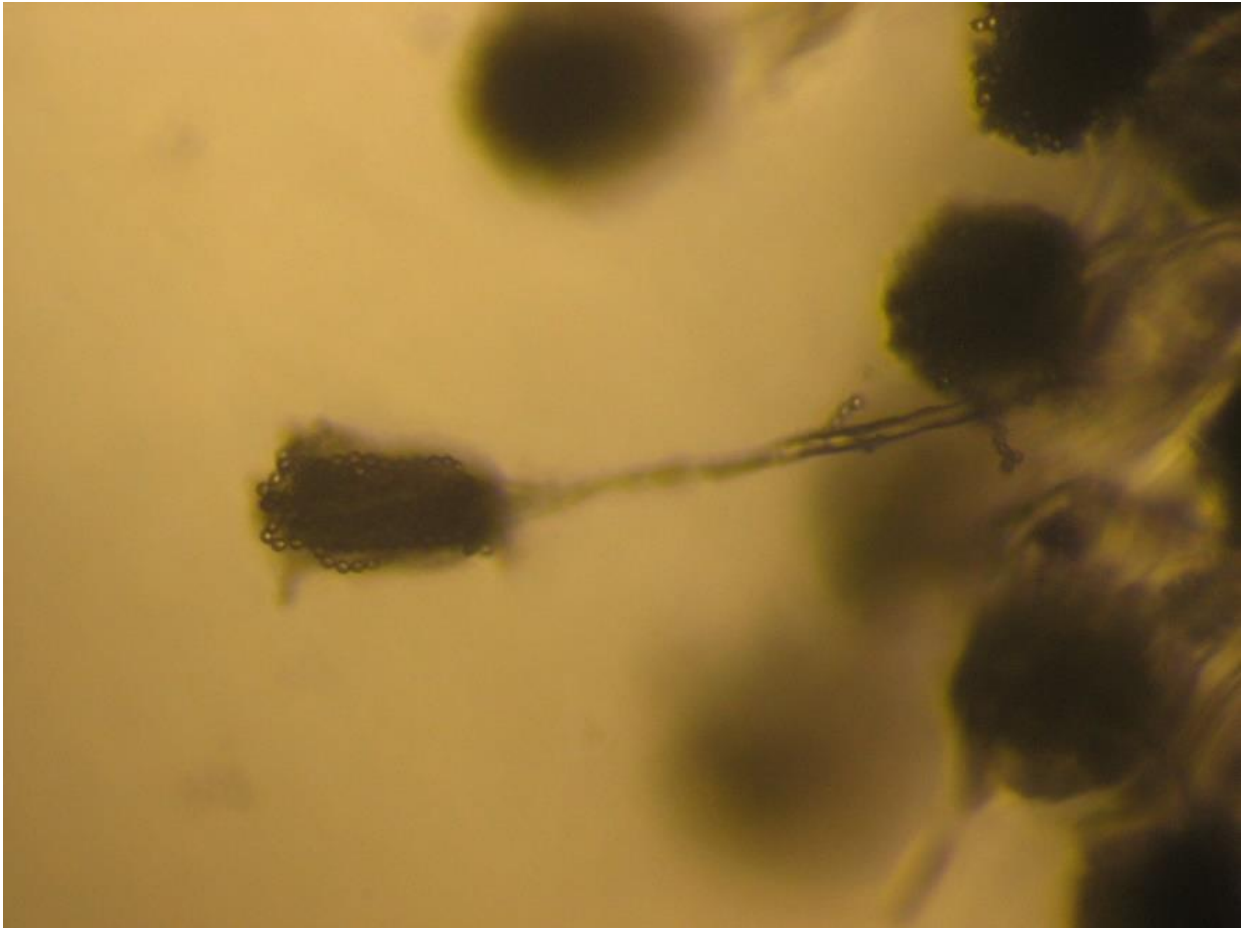
Obr. 12: *Aspergillus niger*, popis částí konidioforu – vlastní kresba

Metuly jsou části konidioforu, vyrůstají z nich fialidy. Fialidy jsou útvary, které nesou konidie. Konidie jsou nepohlavní rozmnožovací výtrusy. Konidiofor je vlákno, které může být i větvené.



Obr. 13: *Aspergillus niger* - detail - vlastní kresba

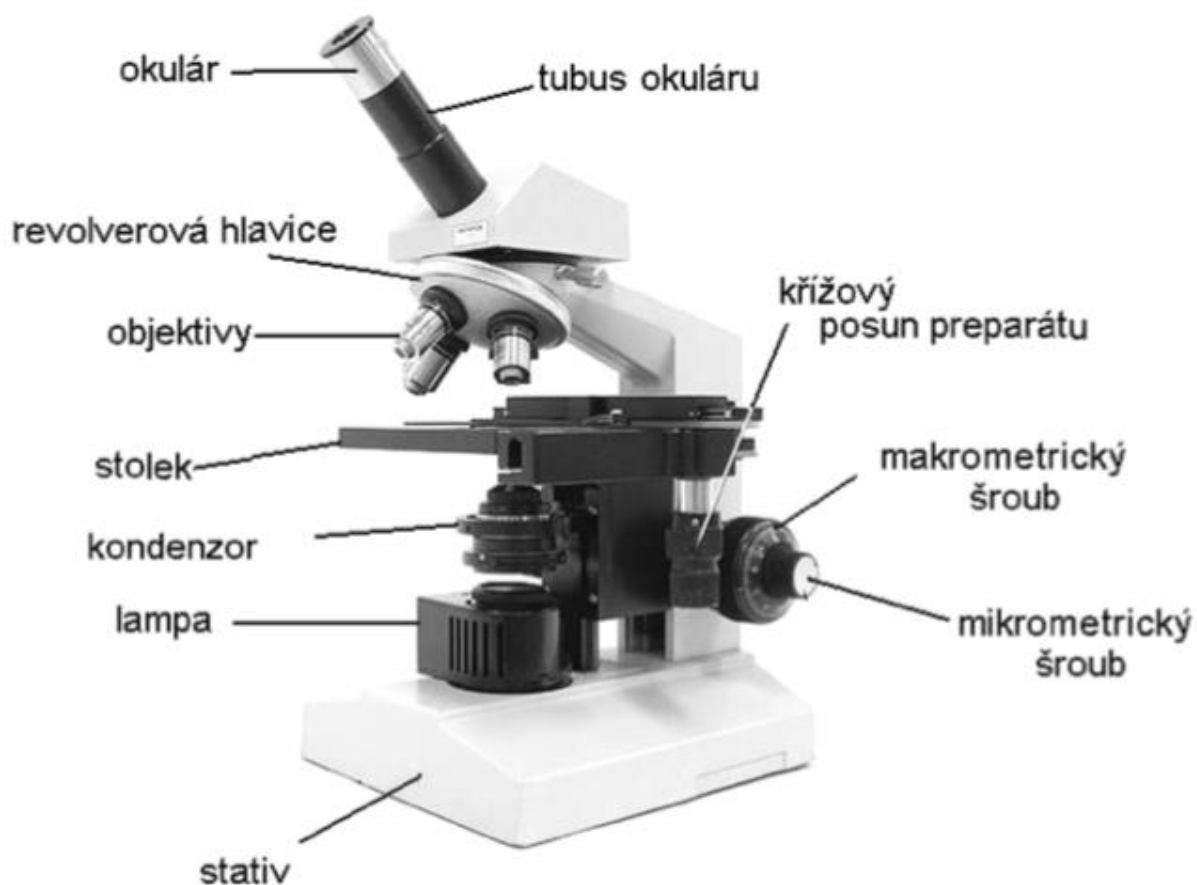
Na levém obrázku lze vidět přibližné fialidy *Aspergillus niger*. Fialidy jsou buď jednovrstvé nebo dvouvrstvé. Na obrázku jsou vidět fialidy dvouvrstvé. Rozvrstvení fialid je základní určující znak pro rozlišení plísni rodu *Aspergillus* do druhů. Na pravém obrázku lze naopak vidět *Aspergillus niger* při menším zvětšení (Obr. 13). Už u mladého jedince *Aspergillus niger* je hlavička kulatá, podle čehož lze *Aspergillus niger* poznat. Naopak u mladého jedince *Aspergillus fumigatus* je hlavička doutníkovitého tvaru s řetízky (Obr. 14).



Obr. 14: Mladé hlavičky *Aspergillus fumigatus*, pod mikroskopem, zvětšení 10×20

## 2.16 Popis mikroskopu

Při práci v laboratoři je důležitá práce s mikroskopem. Je součástí diagnostických procesů. Na obrázku (Obr. 15) jsou popsány jednotlivé části mikroskopu.



Obr. 15: Popis mikroskopu

## 3 PRAKTICKÁ ČÁST

### 3.1 Obsah praktické části

Cílem praktické části bylo seznámit se s Oddělením společných laboratoří v Nemocnici Havlíčkův Brod, které jsem několikrát navštívila. Praktická část se zaměřuje na rod *Aspergillus*. Součástí praktické části je také zmapování výskytu plísní rodu *Aspergillus* od 1. 1. 2018 do 9. 11. 2023 v laboratoři havlíčkobrodské nemocnice. Popisuji typy vzorků, které byly v uvedené laboratoři zkoumány. Dále uvádím laboratorní postupy a metody používané při vyšetřování plísní. Tato část je zakončena kazuistikou.

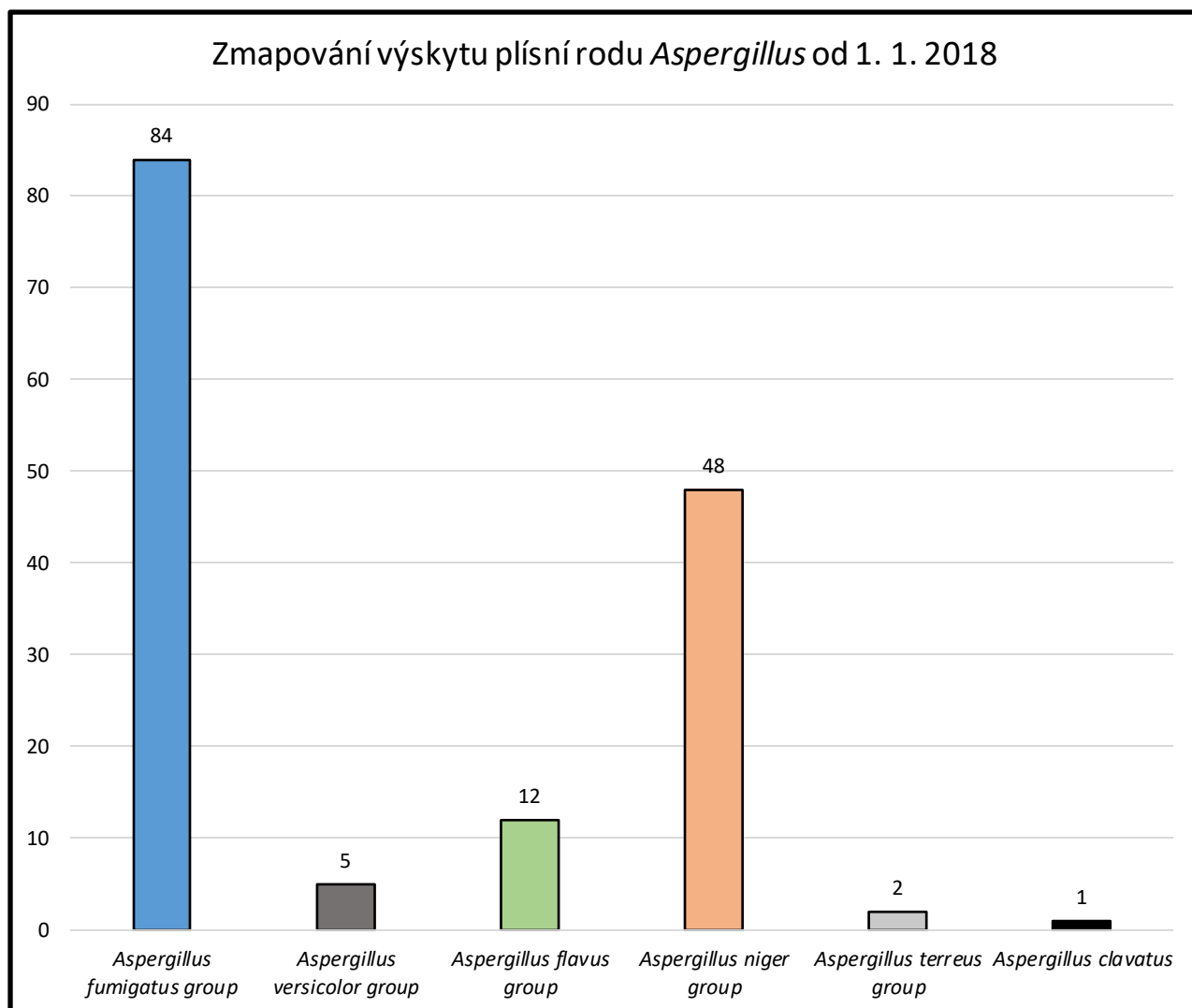
### 3.2 Seznámení s Oddělením společných laboratoří

Během zpracování této práce jsem několikrát navštívila Oddělení společných laboratoří (Obr. 16) v havlíčkobrodské nemocnici. 8. 12. 2023 jsem byla seznámena s laboratořemi klinické mikrobiologie (úsek mykologie). V tento den jsem měla poprvé možnost vyzkoušet některé laboratorní postupy a metody, jako je například příprava mikrokultury, mikroskopie, měření mikroskopických objektů, atd.



Obr. 16: Oddělení společných laboratoří

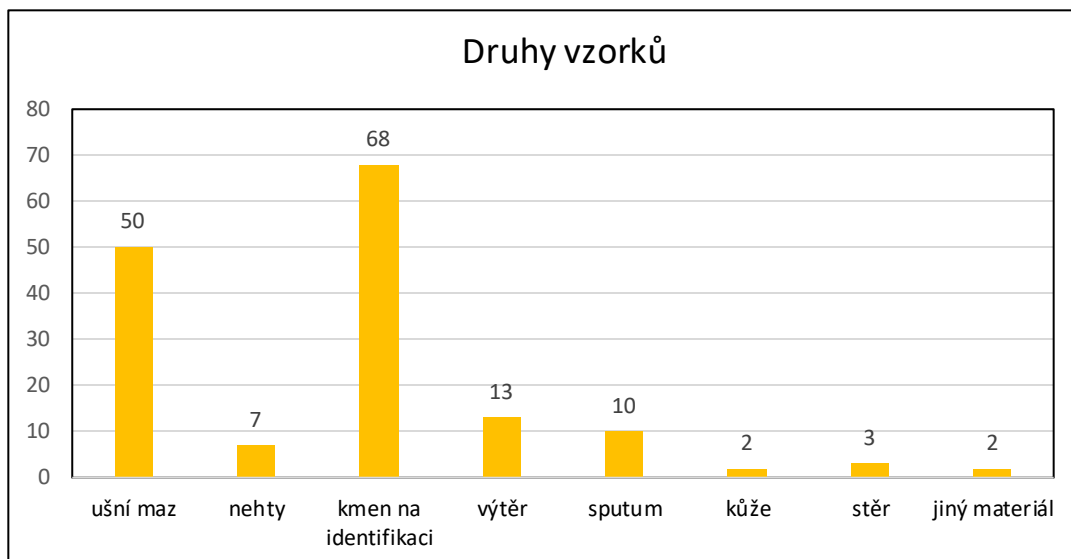
### 3.3 Průzkum aspergilů v Nemocnici Havlíčkův Brod



Graf 1: Zmapování výskytu plísní rodu *Aspergillus* od 1. 1. 2018

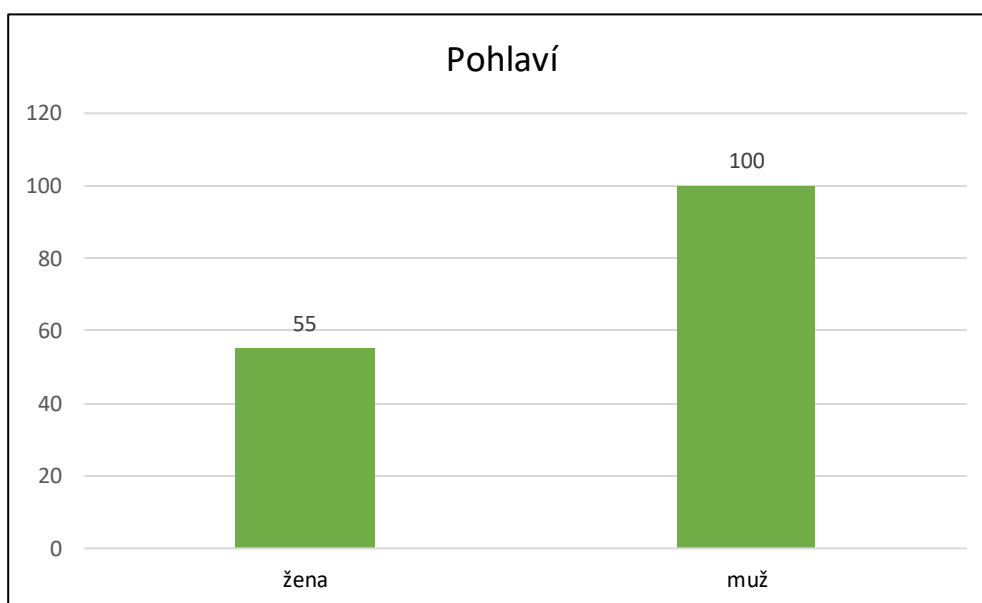
Tento graf znázorňuje zastoupení plísně rodu *Aspergillus* a jeho druhů od 1. 1. 2018 do 9. 11. 2023 ze vzorků v havlíčkobrodské nemocnici. Z 1690 vzorků bylo 223 vzorků pozitivních na plísně, z toho 155 vzorků pozitivní na rod *Aspergillus*. Nejčetnějším druhem byl *Aspergillus fumigatus*, a to v počtu 84. Druhý nejvíce početný druh byl *Aspergillus niger*, a to v počtu 48. Naopak ojediněle se vyskytl rod *Aspergillus clavatus*, pouze 1 (Graf 1).

Data pro zpracování grafů (Graf 1-3) poskytl Mgr. Antonín Melichar.



Graf 2: Druhy vzorků

Tento graf znázorňuje druhy vzorků z havlíčkobrodské nemocnice od 1. 1. 2018 do 9. 11. 2023. Tento graf vychází ze 155 vzorků, ve kterých byl nalezen rod *Aspergillus*. V laboratoři byly nejvíce zkoumány kmeny na identifikaci, což jsou převzaté vzorky z jiných úseků laboratoře (např. vzorek z dýchacích cest), těch bylo 68. Druhým nejčastějším zkoumaným vzorkem byl ušní maz, v počtu 50. Naopak méně časté byly vzorky v podobě kůže a stěru (Graf 2).



Graf 3: Pohlaví

Z tohoto grafu lze vyčíst kolik žen a kolik mužů mělo nejčastěji problém s plísněmi. Z grafu vyplývá, že nejvíce problémů s plísněmi měli muži. Tyto výsledky vychází z pozitivních vzorků na rod *Aspergillus* z havlíčkobrodské nemocnice od 1. 1. 2018 do 9. 11. 2023 (Graf 3).

## 3.4 Typy vzorků

Toto jsou typy vzorků, které se zkoumají v laboratoři havlíčkobrodské nemocnice.

„Druh vzorku:

- *nátěr na podložním skle* – zaschlý, nefixovaný nátěr (zvukovod, HCD)
- *ušní maz* – materiál dodaný ve zkumavce z lokalizace ucho nebo zvukovod, který umožňuje mikroskopické i kultivační mykologické vyšetření
- *nehty* – šupiny nehtů, materiál z podnehtových hyperkeratoz
- *výtěr* – odběrový tampon (v transportním médiu) – výtěry z nosu, krku, laryngu, nosohltanu, tonzil, dutiny ústní, ucha, zvukovodu, rekta
- *kmen na identifikaci* – kmen hyfomycet event. kvasinek zachycený z materiálů vyšetřených na ostatních laboratořích úseku klinických laboratoří na pevných kultivačních půdách
- *sputum* – spontánně vykašlané, indukované, odsáté sputum z bronchoskopie
- *aspirát* – odebraný do sterilního kontejneru (jako sputum)
- *stěr* – stěry z povrchu těla různé lokalizace“ (Melichar, 2022, 3).

## 3.5 Vyzkoušené metody – postup

Vše, co jsem měla možnost si vyzkoušet v laboratoři v Havlíčkově Brodě, je postup metod, který se používá při zkoumání každého vzorku, který přijde do mykologické laboratoře. Materiálem pro dva vzorky z laboratoře v Havlíčkově Brodě, č. 263 a 271 (tyto dva vzorky jsou použity k následujícím metodám), byl ušní maz.

### 3.5.1 Primární preparát

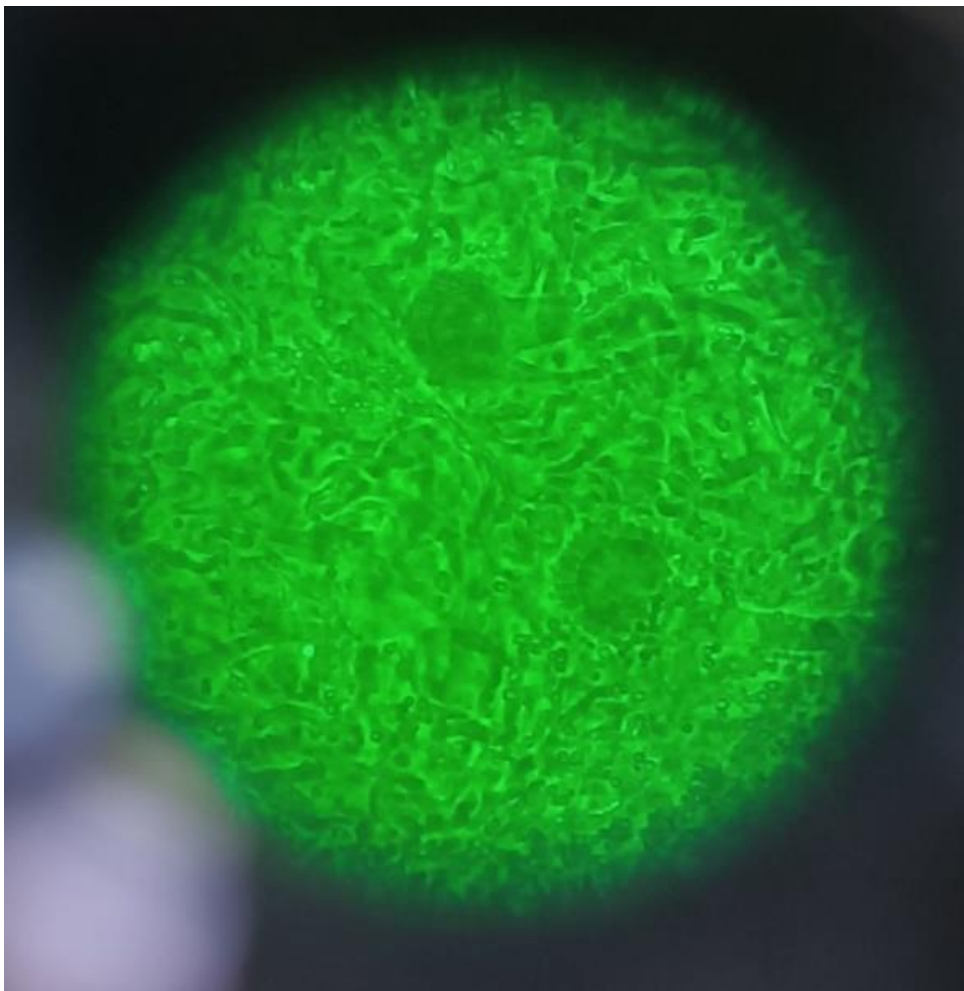
U každého vzorku se nejprve zjišťuje, zda vzorek obsahuje mykotické elementy (hyfy vláknitých hub nebo blastokonidie kvasinek). V případě, že je vzorek pozitivní, vydává se předběžný výsledek (Obr. 17-19).

Přímá mikroskopie:

1. Nátěr na podložním skle – kápne se 1-2 kapky Lugolova roztoku na nátěr, mikroskopuje se ve fázovém kontrastu (zvýrazní špatně viditelné vlákna a kontury), okulár 10×, objektiv 10×, 20×, 40×.
2. Pevné materiály (např. nehty, kůže, ušní maz) – část pevného vzorku se přenese do kapky 10% roztoku KOH na podložním skle, přiklopí se krycím sklem. Nechá se při pokojové teplotě po dobu několika minut až několika hodin na vodorovné podložce (dobu nelze přesně určit – do rozvolnění materiálu). Proces lze urychlit vložením takto připraveného preparátu do termostatu na 37 °C. Opatrným tlakem na krycí sklo se poté rozvolní materiál. Mikroskopuje se (fázový kontrast), okulár 10×, objektiv 40×.

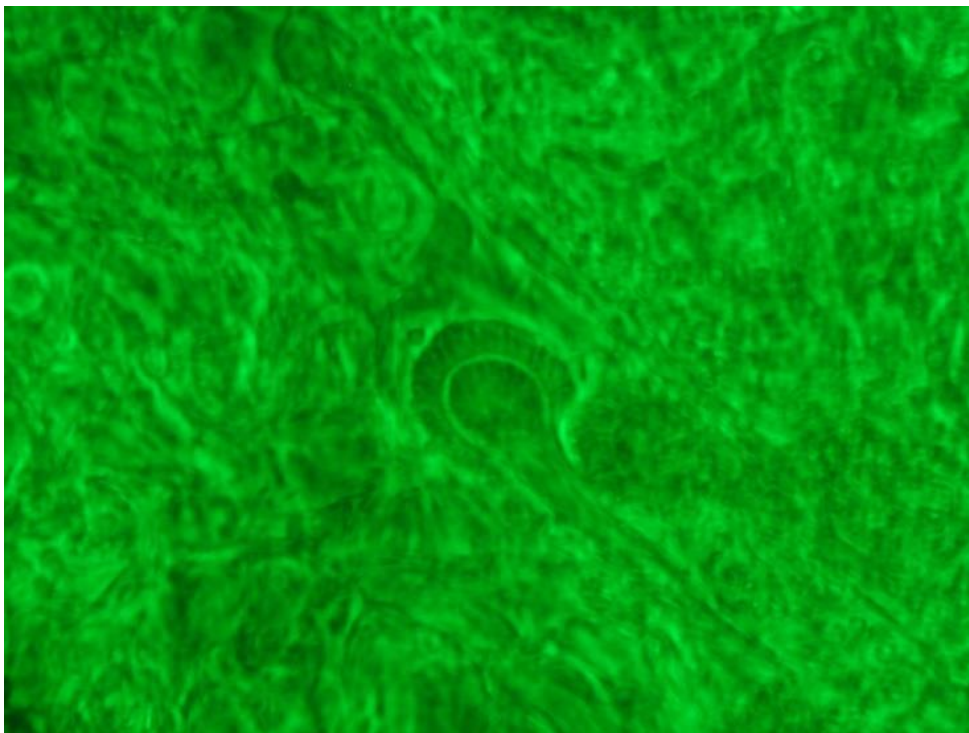
3. Tekutý materiál např. sputum, aspirát – 1 kapka o objemu cca 25  $\mu$ l se přenese na podložní sklo, přiklopí se krycím sklíčkem. Nebo se může ke kapce materiálu přikápnout kapka Lugolova roztoku, přiklopí se krycí sklíčko. Mikroskopuje se mikroskopem (fázový kontrast), okulár 10 $\times$ , objektiv 40 $\times$ .<sup>11</sup>

VÝSLEDKY: Na přiložených obrázcích jsem viděla mykotické elementy – hyfy vláknitých hub (Obr. 17-19). V tomto případě jsem našla mykotické elementy ve vzorku, a proto byl vzorek pozitivní. Na Obr. 18 jsou zřetelně viditelné metuly rodu *Aspergillus*. Již první den jsem viděla konidiofory typického vzhledu určujícího rod *Aspergillus*. Nestává se často, abychom určili plíseň rovnou do rodu hned první den.

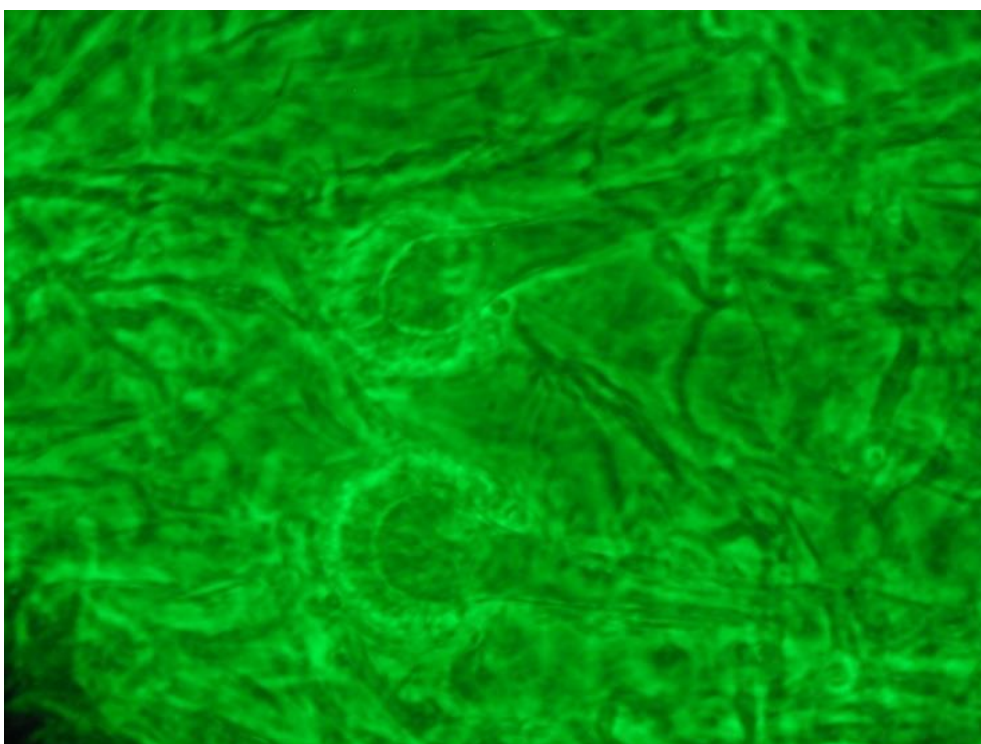


Obr. 17: Primární preparát, zvětšení 10 $\times$ 40, ušní maz





*Obr. 18: Primární preparát, zvětšení 10×40, ušní maz*



*Obr. 19: Primární preparát, zvětšení 10×40, ušní maz*

### 3.5.2 Kultivace

Kultivace se provádí v havlíčkobrodské nemocnici pouze jako primokultivace (neprovádí se vyočkování z tekutých medií), která se kultivuje standardně 20 dní na pevných mediích. Kultivace se zakládá v den přijetí vzorků, v ten samý den se také provádí přímá mikroskopie. Používá se základní půda, a tou je Sabouraudův agar s příměsí chloramfenikolu a gentamicinu (příměs – antibiotika, z důvodu potlačení růstu bakterií) - zkratka SCG agar.

Kultivují se dvě misky, jedna při teplotě 22 °C (při této teplotě rostou rychleji saprofytické plísňe), druhá při teplotě 37 °C (což odpovídá teplotě lidského těla při které se očekává růst patogenních plísňí). Doba kultivace je různá, závisí na tom, co se kultivuje, např. 10 dní probíhá kultivace dvou misek v již zmíněných teplotách pro kultivaci aspergilů a jiných rychle rostoucích plísňí, atd. Patogenní plísňe rostou obvykle pomaleji než ostatní.

Kultivace se provádí v termostatu, který udržuje určenou teplotu. Při vhodných podmínkách pro plísňe, tedy za dostatku vody, vzduchu (kyslíku), vlhkosti (zalepením misky parafilmem, se zamezí vysychání vzorku při dlouhodobé kultivaci). Misky se mohou také kultivovat v např. igelitových pytlících nebo v uzavřených plastových krabicích. Růst na plotnách se sleduje po třech dnech, dále pak vždy po pěti dnech.<sup>11</sup>

VÝSLEDKY: Na vložených obrázcích kultivace lze vidět postupný růst plísňí ve dvou teplotách v průběhu 8 dní. Na Petriho misce, která se kultivovala při teplotě 37 °C, začala plísň růst znatelně rychleji než na misce, která se kultivovala při teplotě 22 °C. Po 72 hodinách začala plísň na Petriho misce, která se kultivovala při teplotě 37 °C, produkovat rozmnožovací elementy (konidie). Pokud měla plísň ke svému růstu na misce dostatek místa, byla její kolonie kulatá. Pokud neměla dostatek místa ke svému růstu, její tvar se začal měnit do „slzovitého útvaru“. Změna tvaru nastala při teplotě 37 °C mezi 48 až 72 hodinami. Plísň na misce, která se kultivovala při teplotě 22 °C, měla i do 192 hodin dostatek místa ke svému růstu, a proto měla stále kulatý tvar (Obr. 20-33).

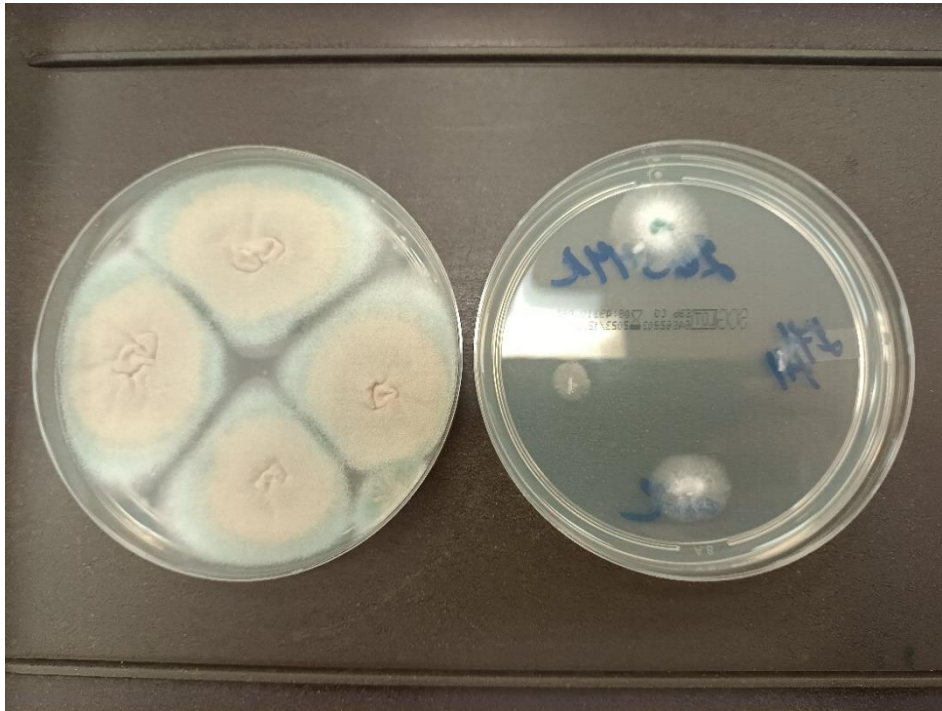


Obr. 20: Kultivace 48 h při teplotě 37 °C

Kultivace 48 h při teplotě 22 °C

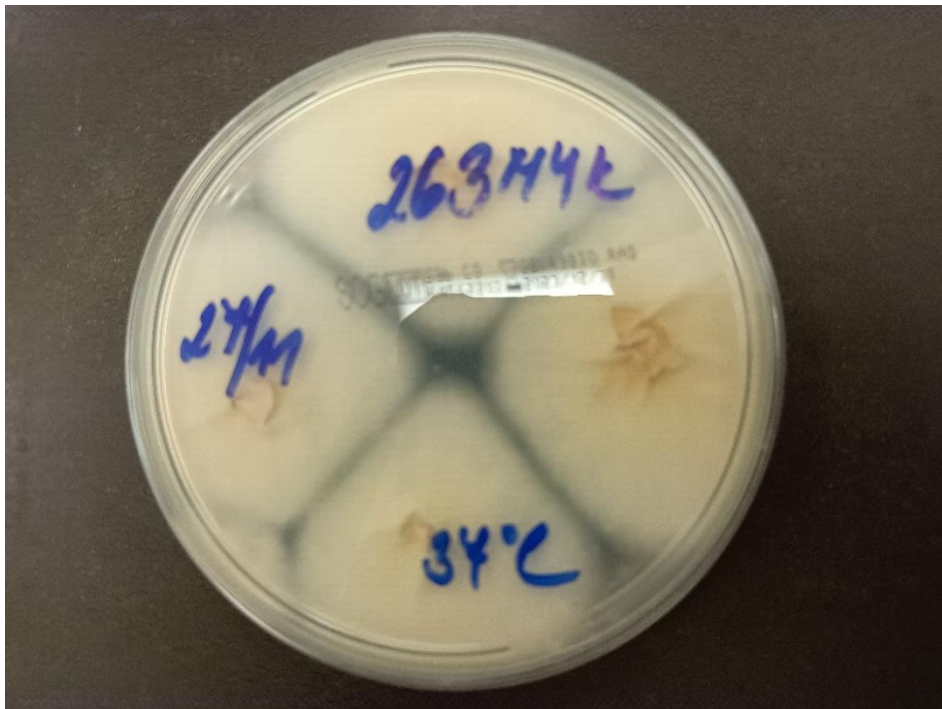


Obr. 21: Kultivace 48 h při teplotě 37 °C pohled z druhé strany

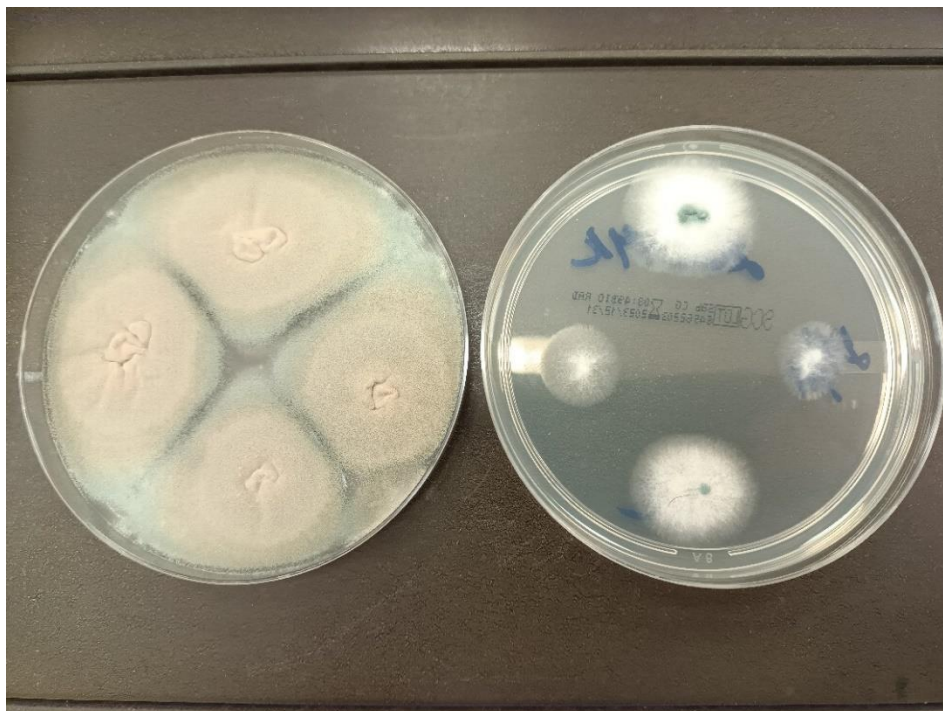


Obr. 22: Kultivace 72 h při teplotě 37 °C

Kultivace 72 h při teplotě 22 °C



Obr. 23: Kultivace 72 h při teplotě 37 °C pohled z druhé strany

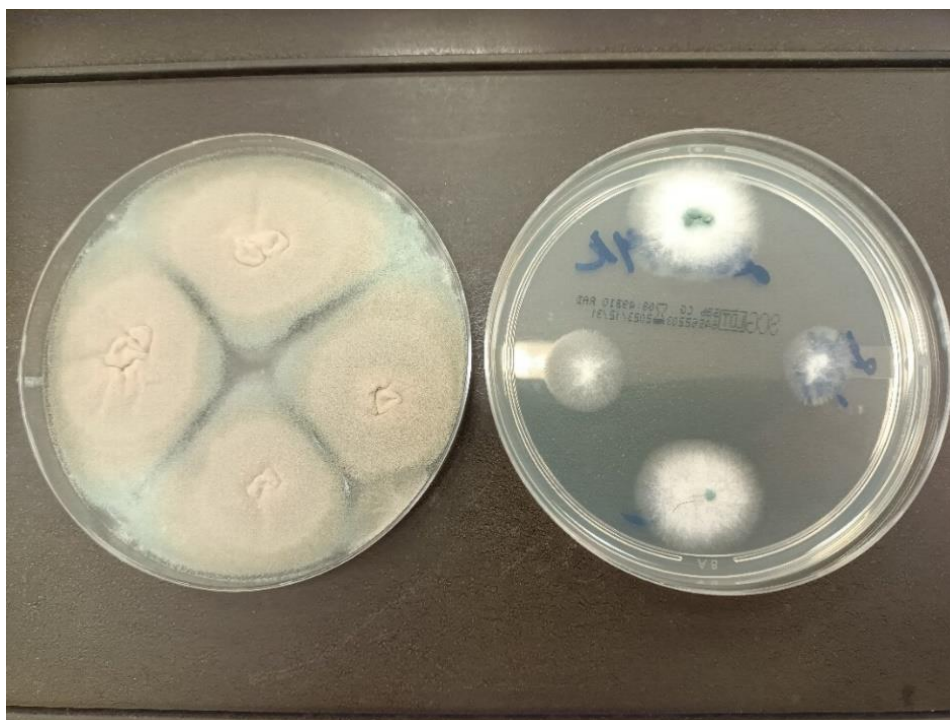


Obr. 24: Kultivace 96 h při teplotě 37 °C

Kultivace 96 h při teplotě 22 °C

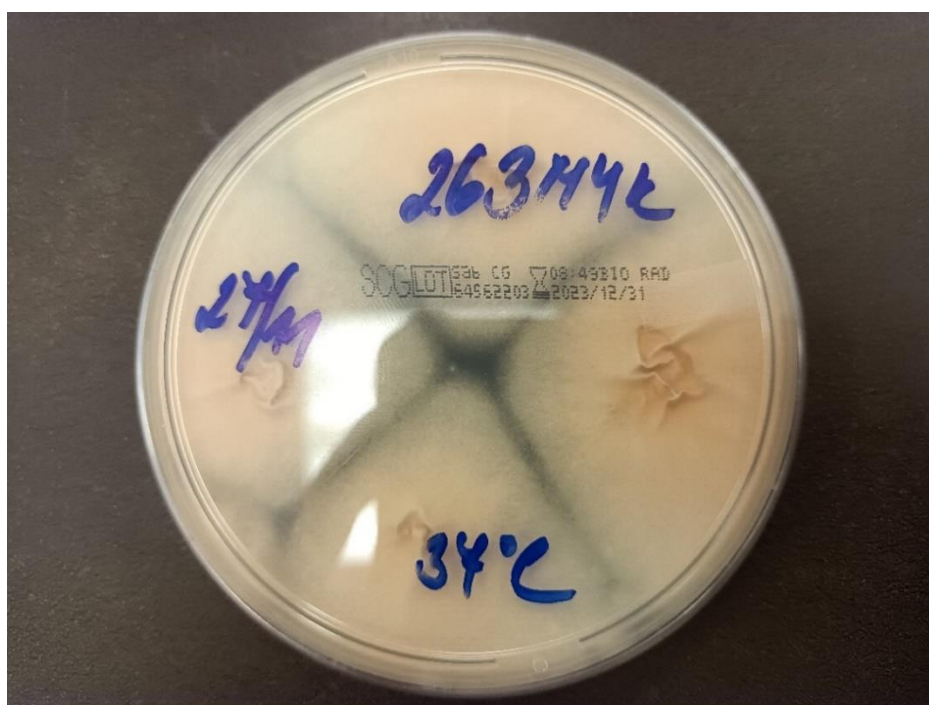


Obr. 25: Kultivace 96 h při teplotě 37 °C pohled z druhé strany

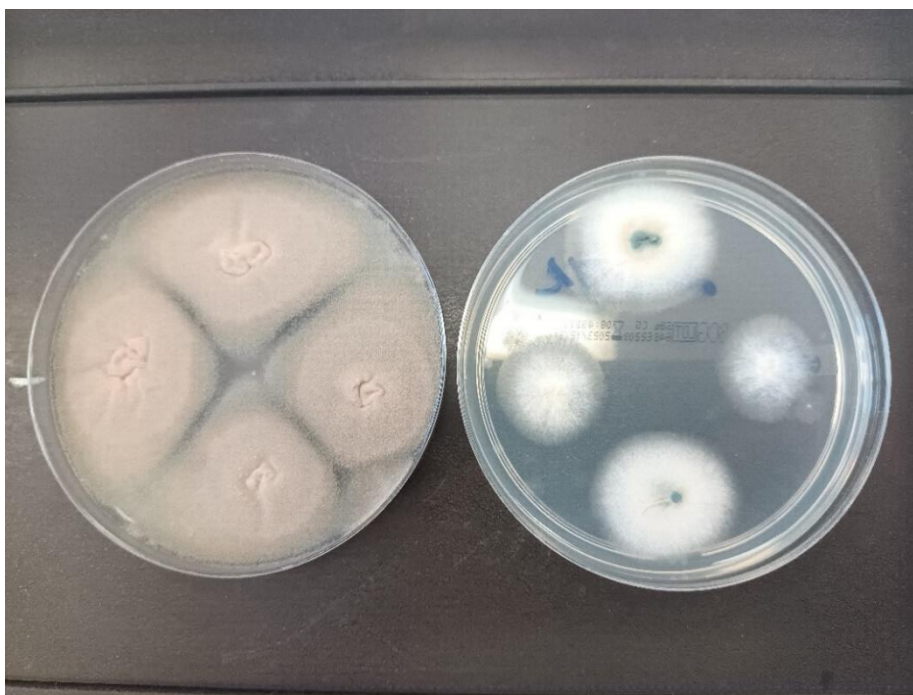


Obr. 26: Kultivace 120 h při teplotě 37 °C

Kultivace 120 h při teplotě 22 °C

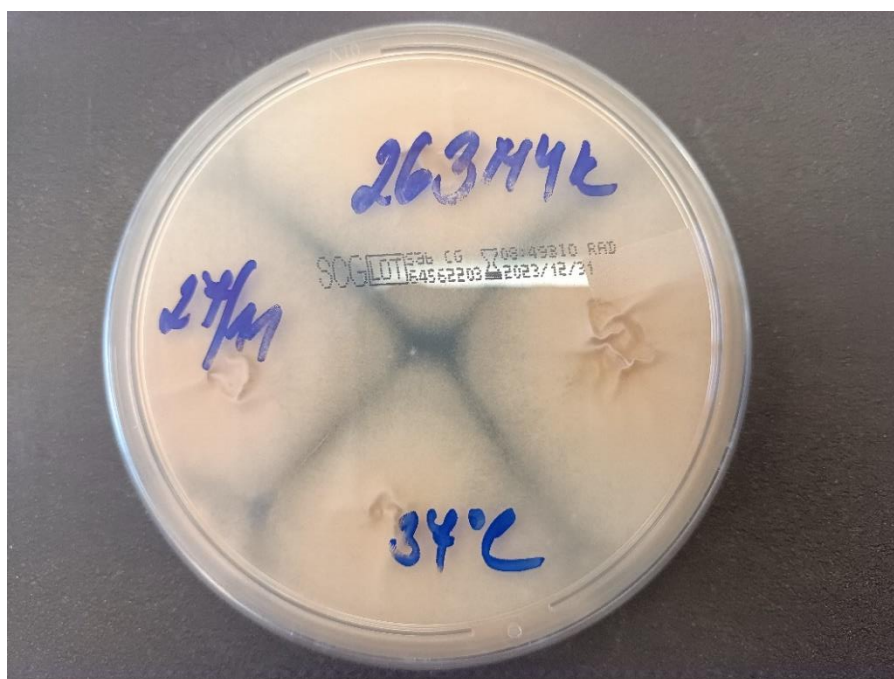


Obr. 27: Kultivace 120 h při teplotě 37 °C pohled z druhé strany



Obr. 28: Kultivace 144 h při teplotě 37 °C

Kultivace 144 h při teplotě 22 °C



Obr. 29: Kultivace 144 h při teplotě 37 °C pohled z druhé strany



Obr. 30: Kultivace 168 h při teplotě 37 °C

Kultivace 168 h při teplotě 22 °C



Obr. 31: Kultivace 168 h při teplotě 37 °C pohled z druhé strany





Obr. 32: Kultivace 192 h při teplotě 37 °C

Kultivace 192 h při teplotě 22 °C



Obr. 33: Kultivace 192 h při teplotě 37 °C pohled z druhé strany

### 3.5.3 Příprava mikrokultury (sklíčkové kultury)

Mikrokultura se provádí z narostlé kultury po 5 dnech kultivace.

Materiál: Petriho miska s kulturou

Pomůcky: preparační jehla, Petriho miska s kultivačním médiem (živnou půdou), pinzeta, kahan, sterilní destilovaná voda, krycí sklíčko, podložní sklíčko, parafilm M, buničina, agar, zkumavka, sterilní skleněná Petriho miska

Předměty se sterilizují tím, že se vloží do plamene kahanu. Vše, co jde do skleněné Petriho misky, musí být sterilní z důvodu minimalizace kontaminace (krycí sklíčko se do plamene kahanu nevkládá - je moc tenké, prasklo by).

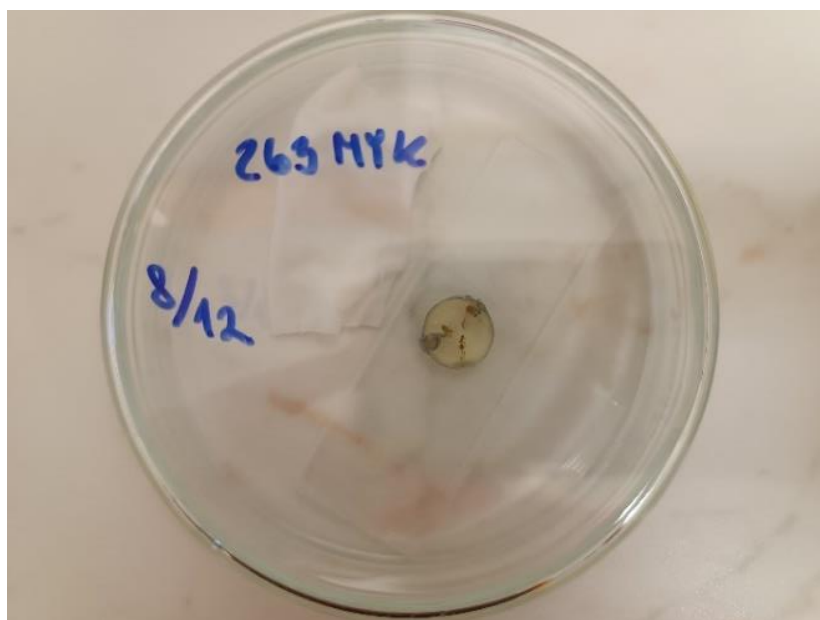
Postup: Do sterilní skleněné Petriho misky se vloží sterilní pinzetou vlhká buničina. Ke zvlhčení buničiny se použila destilovaná voda. Dále se do skleněné Petriho misky vloží sterilní podložní sklíčko. V (SCG) agaru se vykrojí pomocí trochu teplé zkumavky kolečko, které se pinzetou položí na podložní sklíčko v Petriho misce. Z kultivačního media se odebere sterilní jehlou část kultury. Jehla s nabranou kulturou se naočkuje do kolečka agaru a zanechá tam část kultury. Jehla se zabodne celkem třikrát do kolečka agaru směrem k okraji. Kultura musí být na hranici agaru a vzduchu. Na právě vytvořený agar se vzorkem v Petriho misce se položí krycí sklíčko a pomocí pinzety se mírně zatlačí. Miska se uzavře, popíše datem a číslem vzorku a oblepí parafilmem M (Obr. 34).

Kultivuje se 5-7 dní (Obr. 35, 37) při teplotě 30 °C (doba kultivace se může i zkrátit u rychle rostoucích plísni).

VÝSLEDKY: Po několika dnech jsem viděla pouhým okem narostlé plísně (Obr. 36). V mikroskopu se plísně pozorují na rozhraní vzduchu a agaru. Očekáváme, že na vzduchu budou produkovat více rozmnožovacích útvarů, které jsou důležité při identifikaci. Výhodou mikrokultury je, že již v průběhu kultivace ji lze pozorovat při zvětšení 400x, a tím pádem jsou viditelné větší detaily.



*Obr. 34: Mikroklutura právě vytvořená*



*Obr. 35: Mikroklutura 3 dny*



*Obr. 36: Pod mikroskopem, zvětšení 10×20*



*Obr. 37: Mikrokultura 4 dny*

### 3.5.4 Identifikace narostlé kultury

„Mikroskopie z narostlé kultury

Kolonie plísňového charakteru – do kapky fyziologického nebo Lugolova roztoku na podložním skle. Bakteriologickou kličkou se přenese část typické kolonie vyrostlé na pevné půdě (s rozmnožovacími orgány), materiál je mnohdy nutno rozcupovat sterilními jehlami (pro lepší přehlednost), přiklopí se krycím sklíčkem. Mikroskopuje se mikroskopem (fázový kontrast), okulár 10×, objektiv 40×“ (Melichar, 2018, 5).

Více pohledů:

#### 1. Makroskopický vzhled

Pozoruje se rozměr, barva, vrásnění a struktura kolonií (Obr. 38), reverz [otočením misky dnem vzhůru a pohled přes kultivační medium pohled přes dno přes kultivační medium, (Obr. 39)], atd.

VÝSLEDKY: Na Petriho misce lze vidět tři narostlé plísně kulatého tvaru o průměru 3 cm. Narostlé plísně mají světlé a sametové okraje a výrazně narostlé konidie. Pokud misku otočíme z druhé strany (reverz) je vidět výrazné vrásnění.



Obr. 38: Identifikace hub



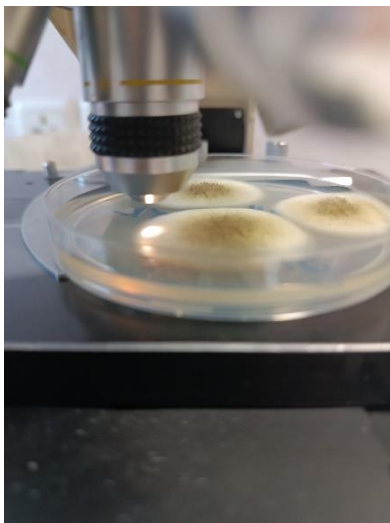
Obr. 39: Identifikace hub - revers

## 2. Mikroskopický vzhled

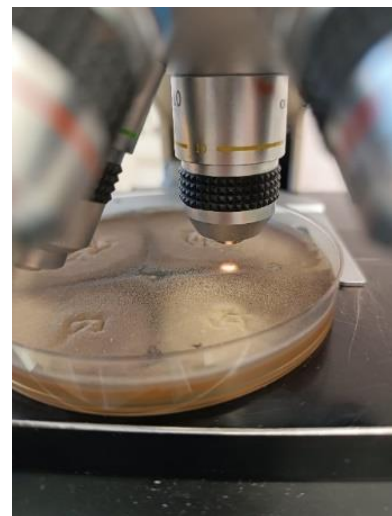
Pozoruje se struktura vláken, větvení, tvorba spor, konidií, barva, uspořádání, atd. (Obr. 42-44).

Celá Petriho miska nebo mikrokultura se vsune pod mikroskop (Obr. 40, 41).

VÝSLEDKY: Na Petriho misce pod mikroskopem lze vidět kulaté černé konidiofory (hlavičky). Velikost objektů je 81,25  $\mu\text{m}$ . Šířka stopek je 3,125  $\mu\text{m}$ . Konidie jsou černé barvy.



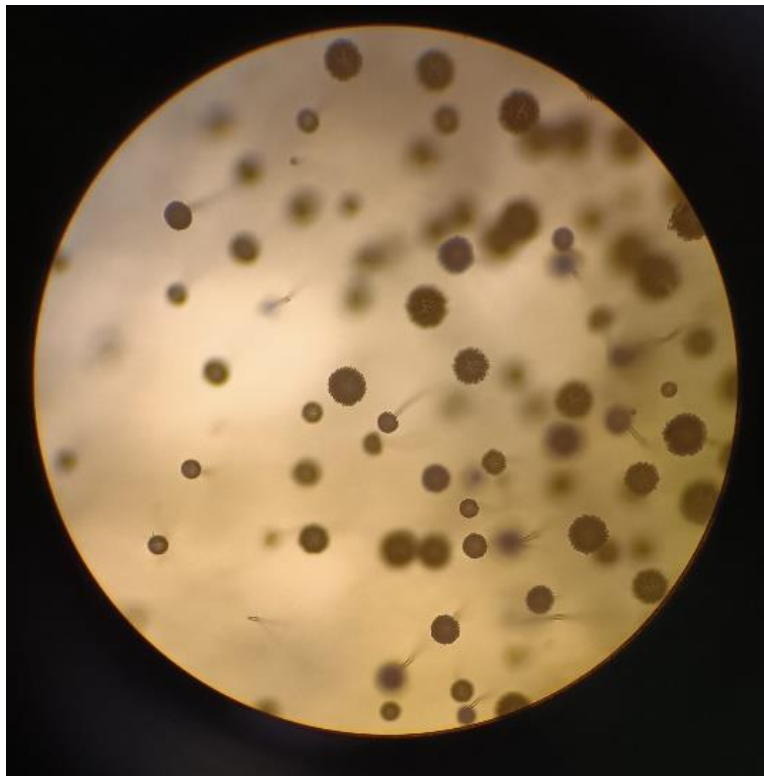
Obr. 40: Identifikace hub – mikroskopický vzhled



Obr. 41: Identifikace hub – mikroskopický vzhled



*Obr. 42: Aspergillus niger pod mikroskopem, zvětšení 10×20*



*Obr. 43: Aspergillus niger pod mikroskopem , zvětšení 10×20*



Obr. 44: *Aspergillus niger* pod mikroskopem, zvětšení 10×20

### 3. Hmotnostní spektrofotometrie – MALDI

MALDI TOF je zkratka pro Matrix Assisted Laser Desorption Ionization /Time Of Flight. Tato metoda se provádí hlavně u bakteriálních kultur, ale i u plísní. Metoda je rychlá oproti klasickým biochemickým metodám. Výjimečná je tím, že na základě analýzy hmotového spektra na úrovni bílkovin dokáže identifikovat přesný organismus. Díky metodě MALDI je možné zkrátit dobu od odběru vzorku k určení mikroorganismu na necelých 24 hodin.<sup>5</sup>

VÝSLEDKY: Podle metody MALDI byl vzorek vyhodnocen jako vysoce důvěryhodná identifikace plísně druhu *Aspergillus niger* (Obr. 45).



## Sample 2



Sample Identifier: -  
 Sample Name: -  
 Sample Description: -  
 Target Position: A7  
 Sample Creation Date/Time: 21.12.2023 7:03  
 Sample Type / Prep. Protocol: Filamentous Fungi / -  
 AutoXecute / ACQ Method: MBT\_AutoX\_FilFungi\_2 / D:\Methods\flexControlMethods\MBT\_FC.par  
 Preprocessing Method: Bruker Standard Pre-Processing Method 01.10.2020 16:17  
 Identification Method: Bruker Filamentous Fungi Identification Method 25.01.2023 10:54  
 Applied MSP Library(ies): Filamentous Fungi / 5 / 779  
 Consistency category (based on two best matches): A

Rank	Matched Pattern	log(score) (Conf.)	NCBI Identifier
1	<a href="#">Aspergillus niger M10 RLH</a>	2.24 (+++)	<a href="#">5061</a>
2	<a href="#">Aspergillus niger M14 RLH</a>	2.22 (+++)	<a href="#">5061</a>
3	<a href="#">Aspergillus niger Asp Nr 2 UGB</a>	2.18 (+++)	<a href="#">5061</a>
4	<a href="#">Aspergillus niger DSM 11167 DSM</a>	2.17 (+++)	<a href="#">5061</a>
5	<a href="#">Aspergillus niger DSM 22593 DSM</a>	2.15 (+++)	<a href="#">5061</a>
6	<a href="#">Aspergillus niger M16 RLH</a>	2.09 (+++)	<a href="#">5061</a>
7	<a href="#">Aspergillus niger DSM 12634 DSM</a>	2.03 (+++)	<a href="#">5061</a>
8	<a href="#">Aspergillus niger DSM 737 DSM</a>	1.9 (+++)	<a href="#">5061</a>
9	<a href="#">Aspergillus niger D 16 256 7 3 LLH</a>	1.89 (+++)	<a href="#">5061</a>
10	<a href="#">Aspergillus niger e7158 LLH</a>	1.8 (+++)	<a href="#">5061</a>

Obr. 45: Výpis - MALDI

#### 4. Molekulárně biologické metody – PCR

PCR je polymerázová řetězová reakce, která dokáže detekovat přítomnost cílové (druhově specifické) DNA, tudíž ji lze zacílit na konkrétní hledaný organismus. Principem této metody je namnožení cílového úseku DNA. Pro analýzu produktů reakce metoda využívá fluorescenčních sond, které již v průběhu, v případě pozitivní reakce, umožňují sledovat nárůst fluorescence (realtime PCR).<sup>8</sup>

VÝSLEDKY: V tomto případě nebylo PCR provedeno z důvodu spolehlivé identifikace po provedení klasických metod (mikroskopie, kultivace, atd.). Metoda zde je zmíněna jen jako další možnost, kterou lze využít při identifikaci.

CELKOVÉ VÝSLEDKY: Všechny zjištěné výsledky z použitých metod jsem porovnávala s odborným atlasem. Následně jsem vyhodnotila, že ve vzorku 271 MYK se nachází *Aspergillus niger*. Ve vzorku 263 MYK se nachází *Aspergillus fumigatus*.

V laboratoři jsem pracovala a pozorovala dva vzorky (263 a 271 MYK). Pro zdokumentování metod jsem vybrala vždy ze dvou obrázků jen ten názornější a kvalitnější obrázek, kde bylo více zřetelné to, co jsme v dané metodě pozorovali.

### 3.5.5 Měření mikroskopických objektů

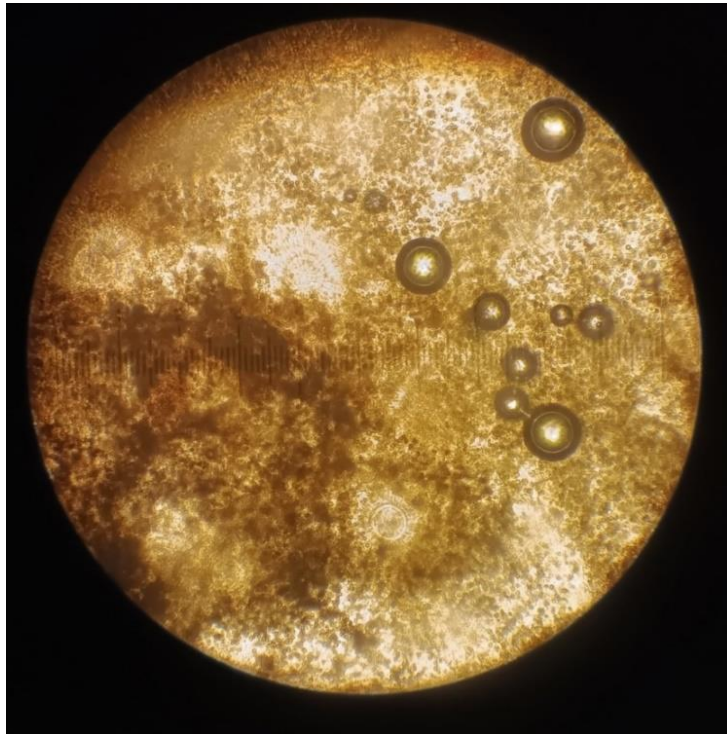
Měření délky a šířky objektu (Obr. 46):

Měřicím okulárem se změří délka a šířka objektu (v dílcích) a podle přiložené tabulky (Tab. 1) se přepočítá na  $\mu\text{m}$  (Obr. 47).<sup>12</sup>

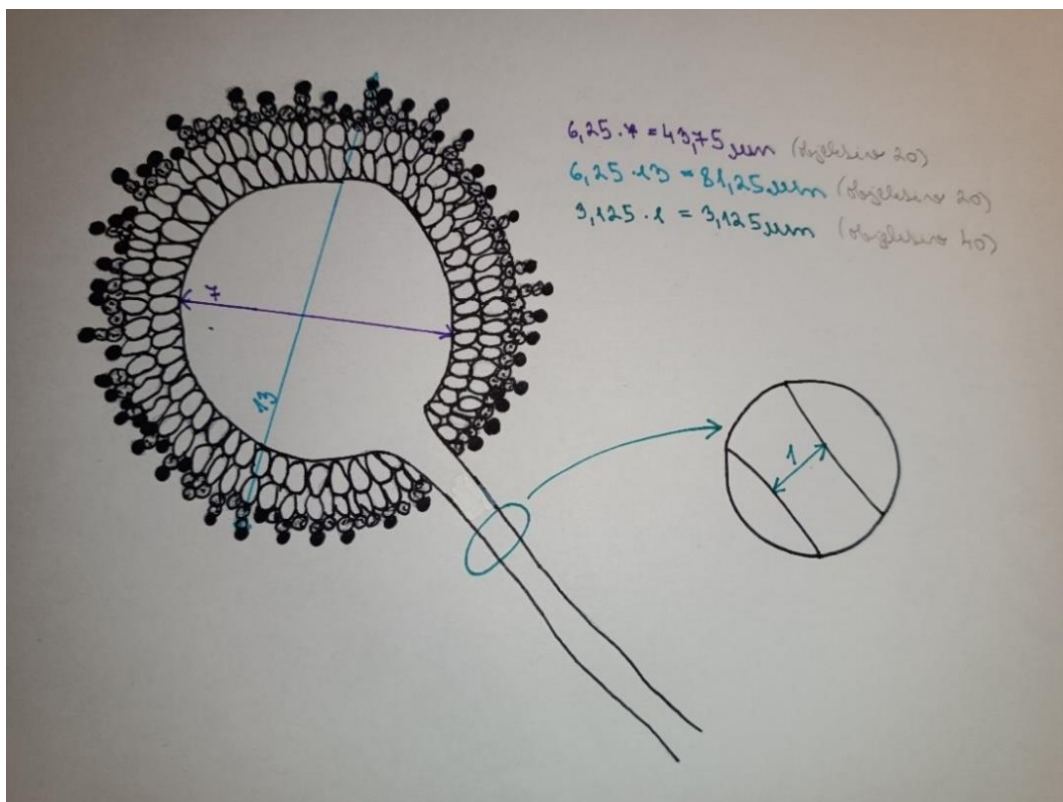
Měření objektů na mikroskopu OLYMPUS BH – 2

objektiv	1 dílek = X $\mu\text{m}$
100	1,25
40	3,125
20	6,25
16	7,813
10	12,5

Tab. 1: Měření objektů OLYMPUS BH-2



Obr. 46: Vzorek *Aspergillus niger* k měření



Obr. 47: Kreslený obrázek *Aspergillus niger* a jeho měření při zvětšení 200x. Výřez na obrázku je měřen při zvětšení 400x.



*Obr. 48: Mikroskop OLYMPUS BH – 2*

Součástí vybavení Oddělení společných laboratoří je mimo jiné i mikroskop OLYMPUS BH–2 (Obr. 48), který jsem měla možnost si vyzkoušet. Pomocí tohoto mikroskopu jsem odečítala primární preparát. Pozorovala jsem mikrokulturu a mikroskopický vzhled narostlé kultury. Poté jsem si vyzkoušela pomocí mikroskopu i měření mikroskopických objektů. Na tomto laboratorním mikroskopu se provádí pozorování všech preparátů z úseku mykologie a parazitologie (Obr. 15).

### 3.6 Kazuistika

Žena 55.let, zubní laborantka

Pacientka dne 15. 9. 2023 navštívila kožní ambulanci v havlíčkobrodské nemocnici po půl ročních problémech na prstech a nehtech levé ruky. Do ordinace přišla s potíží: zarudnutá levá dlaň, loupání kůže na levé ruce, okraji nehtů subungální onycholýza a změna barvy. Pacientka byla vyšetřena lékařem, který stanovil předběžnou diagnózu Onychomycosis, Onychodystrophia manuum, eczema manuum contactum. Poté byla pacientce odebrána část nehtů na mykologii. Vzorek byl odeslán do laboratoří ke stanovení přesnější diagnózy. Pacientce byla předepsaná dočasná léčba: roztok Exoderil (antimykotikum, účinná látka Naftifin) 2x denně na nehty a na ruce 3% bor-salicyl. Pacientka byla objednána na kontrolu za 3 měsíce. V mezidobí (9. 10. 2023) proběhla telefonická konzultace s lékařem. V laboratoři s odebraným vzorkem provedli mykologické vyšetření, aerobní kultivaci, mikrokulturu, přímou mikroskopii, identifikaci hyfomycet. Po analýze vzorku byl zjištěn *Aspergillus clavatus* a vzorek byl dále kontaminován saprofytickými plísněmi. Pacientka byla seznámena se svojí konečnou diagnózou a byla jí předepsaná další léčba. Při návštěvě 19. 12. 2023 byla pacientka beze změny a byl jí předepsán Polinail (speciální lak na nehty s účinnou látkou ciklopirox). Při další návštěvě 10. 1. 2024 byly nehty na levé ruce bez výrazných změn. Byly předepsány nové léky k léčbě tj. Prokanazol (antimykotikum, účinná látka intrakonazol) 200mg 2x denně. Pacientka byla objednána na další kontroly tj. 26. 2. 2024 a v březnu 2024.

Konečná diagnóza: tinea nehtů, onychomycosis, onychodystrophia manuum.

## 4 ZÁVĚR

Práce je rozdělena na dvě části, teoretickou a praktickou. Teoretická část se zabývá termínem plíseň, její stavbou a možnými podmínkami pro její vznik. Popisují vybrané rody plísní a jejich působení, projevy či škodlivost na lidský organismus. V práci ale také zmiňují naopak využití ušlechtilých plísní v potravinářském a farmaceutickém průmyslu. Rozebírám i možné lokace plísní na lidském těle.

Z možných typů plísní jako jsou např. rody *Aspergillus*, *Alternaria*, *Cladosporium*, a *Penicillium* jsem se zaměřila na rod plísně *Aspergillus*, který patří k nejrozšířenějším druhům.

Zaujalo mě, že plísně může přenášet i hmyz. Měla jsem několik hypotéz, jak k tomu může docházet. Moje hypotézy zněly buď, že hmyz pomocí svých končetin přenese spory plísní na jiné místo, nebo že hmyz spory plísní sní a na jiném místě je vyloučí. Z důvodu nedostatku literatury se mi tyto hypotézy nepodařilo potvrdit, ani vyvrátit.

V praktické části se zabývám různými metodami, které se používají při analýze vzorků v laboratořích. K této části bylo již zapotřebí navštěvovat odborné pracoviště Oddělení společných laboratoří v havlíčkobrodské nemocnici. Zde jsem se dozvěděla mnoho cenných rad a informací k tématu mé práce. Měla jsem možnost vyzkoušet si mikroskopii, zhotovení mikrokultury, kultivaci, identifikaci z narostlé kultury, atd. Nejvíce mě naplňovala práce s mikroskopem a vytvoření mikrokultury.

Z obrázků kultivace, které jsem přiložila k popsané metodě, je patrné jak probíhá proces růstu vzorků v kultivaci ve dvou miskách a při dvou teplotách. Můžeme tak vidět, jak rychle při různých teplotách plísně rostou. Lze vyčíst, že plísně začaly po 48 hodinách růst neuvěřitelně rychle na misce, která se kultivovala při teplotě 37 °C. Poté už tato miska mnoho změn nevykazuje, vypadá stejně, pouze trochu ztmavla a růst plísně podle mě končí po 96 hodinách. Naopak na misce, která se kultivovala při teplotě 22 °C, se toho moc nezměnilo. Tady byly plísně přítomné v agaru teprve po 96 hodinách. Znatelně jsou zde vidět až za 144 hodin. Po 168 hodinách vidíme, že plíseň zasahuje do okolního agaru v misce. Nejvíce patrné je to po 192 hodinách.

Grafy, kterými otvírám praktickou část, jsem zpracovávala podle zdrojů laboratoře v Havlíčkově Brodě. Na základě analýzy získaných dat jsem zjistila, že nejvíce byl zastoupen druh plísní *Aspergillus fumigatus* (Graf. 1). V několika zkoumaných vzorcích, které jsem měla možnost spatřit vlastním okem v mikroskopu, se ale nejčastěji objevoval *Aspergillus niger*. Můj předpoklad o nejčastějším výskytu plísně rodu *Aspergillus niger* byl mylný. Z druhů vzorků, kde byl zjištěn rod *Aspergillus*, bylo nejvíce kmenů na identifikaci (Graf. 2). Protože slýchávám, že hodně lidí má problémy s plísněmi na nehtech, očekávala jsem vzorek nehtů. Problémy nastávají hlavně v létě, když je velké teplo a všem se potí a zapařují nohy. Ze zdrojů také vyplývá, že se s plísněmi léčilo nebo léčí spíše muži (Graf. 3).

Svá „bádání“ jsem pečlivě zapisovala, fotografovala a různými způsoby dokumentovala.

Podle nálezu v mikroskopu jsem se pokusila *Aspergillus niger* namalovat a poukázat na morfologii tohoto druhu (Obr. 12), který se vyznačuje kulatou hlavičkou. Na dalším obrázku lze vidět, jak se v mikroskopu měří nalezený objekt (Obr. 47).

Dále jsem měla možnost napsat si kazuistiku na jednu pacientku, která se s plísněmi léčí už několik měsíců. Seznámení a návštěva laboratoře v nemocnici, byl pro mne také zážitek, který by mohl ovlivnit mé další studium.

V kazuistice mě překvapilo, že pacientka se léčí několik měsíců s plísněmi na nehtech levé ruky a její léčba je stále bez patrných změn. Při psaní této práce jsem se dozvěděla, že je mnoho preparátů na léčbu plísní jako jsou např. masti, léky, speciální laky na nehty s účinnou látkou, atd. Ale ne každý preparát zabírá.

Vše, co jsem zjistila v praktické části např. v mikroskopii, kultivaci, mikrokultuře jsem složila jako puzzle a porovnávala s odborným atlasem. Všechny mé zjištěné výsledky se mi shodovaly a zjistila jsem, že mnou hledaný druh je *Aspergillus niger*. Identifikace hub je složitá. Velmi často nelze plíseň určit až do druhu, ale závěrem je pouze jen rodová identifikace nebo dokonce nelze plíseň identifikovat vůbec (např. z důvodu neplodícího *mycelia*).

Při psaní této práce jsem se naučila morfologii, fyziologii a taxonomii plísní, základní identifikaci plísní rodu *Aspergillus* a orientuji se trochu v makroskopickém a mikroskopickém vzhladu narostlé kultury.

Touto prací jsem chtěla přispět k rozšíření podvědomí o plísních a motivovat k včasnému zahájení léčby. Cíle, které jsem si vytyčila, se mi podařilo splnit. Myslím si, že napsání této práce bylo velmi obtížné z důvodu nedostatku české literatury, která by se zabývala mykologií, konkrétně přímo plísněmi. Ráda bych na téma této práce navázala v budoucnu např. při studiu na vysoké škole.

## 5 ZDROJE

### TEXTOVÉ

- <sup>1</sup> BENNETT, Joan W.; CHUNG, King-Thom. *Alexander Fleming and the discovery of penicillin* [online]. [cit. 1.1.2024]. Dostupný na WWW: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0065216401490137>
- <sup>2</sup> JANÍČKOVÁ, Hana. *Odborný článek - Alergie na roztoče a plísně* [online]. [cit. 1.1.2024]. Dostupný na WWW: <https://www.solen.cz/pdfs/ped/2009/03/06.pdf>
- <sup>3</sup> JEŘÁBKOVÁ, Lucie. *Bakalářská práce Toxinogenní plísně a mykotoxiny v životním prostředí člověka* [online]. [cit. 1.1.2024]. Dostupný na WWW: [https://dk.upce.cz/bitstream/handle/10195/47550/JerabkovaL\\_ToxinogenniPlisne\\_DH\\_2012.pdf?sequence=2&isAllowed=y](https://dk.upce.cz/bitstream/handle/10195/47550/JerabkovaL_ToxinogenniPlisne_DH_2012.pdf?sequence=2&isAllowed=y)
- <sup>4</sup> KOTALOVÁ, Kateřina. *Alfatoxiny, možný vliv na lidské i zvířecí zdraví* [online]. [cit. 18.1.2024]. Dostupný na WWW: <https://theses.cz/id/xovqwu/STAG84701.pdf>
- <sup>5</sup> NEUVEDEN. *MALDI TOF* [online]. [cit. 3.2.2024]. Dostupný pod licenci CC BY 4.0 DEED na WWW: [https://www.wikiskripta.eu/w/MALDI\\_TOF](https://www.wikiskripta.eu/w/MALDI_TOF)
- <sup>6</sup> NEUVEDEN. *Sérologické metody* [online]. [cit. 28.1.2024]. Dostupný na WWW: [https://www.wikiskripta.eu/w/S%C3%A9rologick%C3%A9\\_metody](https://www.wikiskripta.eu/w/S%C3%A9rologick%C3%A9_metody)
- <sup>7</sup> SIANG YONG TAN. *Alexander Fleming (1881–1955): Objevitel penicilinu* [online]. [cit. 18.1.2024]. Dostupný na WWW: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4520913/>
- <sup>8</sup> UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI. *Molekulárně biologické a cytogenetické metody - LF* [online]. [cit. 3.2.2024]. Dostupný na WWW: [http://old.lf.upol.cz/fileadmin/user\\_upload/LF-kliniky/hippokrat/Pracoviste/Patologie/04\\_Molekularne\\_biologicke\\_a\\_cytogeneticke\\_metody.pdf](http://old.lf.upol.cz/fileadmin/user_upload/LF-kliniky/hippokrat/Pracoviste/Patologie/04_Molekularne_biologicke_a_cytogeneticke_metody.pdf)

### BIBLIOGRAFICKÉ

- <sup>9</sup> KLÁNOVÁ, Kateřina. *Plísně v domě a bytě*. Praha: Grada, 2013, ISBN 978-80-247-4790-3
- <sup>10</sup> LANGEOVÁ, Elisabeth; GUZEKOVÁ, Gaby. *Plísňová onemocnění: Vhodnou životosprávou posilujeme imunitní systém*. Praha: Ikar, 2013, ISBN 978-80-249-2029-0.
- <sup>11</sup> MELICHAR, Antonín (2022). *SOP Mykologické vyšetření biologického materiálu za pomoci mikroskopie, kultivace a stanovení citlivosti k antibiotikům*. Řízená dokumentace Oddělení společných laboratoří. Havlíčkův Brod
- <sup>12</sup> MELICHAR, Antonín (2018). *Návod pro měření mikroskopických objektů*. Řízená dokumentace Oddělení společných laboratoří. Havlíčkův Brod



<sup>13</sup> SLANINA, Ľudovít; SOKOL, Jozef; JABLONOVSKÝ, František. *Vademecum veterinárneho lekára*. Bratislava: Príroda, 1991, ISBN 80-07-00419-X.

<sup>14</sup> VOTAVA, Miroslav. *Lékařská mikrobiologie speciální*. Brno: Neptun, 2003, ISBN 80-902896-6-5.

## GRAFICKÉ

Obr. 1 - VANLUUBIO. *wikipedia commons [online]*. [cit. 18.11.2023]. Dostupný pod licencií CC-BY-SA-3.0 na WWW: [https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Alternaria\\_alternata\\_-\\_SNAP-165447-0005.jpg](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Alternaria_alternata_-_SNAP-165447-0005.jpg)

Obr. 2 - MEDMYCO. *wikipedia commons [online]*. [cit. 28.12.2023]. Dostupný pod licencií CC-BY-SA-4.0 na WWW: [https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Aspergillus\\_flavus.jpg](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Aspergillus_flavus.jpg)

Obr. 3 - UFFICIO COMUNICAZIONE, AZIENDA OSPEDALIERA SS. ANTONIO E BIAGIO E CESARE ARRIGO, ALESSANDRIA A BIBLIOTECA BIOMEDICA CENTRO DI DOCUMENTAZIONE. *wikipedia commons [online]*. [cit. 18.11.2023]. Dostupný pod licencií CC-BY-SA-4.0 na WWW: [https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Antonio\\_e\\_Biagio\\_e\\_Cesare\\_Arrigo\\_AspERGILLUS\\_fu\\_migatus\\_01.jpg](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Antonio_e_Biagio_e_Cesare_Arrigo_AspERGILLUS_fu_migatus_01.jpg)

Obr. 4 - NEUVEDEN. *wikipedia commons [online]*. [cit. 28.12.2023]. Dostupný pod licencií CC-BY-SA-3.0-migrováno na WWW: [https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Aspergillus\\_niger\\_Micrograph.jpg](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Aspergillus_niger_Micrograph.jpg)

Obr. 5 - MEDMYCO. *wikipedia commons [online]*. [cit. 28.12.2023]. Dostupný pod licencií CC-nula na WWW: [https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Aspergillus\\_versicolor.jpeg](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Aspergillus_versicolor.jpeg)

Obr. 6 – RDRG109. *wikipedia commons [online]*. [cit. 18.11.2023]. Dostupný pod licencií CC-BY-SA-4.0 na WWW: [https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Lim%C3%B3n\\_con\\_moho\\_color\\_blanco.jpg](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Lim%C3%B3n_con_moho_color_blanco.jpg)

Obr. 7 - KEISOTYO. *wikipedia commons [online]*. [cit. 18.11.2023]. Dostupný pod licencií CC-BY-SA-3.0-migrováno na WWW: [https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Cladosporium\\_sp\\_conidia.jpg](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Cladosporium_sp_conidia.jpg)

Obr. 8 - KUMAR CHAURASIYA, Ajay. *wikipedia commons [online]*. [cit. 11.11.2023]. Dostupný pod licencií CC-BY-SA-4.0 na WWW: [https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Penicillium\\_in\\_LPCB\\_Tease\\_Mount\\_Microscopy.jpg](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Penicillium_in_LPCB_Tease_Mount_Microscopy.jpg)

Obr. 9 – vlastní zdroj

Obr. 10 – CHAURASIYA, Ajay Kumar. *wikipedia commons [online]*. [cit. 18.11.2023]. Dostupný pod licencií CC-BY-SA-4.0 na WWW: [https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Various\\_fungal\\_growth.jpg](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Various_fungal_growth.jpg)

Obr. 11 - N:USER. wikipedia commons [online]. [cit. 29.1.2024]. Dostupný pod licenci CC-BY-SA-3.0-migrováno na WWW: <https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Conidium.png>

Obr. 12-14 – vlastní zdroj

Obr. 15 - BALÍK, Michal. wikiskripta [online]. [cit. 25.1.2024]. Dostupný pod licenci CC BY 4.0 DEED na WWW:

[https://www.wikiskripta.eu/w/Soubor:%C4%8C%C3%A1sti\\_mikroskopu\\_s\\_popisem.png](https://www.wikiskripta.eu/w/Soubor:%C4%8C%C3%A1sti_mikroskopu_s_popisem.png)

Obr. 16-48 – vlastní zdroj

## 6 SEZNAM OBRÁZKŮ

Obr. 1: Spory <i>Alternaria alternata</i> .....	10
Obr. 2: <i>Aspergillus flavus</i> .....	11
Obr. 3: Mikroskopický snímek <i>Aspergillus fumigatus</i> .....	11
Obr. 4: <i>Aspergillus niger</i> .....	12
Obr. 5: <i>Aspergillus versicolor</i> .....	12
Obr. 6: Plíseň vyskytující se na citrusech .....	13
Obr. 7: Rod <i>Cladosporium</i> .....	13
Obr. 8: Rod <i>Penicillium</i> sp. ....	14
Obr. 9: Klíčící spory plísní .....	17
Obr. 10: Kolonie plísní .....	18
Obr. 11: Konidie .....	19
Obr. 12: <i>Aspergillus niger</i> , popis částí konidioforu – vlastní kresba .....	23
Obr. 13: <i>Aspergillus niger</i> - detail - vlastní kresba .....	23
Obr. 14: Mladé hlavičky <i>Aspergillus fumigatus</i> , pod mikroskopem, zvětšení 10×20 .....	24
Obr. 15: Popis mikroskopu .....	25
Obr. 16: Oddělení společných laboratoří .....	26
Obr. 17: Primární preparát, zvětšení 10×40, ušní maz .....	30
Obr. 18: Primární preparát, zvětšení 10×40, ušní maz .....	31
Obr. 19: Primární preparát, zvětšení 10×40, ušní maz .....	31
Obr. 20: Kultivace 48 h při teplotě 37 °C    Kultivace 48 h při teplotě 22 °C .....	33
Obr. 21: Kultivace 48 h při teplotě 37 °C pohled z druhé strany .....	33
Obr. 22: Kultivace 72 h při teplotě 37 °C    Kultivace 72 h při teplotě 22 °C .....	34
Obr. 23: Kultivace 72 h při teplotě 37 °C pohled z druhé strany .....	34
Obr. 24: Kultivace 96 h při teplotě 37 °C    Kultivace 96 h při teplotě 22 °C .....	35
Obr. 25: Kultivace 96 h při teplotě 37 °C pohled z druhé strany .....	35
Obr. 26: Kultivace 120 h při teplotě 37 °C    Kultivace 120 h při teplotě 22 °C .....	36
Obr. 27: Kultivace 120 h při teplotě 37 °C pohled z druhé strany .....	36
Obr. 28: Kultivace 144 h při teplotě 37 °C    Kultivace 144 h při teplotě 22 °C .....	37
Obr. 29: Kultivace 144 h při teplotě 37 °C pohled z druhé strany .....	37
Obr. 30: Kultivace 168 h při teplotě 37 °C    Kultivace 168 h při teplotě 22 °C .....	38

Obr. 31: Kultivace 168 h při teplotě 37 °C pohled z druhé strany .....	38
Obr. 32: Kultivace 192 h při teplotě 37 °C      Kultivace 192 h při teplotě 22 °C .....	39
Obr. 33: Kultivace 192 h při teplotě 37 °C pohled z druhé strany .....	39
Obr. 34: Mikrokultura právě vytvořená .....	41
Obr. 35: Mikrokultura 3 dny .....	41
Obr. 36: Pod mikroskopem, zvětšení 10×20 .....	42
Obr. 37: Mikrokultura 4 dny .....	42
Obr. 38: Identifikace hub .....	43
Obr. 39: Identifikace hub - reverz .....	44
Obr. 40: Identifikace hub – mikroskopický vzhled .....	44
Obr. 41: Identifikace hub – mikroskopický vzhled .....	44
Obr. 42: <i>Aspergillus niger</i> pod mikroskopem, zvětšení 10×20 .....	45
Obr. 43: <i>Aspergillus niger</i> pod mikroskopem, zvětšení 10×20 .....	45
Obr. 44: <i>Aspergillus niger</i> pod mikroskopem, zvětšení 10×20 .....	46
Obr. 45: Výpis - MALDI .....	47
Obr. 46: Vzorek <i>Aspergillus niger</i> k měření .....	49
Obr. 47: Kreslený obrázek <i>Aspergillus niger</i> a jeho měření při zvětšení 200x. Výřez na obrázku je měřen při zvětšení 400x. ....	49
Obr. 48: Mikroskop OLYMPUS BH – 2 .....	50

## 7 SEZNAM GRAFŮ

Graf 1: Zmapování výskytu plísni rodu <i>Aspergillus</i> od 1. 1. 2018 .....	27
Graf 2: Druhy vzorků .....	28
Graf 3: Pohlaví .....	28